

Tierärztliche Hochschule Hannover

**Untersuchung zur Antikörperkinetik gegen
Equines Influenzavirus bei der
Grundimmunisierung von Fohlen: Vergleich
zweier Impfprotokolle.**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Veterinärmedizin

- Doctor medicinae veterinariae -

(Dr. med. vet.)

vorgelegt von

Alexandra Allkofer

Regensburg

Hannover 2023

Wissenschaftliche Betreuung:

PD Dr. Monica Venner PhD, Dipl. ECEIM
Pferdeklinik Destedt GmbH
Tierärztliche Hochschule Hannover

1. Gutachterin:

PD Dr. Monica Venner, PhD, Dipl. ECEIM
Pferdeklinik Destedt GmbH
Tierärztliche Hochschule Hannover

2. Gutachterin:

Prof. Dr. Asisa Volz
Institut für Virologie
Tierärztliche Hochschule Hannover

Tag der mündlichen Prüfung:

30.11.2023

**In Liebe und Dankbarkeit,
meiner Familie
und meinen Großeltern.**

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
2. Erste Publikation:	10
Primary vaccination in foals: a comparison of the serological response to equine influenza and equine herpesvirus vaccines administered concurrently or 2 weeks apart.....	10
3. Zweite Publikation:	20
Grundimmunisierung gegen Equine Influenza bei Fohlen: wann, wie und womit? – Übersicht über den aktuellen wissenschaftlichen Stand	20
4. Übergreifende Diskussion	30
4.1. Grundimmunisierung bei Fohlen: Vergleich zweier Impfprotokolle hinsichtlich der serologischen Immunantwort auf eine gleichzeitige oder im Abstand von zwei Wochen verabreichte Impfung gegen Influenza- und Herpesvirus-1/4 ..	30
4.2. Grundimmunisierung gegen Equine Influenza bei Fohlen: wann, wie und womit? – Übersicht über den aktuellen wissenschaftlichen Stand	36
4.3. Schlussfolgerungen	40
5. Zusammenfassung.....	41
6. Summary.....	43
7. Literaturverzeichnis	45
8. Danksagung.....	52

1. Einleitung

Das Pferdeinfluenzavirus, ein Influenza-A-Virus aus der Gattung *Alphainfluenzavirus*, Familie *Orthomyxoviridae*, verursacht fast weltweit Ausbrüche von Atemwegserkrankungen bei Pferden. Das equine Influenzavirus (EIV) ist endemisch in Europa und Nordamerika, es gibt aber auch Berichte von Ausbrüchen in Afrika, Asien, Australien und Südamerika (Sack et al. 2019).

Seit 1979 wurde nur noch der Subtyp H3N8 bei Pferden nachgewiesen, der andere Subtyp H7N7 gilt als ausgestorben, da er seit über drei Jahrzehnten nicht mehr isoliert wurde (Webster 1993). Heute weiß man, dass sich der H3N8-Subtyp aufgrund von Antigendrift in zwei Linien - die amerikanische und die europäische Linie - aufgespalten hat (Daly et al. 1996). Aus der amerikanischen Linie haben sich drei Sublinien - Kentucky, Südamerika und Florida - entwickelt (Lai et al. 2001). Heutzutage ist die Florida-Sublinie vorherrschend und hat sich in Clade 1 (FC 1) und Clade 2 (FC 2) aufgeteilt, die beide gemäß den Empfehlungen der Weltorganisation für Tiergesundheit (World Organisation of Animal Health – ehemals OIE) in Influenza-Impfstoffen enthalten sein sollen (OIE 2010).

Über die letzten zwei Jahrzehnte wurde in Europa fast ausschließlich FC 2 nachgewiesen, was sich mit zahlreichen Influenza-Ausbrüchen in Europa im Jahr 2019 änderte, als erstmals seit vielen Jahren wieder eine Zirkulation von FC 1 EIV festgestellt wurde.

Das H3N8-Virus ist hoch ansteckend und kann aufgrund der raschen Ausbreitung der Infektion in Pferdepopulationen zu großen wirtschaftlichen Verlusten führen (Cullinane et al. 2010, Cullinane & Newton 2013, Glass et al. 2002). Obwohl es sich um eine selbstlimitierende Krankheit handelt, die durch Fieber, Nasenausfluss, Apathie und trockenen Husten gekennzeichnet ist (van Maanen & Cullinane 2002), kann die Verbringung infizierter Pferde in empfängliche Pferdepopulationen zu großen Ausbrüchen führen.

Die Pferde werden heutzutage zu Zucht- und Turnierzwecken national und international transportiert, was zu einer weiten Verbreitung des Virus führen kann (Timoney 2014), insbesondere wenn kein optimaler Impfschutz besteht oder subklinisch infizierte, geimpfte Pferde als Virusausscheider fungieren.

Die wirtschaftlichen Verluste können verheerend sein, wie der Ausbruch von Equiner Influenza in einer bis dahin naiven Pferdepopulation in Australien im Jahr 2007 zeigte,

als rund eine Milliarde australische Dollar für die Bekämpfung und Beseitigung der Pferdegrippe ausgegeben wurden (Garner et al. 2011).

Aus den oben genannten Gründen wurde bei vielen nationalen (FN, Dt. Galopp) und internationalen (FEI, International Federation of Horseracing Authorities) Pferdesportverbänden, sowie für den Import von Pferden, eine Impfpflicht für EI eingeführt (Cullinane et al. 2020).

Trotz der immer bestehenden Gefahr eines Impfversagens, insbesondere wenn der Impfstamm zu stark vom zirkulierenden Wildtypstamm im Feld abweicht (Daly et al. 2004, Park et al. 2004), ist die Impfung gegen das equine Influenzavirus eine der wirksamsten Methoden zur Prävention vor einer Erkrankung. Eine Impfung reduziert die klinischen Symptome, die Virusausscheidung und verringert somit auch die Zahl der Neuinfektionen (Cullinane & Newton 2013, Paillot 2014).

Der Schutz gegen EIV beruht hauptsächlich auf der Fähigkeit des Pferdes nach der Impfung oder Virusexposition zirkulierende Antikörper zu bilden, die spezifisch für das Hämagglutinin-Glykoprotein (HA) sind und die Infektiosität des Virus neutralisieren. Ein Zusammenhang zwischen den Antikörperspiegeln gegen EIV und der schützenden Immunität wurde in Challenge-Studien und bei Beobachtungen von Ausbrüchen im Feld nachgewiesen (Mumford et al. 1994a, Mumford & Wood 1992, Newton et al. 2000). Die Kinetik der Immunantwort von Pferden auf eine Influenzaimpfung wurde auf Basis des Single-Radial-Haemolysis (SRH)-Test bereits in diversen Studien dargestellt (Dilai et al. 2018, Gildea et al. 2011b, Gildea et al. 2013).

Bisher gibt es jedoch wenig Daten zur Antikörperkinetik während und nach der Grundimmunisierung von Fohlen gegen EIV. Aufgrund des Mangels an Daten bezüglich des Einflusses einer gleichzeitigen Impfung gegen EIV und EHV-1/4 auf die Antikörperantwort bei Fohlen wurde bei der Grundimmunisierung bisher eine zeitlich getrennte Impfung (im Abstand von zwei Wochen) empfohlen.

Eine der Fragestellungen war, ob eine zeitgleiche Impfung gegen EIV und EHV-1/4 die humorale Immunantwort negativ beeinträchtigt und/oder unerwünschte Nebenwirkungen auftreten.

In der durchgeführten Studie wurde die Antikörperkinetik gegen EIV (und EHV-1/4) bei der Grundimmunisierung von Fohlen untersucht. Dabei wurden zwei verschiedene Impfprotokolle der Grundimmunisierung miteinander verglichen, wobei entweder eine gleichzeitige oder eine zeitlich getrennte Impfung gegen EIV und EHV-1/4 erfolgte. Die Ergebnisse dieser Studie sind der ersten Publikation zu entnehmen.

In der zweiten Publikation ging es um die Erstellung einer Literaturübersicht über die bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnisse zur Immunantwort von Fohlen, zu Qualität und Inhaltsstoffen des Kolostrums und zur Grundimmunisierung gegen das equine Influenzavirus bei Fohlen. Ziel dieser Literaturübersicht war es, die aktuellsten Ergebnisse von wissenschaftlichen Studien zusammenzufassen und es somit Tierärzten und Tierärztinnen zu erleichtern, ihre Kunden bzgl. Zeitpunkt der Erstimpfung (V1), sowie bzgl. des Impfschemas für die Grundimmunisierung von Fohlen gegen das equine Influenzavirus auf wissenschaftlicher Basis zu beraten.

2. Erste Publikation:

Primary vaccination in foals: a comparison of the serological response to equine influenza and equine herpesvirus vaccines administered concurrently or 2 weeks apart

Published in:

Archives of Virology 166 (2021) 2: 571-579; DOI 10.1007/s00705-020-04846-6

Alexandra Allkofer ¹, Marie Garvey ², Evelyn Ryan ², Rachel Lyons ², Megan Ryan ², Gabija Lukaseviciute ², Cathal Walsh ³, Monica Venner ⁴, Ann Cullinane ²

- 1 Clinic for Horses, University of Veterinary Medicine Hanover, Germany
- 2 Virology Unit, The Irish Equine Centre, Johnstown, Naas, Ireland
- 3 Department of Mathematics and Statistics, University of Limerick, Ireland
- 4 Equine Clinic Destedt, Germany

*** Correspondence and requests should be addressed to:**

Dr. Monica Venner. PD, PhD, FTA für Pferde, Dipl. ECEIM
Pferdeklinik Destedt GmbH, Trift 4, 38162 Destedt, Germany
E-Mail: mvenner@gmx.de

Professor Ann Cullinane. MVB, PhD, MRCVS
The Irish Equine Centre (Virology Unit), Johnstown, Naas, Ireland
E-Mail: acullinane@irishequinecentre.ie



Primary vaccination in foals: a comparison of the serological response to equine influenza and equine herpesvirus vaccines administered concurrently or 2 weeks apart

Alexandra Allkofer¹ · Marie Garvey² · Evelyn Ryan² · Rachel Lyons² · Megan Ryan² · Gabija Lukaseviciute² · Cathal Walsh³ · Monica Venner⁴ · Ann Cullinane² 

Received: 15 June 2020 / Accepted: 9 September 2020
© Springer-Verlag GmbH Austria, part of Springer Nature 2021

Abstract

This study compared concurrent and separate primary vaccination against equid alphaherpesviruses 1 and 4, genus *Varicellovirus*, subfamily *Alphaherpesvirinae*, family *Herpesviridae*, and equine influenza A virus, genus *Alphainfluenzavirus*, family *Orthomyxoviridae*. Their vernacular names are equine herpesvirus 1 and 4 (EHV1/4) and equine influenza virus (EIV). Infection with these respiratory pathogens is associated with loss of performance, interruption of training schedules, and on occasion, cancellation of equestrian events. Vaccination is highly recommended, and for some activities it is a mandatory requirement of the relevant authority. As there is a dearth of information relating to the impact of concurrent vaccination on the antibody response to EHV and EIV vaccines, they are usually administered separately, often 2 weeks apart. In a previous study of booster vaccination in Thoroughbred racehorses, concurrent vaccination with whole-virus inactivated carbopol-adjuvanted EHV and EIV vaccines did not impact negatively on the antibody response. In this study, investigations were extended to concurrent versus separate primary vaccination of warmblood foals. A field study was conducted to compare the immune response to a carbopol-adjuvanted EHV vaccine and an immune stimulating complex (ISCOM)-adjuvanted EI vaccine administered concurrently and 2 weeks apart. No adverse clinical reactions were observed, the pattern of EI and EHV antibody response was similar for both groups, and there was no evidence that concurrent primary vaccination compromised the humoral response. The results are of relevance to horse owners who wish to decrease veterinary costs, limit handling of young animals, and simplify record keeping by vaccinating concurrently.

Handling Editor: William G Dundon.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00705-020-04846-6>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Monica Venner
MVenner@gmx.de

✉ Ann Cullinane
ACullinane@irishequinecentre.ie

¹ Clinic for Horses, University of Veterinary Medicine Hanover, Hanover, Germany

² Virology Unit, The Irish Equine Centre, Johnstown, Naas, Co. Kildare W91 RH93, Ireland

³ Department of Mathematics and Statistics, University of Limerick, Limerick, Ireland

⁴ Equine Clinic Destedt, Trift 4, 38162 Destedt, Germany

Introduction

The aim of this study was to compare concurrent and separate primary vaccination against equid alphaherpesviruses 1 and 4 of the genus *Varicellovirus*, subfamily *Alphaherpesvirinae*, family *Herpesviridae*, and equine influenza A virus of the genus *Alphainfluenzavirus*, family *Orthomyxoviridae* in weanling foals. The vernacular names of these viruses are equine herpesvirus 1 and 4 (EHV1 and EHV4) and equine influenza virus (EIV), and they are amongst the most important equine pathogens internationally. EHV-1 and EHV-4 are endemic in horse populations worldwide. Both viruses cause respiratory disease and abortion, and EHV-1 is associated with a potentially fatal neurological disease known as equine herpesvirus myeloencephalopathy (EHM), which can instigate the implementation of movement restrictions and the cancellation or rescheduling of equestrian events [1]. Equine influenza virus (EIV) is endemic in Europe and North America, and outbreaks

have been reported in Africa, Asia, Australia and South America [2]. The virus is highly contagious and spreads explosively in naïve populations, leading to significant disruption of equestrian events and fatalities in working equids [3, 4].

Equine herpesvirus (EHV) and equine influenza (EI) vaccines reduce the impact of these viruses. Mandatory vaccination policies particularly for EI, are implemented by many equestrian authorities and importing countries [5]. Horses must be vaccinated against EI to compete at events held under the auspices of the Federation Equestre Internationale (FEI), the international governing body for equestrian sports such as dressage, eventing and showjumping. Horses can compete for up to 6 months + 21 days after the second vaccination of the primary course, which must consist of two doses of vaccine administered 21 to 92 days apart [6]. The FEI does not require vaccination against EHV1/4, but it is required for horses entering US Equestrian Federation–licensed competitions [7]. Furthermore, the vaccination of young stock on stud farms with a 4- to 6-week interval between the first two doses is considered the best practice not only to protect weanlings against respiratory disease but also to minimise virus transmission and protect pregnant mares against EHV-associated abortion [7].

The primary focus of our research is to maximize the effectiveness of vaccination in the target equine population by developing science-based regimes and to evaluate vaccine performance in the field [5, 8–11]. It is important to minimize costs, and the expenditure on vaccination programs can be reduced by concurrent vaccination. This not only decreases veterinary expenses but limits animal handling and restraint, which can be stressful for young horses. It also simplifies vaccination record keeping, thus reducing potential errors. However, there is a dearth of published information on concurrent administration of EI and EHV vaccines and the possibility of decreased antibody response and/or increased rate of adverse reactions. In an earlier study concerning 2-year-old Thoroughbred racehorses in an Irish training yard, we demonstrated that when they received a booster vaccination against EIV concurrently with their first dose of EHV1/4 vaccine, the antibody response to the EHV vaccine was not compromised and that, in fact, there was an increased response to EIV [11]. That study was restricted to 30 adult horses, an inactivated whole-virus EI and EHV vaccines adjuvanted with carbopol, and a monitoring period of 6 weeks post-vaccination. In this study, concurrent vaccination with an immune stimulating complex (ISCOM)-formulated EI vaccine and a carbopol-adjuvanted EHV vaccine was investigated in a population of 71 weanling warmblood horses receiving two primary doses of both vaccines. The antibody response was monitored for all of the horses over a 4-month period.

Materials and methods

Horses

This study was carried out on a population of 71 unvaccinated female warmblood weanlings located on a stud farm in Germany. All of the horses were scheduled for primary vaccination as part of the preventive health measures routinely implemented for recently weaned foals. The weanlings ranged in age from 183 to 347 days (median age: 281 days) at the time of administration of the first dose of vaccine (V1).

The study protocol was reviewed and approved in accordance with ethics guidelines of Hanover University and the German Animal Welfare Act. Throughout the study, the horses were housed in large groups, hay and water was available *ad libitum*, and once a day they received additional compound feeds. Clinical examination was performed by a veterinarian (namely, the author AA) before the start of the study and again on each day of vaccination. The rectal temperature, presence or absence of nasal discharge, size of mandibular lymph nodes, and general condition were checked. For 3 days after vaccination, the animals were observed for adverse reactions such as stiffness, inappetence and lethargy. Injection sites were inspected for localized swelling. Throughout the trial, the animals were monitored on a daily basis by experienced animal handlers.

Vaccines

Equip FT® (Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Germany), an inactivated whole-virus influenza vaccine adjuvanted by biological (Quil A) and chemical (aluminium) adjuvants plus concentrated immunopurified tetanus toxoid vaccine, was used. Equip FT contains inactivated A/eq/1/Newmarket/77 (H7N7), the prototype H7N7 virus; A/eq/Borlange/91 (H3N8), a representative of the H3N8 Eurasian lineage; and A/eq/Kentucky/98 (H3N8), a representative of the H3N8 American lineage. The herpesvirus vaccine, Equip EHV-1,4® (Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Germany), contains inactivated EHV-1 strain 438/77 and EHV-4 strain 405/76 adjuvanted with carbopol.

Vaccinations

The horses were randomly allocated to two vaccination groups A (38 horses) or B (33 horses) based on location, i.e., adjacent fields. Horses in group A were vaccinated separately against EIV (V1^{EquipFT}: day 1, V2^{EquipFT}: day 30) and EHV-1/4 (V1^{EquipEHV1,4}: day 14, V2^{EquipEHV1,4}: day 44). Horses in group B were vaccinated concurrently

against EIV and EHV-1/4 (V1^{EquipFT + EquipEHV1,4}: day 1 and V2^{EquipFT + EquipEHV1,4}: day 30). This is summarized in Table 1. Vaccinations were given by deep intramuscular injection in alternating sides of the neck and were performed by the attending veterinarian.

Collection of samples

Five hundred and two samples were collected and serologically tested for the study. A total of eight (group A) or six (group B) whole-blood samples were collected from all horses by jugular venipuncture at the time of V1, 2 weeks after V1, on the day of the second vaccination (V2), and 2 weeks, 4 weeks and 3 months after V2 for both vaccines. This sampling schedule is summarized in Table 1 and is the same for Equip FT for both groups and for Equip EHV1,4 for group B, i.e., days 0 (V1), 14, 30 (V2), 44, 58 and 120. For group A, which received the vaccines 2 weeks apart, the six Equip EHV 1,4 sampling timepoints were day 14 (V1), day 30 (2 weeks after V1), day 44 (V2), day 58 (2 weeks after V2), day 72 (4 weeks after V2), and day 134 (3 months after V2). Samples were allowed to clot at room temperature and were then centrifuged. Serum was pipetted into Eppendorf Safe-Lock Tubes (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) (2 ml) and stored frozen at -20 °C until testing.

Serology

All serology testing was carried out at the Irish Equine Centre, where the samples were codified so the laboratory investigator was blinded to the vaccination regimes of individual horses. Samples from each horse were tested side by side. The results are presented in Supplementary Data Tables S1 and S2. Antibodies against EHV-1 were measured by using the complement fixation test (CFT) in principle as described by Thomson et al. [12]. A haemolysin-versus-complement checkerboard was used to determine the optimum sensitizing concentration of the haemolysin and one minimal haemolytic dose 50 (1 MHD₅₀) of the complement [13]. The complement was used at 3MHD in the CFT. Test sera were heat inactivated at 60 °C for 30 min to eliminate naturally occurring complement. For fixation, serial dilutions of inactivated test sera were incubated with EHV-1 antigen in the presence of guinea pig complement at 4 °C overnight. Sheep

red blood cells (SRBC) (1%) sensitized with haemolysin for 10 min at 37 °C and refrigerated overnight were then added as the indicator system [12]. Titres were expressed as the reciprocal of the highest dilution of serum displaying 50% haemolysis. Seroconversion was defined as a fourfold or greater rise in CF antibody titre. A significant decline was defined as a fourfold or greater decrease in CF antibody titre.

The sera were tested for antibodies against EIV of the H3N8 subtype by single radial haemolysis (SRH) according to standard procedures [14] with A/eq/South Africa/4/03 (H3N8) as representative antigen of the American lineage. Reference antiserum against A/eq/South Africa/4/03 (H3N8) from the European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare (EDQM) was included on each plate. The haemolytic zones resulting from the lysis of the antigen-coated SRBCs by the antibody in the test sera were measured with a viewer and digital recording apparatus (Mitutoyo, Aurora, Illinois, USA). The titres of SRH antibody were expressed as the area of haemolysis (mm²). The results were evaluated in accordance with published data (antibody titre ≤ 50 mm² = potential index cases, ≥ 50 but < 85 mm² = partially protected, ≥ 85 but < 150 mm² = clinically protected, and ≥ 150 mm² = virologically protected) [15–17]. In general, an increase of at least 25 mm² or 50% in the area of the zone of haemolysis was regarded as significant, whichever was smaller between the paired serum samples [16]. A poor responder was defined as a horse that did not mount an SRH antibody response of > 25 mm² post-vaccination [18].

Statistical analysis

The statistical analysis was carried out on the base distribution of the open-source package R version 3.1.1 [19]. EHV-1 data were analysed using the Wilcoxon rank test with continuity correction to examine the CFT results as changes on the basis of the mean fold increase, which was not normally distributed. The antibody titres of EIV were analysed using independent *t*-tests. A paired *t*-test was used for longitudinal analysis comparing the data at different times post-vaccination, given that the SRH values over time were approximately normally distributed. A two-sample *t*-test was used for cross-sectional analysis to compare the SRH results between groups A and B. The area under the curve (AUC)

Table 1 Summary of vaccination and sampling schedule

Study Day	0	14	30	44	58	72	120	134
Group A	V1 Equip FT	V1 Equip EHV 1,4	V2 Equip FT	V2 Equip EHV 1,4				
Group B	V1 Equip FT + Equip EHV 1,4		V2 Equip FT + Equip EHV 1,4			N/A		N/A

Group A, separate vaccination; group B, concurrent vaccination. N/A = not applicable. The timepoints when the horses were vaccinated and sampled are colour-coded grey, and the timepoints when horses were sampled but not vaccinated are colour-coded light blue

[20] was calculated by the trapezoidal rule and used as the metric for the repeated-measures analysis of EIV antibody titres. Statistical significance was set at $P \leq 0.05$.

Results

No adverse clinical reactions were observed in any of the horses at any time after vaccination.

EHV-1 serology

At the time of administration of the first EHV-1,4 vaccine (V1_EHV1,4), 34 of the 71 horses (47.9%) included in the study were considered seronegative for EHV-1 with CF titres ≤ 5 . The remaining 37 horses, i.e., 18 of 38 horses (47.4%) in group A and 19 of the 33 horses (57.6%) in group B, had serological evidence of prior exposure to EHV, with CF titres ranging from 10 to 40 (Supplementary Table S1). There was no significant difference in the CF titres between the horses in group A and group B prior to V1_EHV1,4, ($P=0.19$). Two weeks after V1_EHV1,4, 37 of the horses in group A (97.4%) and all 33 horses (100%) in group B had seroconverted to EHV-1 (Fig. 1).

The pattern of antibody response to EHV1,4 vaccination was similar for both groups. The mean fold change in the EHV-1 antibody titre at the different time points for

groups A and B is illustrated in Figure 2. At day 14 post-V1_EHV1,4, the EHV1-antibody mean fold increase was significantly lower in group A (separate vaccination) than in group B (concurrent vaccination) ($P=0.0015$). By the day of the second vaccination (30 days post-V1_EHV1,4), the antibody titres had declined significantly (fourfold or greater) in nearly a third (32%) of all horses tested, i.e., 13 of 38 horses in group A and 10 of 33 in group B. The mean fold increases from baseline were significantly lower in group A than in group B ($P=0.0006$). By 2 weeks post-V2, 29 horses in group A (76.3%) and 22 horses in group B (66.7%) seroconverted a second time (Fig. 1), at which time the highest fold increases from baseline were recorded for both groups A (28.21 ± 3.8 SE) and B (26.67 ± 3.0 SE) (Fig. 2). Six of the nine horses in group A and all eleven horses in group B that did not seroconvert had EHV-1 antibody titres ≥ 80 at the time of V2_EHV1,4 (Supplementary Table S1).

By 4 weeks post-V2_EHV1,4 group B had experienced a greater decline in antibody titre than group A (Fig. 2); i.e., at this time point the group B fold increase in antibodies from baseline (12.79 ± 1.95 SE) was lower than group A (18.42 ± 3.46 SE). All 38 horses in group A and 31 of 33 (94%) horses in group B experienced a decline in antibody titre from 4 weeks post-V2_EHV1,4 to the last day of sampling. By 3 months post-V2, both groups had antibody titres close to the baseline value at V1_EHV1,4. The two groups did not have a significant difference in the mean

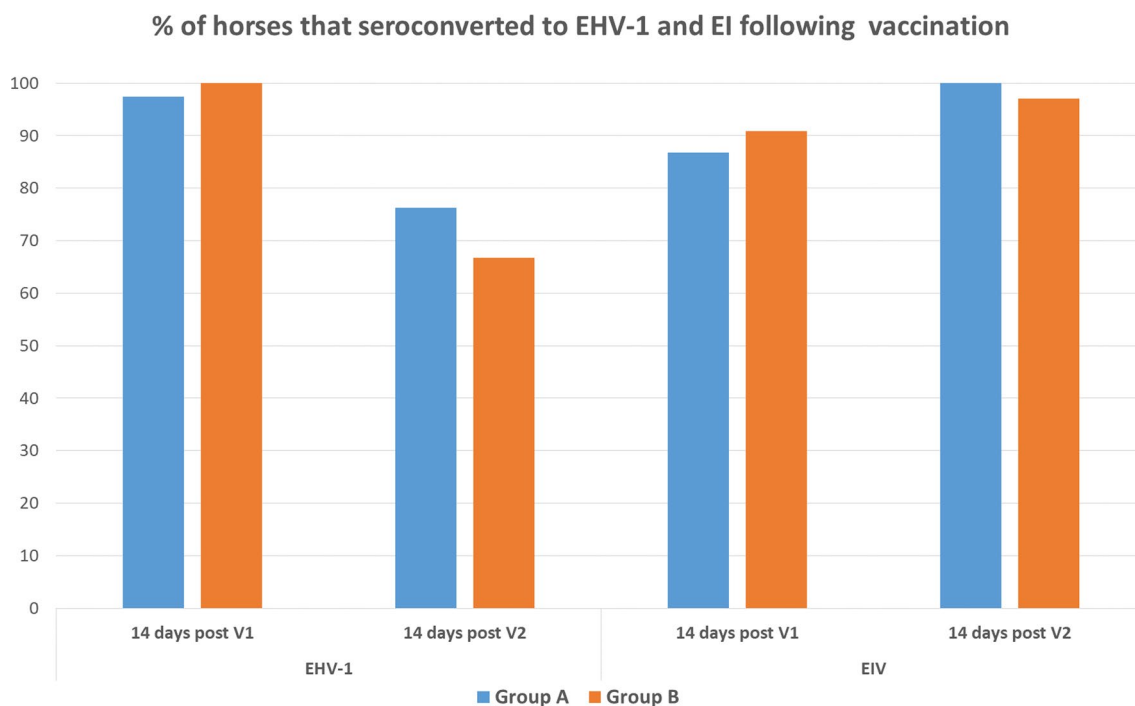


Fig. 1 The percentage of horses in groups A (separate vaccination) and B (concurrent vaccination) that had seroconverted to EHV-1 and EIV by 14 days after the first vaccination (V1) and 14 days after the second vaccination (V2)

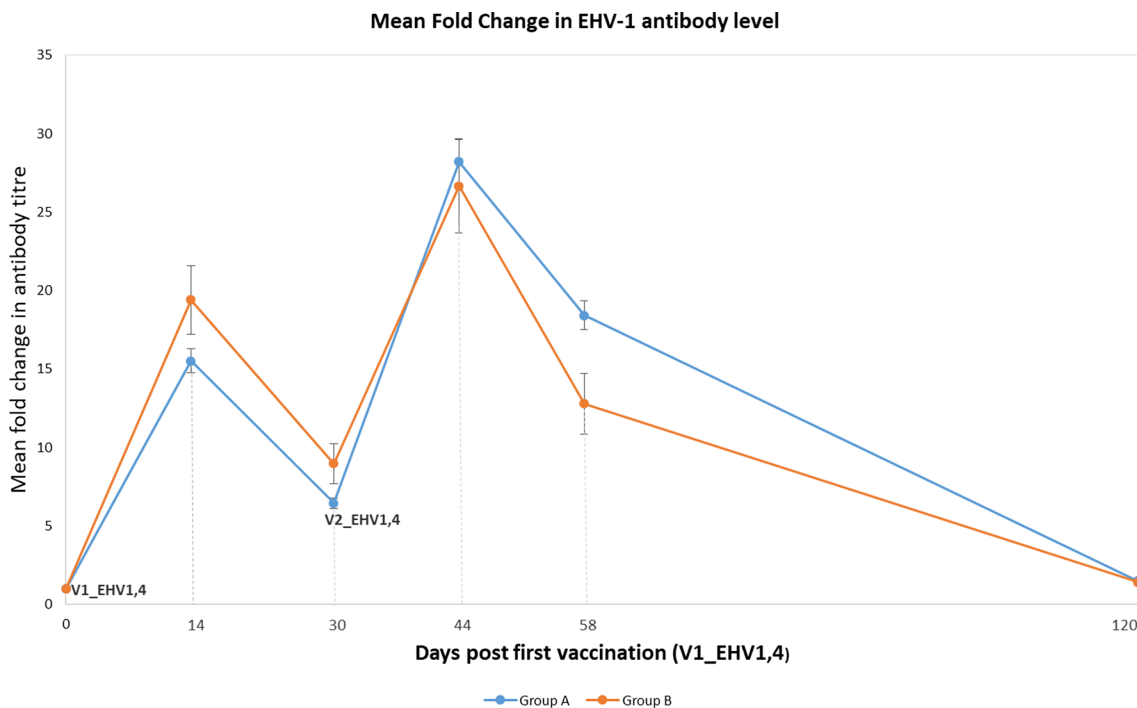


Fig. 2 Mean fold increase in EHV-1 antibody titres from day 0 (V1_EHV1,4) as measured by CFT at D0, D14, D30, D44, D58 and D120 post-vaccination for groups A (separate vaccination) and B (concur-

rent vaccination). The timing of the first vaccination (V1_EHV1,4) and the second vaccination (V2_EHV1,4) is shown. Error bars represent the standard error of the mean

fold increase in EHV-1 antibodies from baseline at day 44 ($P=0.19$), 58 ($P=0.52$) or 120 ($P=0.11$).

EIV serology

On the day of the administration of the first EIV vaccination (V1) all 71 horses included in the study were seronegative for EIV. Within 14 days of the first vaccination (V1), 33 of the horses in group A (86.8%) and 30 of the horses in group B (90.9%) seroconverted to EIV (Fig. 1 and Supplementary Table S2).

The pattern of EIV antibody response post-vaccination was similar for both groups (Fig. 3). The majority of horses in both groups responded to the first dose of EIV vaccine within 2 weeks with SRH titres associated with clinical protection, i.e., ≥ 85 but < 150 mm². There was a significant difference in the antibody titre ($P=0.0015$) between the two groups, as the mean antibody titre was higher in group A (separate vaccination) (99.4 ± 7.8 mm² SE) than in group B (concurrent vaccination) (90.5 ± 8.5 mm² SE). By the day of the second vaccination (day 30), 10 of 38 (26.3%) horses in group A and five of 33 horses (15.2%) in group B had experienced a significant decline in antibody titre. Nevertheless, the mean SRH antibody titres against EIV at day 30 remained significantly higher ($P=0.0006$) in group A (85.3 ± 6.6 mm² SE) than group B (78.8 ± 7.6 mm² SE).

A strong antibody response was mounted by 14 days after the second vaccination, at which time 38 horses in group A (100%) and 32 horses in group B (97%) seroconverted (Fig. 1). The mean SRH antibody titre rose to 213.8 ± 4.0 mm² SE and 207.5 ± 6.0 mm² SE for group A and B, respectively, i.e., titres associated with virological protection. There was no significant difference detected between the two groups ($P=0.1952$). By 4 weeks post-V2 (day 58), 71% (27/38) of the horses in group A and 72.7% (24/33) in group B had experienced a significant decline in SRH antibody of > 25 mm². At this time, the mean H3N8 antibody titre for group A and group B was 181.5 ± 3.7 mm² SE and 174.8 ± 5.1 mm² SE, respectively. At 3 months post-V2, the last day of sampling, the mean SRH antibody titre had declined to 107.0 ± 2.7 mm² SE and 94.1 ± 3.7 mm² SE for group A and B, respectively. The area under the curve of the SRH titres was calculated as described by Heldens et al. [20], and no significant difference between the two groups was established ($P=0.14$).

Discussion and conclusion

Vaccination is the most effective method of controlling equine viral disease and is accepted by industry professionals as an investment in animal health and business continuity [21, 22]. Replacing separate vaccination with concurrent

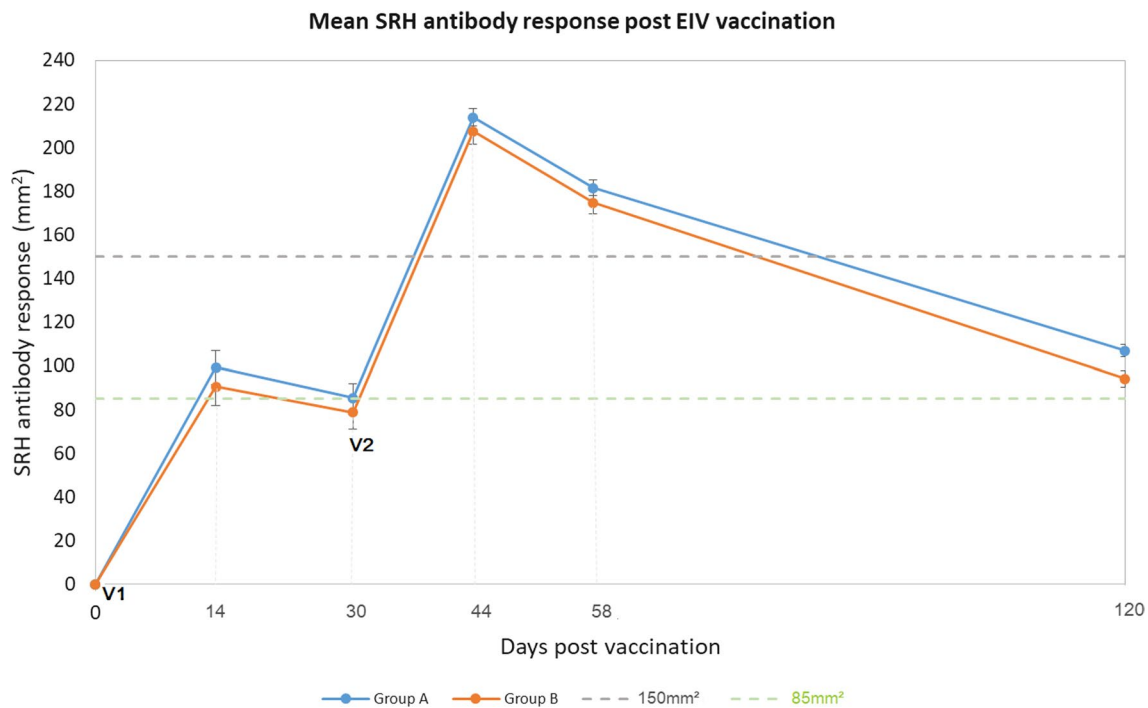


Fig. 3 Mean single radial haemolysis (SRH) antibody response to A/eq/South Africa/4/03 (H3N8) measured at D0 (day of first vaccination), D14, D30 (day of second vaccination), D44, D58, and D120

after the first vaccination for groups A (separate vaccination, blue line) and B (concurrent vaccination, orange line). Error bars represent the standard error of the mean

vaccination reduces costs to the industry, but such practice warrants investigation to determine if it results in immunological interference. This study is a follow-up study to an investigation of concurrent vaccination in racehorses in which an influenza vaccine was administered as a booster [11]. To our knowledge, it is the first study to compare the serological response of weanlings to concurrent and consecutive primary vaccination against EIV and EHV1/4. These horses were bred for dressage, and their primary EIV vaccination was compliant with the regulations of the FEI. Vaccination against EIV and EHV1/4 was routinely practiced on the farm where the study was executed, but traditionally, the EIV and EHV1/4 vaccines were administered 2 weeks apart. The aim of the study was to determine if concurrent vaccination could be introduced for primary vaccinations without compromising the safety or efficacy of either vaccine.

In this comparative study, both groups received Equip FT, which includes tetanus toxoid. The measurement of the response to tetanus was beyond the scope of the project. Previous studies with an ISCOM-adjuvanted vaccine gave no indication that the inclusion of tetanus toxoid in an equine influenza vaccine has any adverse effect on the response to the influenza viruses contained in the vaccine [23]. Single radial haemolysis (SRH) was used to measure antibodies against EIV haemagglutinin, as there is a correlation between pre-existing SRH antibody titres and

protection, and internationally standardized controls are available from the EDQM [15, 16, 23]. A virus neutralization test (VNT) in embryonated hen eggs has been used in field studies to monitor the response of racehorses and yearlings to booster or primary immunization against EIV, but the VN titre that unequivocally correlates with protection has to be established [24]. In this study, only H3N8 antibodies against a virus of the American lineage were measured. Although the vaccine Equip FT contains a H7N7 virus, the antibody response to this subtype is not clinically relevant. The last confirmed outbreak of equine influenza in horses due to a H7N7 virus was over four decades ago. Furthermore, a H3N8 virus of the Eurasian lineage similar to A/eq/Borlange/91 (H3N8) has not been detected in the course of many years of surveillance, and viruses of this lineage are presumed not to be circulating. Since 2010, the OIE has recommended only viruses of the American lineage for inclusion in the vaccines.

In contrast to EI, there is no unequivocal correlate of protection for EHV1 and 4 and no internationally recognised reagents or standardised techniques for performing any of the serological tests for detection of EHV1/4 antibody. The two most commonly used serological assays for EHV1 and 4 are the virus neutralization test (VNT) and the complement fixation test (CFT), neither of which is type specific [12]. Both virus-neutralizing and complement-fixing

antibodies are routinely measured in vaccine studies, and although they have been associated with diminished virus excretion in young horses, the relationship between protection and systemic antibodies is not robust [25–27]. Despite high levels of neutralizing antibodies, pregnant mares may abort, and horses are not protected against neurological disease [28–31]. Cellular immunity is thought to play the predominant role in minimizing viraemia [22, 32]. In this study, the CFT was used to monitor antibody response post-vaccination, as it is the serology test routinely performed in our laboratory and is less labour-intensive than the VNT. As the CFT does not differentiate between EHV1 and 4 due to their antigenic relatedness, only EHV1 was included in the tests performed.

All of the weanlings included in the study were female, but in a previous study, gender was not an influencing factor in the vaccination response in young horses [18]. The two groups were not closely age matched; there was a difference of 1 month in the mean age between them. This problem is not unusual for equine studies involving large numbers of privately owned animals. In such circumstances, assembly of study groups is inevitably a matter of doing the best one can with the animals available and the agreement of the personnel on the farm. However, as age at first vaccination has been demonstrated to impact on the antibody response to vaccination [33], additional analysis (data not shown) was carried out on age-matched subgroups consisting of 28 horses and 22 horses from group A and B, respectively. The findings confirmed those from the original study; i.e., for EI the AUC of the two groups was not significantly different and for EHV1 the results were significantly different at 2 and 4 weeks post-V1, and not otherwise.

Many of the weanlings were seropositive for EHV1 at the time of the first vaccination. This was consistent with the finding that infection with EHV1 is common in young horses both before and after weaning [34]. Thus, the study population was truly representative of the target population in the field rather than the naïve foals that are commonly used in experimental efficacy studies. Both groups in this study included seronegative weanlings, but seronegative results are not necessarily indicative of a lack of previous exposure, as CF titres are short-lived and tend to return to baseline within 3 months of exposure to EHV [12]. In this case, the immune response to vaccination of the seronegative horses was similar to that of their seropositive cohort in that the EHV-1 titres obtained at the different times post-vaccination were statistically indistinguishable, suggesting that they were not naïve but had been previously exposed to the virus. An anamnestic-type response was observed on first vaccination when all but one weanling seroconverted. This is similar to what has been observed in young adult racehorses [11]. In contrast, in an efficacy study of the same vaccine carried out for regulatory purposes, only four of 20

naïve weanlings had CF titres > 5 two weeks after vaccination, but they showed an anamnestic response after their second dose, when 19 seroconverted [25]. In this study, the EHV1 antibody response of the weanlings was similar in the group vaccinated separately and the group vaccinated concurrently; the highest antibody titres were recorded at 14 days post second vaccination, and they declined at similar rates to their original titres within 3 months. This is consistent with the findings of Thompson et al. that CF antibodies to EHV1 are short-lived and often decline to undetectable titres within 10 weeks [12].

All weanlings included in the study were seronegative for EIV on the day of vaccination. There was no evidence of the persistence of maternal antibodies against EI, which have been shown to interfere with the immune response to vaccination [35, 36]. All but eight weanlings (11%) had seroconverted by 2 weeks post-vaccination. The eight poor responders (five in group A and three in group B) were still seronegative by 1 month post-vaccination. However, this compares favorably to a previous study where 11 of 14 (79%) horses responded poorly to their first vaccination with Equip FT [18]. In both studies, all poor responders mounted an antibody response to the second dose of vaccine.

The pattern of SRH antibody response against EI was similar for the weanlings vaccinated separately and those vaccinated concurrently. Antibody titres consistent with clinical and virological protection were observed after the first and second vaccination, respectively. As anticipated from other studies highlighting the immunity gap between the second and third vaccination, by 3 months after the second vaccination, the antibody titres had declined from virological to clinical protection levels [8, 15, 23, 36, 37]. The findings differed from the previous study in racehorses, where horses that received a booster vaccination against EI on the same day as an EHV vaccine mounted a greater antibody response than those that were vaccinated separately; i.e., there was a significant difference between the AUC of the SRH titres for the two groups [11]. In the current study, there was no significant difference between the AUC for the two groups, and in fact, group A (separate vaccination) responded better than group B (concurrent vaccination) to the first dose of vaccine. The different findings in the two studies may be linked to the adjuvants in the EI vaccines. The concurrently vaccinated group of racehorses may have benefited from receiving two carbopol-adjuvanted vaccines in contrast to the weanlings in this study, which received the carbopol-adjuvanted EHV1/4 vaccine with an ISCOM-based EI vaccine. However, at present, this is mere speculation, and further studies are required to understand the mechanism of adjuvants and how they interact to modulate the antibody response.

In summary, the findings of this study were that no adverse clinical reactions were associated with concurrent

primary vaccination against EI and EHV1/4 and that the antibody titres were similar to those observed when the vaccines were administered separately. These findings are supportive of a previous study in racehorses in which it was concluded that concurrent vaccination did not compromise the humoral immune response against either vaccine. Concurrent vaccination against these viruses should be considered, as it represents better economic value and thus may result in improved vaccination coverage.

Acknowledgements The authors wish to thank Paul Schockemoehle and the team of Lewitz Stud for their invaluable contribution to this study.

Declarations

Funding The laboratory work that was carried out at the Irish Equine Centre was funded by the Department of Agriculture, Food and the Marine.

Conflicts of interest/competing interests The authors declare no conflicts of interest.

Ethics approval The study protocol was reviewed and approved in accordance with ethics guidelines of Hanover University and the German Animal Welfare Act.

Consent to participate Paul Schockemoehle provided consent for the participation of the horses at Lewitz Stud.

References

1. Oladunni FS, Horohov DW, Chambers TM (2019) EHV-1: a constant threat to the horse industry. *Front Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02668>
2. Sack A, Cullinane A, Daramragchaa U, Chuluunbaatar M, Gonchigoo B, Gray GC (2019) Equine influenza virus—a neglected, reemerging disease threat. *Emerg Infect Dis* 25(6):1185–1191. <https://doi.org/10.3201/eid2506.161846>
3. Cowled B, Ward MP, Hamilton S, Garner G (2009) The equine influenza epidemic in Australia: spatial and temporal descriptive analyses of a large propagating epidemic. *Prev Vet Med* 92(1):60–70. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2009.08.006>
4. Diallo A, Souley MM, Ibrahim AI, Alassane A, Issa R, Gagara H, Yaou B, Issiakou A, Diop M, Ba Diouf RO, Lo FT, Lo MM, Sylla M, Seck MT, Meseko C, Shittu I, Cullinane A, Settypalli TBK, Lamien CE, Dundon WG, Cattoli G (2020) Transboundary spread of equine influenza viruses (H3N8) in West and Central Africa: molecular characterization of identified viruses during outbreaks in Niger and Senegal, in 2019. *Transbound Emerg Dis.* <https://doi.org/10.1111/tbed.13779>
5. Cullinane A, Gahan J, Walsh C, Nemoto M, Entenfellner J, Olguin-Perglione C, Garvey M, Huang Fu TQ, Venner M, Yamanaka T, Barrandeguy M, Fernandez CJ (2020) Evaluation of current equine influenza vaccination protocols prior to shipment, guided by OIE standards. *Vaccines.* <https://doi.org/10.3390/vaccines8010107>
6. FEI (2020) Vaccinations. <https://inside.fei.org/fei/your-role/veterinarians/biosecurity-movements/vaccinations>. Accessed 01 May 2020
7. AAEP (2020) Risk-based vaccination guidelines: equine herpesvirus (rhinopneumonitis). <https://aaep.org/guidelines/vaccination-guidelines/risk-based-vaccination-guidelines>. Accessed 28 July 2020
8. Cullinane A, Gildea S, Weldon E (2014) Comparison of primary vaccination regimes for equine influenza: working towards an evidence-based regime. *Equine Vet J* 46(6):669–673. <https://doi.org/10.1111/evj.12214>
9. Gildea S, Garvey M, Lyons P, Lyons R, Gahan J, Walsh C, Cullinane A (2018) Multifocal equine influenza outbreak with vaccination breakdown in thoroughbred racehorses. *Pathogens.* <https://doi.org/10.3390/pathogens7020043>
10. Gildea S, Lyons P, Lyons R, Gahan J, Garvey M, Cullinane A (2020) Annual booster vaccination and the risk of equine influenza to Thoroughbred racehorses. *Equine Vet J* 52(4):509–515. <https://doi.org/10.1111/evj.13210>
11. Gildea S, Sanchez Higgins MJ, Johnson G, Walsh C, Cullinane A (2016) Concurrent vaccination against equine influenza and equine herpesvirus—a practical approach. *Influenza Other Respir Viruses* 10(5):433–437. <https://doi.org/10.1111/irv.12396>
12. Thomson GR, Mumford JA, Campbell J, Griffiths L, Clapham P (1976) Serological detection of equid herpesvirus 1 infections of the respiratory tract. *Equine Vet J* 8(2):58–65
13. Hawkes (1979) Complement-fixation (CF). In: Lennette EH, Schmidt NJ (eds) *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections*, 5th edn. American Public Health Association, Washington DC, pp 35–42
14. 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 Other Respir Viruses* 4(6):363–372
15. Mumford JA, Wilson H, Hannant D, Jessett DM (1994) Antigenicity and immunogenicity of equine influenza vaccines containing a Carbomer adjuvant. *Epidemiol Infect* 112(2):421–437
16. Newton JR, Townsend HG, Wood JL, Sinclair R, Hannant D, Mumford JA (2000) Immunity to equine influenza: relationship of vaccine-induced antibody in young Thoroughbred racehorses to protection against field infection with influenza A/equine-2 viruses (H3N8). *Equine Vet J* 32(1):65–74
17. Mumford J, Wood J (1991) Establishing an acceptability threshold for equine influenza vaccines. *Dev Biol Stand* 79:137–146
18. Gildea S, Arkins S, Walsh C, Cullinane A (2011) A comparison of antibody responses to commercial equine influenza vaccines following primary vaccination of Thoroughbred weanlings—a randomised blind study. *Vaccine* 29(49):9214–9223. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.101>
19. RCoreTeam (2016) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna
20. Heldens JGM, Weststrate MW, van den Hoven R (2002) Area under the curve calculations as a tool to compare the efficacy of equine influenza vaccines—a retrospective analysis of three independent field trials. *J Immunol Methods* 264(1):11–17. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(01\)00571-3](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(01)00571-3)
21. Cullinane A, Elton D, Mumford J (2010) Equine influenza—surveillance and control. *Influenza Other Respir Viruses* 4(6):339–344. <https://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2010.00176.x>
22. Kydd J, Townsend HG, Hannant D (2006) The equine immune response to equine herpesvirus-1: the virus and its vaccines. *Vet Immunol Immunopathol* 111(1–2):15–30. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.01.005>
23. Mumford JA, Jessett D, Dunleavy U, Wood J, Hannant D, Sundquist B, Cook RF (1994) Antigenicity and immunogenicity of experimental equine influenza ISCOM vaccines. *Vaccine* 12(9):857–863
24. Yamanaka T, Nemoto M, Bannai H, Tsujimura K, Matsumura T, Kokado H, Gildea S, Cullinane A (2018) Neutralization antibody

- response to booster/priming immunization with new equine influenza vaccine in Japan. *J Vet Med Sci* 80(2):382–386. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0538>
25. Heldens JG, Hannant D, Cullinane AA, Prendergast MJ, Mumford JA, Nelly M, Kydd JH, Weststrate MW, van den Hoven R (2001) Clinical and virological evaluation of the efficacy of an inactivated EHV1 and EHV4 whole virus vaccine (Duvaxyn EHV1,4). Vaccination/challenge experiments in foals and pregnant mares. *Vaccine* 19(30):4307–4317
 26. Goehring L, van Maanen C, Berendsen M, Cullinane A, de Groot RJ, Rottier PJM, Wesselingh JJCM, Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM (2010) Experimental infection with neuropathogenic equid herpesvirus type 1 (EHV-1) in adult horses. *Vet J* 186(2):180–187. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.08.007>
 27. Patel JR, Heldens J (2005) Equine herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4)—epidemiology, disease and immunoprophylaxis: a brief review. *Vet J* 170(1):14–23. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2004.04.018>
 28. Wilson WD (1997) Equine herpesvirus 1 myeloencephalopathy. *Vet Clin N Am Equine Pract* 13(1):53–72. [https://doi.org/10.1016/S0749-0739\(17\)30255-9](https://doi.org/10.1016/S0749-0739(17)30255-9)
 29. Burrows R, Goodridge D, Denyer MS (1984) Trials of an inactivated equid herpesvirus 1 vaccine: challenge with a subtype 1 virus. *Vet Rec* 114(15):369–374. <https://doi.org/10.1136/vr.114.15.369>
 30. Mumford JA (1985) Equid herpesvirus 1 (EHV 1) latency: more questions than answers. *Equine Vet J* 17(5):340–342. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1985.tb02515.x>
 31. Mumford JA, Rossdale PD, Jessett DM, Gann SJ, Ousey J, Cook RF (1987) Serological and virological investigations of an equid herpesvirus 1 (EHV-1) abortion storm on a stud farm in 1985. *J Reprod Fertil Suppl* 35:509–518
 32. Osterrieder N, Van de Walle GR (2010) Pathogenic potential of equine alphaherpesviruses: the importance of the mononuclear cell compartment in disease outcome. *Vet Microbiol* 143(1):21–28. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.02.010>
 33. Fougere S, Legrand L, Garrett D, Birand I, Foursin M, D'Ablon X, Bayssat P, Newton RJ, Pronost S, Paillot R (2016) Influential factors inducing suboptimal humoral response to vector-based influenza immunisation in Thoroughbred foals. *Vaccine* 34(33):3787–3795. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.05.068>
 34. Gilkerson JR, Whalley JM, Drummer HE, Studdert MJ, Love DN (1999) Epidemiology of EHV-1 and EHV-4 in the mare and foal populations on a Hunter Valley stud farm: are mares the source of EHV-1 for unweaned foals. *Vet Microbiol* 68(1–2):27–34
 35. van Maanen C, Bruin G, de Boer-Luijtz E, Smolders G, de Boer GF (1992) Interference of maternal antibodies with the immune response of foals after vaccination against equine influenza. *Vet Q* 14(1):13–17. <https://doi.org/10.1080/01652176.1992.9694319>
 36. Cullinane A, Weld J, Osborne M, Nelly M, McBride C, Walsh C (2001) Field studies on equine influenza vaccination regimes in thoroughbred foals and yearlings. *Vet J (Lond, Engl)* 197(2):174–185. <https://doi.org/10.1053/tvjl.2000.0546>
 37. Paillot R, Prowse L, Montesso F, Stewart B, Jordon L, Newton JR, Gilkerson JR (2013) Duration of equine influenza virus shedding and infectivity in immunised horses after experimental infection with EIV A/eq2/Richmond/1/07. *Vet Microbiol* 166(1–2):22–34. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.04.027>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

3. Zweite Publikation:

Grundimmunisierung gegen Equine Influenza bei Fohlen: wann, wie und womit? – Übersicht über den aktuellen wissenschaftlichen Stand

Veröffentlicht in:

Pferdeheilkunde - Equine Medicine 40 (2024) 1: 18-26; DOI 10.21836/PEM20240103

Alexandra Allkofer ¹, Monica Venner ²

1 Pferdeklinik Bieberstein Altano GmbH, Thierlstein 5, 93413 Cham

2 Pferdeklinik Destedt GmbH, Trift 4, 38162 Destedt

*** Korrespondenz und Anfragen sind zu richten an:**

Dr. Monica Venner. PD, PhD, FTA für Pferde, Dipl. ECEIM
Pferdeklinik Destedt GmbH, Trift 4, 38162 Destedt, Germany
E-Mail: mvenner@gmx.de

Grundimmunisierung gegen Equine Influenza bei Fohlen: wann, wie und womit? – Übersicht über den aktuellen wissenschaftlichen Stand

Alexandra Allkofer¹ und Monica Venner²

¹ Pferdeklinik Bieberstein Altano GmbH, Thierstein 5, 93413 Cham

² Pferdeklinik Destedt GmbH, Trift 4, 38162 Destedt

Zusammenfassung: Das Equine Influenza Virus (EIV) ist hochgradig ansteckend und verursacht fast weltweit Ausbrüche von Atemwegserkrankungen bei Pferden. Besonders gefährdet für eine Infektion mit EIV sind vor allem „naive“ Pferde, die bisher noch keinen Kontakt zu EIV hatten oder die keine oder nur eine unvollständige Grundimmunisierung erhalten haben. Diese Literaturübersicht soll unter anderem einen Überblick über die bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnisse zur Immunantwort von Fohlen auf eine Impfung geben, die sich aufgrund von zahlreichen Einflussfaktoren von der unterscheidet, die erwachsene Pferde zeigen. Es wird auf die Inhaltsstoffe des Kolostrums (Antikörper, Zytokine und andere maternale Zellen) und deren Einfluss bei der Immunantwort von Fohlen eingegangen. Auch die Fragen in welchem Alter ein Fohlen die erste Impfung der Grundimmunisierung gegen EIV bekommen sollte, sowie welches Impfschema dabei zu empfehlen ist, werden durch die Zusammenfassung der Ergebnisse zahlreicher wissenschaftlicher Studien diskutiert. Dieser Übersichtsartikel soll es den Tierärzten und Tierärztinnen erleichtern, ihre Kunden bzgl. Zeitpunkt und Impfschema für die Grundimmunisierung gegen das Equine Influenzavirus bei Fohlen anhand der individuellen Situation (Impfstatus der Stute vor der Geburt, Alter des Fohlens bei der Erstimpfung, Infektionsdruck, Verfügbarkeit der Impfstoffe und Praktikabilität) auf wissenschaftlicher Basis zu beraten. Aufgrund neuer Erkenntnisse in Bezug auf die Grundimmunisierung von Fohlen gegen Influenza ist zusammenfassend zu sagen, dass das Verkürzen der Impfintervalle zu einer geringeren humoralen Immunantwort gegen EI führt, dass das Wechseln der Impfstoff-Typen zu einer höheren humoralen Immunantwort gegen EI führt und eine Simultan-Impfung gegen Influenza, Herpes und Tetanus sich nicht nachteilig auf die humorale Immunantwort gegen EI auswirkt.

Schlüsselwörter: Grundimmunisierung, Impfung, Antikörper, Equine Influenza, Equines Influenzavirus, Fohlen, Pferd, Übersicht

Primary vaccination against equine influenza in foals: when, how and with what? – Overview of the current scientific status

Equine influenza virus (EIV) is highly contagious and causes outbreaks of respiratory disease in horses almost worldwide. Particularly at risk for infection with EIV are "naive" horses that have had no previous contact with EIV or that have received no or only incomplete primary vaccination. This article is intended, among other things, to give an overview of the scientific findings to date on the immune response of foals to vaccination, which differs from that shown by adult horses due to numerous influencing factors. It will discuss the components of the colostrum (antibodies, cytokines and other maternal cells) and their influence on the immune response of foals. The questions at which age a foal should receive the first vaccination of the primary vaccination against EIV, as well as which vaccination scheme is recommended, are also discussed by summarising the results of numerous scientific studies. This review article is intended to help veterinarians advise their clients on the timing and schedule of primary vaccination against equine influenza in foals based on the individual situation (mare's prepartum vaccination status, foal's age at first vaccination, infection pressure, vaccine availability and practicality) on a scientific basis. Based on new study results regarding the primary vaccination of foals against influenza, it can be summarised that shortening the vaccination intervals leads to a lower humoral immune response against EI, that switching vaccine types leads to a higher humoral immune response against EI and that simultaneous vaccination against influenza, herpes and tetanus does not have a detrimental effect on the humoral immune response against EI.

Keywords: primary vaccination, vaccination, antibodies, equine influenza, equine influenza virus, foal, horse, review

Zitation: Allkofer A, Venner M (2023) Grundimmunisierung gegen Equine Influenza bei Fohlen: wann, wie und womit? – Übersicht über den aktuellen wissenschaftlichen Stand. *Pferdehkl Equine Med* 40, 18–26; DOI 10.21836/PEM20240103

Korrespondenz: Monica Venner, Pferdeklinik Destedt GmbH, Trift 4, 38162 Destedt; mvenner@gmx.de

Eingereicht: 23. Juli 2023 | **Angenommen:** 23. September 2023

Einleitung

Das Equine Influenza Virus (EIV) ist hochgradig ansteckend und verursacht fast weltweit Ausbrüche von Atemwegserkrankungen bei Pferden. Der Equine Influenza-Subtyp H3N8 teilt sich in zwei Gruppen auf: Florida Clade 1 (FC 1) und Florida Clade 2 (FC 2). Über die letzten zwei Jahrzehnte wurde in

Europa fast ausschließlich FC 2 nachgewiesen, was sich mit zahlreichen Influenza-Ausbrüchen in Europa im Jahr 2019 änderte, als erstmals seit vielen Jahren wieder eine Zirkulation von FC 1 EIV festgestellt wurde.

Besonders gefährdet für eine Infektion mit EIV sind vor allem „naive“ Pferde, die bisher noch keinen Kontakt zu EIV hatten

oder die keine oder nur eine unvollständige Grundimmunisierung erhalten haben.

Das Pferdeinfluenzavirus ist sehr kontagiös und kann aufgrund der schnellen Ausbreitung der Infektion in Pferdepopulationen zu großen wirtschaftlichen Verlusten führen [1–3]. Obwohl die Erkrankung, die durch Symptome wie Fieber, Nasenausfluss, Apathie und trockenen Husten gekennzeichnet ist [4], meist selbstlimitierend ist, kann die Verbringung von infizierten Pferden in empfängliche Populationen zu bedeutenden Ausbrüchen führen. Die Inkubationszeit beträgt zwei bis fünf Tage und kann, besonders bei geimpften Pferden, auch subklinisch ablaufen.

Positiv ist, dass die Impfung gegen die Equine Influenza (EI) nach wie vor eine der effektivsten Methoden zur Kontrolle der Krankheit ist [5, 6] und dass sie die Zahl der Neuinfektionen, die klinischen Symptome sowie die Virusausscheidung signifikant reduziert [1, 6]. Es besteht nach erfolgter Impfung eine positive Korrelation zwischen SRH (Single Radial Haemolysis) Antikörper-Titern und dem Schutz vor EI (85 mm² = Schwellenwert für klinischen Schutz und 154 mm² = Schwellenwert für virologischen Schutz) [7]. Die SRH Antikörperkonzentrationen sollten laut einer Studie von Thein et al. aber nicht als absolutes bzw. alleiniges Maß hinsichtlich des Immunschutzes des individuellen Pferdes angesehen werden, da die Laborergebnisse von vielen technischen und immunologischen Faktoren abhängig sind und die zelluläre Immunität bzw. das immunologische Gedächtnis (z.B. hervorgerufen durch eine Infektion mit EIV) durch die gängigen Labortests (HAH- und SRH-Test) nicht erfasst werden [8]. Der SRH Test ist allerdings derzeit das von der ehemals OIE (nun WOAH) empfohlene Testverfahren zur Bestimmung der Anti-Influenzazititer [9, 10]. Die Kinetik der humoralen Immunantwort auf eine Influenzaimpfung wurde auf Basis des SRH Test in diversen Studien dargestellt [11–13].

Laut den Herstellerangaben von Influenza-Impfstoffen besteht die Grundimmunisierung aus zwei Impfungen (V1 und V2), die mit einem Abstand von vier bis sechs Wochen geimpft werden sollen [6], gefolgt von einer dritten Impfung (V3), die fünf bis sechs Monate nach der zweiten Impfung V2 appliziert wird (Übersicht über verschiedene Herstellerangaben siehe Tabelle 1). Anschließend sollten halbjährliche (oder jährliche) Booster-Impfungen durchgeführt werden, je nach aktuellem Infektionsrisiko [14, 15].

Eine Impfpflicht gegen EI wird auch von vielen Behörden im Pferdesport, sowie für Importe von Pferden, vorgeschrieben [16]. Die nationalen und internationalen Pferdesportverbände (z.B. FN, FEI, International Federation of Horseracing Authorities, Deutscher Galopp e.V.) haben alle eine eigene Regelung zur Impfung von Pferden gegen EIV und auch die Ständige Impfkommision (StlKo Vet) formuliert und aktualisiert regelmäßig diesbezüglich Empfehlungen (siehe Tabelle 2).

Diese Literaturübersicht soll einen Überblick über die bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnisse zur Immunantwort von Fohlen und zur Grundimmunisierung gegen das Equine Influenzavirus bei Fohlen geben. Ein weiteres Ziel war es, die aktuellsten Ergebnisse von wissenschaftlichen Studien zusammenzufassen und es somit Tierärzten und Tierärztinnen zu erleichtern, ihre Kunden bzgl. Zeitpunkt der Erstimpfung (V1), sowie bzgl. des Impfschemas für die Grundimmunisierung gegen das Equine Influenzavirus auf wissenschaftlicher Basis zu beraten.

Wissenswertes zur Immunantwort bei Fohlen

Die Entwicklung der Immunität vom Zeitpunkt der Geburt bis zum Erwachsenenalter des Pferdes ist komplex und ist nach wie vor nicht vollständig erforscht bzw. verstanden. Die Im-

Tab. 1 Alter der Fohlen bei der Grundimmunisierung: Herstellerangaben verschiedener Influenzaimpfstoffe für Pferde. | *Age of the foals at primary vaccination: Manufacturers' instructions of different influenza vaccines for horses.*

Influenza Impfung	Equilis Prequenza®	Equip F®	ProteqFlu®	Duvaxyn IE Plus®
V 1	mit 6 Monaten	mit 5 Monaten	mit 5–6 Monaten	mit 5 Monaten
V 2	4 Wochen nach V1	6 Wochen nach V1	4–6 Wochen nach V1	4–6 Wochen nach V1
V 3/1. Booster Impfung	5 Monate nach V2	5 Monate nach V2	5 Monate nach V2	6 Monate nach V2

Tab. 2 Impfpfehlungen gegen Pferdeinfluenza verschiedener Pferdesportverbände. | *Vaccination recommendations against equine influenza from various equestrian associations.*

Influenza Impfung	StlKo Vet (D)	FN (D) (Stand 2022)	Deutscher Galopp e.V. (Stand 2022)	FEI (International) (Stand 2022)
V 1	mit 6 Monaten*			
V 2	28–42 Tage nach V1	28–70 Tage nach V1**	21–92 Tage nach V1***	21–92 Tage nach V1***
V 3/1. Booster Impfung	5–6 Monate nach V2	max. 6 Monate + 21 Tage nach V2***	150–215 Tage nach V2	max. 6 Monate + 21 Tage nach V2***
Weitere Booster Impfungen	alle 6 Monate	max. 6 Monate + 21 Tage nach der letzten Booster Impfung***	max. 9 Monate (275 Tage)	max. 6 Monate + 21 Tage nach der letzten Booster Impfung***

* Fohlen ungeimpfter Mutterstuten oder mit fehlender/unzureichender Kolostrumaufnahme à V1 bereits mit 4 Monaten
 ** Teilnahme am Wettkampf erlaubt, wenn V2 vor mindestens 14 Tagen oder mehr vor der Ankunft am Turnierplatz erfolgt ist
 *** Teilnahme am Wettkampf erlaubt, wenn Impfung vor mindestens 7 Tagen oder mehr vor der Ankunft am Turnierplatz erfolgt ist

munantwort von neonaten und jungen Fohlen unterscheidet sich aufgrund von zahlreichen Einflussfaktoren deutlich von der Immunantwort der erwachsenen Pferde. Die Fohlen zeigen z.B. eine verminderte Antikörper-Antwort [17–19] und T-Zellen-Antwort [20], andere Zytokin-Profile auf die meisten Pathogene, usw. [20–23]. Die angeborene (natürliche, unspezifische) Immunität scheint bereits von Geburt an voll funktionsfähig zu sein, wohingegen die Entstehung der adaptiven (erworbenen, spezifischen) Immunität verzögert abläuft.

Es treten erhebliche Probleme dabei auf junge Fohlen vor infektiösen Krankheiten zu schützen, da sie schlecht auf die für erwachsene Pferde entwickelten, verfügbaren Impfstoffe reagieren. Dies zeigt sich durch eine verzögerte oder schwache adaptive Immunantwort nach der Impfung gegen verschiedene Pathogene [24–27].

Direkt nach der Geburt sind Fohlen also auf den passiven Transfer von Immunglobulinen (IGs) über die Aufnahme von Kolostrum angewiesen, da eine Übertragung in utero auf den Fötus über die Plazenta, wie bei vielen anderen Spezies, nicht möglich ist. Eine schnellstmögliche Aufnahme des Kolostrums ist wichtig, da das Kolostrum zum Zeitpunkt des Abfohlens durchschnittlich 70g/L IgG enthält. Diese Konzentrationen sinken jedoch bereits nach zwei bis drei Stunden deutlich und fallen auf Konzentrationen unter 5g/L nach 24 Stunden [28]. Es ist jedoch nicht nur wichtig, dass neugeborene Fohlen schnellstmöglich eine ausreichende Menge Kolostrum aufnehmen, sondern auch dessen Qualität („sehr gute Qualität“ → IgG-Konzentration > 80g/L, „gute Qualität“ → IgG-Konzentration zwischen 50 und 80g/L, „mittelmäßige Qualität“ → IgG-Konzentration zwischen 28 und 50g/L, „schlechte Qualität“ → IgG-Konzentration < 28g/L) spielt eine entscheidende Rolle [29]. Es gibt eine aktuelle Studie dazu, wie die Qualität von Kolostrum mittels optischem oder digitalem Refraktometer schnell, einfach und kostengünstig beurteilt werden kann [30].

Ein Fohlen, das in ausreichender Menge Kolostrum von guter Qualität getrunken hat, sollte Serum-IgG-Konzentrationen von > 8g/L aufweisen [31].

Wenn das Fohlen keine ausreichende Menge an kolostralem IgG aufnimmt bzw. absorbiert, kommt es zu einem vollständigen „failure of passive transfer“ (FPT, Serum-IgG-Konzentration < 4g/L) oder teilweisem „failure of passive transfer“ (PFPT, Serum-IgG-Konzentration zwischen 4 und 8g/L) [31, 32]. Die passive Immunität ist essenziell, um das Neugeborene vom Zeitpunkt der Geburt bis zur Entwicklung der „eigenen“ Immunabwehr vor Pathogenen der Umwelt zu schützen. Fohlen mit „FPT“ sind sehr anfällig für Infektionskrankheiten, haben ein erhöhtes Risiko eine Sepsis zu entwickeln und sind dementsprechend potenziell lebensbedrohlichen Folgen ausgesetzt [33, 34]. Die Messung von Gesamtprotein im Blut von zwölf Stunden alten, gesunden Fohlen mittels Refraktometer kann bei der Bewertung von „FPT“ helfen, da sie eine hohe Sensitivität aufweist und zudem kostengünstig, schnell und einfach durchzuführen ist [35, 36].

Mit dem Kolostrum werden aber auch noch andere maternale Immunkomponenten wie Immunzellen und Zytokine auf das Neugeborene übertragen. Diese spielen wahrscheinlich ebenfalls eine Rolle in der neonatalen Entwicklung des Immunsystems und beim Schutz gegen Pathogene [28].

Inhaltsstoffe des Kolostrums – Antikörper, Zytokine und andere maternale Zellen

IgG ist in großer Menge im equinen Kolostrum enthalten (bis zu 70g/L). Man unterscheidet 7 verschiedene IgG-Isotypen (IgG1–IgG7) mit unterschiedlichen immunologischen Funktionen [37, 38]. Auch IgA und IgE sind Bestandteile des Kolostrums [17]. Die Impfung von trächtigen Stuten gegen verschiedene Pathogene, u.a. Influenza und Tetanus, erhöht die Übertragung von antigen-spezifischen IgG's über das Kolostrum auf Fohlen [26].

Zytokine sind potente Modulatoren der Immunantwort. Vor der Aufnahme von Kolostrum enthält das Serum von gesunden neonatalen Fohlen keine nachweisbaren Mengen der Zytokine Interleukin-6 (IL-6) und Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α), jedoch sind sie im Kolostrum und im Fohlenserum nach dem Säugen messbar [39, 40]. Ungeachtet dessen wurde IL-10 weder im Serum noch im Kolostrum der Stuten zum Zeitpunkt des Abfohlens nachgewiesen [40]. Dies ist hinweisend darauf, dass der Transfer von Zytokinen auf das Fohlen über das Kolostrum selektiv ist und eine Entzündungsreaktion auslöst, da IL-6 und TNF-α beides Entzündungsmediatoren sind. Es wird angenommen, dass das die allgemeine „Wachsamkeit“ des Immunsystems direkt nach der Geburt steigern soll. Das Verständnis für die Rolle von maternalen, passiv übertragenen Zytokinen bei der Entwicklung des neonatalen Immunsystems ist aktuell noch sehr unvollständig.

Equines Kolostrum enthält zudem viele CD4+ Lymphozyten (= T-Helferzellen) und CD8+ Lymphozyten (= zytotoxische T-Zellen), sowie einige B-Zellen. Die Unterschiede der Menge bzw. des Vorkommens von Immunzellen im peripheren Blut der Stuten und im Kolostrum weisen darauf hin, dass zytotoxische T-Zellen, Interferon-γ (IFN-γ) und IL-17 produzierende T-Helferzellen in einem selektiven Vorgang auf das Kolostrum übertragen werden [41]. Diese Erkenntnisse rechtfertigen weitere Untersuchungen bzgl. der potentiellen Rolle von maternalen T-Zellen bei der „Bereitstellung“ von passiver zellulärer Immunität und des Einflusses auf die Aktivierung, Modulation und Entwicklung des Immunsystems von neonaten Fohlen.

In welchem Alter sollte ein Fohlen die erste Impfung der Grundimmunisierung gegen EIV bekommen?

Für neugeborene Fohlen stellt das Kolostrum und damit verbunden die Aufnahme von maternalen Antikörpern (maternally derived antibodies = MDA) die erste und initial einzige „Immunabwehr“ dar [5]. Dabei ist entscheidend, dass die Stute selbst eine ausreichende Immunisierung durch Impfungen

Tab. 3	Impfung trächtiger Stuten.	Vaccination of pregnant mares.
	Impfung trächtiger Stuten im 4. bis 5. und 8. Monat	EHV-1 (Lebendvakzine)
	oder im 5. und 7. sowie 9. Monat der Trächtigkeit (vorzugsweise sollte für die Wiederholungsimpfungen innerhalb einer Trächtigkeit der gleiche Impfstoff verwendet werden)	EHV-1 (inaktivierte Vakzine)
	im 4. bis 5. und 10. bis 11. Monat der Trächtigkeit	EIV

vor und während der Trächtigkeit erhalten hat (siehe dazu die Impfpfehlungen für trüchtige Stuten der Ständigen Impfkommission Veterinärmedizin (StIKo Vet), Tabelle 3).

Viral ausgelöste Pneumonien bei Fohlen treten am häufigsten im Alter von zwei bis drei Monaten auf. Dies liegt zum einen daran, dass zu diesem Zeitpunkt die maternalen Antikörper (MDA) abnehmen, zum anderen an der noch unzureichenden eigenen Immunantwort der Fohlen bis zum Alter von vier Monaten. Des Weiteren wird ein negativer Einfluss von Umwelt- und Haltungsfaktoren auf die Effektivität der respiratorischen Immunabwehr vermutet [42]. Beispielsweise kann eine Infektion mit EIV bei naiven Neugeborenen (ohne maternale Antikörper) zu einer fatalen und tödlich verlaufenden Pneumonie führen, wie nach dem erstmaligen Influenza Ausbruch in Australien 2007 berichtet wurde [43].

Auf die Frage welcher Zeitpunkt für die Grundimmunisierung von Fohlen gegen EIV optimal ist gibt es keine pauschal gültige Antwort, da dieser von zahlreichen Faktoren wie maternalen Antikörpern, aktuellem Infektionsdruck, verfügbaren Impfstoffen usw. abhängig ist. Grundsätzlich wird bei Fohlen aus geimpften Mutterstuten von verschiedenen Pferdesportverbänden sowie von den Impfstoffherstellern die Impfung V1 meist im Alter von (fünf bis) sechs Monaten empfohlen (siehe Tabelle 1 und 2).

Bei Fohlen, deren Mutterstuten in den letzten zwei Monaten der Trächtigkeit Booster-Impfungen erhalten haben, können im Serum die über das Kolostrum aufgenommenen maternalen Antikörper (IgG_a und IgG_b Sub-Isotypen) nachgewiesen werden [26]. Die Konzentration dieser spezifischen maternalen Antikörper sinken (ähnlich wie nach einer Impfung) schnell ab, sind aber bis zu einem Alter von ca. sechs Monaten nachweisbar. Die Immunantwort von IgG_a und IgG_b auf die ersten beiden Impfungen der Grundimmunisierung von sechs Monate alten Fohlen war ähnlich zu der von erstmals geimpften Jährlingen, aber die Höhe der Antikörper-Titer war etwas niedriger [26]. Schaut man sich im Gegensatz dazu den Titerverlauf von Fohlen an, die ihre Erstimpfung mit drei Monaten erhalten haben, zeigt sich, dass kein deutlicher Anstieg der IgG Sub-Isotypen auf V1 und V2 stattfindet. Diese zum Zeitpunkt V1 drei Monate alten Fohlen benötigen eine bis drei zusätzliche Booster-Impfungen, um auf ähnliche Titer wie die mit nur zwei Dosen geimpften Jährlinge zu kommen. In der eben in Kurzform beschriebenen Studie zeigte sich beim Fohlen ein hemmender Effekt von maternalen Antikörpern (MDA) auf die humorale Antwort auf inaktivierte Influenza-Antigene [26]. Passiv aufgenommene maternale Antikörper haben also das Potential, die Immunantwort von Fohlen auf inaktivierte Impfstoffe zu beeinflussen [44]. Auch einige ältere Studien stellten die Theorie auf, dass Fohlen < 6 Monaten keine ausreichende serologische Immunantwort auf inaktivierte Influenza Impfstoffe zeigen [24, 25, 44]. Die Ergebnisse müssen aber mit Vorsicht interpretiert werden, da nur die humorale Immunantwort gemessen und bewertet wird. Die zelluläre Immunantwort oder lokale „Abwehrmechanismen“ des Respirationstrakt werden dabei außer Acht gelassen.

Etwas anders sieht es beim Einsatz des modifizierten Kanarienvirus-impfstoffs ProteqFlu® (Boehringer Ingelheim) aus, der wie von der World Organisation for Animal

Health (WOAH – ehemals OIE) empfohlen, sowohl FC1 (A/eq/Ohio/03) als auch FC 2 (A/eq/Richmond/1/07) enthält. Nach der Impfung exprimieren die Viren die für den Impfschutz verantwortlichen Proteine, ohne sich selbst im Pferd zu vermehren. Bei diesem Impfstoff gibt es widersprüchliche Ansichten und Studien dazu, ob maternale Antikörper bzw. das Alter der Fohlen bei der Erstimpfung V1 langfristig einen negativen Effekt auf die Antikörpertiter haben [45–48].

In einer Studie aus 2007 zeigte sich, dass eine Impfung mit ProteqFlu® von Fohlen im Alter von 10 bis 20 Wochen unter Anwesenheit von maternalen Antikörpern das Immunsystem effektiv und positiv beeinflusst hat [46]. Die Impfung führte nach V1 zwar nicht zur Synthese von EI-spezifischen Antikörpern unter der Anwesenheit der MDA, aber nach erneutem Kontakt (V2) wurde ein schneller und deutlicher Anstieg von Antikörpern nachgewiesen, der typisch für eine sekundäre Impfantwort ist. Die nach der Impfung ausgelöste T-Zellen Immunantwort wurde nicht negativ durch die MDA beeinflusst.

Während des großen Influenza Ausbruchs in Australien 2007, ein Land in dem die Influenza-Impfung beim Pferd bis zu diesem Zeitpunkt untersagt war, wurden „beschleunigte Impfprotokolle“ mit kürzeren Intervallen zwischen den Impfungen sowie eine Impfung von Fohlen < 4 Monaten mit ProteqFlu® als Strategie zur Ausbruchseindämmung angewendet [45]. Dabei zeigte sich, dass alle Pferde in allen Altersgruppen – Fohlen (< 3 Monate), Jährlinge und adulte Rennpferde, sowie Ponys – nach der Grundimmunisierung (V1 + V2) Antikörpertiter entwickelt hatten, die ausreichend wären um vor einer Infektion zu schützen und die deutlich durch die Drittimpfung V3 geboostert wurden. Es gab auch in dieser Studie [45] keine Unterschiede in der serologischen Immunantwort nach der Grundimmunisierung mit ProteqFlu® zwischen Fohlen < 3 Monaten und Jährlingen. Hierbei ist allerdings zu vermerken, dass die australischen Fohlen keine maternalen Antikörper gegen EIV hatten und deshalb deren vermutete hemmende Wirkung auf die eigene Antikörper-Synthese nicht zu tragen kam.

Eine andere Studie [47], die an insgesamt 66 ungeimpften Vollblut-Absetzern durchgeführt wurde, welche mit fünf unterschiedlichen Impfstoffen (Duvaxyn IE-T Plus® (Fort Dodge), Equilis Resequin® (Intervet), Equip FT® (Schering Plough), Equilis Prequenza Te® (Intervet) und ProteqFlu-Te® (Merial)) grundimmunisiert wurden, zeigte andere Ergebnisse: Bei fünf der 66 Absetzer waren zum Zeitpunkt der Erstimpfung V1 SRH Antikörper messbar, die mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit maternalen Ursprungs (MDA) waren. „Absetzer 1“ wurde mit Duvaxyn IE-T Plus® geimpft, er zeigte keine humorale Immunantwort auf V1, aber reagierte gut auf V2 und V3. „Absetzer 2 und 3“ wurden mit Equilis Resequin® geimpft, beide sprachen weder auf V1 noch auf V2 an, zeigten aber eine gute Immunantwort auf die Drittimpfung V3. Bei „Absetzer 4“ wurde Equilis Prequenza Te® genutzt, auch er zeigte keine humorale Immunantwort auf V1, aber reagierte gut auf V2 und V3. Zuletzt wurde noch „Absetzer 5“ mit ProteqFlu Te® geimpft. Analog zu „Absetzer 2 und 3“ sprach er weder auf V1 noch auf V2 an, zeigte aber eine gute Immunantwort auf die Drittimpfung V3. Dementsprechend wurden bei „Absetzer 5“ (n = 1), der mit dem Kanarienvirus-basierten EI Impfstoff unter der Anwesenheit von MDA grundimmunisiert wurde, keine bzw.

nicht schützende SRH Antikörpertiter zwischen V2 und V3 + 3 Monate gemessen [47].

Eine etwas größer angelegte Studie aus 2016 [48] konnte dieses Ergebnis untermauern. Nur 9 von 26 Fohlen (34,6%), die bei Vorliegen von maternalen Antikörpern mit ProteqFlu-Te® (Merial) grundimmunisiert wurden, zeigten messbare SRH Antikörpertiter zwei Wochen nach V2. Des Weiteren hatten die MDA einen signifikanten Einfluss auf die drei Monate nach V3 gemessenen SRH Antikörpertiter. Dem zugrunde liegen komplexe immunologische Prozesse, die eine weitere Erforschung nötig machen.

Zusammenfassend ist aber zu sagen, dass die Beeinträchtigung der Immunantwort durch maternale Antikörper mehrfach beschrieben wurde [24, 44], aber die Auswirkung dieser Interaktion vom Impfstoff-Typ abhängig ist. Des Weiteren sind fast alle zugelassenen Impfstoffe dahingehend optimiert, eine Immunität in adulten Pferden auszulösen und berücksichtigen dabei nicht die spezifischen Eigenschaften des neonatalen Immunsystems.

Von inaktivierten und/oder Sub-Unit Impfstoffen ist bekannt, dass sie von maternalen Antikörpern neutralisiert werden [49]. Das Fehlen einer direkten Interaktion zwischen MDA und dem Kanarienvogel-pocken-basierten EI Impfstoff ProteqFlu® könnte erklären, warum ein signifikanter Anstieg erst relativ spät (V3 + 3 Monate) nachweisbar wird. Zu diesem Zeitpunkt sind die Unterschiede in der Immunogenität möglicherweise besser nachweisbar als zum Zeitpunkt des Peaks der Immunität (z.B. V2 + 2 Wochen) [48].

Die Grundimmunisierung von Fohlen unter vier Monaten scheint wie eben ausgeführt nicht den „Optimalschutz“ in Bezug auf die humorale Immunantwort zu bieten. In Einzelfällen kann eine solche Impfstrategie jedoch nötig sein, z.B. angesichts eines akuten Influenza-Ausbruchs oder eines erhöhten Kontakttrisikos mit EIV, um die Zeitspanne der Empfänglichkeit für eine EI-Infektion zu reduzieren. Auch bei Fohlen, deren Mutterstuten nicht geimpft sind, sollte die Grundimmunisierung gegen EIV nach aktuellen Empfehlungen der StIKo Vet bereits mit vier Monaten erfolgen, unabhängig von der Art des Impfstoffes.

Welches Impfschema ist bei der Grundimmunisierung gegen EIV zu empfehlen?

Es ist eine komplexe Aufgabe, die Pferdepopulation ausreichend vor EIV zu schützen. Es gibt erhebliche individuelle Unterschiede in der Immunantwort bei Fohlen nach der Impfung, weshalb vermutet wird, dass sowohl das angeborene Immunsystem, als auch das Alter der Fohlen und „Stress“ (Training, Futterwechsel, Transport usw.) einen Einfluss auf die Immunantwort haben können [50]. Insgesamt bleibt die Immunisierung eines möglichst großen Anteils der Population die effektivste Methode vor EI (und anderen Pathogenen) zu schützen.

Auch bei der Frage welches Impfschema bei der Grundimmunisierung gegen EIV zu empfehlen ist gibt es verschiedene Ansätze, unterschiedliche Vorgaben der Pferdesportverbände und der Impfstoffhersteller (siehe Tabelle 1 und 2), und na-

türlich zahlreiche Studien bzw. wissenschaftliche Erkenntnisse, die im Folgenden dargestellt werden sollen.

Nach dem „Erstschutz“ vor EI durch aufgenommene maternale Antikörper von geimpften Mutterstuten direkt nach der Geburt stellt die Grundimmunisierung, bestehend aus drei Impfungen, durch die Bildung von spezifischen Antikörpern die nächste Schutzmaßnahme gegen EIV dar. Ob ein klinischer (Werte von $\geq 85 \text{ mm}^2$) oder sogar virologischer (Werte von $\geq 154 \text{ mm}^2$) Schutz vor EI besteht hängt von den durch die Impfung ausgelösten SRH Antikörper-Titern zum Zeitpunkt der Infektion ab [7, 51, 52], sofern das zirkulierende Virus („Wildtyp“) dem im Impfstoff enthaltenen Virusstamm ähnelt. Es ist zu beachten, dass nach der Applikation einer einmaligen Impfdosis (Erstimpfung V1) noch keine ausreichenden Antikörpermengen gebildet werden, um Fohlen einen Schutz vor EI zu bieten [13, 48]. In den ersten zwei bis vier Wochen nach der zweiten Impfung (V2) steigen die EIV Antikörper-Titer (normalerweise – ausgenommen bei sog. „Impfversagern“) deutlich an und sinken dann zwischen V2 und V3 wieder [13, 53]. Innerhalb von drei Monaten nach V2 reduzieren sich die Antikörper von Konzentrationen mit virologischem Schutz auf Konzentrationen, die nur noch einen klinischen Schutz bieten [44, 51, 53–56]. Daraus ergibt sich ein Zeitfenster für eine mögliche Empfänglichkeit für EI bzw. Infektion mit EIV, die sog. „Immunity Gap“ (= SRH Antikörperkonzentrationen $< 85 \text{ mm}^2$) [53, 57].

In mehreren Studien wurde untersucht, was der optimale zeitliche Abstand zwischen den ersten drei Impfungen ist, um einen bestmöglichen Schutz zu gewährleisten. Cullinane et al. (2014) haben drei verschiedene Protokolle für die Grundimmunisierung bei 55 seronegativen, ungeimpften Pferden verschiedener Rassen in Bezug auf ihre Effektivität miteinander verglichen: Gruppe 1 erhielt die Impfungen mit dem geringsten zeitlichen Abstand, die der Pferderennsport-Verband erlaubt (V1, 3 Wochen später V2 und 5 Monate später V3), wohingegen Gruppe 3 mit dem größtmöglichen erlaubten Abstand (V1, 13 Wochen später V2 und 7 Monate später V3) geimpft wurde. Gruppe 2 wurde analog der Herstellerangaben geimpft (V1, 6 Wochen später V2 und 5 Monate später V3). Alle Pferde wurden mit Equip FT® (Zoetis) geimpft. Die Kinetik der humoralen Immunantwort auf die Impfungen war bei allen drei Gruppen gleich. Alle drei Gruppen erreichten drei Wochen nach V1 ähnlich hohe Antikörper-Titer (Gruppe 1: $85 \pm 19,7 \text{ mm}^2$, Gruppe 2: $77 \pm 19,7$ und Gruppe 3: $91 \pm 19,6 \text{ mm}^2$). Gruppe 1 erhielt zu diesem Zeitpunkt (3 Wochen nach V1) direkt die Zweitimpfung V2. Das kurze Impfindervall von drei Wochen zwischen V1 und V2 in Gruppe 1 rief keine unerwünschten Nebenwirkungen hervor. In Gruppe 2 und 3 sanken die Antikörper-Konzentrationen aufgrund des längeren Zeitraums bis zur Zweitimpfung (Gruppe 2: 6 Wochen und Gruppe 3: 13 Wochen bis V2) langsam wieder ab auf Werte, die unterhalb des Schwellenwertes für klinischen Schutz lagen (Gruppe 2: $59 \pm 15,1$ und Gruppe 3: $37 \pm 9,1 \text{ mm}^2$). Der niedrigste gemessene Wert zum Zeitpunkt von V2 bei Gruppe 3 ergibt sich aus der Verlängerung des Impfindervalls zwischen V1 und V2 auf 13 Wochen. Nach der Zweitimpfung V2 zeigten erneut alle drei Gruppen eine deutliche Immunantwort. Dabei wurden (unabhängig von der Gruppe) drei Wochen nach V2 Konzentrationen erreicht, die mit virologischem Schutz einhergehen (Gruppe 1: $189 \pm 12,8 \text{ mm}^2$, Gruppe 2: $191 \pm 5,9$ und Gruppe 3:

192 ± 6,4 mm²). Der normalen Kinetik folgend sanken die Antikörper-Titer innerhalb von vier Monaten nach V2 dann wieder auf Werte, die nur noch klinischen Schutz boten. Da in Gruppe 3 die letzte Impfung der Grundimmunisierung V3 erst nach sieben Monaten erfolgte, nicht wie bei den anderen beiden Gruppen bereits nach fünf Monaten, war die Zeitspanne einer möglichen Empfänglichkeit für EIV zwischen V2 und V3 (aufgrund des längeren Zeitraums mit niedrigen Antikörpern) signifikant länger. Alle drei Gruppen zeigten aber unabhängig vom Impfintervall eine starke Immunantwort nach V3 und erreichten erneut Konzentrationen, die oberhalb des Schwellenwertes für virologischen Schutz lagen [54].

Paillot et al. (2015) untersuchten ebenfalls die Auswirkungen eines verkürzten Impfintervalls von drei Wochen zwischen V1 und V2 bei der Grundimmunisierung mit Equip FT® (Zoetis). Zwei Wochen nach V2 (Tag 56) und zwei Wochen nach V3 (Tag 209) wurden die EIV-spezifischen Antikörper-Konzentrationen gemessen und die beiden Gruppen miteinander verglichen, um den Einfluss eines verkürzten Protokolls der Grundimmunisierung in Bezug auf die humorale Immunantwort zu evaluieren. An Tag 56 (V2 + 2 Wochen) und an Tag 209 (V3 + 2 Wochen) hatten ca. 50% bzw. 80% der geimpften Pferde aus beiden Gruppen eine SRH Antikörper-Konzentration von > 150 mm². Das verkürzte Drei-Wochen-Intervall bei der Grundimmunisierung gegen EIV wurde gut toleriert, bewirkte während des Studienzeitraums eine gute humorale Immunantwort und eröffnet eine Möglichkeit, den ISCOM-basierten Impfstoff dazu zu nutzen den Zeitraum der Grundimmunisierung gegen EIV zu verkürzen [58].

In einer neueren Studie von Dilai et al. (2021) wurde der Impfstoff Equilis Prequenza-TE® (MSD) an Vollblutfohlen eingesetzt. Es wurden ebenfalls verschiedene Zeitintervalle (ein, zwei oder drei Monate) zwischen V1 und V2 miteinander verglichen und alle 21 Fohlen erhielten V3 dann sechs Monate nach V2, unabhängig von ihrer Gruppe. Die Antikörper-Antwort wurde regelmäßig mittels SRH-Test bis ein Jahr nach V3 gemessen. Alle Fohlen serokonvertierten und überschritten den Grenzwert für klinischen Schutz zwei Wochen nach V2 bzw. einen Monat nach V3. Es gab aber dennoch signifikante Unterschiede bzgl. des „Peaks“ der Immunität (= höchste gemessene Antikörper-Konzentration) nach V2, sowie für den Zeitraum der „Immunitätslücke“ zwischen V2 und V3. Die Gruppe, die nach einem Monat V2 erhielt, zeigte die niedrigsten maximalen Antikörper-Konzentrationen (158,05 ± 6,63 mm²) nach V2 und hatte dementsprechend auch ein längeres Zeitintervall (18 Wochen) für eine mögliche Empfänglichkeit für EIV zwischen V2 und V3, verglichen mit den anderen beiden Gruppen (Maximalwerte von 174,72 ± 6,86 mm² und 16 Wochen „Immunitätslücke“ zwischen V2 und V3 bei einem zweimonatigem Intervall und Maximalwerte von 221,45 ± 14,48 mm² und 12 Wochen „Immunitätslücke“ zwischen V2 und V3 bei einem dreimonatigem Intervall). Je kürzer das Impfintervall zwischen V1 und V2 ist, desto niedriger ist also der Peak der Antikörperkonzentration. Der Vorteil eines kurzen Impfintervalls von einem Monat ist aber, dass eine frühere schützende Immunität geboten wird. Dies bedeutet jedoch auch, dass sich die „Immunitätslücke“ nach V2 im Vergleich zu Fohlen, die mit einem zwei- oder dreimonatigen Intervall geimpft wurden, entsprechend verlängert. Dieser „Nachteil“ relativiert sich aber vier Wochen nach V3

wieder, da die Gruppe mit dem kürzesten Impfintervall (von einem Monat zwischen V1 und V2) in dieser Studie die höchsten Antikörper-Konzentrationen (193,1 ± 9,8 mm²) erreichte. Die Gruppe mit dem zwei-monatigen Intervall erreichte Werte von 139,5 ± 14,7 mm² und die Gruppe mit dem drei-monatigen Intervall von 166,5 ± 11,3 mm². Danach begannen die Titer in allen Gruppen wieder zu sinken, aber blieben bis ein Jahr nach V3 bei Gruppe 1 (Ein-Monats-Intervall), für 11 Monate nach V3 bei Gruppe 2 (Zwei-Monats-Intervall) und für 10 Monate nach V3 bei Gruppe 3 (Drei-Monats-Intervall) oberhalb des Grenzwertes für klinischen Schutz (85 mm²) [59].

Trotz der eben bereits mehrfach erwähnten „Immunitätslücke“ sind Fohlen in den Lebensmonaten drei bis sechs nicht vollständig ungeschützt. In zahlreichen Studien wurde die Effektivität verschiedener Impfstoffe durch experimentelle Infektion mit EIV zu verschiedenen Zeitpunkten der Grundimmunisierung getestet und stets wurde ein guter oder zumindest partieller Schutz vor EI nachgewiesen [53, 56, 58, 60-65].

Zusammenfassend gilt also, dass ein verkürztes Intervall zwischen V1 und V2 keinerlei negative Effekte verursacht [54, 58, 66], aber der Versuch den Zeitraum der sog. „Immunity Gap“ zwischen V2 und V3 (z.B. auf nur zwei Monate) zu reduzieren eher kontraproduktiv ist und mit einer geringeren humoralen Immunantwort auf die folgenden Booster-Impfungen einhergeht [67]. Es wird angenommen, dass vorhandene (noch hohe) EIV-spezifische Antikörper-Titer zum Zeitpunkt der Impfung signifikant mit einer verringerten oder fehlenden Immunantwort auf die Booster-Impfung korrelieren [13, 67].

Studien belegen wiederum auch, dass ein höheres Infektionsrisiko für EI besteht, wenn Booster-Impfungen länger als sechs Monate her sind, unabhängig vom genutzten Impfstoff [15, 68, 69].

Neben dem Zeitpunkt der Impfungen (V1, V2 und V3) spielen auch noch andere Faktoren während der Grundimmunisierung eine Rolle, z.B. welcher Impfstoff aktuell lieferbar ist und ob die Immunisierung gegen EIV simultan mit der Impfung gegen Equines Herpesvirus (EHV) erfolgen soll. Aufgrund von immer wieder vorkommenden Lieferengpässen des von der World Organisation for Animal Health (WOAH – ehemals OIE) empfohlenen Influenza-Impfstoffs ProteqFlu®, wie zuletzt 2022/23 [14], ist es wichtig zu wissen, dass ein Wechsel des Impfstoffs im Zuge der Grundimmunisierung keinen nachteiligen Einfluss auf den Schutz vor einer EIV-Infektion sondern viel mehr einen positiven Effekt auf den SRH Antikörper-Titer hat [11].

Auch die Frage, ob eine Simultanimpfung gegen Influenza, Herpes und Tetanus einen negativen Einfluss auf die humorale Immunantwort hat, wurde in einer Studie aus 2021 untersucht. Dafür wurden 71 weibliche Warmblut Absetzer zeitgleich oder mit einem zweiwöchigen Abstand (analog der Empfehlung der StIKoVet) gegen Tetanus, EIV und EHV mit Equip FT® (Zoetis) und Equip EHV 1,4® (Zoetis) geimpft. Der Anstieg der EIV spezifischen SRH-Antikörper war in beiden Protokollen gleich und es gab keine unerwünschten Reaktionen in der simultan geimpften Gruppe. Aufgrund dieser Studienergebnisse kann die Simultan-Impfung gegen Influenza, Herpes und Tetanus bei der Grundimmunisierung von Fohlen empfohlen werden [70].

Fazit

Um Züchter und Pferdebesitzer optimal beraten zu können bzgl. der Frage „Grundimmunisierung gegen Equine Influenza bei Fohlen: wann, wie und womit?“ müssen viele Gegebenheiten bedacht werden. Es ist immer eine individuelle Entscheidung abhängig vom Impfstatus der Stute vor der Geburt, vom geplanten Alter des Fohlens bei der Erstimpfung (V1), vom aktuellen Infektionsdruck und natürlich zu guter Letzt von der Verfügbarkeit der Impfstoffe und der Praktikabilität. Es lässt sich dementsprechend kein allgemein gültiges „Standardschema“ für die Grundimmunisierung gegen EI festlegen. Allerdings lassen sich neue nützliche Erkenntnisse in Bezug auf die Grundimmunisierung von Fohlen gegen Influenza zusammenfassen:

- das Verkürzen der Impfintervalle V2 – V3 führt zu einer geringeren humoralen Immunantwort gegen EI
- das Wechseln der Impfstoff-Typen führt zu einer höheren humoralen Immunantwort gegen EI
- eine Simultan-Impfung gegen Influenza, Herpes und Tetanus wirkt sich nicht nachteilig auf die humorale Immunantwort gegen EI aus

Erklärung zum Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass zu genannten Herstellern der Impfstoffe kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

- Cullinane A, Newton JR (2013) Equine influenza – A global perspective. *Vet Microbiol* 167 (1–2), 205–14, DOI 10.1016/j.vetmic.2013.03.029
- Cullinane A, Elton D, Mumford J (2010) Equine influenza - surveillance and control. *Influenza Other Respir Virus* 4, 339–344, DOI 10.1111/j.1750-2659.2010.00176.x
- Glass K, Wood JL, Mumford JA, Jesset D, Grenfell BT (2002) Modelling Equine Influenza 1: A Stochastic Model of Within-Yard Epidemics. *Epidemiol Infect* 128, 491–502, DOI 10.1017/S0950268802006829
- van Maanen C, Cullinane A (2002) Equine influenza virus infections: an update. *Vet Q* 24, 79–94, DOI 10.1080/01652176.2002.9695127
- Paillot R, Hannant D, Kydd JH, Daly JM (2006) Review: Vaccination against equine influenza: Quid novi? *Vaccine* 24, 4047–4061, DOI 10.1016/j.vaccine.2006.02.030
- Paillot R (2014) A Systematic Review of Recent Advances in Equine Influenza Vaccination. *Vaccines* 2, 797–831, DOI 10.3390/vaccines2040797
- Mumford JA, Wood J (1992) Establishing an acceptability threshold for equine influenza vaccines. *Dev Biol Stand* 79, 137–146, PMID 1286748
- Thein P, Düe M, Röhm A, Lagershausen H (2017) Equine Influenza – Vergleichende Untersuchungen zu Impfungen und serologischen Ergebnissen an 636 Pferden im Zeitraum 2013–2017. *Pferdeheilkunde* 33, 597–611, DOI 10.21836/PEM20170608
- OIE (2019) Equine influenza (infection with equine influenza virus) - Chapter 3.6.7. In: *Terrestrial Manual*
- OIE (2010) Expert Surveillance Panel on Equine Influenza Vaccine Composition - Conclusions and Recommendations. *Off Int Epizoot Bull* 2, 44–45
- Dilai M, Piro M, El Harrak M, Fougerolle S, Dehhaoui M, Dikralah A, Legrand L, Paillot R, Fassi Fihri O (2018) Impact of Mixed Equine Influenza Vaccination on Correlate of Protection in Horses. *Vaccines* 6, 71, DOI 10.3390/vaccines6040071
- Gildea S, Quinlivan M, Murphy BA, Cullinane A (2013) Humoral response and antiviral cytokine expression following vaccination of thoroughbred weanlings--a blinded comparison of commercially available vaccines. *Vaccine* 31, 5216–5222, DOI 10.1016/j.vaccine.2013.08.083
- Gildea S, Arkins S, Walsh C, Cullinane A (2011) 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, DOI 10.1016/j.vaccine.2011.03.003
- Newton JR, Rendle DI, Mountford DR, Marr CM (2023) Equine influenza vaccination catches an autumn cold! But must get over it as soon as it can. *Equine Vet J* 55, 142, DOI 10.1111/evj.13885
- Colgate VA, Newton JR (2023) Equine influenza bi-annual boosters: What does the evidence tell us? *Equine Vet J* 55, 147–152, DOI 10.1111/evj.13898
- Cullinane A, Gahan J, Walsh C, Nemoto M, Entenfeller J, Olguin-Perglione C, Garvey M, Huang Fu TQ, Venner M, Yamanka T et al. (2020) Evaluation of Current Equine Influenza Vaccination Protocols Prior to Shipment, Guided by OIE Standards. *Vaccines* 8, 107, DOI 10.3390/vaccines8010107
- Sheoran AS, Timoney JF, Holmes MA, Karzenski SS, Crisman MV (2000) Immunoglobulin isotypes in sera and nasal mucosal secretions and their neonatal transfer and distribution in horses. *Am J Vet Res* 61, 1099–1105, DOI 10.2460/ajvr.2000.61.1099
- Holznagel DL, Hussey S, Mihalyi JE, Wilson WD, Lunn DP (2003) Onset of immunoglobulin production in foals. *Equine Vet J* 35, 620–622, DOI 10.2746/042516403775467153
- Wagner B, Flaminio JBF, Hillegas J, Leibold W, Erb HN, Antczak DF (2006) Occurrence of IgE in foals: Evidence for transfer of maternal IgE by the colostrum and late onset of endogenous IgE production in the horse. *Vet Immunol Immunopathol* 110, 269–278, DOI 10.1016/j.vetimm.2005.10.007
- Wagner B, Burton A, Ainsworth D (2010) Interferon-gamma, interleukin-4 and interleukin-10 production by T helper cells reveals intact Th1 and regulatory TR1 cell activation and a delay of the Th2 cell response in equine neonates and foals. *Vet Res* 41, 47, DOI 10.1051/vetres/2010019
- Boyd NK, Cohen ND, Lim WS, Martens RJ, Chaffin MK, Ball JM (2003) Temporal changes in cytokine expression of foals during the first month of life. *Vet Immunol Immunopathol* 92, 75–85, DOI 10.1016/S0165-2427(03)00021-7
- Breathnach CC, Sturgill-Wright T, Stiltner JL, Adams AA, Lunn DP, Horohov DW (2006) Foals are interferon gamma-deficient at birth. *Vet Immunol Immunopathol* 112, 199–209, DOI 10.1016/j.vetimm.2006.02.010
- Wagner B, Stokol T, Ainsworth DM (2010) Induction of interleukin-4 production in neonatal IgE + cells after crosslinking of maternal IgE. *Dev Comp Immunol* 34, 436–444, DOI 10.1016/j.dci.2009.12.002
- van Maanen C, Bruin G, de Boer-Luijtz E, Smolders G, de Boer GF (1992) Interference of maternal antibodies with the immune response of foals after vaccination against equine influenza. *Vet Q* 14, 13–17, DOI 10.1080/01652176.1992.9694319
- Oirschot JT, Bruin G, Boer-Luytze E, Smolders G (1991) Maternal Antibodies against Equine Influenza Virus in Foals and their Interference with Vaccination. *J Vet Med (Series B)* 38, 391–396, DOI 10.1111/j.1439-0450.1991.tb00887.x
- Wilson WD, Mihalyi JE, Hussey S, Lunn DP (2001) Passive transfer of maternal immunoglobulin isotype antibodies against tetanus and influenza and their effect on the response of foals to vaccination. *Equine Vet J* 33, 644–650, DOI 10.2746/042516401776249435
- Bresgen C, Lammer M, Wagner B, Osterrieder N, Damiani AM (2012) Serological responses and clinical outcome after vaccination of mares and foals with equine herpesvirus type 1 and

- 4 (EHV-1 and EHV-4) vaccines. *Vet Microbiol* 160, 9–16, DOI 10.1016/j.vetmic.2012.04.042
- 28 Perkins GA, Wagner B (2015) The development of equine immunity: Current knowledge on immunology in the young horse. *Equine Vet J* 47, 267–74, DOI 10.1111/evj.12387
- 29 McCue PM (2014) Colostrum Banking. In: *Equine Reproductive Procedures*. United States, North America, John Wiley & Sons Inc., 299–301
- 30 Rampacci E, Mazzola K, Beccati F, Passamonti F (2022) Diagnostic characteristics of refractometry cut-off points for the estimation of immunoglobulin G concentration in mare colostrum. *Equine Vet J* 55, 102–110, DOI 10.1111/evj.13568
- 31 Liepman RS, Dembek KA, Slovis NM, Reed SM, Toribio RE (2015) Validation of IgG cut-off values and their association with survival in neonatal foals. *Equine Vet J* 47, 526–530, DOI 10.1111/evj.12428
- 32 Ujvari S, Schwarzwald CC, Fouché N, Howard J, Schoster A (2017) Validation of a point-of-care quantitative equine IgG turbidimetric immunoassay and comparison of IgG concentrations measured with radial immunodiffusion and a point-of-care IgG ELISA. *J Vet Intern Med* 31, 1170–1177, DOI 10.1111/jvim.14770
- 33 Abraham M, Bauquier J (2021) Causes of equine perinatal mortality. *Vet J* 273, 105675, DOI 10.1016/j.tvjl.2021.105675
- 34 Davis R, Giguere S (2005) Evaluation of five commercially available assays and measurement of serum total protein concentration via refractometry for the diagnosis of failure of passive transfer of immunity in foals. *J Am Vet Med Assoc* 227, 1640–1645, DOI 10.2460/javma.2005.227.1640
- 35 de Sobral GG, Gonçalves Neto OCG, da Silva AM, Carneiro GF (2021) Evaluation of Optical Refractometer for Assessing Failure of Transfer of Passive Immunity in Foals. *J Equine Vet Sci* 106, 103758, DOI 10.1016/j.jevs.2021.103758
- 36 Elsohaby I, Riley CB, McClure JT (2019) Usefulness of digital and optical refractometers for the diagnosis of failure of transfer of passive immunity in neonatal foals. *Equine Vet J* 51, 451–457, DOI 10.1111/evj.13040
- 37 Wagner B (2006) Development of immunoglobulins and immunoglobulin genes of the horse. *Dev Comp Immunol* 30, 155–164, DOI 10.1016/j.dci.2005.06.008
- 38 Walther S, Rusitzka TV, Diesterbeck US, Czerny C-P (2015) Equine immunoglobulins and organization of immunoglobulin genes. *Dev Comp Immunol* 53, 303–319, DOI 10.1016/j.dci.2015.07.017
- 39 Secor EJ, Matychak MB, Felipe MJB (2012) Transfer of tumour necrosis factor- α via colostrum to foals. *Vet Rec* 170, 51, DOI 10.1136/vr.100220
- 40 Burton AB, Wagner B, Erb HN, Ainsworth DM (2009) Serum interleukin-6 (IL-6) and IL-10 concentrations in normal and septic neonatal foals. *Vet Immunol Immunopathol* 132, 122–128, DOI 10.1016/j.vetimm.2009.05.006
- 41 Perkins GA, Goodman LB, Wimer C, Freer H, Babasyan S, Wagner B (2014) Maternal T-lymphocytes in equine colostrum express a primarily inflammatory phenotype. *Vet Immunol Immunopathol* 161, 141–150, DOI 10.1016/j.vetimm.2014.07.009
- 42 Rush B, Mair T (2004) Juvenile Pneumonia. In: *Equine Respiratory Diseases*, Blackwell Science Ltd., 251–70
- 43 Patterson-Kane JC, Carrick JB, Axon JE, Wilkie I, Begg AP (2008) The pathology of bronchointerstitial pneumonia in young foals associated with the first outbreak of equine influenza in Australia. *Equine Vet J* 40, 199, DOI 10.2746/042516408X292214
- 44 Cullinane A, Weld J, Osborne M, Nelly M, McBride C, Walsh C (2001) Field studies on equine influenza vaccination regimes in thoroughbred foals and yearlings. *Vet J* 161, 174–185, DOI 10.1053/tvj.2000.0546
- 45 Minke JM, El-Hage CM, Tazawa P, Homer D, Lemaitre L, Cozette V, Gilkerson JR, Kirkland PD (2011) Evaluation of the response to an accelerated immunisation schedule using a canarypox-vectored equine influenza vaccine, shortened interdose intervals and vaccination of young foals. *Aust Vet J* 89, 137–139, DOI 10.1111/j.1751-0813.2011.00767.x
- 46 Minke JM, Toulemonde CE, Dinic S, Cozette V, Cullinane A, Audonnet JC (2007) Effective Priming of Foals Born to Immune Dams against Influenza by a Canarypox-Vectored Recombinant Influenza H3N8 Vaccine. *J Comp Pathol* 137 (Suppl. 1), 76–80, DOI 10.1016/j.jcpa.2007.04.016
- 47 Gildea S, Arkins S, Walsh C, Cullinane A (2011) A comparison of antibody responses to commercial equine influenza vaccines following primary vaccination of Thoroughbred weanlings – A randomised blind study. *Vaccine* 29, 9214–9223, DOI 10.1016/j.vaccine.2011.09.101
- 48 Fougere S, Legrand L, Garrett D, Birand I, Foursin M, D'Ablon X, Baysat P, Newton RJ, Pronost S, Paillet R (2016) Influential factors inducing suboptimal humoral response to vector-based influenza immunisation in Thoroughbred foals. *Vaccine* 34, 3787–3795, DOI 10.1016/j.vaccine.2016.05.068
- 49 Niewiesk S (2014) Maternal antibodies: clinical significance, mechanism of interference with immune responses, and possible vaccination strategies. *Front Immunol* 5, 446, DOI 10.3389/fimmu.2014.00446
- 50 Slater J, Borchers K, Chambers T, Cullinane A, Duggan V, Elton D, Legrand L, Paillet R, Fortier G (2014) Report of the International Equine Influenza Roundtable Expert Meeting at Le Touquet, Normandy, February 2013. *Equine Vet J* 46, 645–650, DOI 10.1111/evj.12302
- 51 Mumford JA, Jessett D, Dunleavy U, Wood J, Hannant D, Sundquist B, Cook RF (1994) Antigenicity and immunogenicity of experimental equine influenza ISCOM vaccines. *Vaccine* 12, 857–863, DOI 10.1016/0264-410x(94)90297-6
- 52 Newton JR, Townsend HGG, Wood JLN, Sinclair R, Hannant D, Mumford JA (2000) Immunity to equine influenza: relationship of vaccine-induced antibody in young Thoroughbred racehorses to protection against field infection with influenza A/equine-2 viruses (H3N8). *Equine Vet J* 32, 65–74, DOI 10.2746/042516400777612116
- 53 Paillet R, Garrett D, Lopez-Alvarez MR, Birand I, Montesso F, Horspool L (2018) The Immunity Gap Challenge: Protection against a Recent Florida Clade 2 Equine Influenza Strain. *Vaccines* 6, 38, DOI 10.3390/vaccines6030038
- 54 Cullinane A, Gildea S, Weldon E (2014) Comparison of primary vaccination regimes for equine influenza: Working towards an evidence-based regime. *Equine Vet J* 46, 669–673, DOI 10.1111/evj.12214
- 55 Mumford JA, Wilson H, Hannant D, Jessett DM (1994) Antigenicity and Immunogenicity of Equine Influenza Vaccines Containing a Carbomer Adjuvant. *Epidemiol Infect* 112, 421, DOI 10.1017/s0950268800057848
- 56 Paillet R, Prowse L, Montesso F, Stewart B, Jordon L, Newton JR, Gilkerson JR (2013) Duration of equine influenza virus shedding and infectivity in immunised horses after experimental infection with EIV A/eq2/Richmond/1/07. *Vet Microbiol* 166, 22–34, DOI 10.1016/j.vetmic.2013.04.027
- 57 Wood JL, Mumford JA, Mair TS, Slater J (2007) Boosting in equine influenza vaccination schedules: Timing and time for a re-evaluation of requirements of national and international authorities. *Vet J* 174, 449–450, DOI 10.1016/j.tvjl.2007.06.012
- 58 Paillet R, Fraser S, Prowse-Davis L, Rash N, Montesso F, Slootmans N, Thomas A, Besognet B, Meinert T, Ons E et al. (2015) ISCOM-based equine influenza vaccine: Duration of immunity and randomised clinical trials to assess an accelerated schedule of immunisation and efficacy. *Trials Vaccinol* 4, 61–70, DOI 10.1016/j.trivac.2015.07.002

- 59 Dilai M, Fassi Fihri O, El Harrak M, Bouchiba A, Dehhaoui M, Mahir W, Dikrallah A, Legrand L, Paillot R, Piro M (2021) An Evaluation of Three Different Primary Equine Influenza Vaccination Intervals in Foads. *J Equine Vet Sci* 99, 103397, DOI 10.1016/j.jevs.2021.103397
- 60 Heldens JG, Pouwels HG, Derks CG, Van de Zande SM, Hoelijmakers MJ (2009) The first safe inactivated equine influenza vaccine formulation adjuvanted with ISCOM-Matrix that closes the immunity gap. *Vaccine* 27, 5530–5537, DOI 10.1016/j.vaccine.2009.06.085
- 61 Soboll G, Hussey SB, Minke JM, Landolt GA, Hunter JS, Jagannatha S, Lunn DP (2010) Onset and duration of immunity to equine influenza virus resulting from canarypox-vectored (ALVAC®) vaccination. *Vet Immunol Immunopathol* 135, 100–107, DOI 10.1016/j.vetimm.2009.11.007
- 62 Minke JM, Toulemonde CE, Coupier H, Guigal PM, Dinic S, Sindle T, Jessett D, Black L, Bublot M, Pardo MC (2007) Efficacy of a canarypox-vectored recombinant vaccine expressing the hemagglutinin gene of equine influenza H3N8 virus in the protection of ponies from viral challenge. *Am J Vet Res* 68, 213–219, DOI 10.2460/ajvr.68.2.213
- 63 Paillot R, Rash NL, Garrett D, Prowse-Davis L, Montesso F, Cullinane A, Lemaitre L, Thibault 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, DOI 10.3390/pathogens5040064
- 64 Paillot R, Prowse L, Montesso F, Huang CM, 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. *Vet Microbiol* 162, 396, DOI 10.1016/j.vetmic.2012.10.019
- 65 Paillot R, Prowse L, Donald C, Medcalf E, Montesso F, Bryant N, Watson J, Jeggo M, Elton D, Newton R et al. (2010) Efficacy of a whole inactivated EI vaccine against a recent EIV outbreak isolate and comparative detection of virus shedding. *Vet Immunol Immunopathol* 136, 272–283, DOI 10.1016/j.vetimm.2010.03.019
- 66 El-Hage CM, Savage CJ, Minke JM, Ficorilli NP, Watson J, Gilkerson JR (2013) Accelerated vaccination schedule provides protective levels of antibody and complete herd immunity to equine influenza. *Equine Vet J* 45, 235–239, DOI 10.1111/j.2042-3306.2012.00605.x
- 67 Heldens JGM, van Loon AAWM, van de Zande S (2007) Is there a benefit from an early booster vaccination in the control of equine influenza? *Vet J* 174, 592–598, DOI 10.1016/j.tvjl.2007.03.004
- 68 Barquero N, Daly JM, Newton JR (2007) Risk factors for influenza infection in vaccinated racehorses: lessons from an outbreak in Newmarket, UK in 2003. *Vaccine* 25, 7520–7529, DOI 10.1016/j.vaccine.2007.08.038
- 69 Gildea S, Arkins S, Cullinane A (2011) Management and environmental factors involved in equine influenza outbreaks in Ireland 2007–2010. *Equine Vet J* 43, 608–617, DOI 10.1111/j.2042-3306.2010.00333.x
- 70 Allkofer A, Garvey M, Ryan E, Lyons R, Ryan M, Lukaseviciute G, Walsh C, Venner M, Cullinane A (2021) Primary vaccination in foals: a comparison of the serological response to equine influenza and equine herpesvirus vaccines administered concurrently or 2 weeks apart. *Arch Virol* 166, 571–579, DOI 10.1007/s00705-020-04846-6

4. Übergreifende Diskussion

Ziel der vorliegenden Studie war zu evaluieren, ob eine zeitgleiche Impfung gegen EIV und EHV-1/4 bei der Grundimmunisierung von Fohlen die Antikörperkinetik bzw. die humorale Immunantwort negativ beeinflusst und ob gegebenenfalls unerwünschte Nebenwirkungen bei zeitgleicher Applikation der Impfstoffe auftreten.

In dieser Studie wurde die Antikörperkinetik gegen EIV (und EHV-1/4) bei der Grundimmunisierung von Fohlen untersucht, wobei zwei verschiedene Impfprotokolle der Grundimmunisierung miteinander verglichen wurden. Es erfolgte entweder eine gleichzeitige oder eine zeitlich getrennte Impfung gegen EIV und EHV-1/4.

Zudem wurde eine Literaturübersicht über die bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnisse zur Immunantwort von Fohlen, zu Qualität und Inhaltsstoffen des Kolostrums und zur Grundimmunisierung gegen das equine Influenzavirus bei Fohlen erstellt. Ziel dieser Literaturübersicht war es, die aktuellsten Ergebnisse von wissenschaftlichen Studien zusammenzufassen und es somit Tierärzten und Tierärztinnen zu erleichtern, ihre Kunden bzgl. Zeitpunkt der Erstimpfung (V1), sowie bzgl. des Impfschemas für die Grundimmunisierung von Fohlen gegen das equine Influenzavirus auf wissenschaftlicher Basis zu beraten.

4.1. Grundimmunisierung bei Fohlen: Vergleich zweier Impfprotokolle hinsichtlich der serologischen Immunantwort auf eine gleichzeitige oder im Abstand von zwei Wochen verabreichte Impfung gegen Influenza- und Herpesvirus-1/4

Die Impfung ist die wirksamste Methode zur Bekämpfung von Viruserkrankungen bei Pferden und wird als eine Investition in die Tiergesundheit angesehen (Cullinane et al. 2010, Kydd et al. 2006). Die Durchführung einer simultanen Impfung anstelle einer separaten Impfung bei der Grundimmunisierung von Fohlen gegen equines Influenzavirus und Herpesvirus-1/4 senkt die Kosten für den Züchter erheblich. Diese Praxis sollte jedoch untersucht werden um festzustellen, ob sie Nachteile - wie einen negativen Einfluss auf die humorale Immunantwort der Fohlen oder unerwünschte Nebenwirkungen - birgt.

Die vorgelegte Studie ist eine Folgestudie zu einer Untersuchung an adulten Rennpferden, bei der ein Influenzaimpfstoff im Zuge der halbjährlichen Auffrischungsimpfung zeitgleich mit einem Herpesimpfstoff verabreicht wurde (Gildea et al. 2016).

Hier (Allkofer et al. 2021) wurde die serologische Immunantwort von weiblichen Absetzern auf eine gleichzeitige oder zeitlich getrennte Grundimmunisierung gegen EIV und EHV-1/4 untersucht, dazu wurden zwei Impfprotokolle miteinander verglichen. Die in die Studie aufgenommenen Pferde - 71 ungeimpfte weibliche Warmblut-Absetzer - wurden für den Dressursport gezüchtet und die geplante EIV-Grundimmunisierung war konform mit den Vorschriften der FN und der FEI. Die Absetzer hatten ein Alter von 183 bis 347 Tagen (Durchschnittsalter: 281 Tage) und wurden nach dem Zufallsprinzip einer der beiden Impfgruppen zugewiesen, wobei Gruppe A (38 Pferde) separat und Gruppe B (33 Pferde) zeitgleich geimpft wurden. Die Impfung gegen EIV und EHV-1/4 wurde auf dem Betrieb, in dem die Studie durchgeführt wurde, routinemäßig durchgeführt. Bis zur Auswertung der Ergebnisse der vorliegenden Studie wurden bei der Grundimmunisierung der Fohlen die EIV- und EHV-1/4 Impfungen im zeitlichen Abstand von zwei Wochen verabreicht.

Ziel der Studie war es festzustellen, ob eine gleichzeitige Impfung bei der Grundimmunisierung eingeführt werden kann, ohne die Sicherheit oder Wirksamkeit der beiden Impfstoffe zu beeinträchtigen.

In dieser Vergleichsstudie erhielten beide Gruppen den Impfstoff EquipFT® (Zoetis Deutschland GmbH, Berlin), der Tetanus-Toxoid enthält. Die Messung der Immunantwort auf Tetanus lag außerhalb des Rahmens des Projektes.

Frühere Studien mit einem ISCOM-basierten Impfstoff ergaben keinen Hinweis darauf, dass die Aufnahme von Tetanustoxoid in einen Influenzaimpfstoff für Pferde eine nachteilige Auswirkung auf die Immunantwort hat (Mumford et al. 1994b).

Zur Messung der Antikörper gegen EIV-Hämagglutinin wurde der Single-Radial-Haemolysis (SRH)-Test verwendet, da eine Korrelation zwischen SRH-Antikörperkonzentrationen und Schutz vor Influenza besteht und zudem international standardisierte Kontrollen von der EDQM (Europäisches Direktorat für die Qualität von Arzneimitteln) zur Verfügung stehen (Mumford et al. 1994b, Mumford et al. 1994c, Newton et al. 2000). In der vorliegenden Studie wurden nur H3N8-Antikörper gegen ein Virus aus der amerikanischen Linie gemessen. Der Impfstoff Equip FT® enthält zwar ein H7N7-Virus, jedoch ist die Antikörperreaktion auf diesen Subtyp nicht klinisch

relevant. Der letzte bestätigte Ausbruch von Pferdeinfluenza, der auf ein H7N7-Virus zurückzuführen war, liegt mehr als vier Jahrzehnte zurück. Seit 2010 empfiehlt die World Organisation for Animal Health (WOAH – gegründet als OIE), dass nur noch Viren der amerikanischen Linie in den Impfstoffen enthalten sein sollen.

Im Gegensatz zu EI gibt es für EHV-1/4 keine eindeutige Korrelation zwischen zirkulierenden Antikörpern und Schutz vor einer Infektion mit Herpesvirus (Goehring et al. 2010a, Goehring et al. 2010b, Heldens et al. 2001, Patel & Heldens 2005). Des Weiteren gibt es keine international anerkannten Reagenzien oder standardisierte Techniken zur Durchführung von serologischen Tests zum Nachweis von EHV-1/4 Antikörpern. Die beiden am häufigsten verwendeten serologischen Tests für EHV-1/4 sind der Virusneutralisationstest (VNT) und der Komplementbindungstest (CFT), von denen keiner typspezifisch ist (Thomson et al. 1976). Sowohl der VNT, als auch der CFT werden zur Messung der Antikörper gegen EHV-1/4 routinemäßig in Impfstoffstudien genutzt.

Obwohl die Antikörper mit einer verminderten Virusausscheidung bei jungen Pferden in Verbindung gebracht werden, ist die Korrelation zwischen Schutz und systemischen Antikörpern nicht eindeutig (Goehring et al. 2010a, Goehring et al. 2010b, Heldens et al. 2001, Patel & Heldens 2005). Trotz vorhandenen neutralisierenden Antikörpern können trächtige Stuten abortieren und geimpfte Pferde sind auch nicht gegen die neurologische Form der Krankheit (Equine Herpesvirus Myeloencephalopathy - EHM) geschützt (Burrows et al. 1984, Mumford 1985, Mumford et al. 1987, Wilson 1997).

Es wird angenommen, dass die zelluläre Immunität die ausschlaggebende Rolle bei der Minimierung der Virämie spielt (Kydd et al. 2006, Osterrieder & Van de Walle 2010).

Alle in die Studie einbezogenen Absetzer-Fohlen waren weiblich. In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass das Geschlecht bei jungen Pferden keinen Einfluss auf die Immunantwort nach einer Impfung hat (Gildea et al. 2011c).

Die beiden Gruppen unterschieden sich jedoch auch altersmäßig im Durchschnitt um ca. einen Monat. Diese Tatsache ist kaum zu vermeiden, wenn eine große Anzahl von Pferden für eine Studie geplant ist. Die zufällige Zusammenstellung von ausgewogenen Studiengruppen wurde bestmöglich versucht umzusetzen, war jedoch von äußeren Einflussfaktoren abhängig, wie z.B. von den zur Verfügung stehenden Tieren und der Kooperation des Personals des Betriebs.

Da jedoch das Alter bei der Grundimmunisierung von Fohlen nachweislich einen Einfluss auf die Bildung von Antikörpern nach der Impfung hat (Fougerolle et al. 2016), wurde eine zusätzliche statistische Analyse an altersgleichen Untergruppen durchgeführt, die aus 28 bzw. 22 Pferden aus Gruppe A bzw. B bestanden. Die Ergebnisse der zusätzlichen Analyse bestätigten die Ergebnisse der ursprünglichen Studie, d. h. für EI unterschied sich die AUC (area under the curve) der beiden Gruppen zu keinem Zeitpunkt signifikant.

Viele der 71 Absetzer waren zum Zeitpunkt der Erstimpfung V1 seropositiv für EHV-1. Dies ist nicht überraschend, da bereits gezeigt wurde, dass eine Infektion mit EHV-1 bei jungen Pferden sowohl vor als auch nach dem Absetzen von den Mutterstuten weit verbreitet ist (Gilkerson et al. 1999a, 1999b). Somit war die Studienpopulation repräsentativ für die Zielpopulation im Feld und nicht für die sonst in experimentellen Wirksamkeitsstudien verwendeten „naiven“ Fohlen.

Beide Gruppen der vorliegenden Studie enthielten aber auch EHV-seronegative Absetzer. Seronegative Ergebnisse sind allerdings nicht unbedingt ein Hinweis auf eine fehlende vorherige Exposition, da CF-Titer nur kurzlebig sind und innerhalb von drei Monaten nach der EHV-Exposition auf den Ausgangswert zurückkehren (Thomson et al. 1976). In der vorliegenden Studie war die Immunantwort der seronegativen Pferde auf die Impfung ähnlich zur Immunantwort der seropositiven Kohorte. Die EHV-1 Konzentrationen der beiden Gruppen waren zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Impfung statistisch nicht zu unterscheiden. Dies deutet darauf hin, dass die seronegative Gruppe nicht „naiv“ war, sondern dem Virus bereits ausgesetzt war.

Es konnte eine anamnestiche Immunantwort auf die Erstimpfung beobachtet werden, bei der alle Absetzer bis auf einen eine Serokonversion (= 4-facher oder höherer Anstieg der CF-Antikörperkonzentrationen) zeigten. Dies ist vergleichbar mit dem, was bei jungen adulten Rennpferden beobachtet wurde (Gildea et al. 2016).

Im Gegensatz dazu wurde in einer Wirksamkeitsstudie mit demselben Impfstoff, die zu Zulassungszwecken durchgeführt wurde, festgestellt, dass nur vier von 20 naiven Absetzern zwei Wochen nach der Impfung CF-Konzentrationen > 5 aufwiesen. Sie zeigten aber eine anamnestiche Immunantwort auf die zweite Dosis des Impfstoffs, wobei dann 19 der 20 Absetzer eine Serokonversion zeigten (Heldens et al. 2001).

In dieser Studie war die EHV-1 Antikörperreaktion der Absetzer die separat geimpft wurden ähnlich zu der, die die gleichzeitig geimpfte Gruppe zeigte. Die höchsten Antikörperkonzentrationen wurden 14 Tage nach der zweiten Impfung (V2) gemessen und fielen innerhalb von drei Monaten wieder auf ihre ursprünglichen Werte zurück (Heldens et al. 2001). Dies stimmt mit den Ergebnissen von Thompson et al. überein, dass CF-Antikörper gegen EHV-1 kurzlebig sind und oft innerhalb von 10 Wochen auf nicht nachweisbare Konzentrationen abfallen (Thomson et al. 1976).

Anders als bei EHV waren alle an der vorliegenden Studie beteiligten Absetzer am Tag der ersten Impfung (V1) seronegativ für EIV. Es gab keine Anzeichen von maternalen Antikörpern (MDA) gegen EI, die die Immunantwort auf die Impfung nachweislich beeinträchtigen können (Cullinane et al. 2001, van Maanen et al. 1992). Bis auf acht Absetzer (11 %) hatten alle innerhalb von zwei Wochen nach der Impfung serokonvertiert. Die acht „Poor-Responder“ (fünf in Gruppe A und drei in Gruppe B) waren einen Monat nach der Impfung immer noch seronegativ. Allerdings waren es wenige (11%) im Vergleich zu einer früheren Studie, bei der 11 von 14 Pferden (entspricht 79 %) schlecht auf ihre erste Impfung mit Equip FT[®] ansprachen (Gildea et al. 2011c). In beiden Studien (Allkofer et al. 2021, Gildea et al. 2011c) zeigten jedoch alle Pferde, die schlecht auf V1 angesprochen hatten, eine gute Immunantwort auf die zweite Dosis des Impfstoffs. Das Muster der SRH-Antikörperreaktion der Absetzer gegen EI war in beiden Gruppen (egal, ob separat oder gleichzeitig geimpft) ähnlich. SRH-Antikörperkonzentrationen, die mit einem klinischen (≥ 85 aber < 150 mm²) oder sogar einem virologischen Schutz (≥ 150 mm²) assoziiert sind (Mumford et al. 1994c, Mumford & Wood 1992, Newton et al. 2000), wurden sowohl nach V1, wie auch nach V2 erreicht.

Wie zu erwarten bzw. wie bereits in zahlreichen anderen Studien hervorgehoben, entsteht eine sog. Immunitätslücke („immunity gap“) zwischen der zweiten und dritten Impfung. Grund hierfür ist, dass die Antikörper innerhalb von ca. drei Monaten nach V2 von Konzentrationen mit virologischem Schutz auf Konzentrationen absinken, die nur noch einen klinischen Schutz bieten (Cullinane et al. 2014, Cullinane et al. 2001, Mumford et al. 1994b, Mumford et al. 1994c, Paillot et al. 2013b).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie an Warmblut Absetzern (Allkofer et al. 2021) unterschieden sich von denen einer früheren Studie an adulten Rennpferden, die die Auffrischungsimpfung gegen EI am selben Tag wie ihre erste EHV-Impfung bekommen hatten (Gildea et al. 2016).

Die gleichzeitig geimpften Pferde zeigten eine stärkere Antikörperreaktion als die separat geimpften Pferde. D.h. es gab bei den adulten Pferden einen signifikanten Unterschied zwischen der AUC der SRH-Antikörperkonzentrationen für die beiden Gruppen (Gildea et al. 2016).

In der vorliegenden Studie gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen der AUC für die beiden Impfgruppen (Gruppe A: separate Impfung, Gruppe B: gleichzeitige Impfung) der Absetzer-Fohlen. Die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Studien können mit den Adjuvantien in den EI-Impfstoffen zusammenhängen. Die Gruppe der gleichzeitig geimpften adulten Rennpferde hat möglicherweise davon profitiert, dass sie zwei Impfstoffe mit Carbopol-Adjuvantien erhalten haben, wohingegen die Absetzer in der vorliegenden Studie einen EHV-1/4 Impfstoff mit Carbopol-Adjuvans (Equip EHV-1,4[®] - Zoetis Deutschland GmbH, Berlin) und einen ISCOM-basierten EI-Impfstoff (Equip FT[®] - Zoetis Deutschland GmbH, Berlin) erhielten. Zum jetzigen Zeitpunkt ist dies jedoch nur eine hypothetische Erklärung und es sind weitere Studien erforderlich, um die Wirkungsmechanismen der verschiedenen Adjuvantien zu erforschen und zu verstehen, wie sie mit dem Immunsystem interagieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine gleichzeitige Grundimmunisierung von Fohlen gegen EIV und EHV-1/4 in der vorliegenden Studie mit keinerlei unerwünschten klinischen Nebenwirkungen verbunden waren und dass die Antikörperkonzentrationen mit denen vergleichbar waren, die in der separat geimpften Gruppe gemessen wurden. Diese Ergebnisse unterstützen die Schlussfolgerung der Autoren der früheren Studie an adulten Rennpferden (Gildea et al. 2016), dass die gleichzeitige Impfung die humorale Immunantwort gegen einen der beiden Impfstoffe nicht negativ beeinträchtigt.

Die gleichzeitige Impfung gegen diese Viren sollte in Betracht gezogen werden, da es wirtschaftlicher ist und somit ggf. zu einer verbesserten und flächendeckenderen Durchimpfungsrate führen kann.

4.2. Grundimmunisierung gegen Equine Influenza bei Fohlen: wann, wie und womit? – Übersicht über den aktuellen wissenschaftlichen Stand

Eine korrekt durchgeführte Grundimmunisierung und regelmäßige Auffrischungsimpfung gegen die Equine Influenza (EI) ist nach wie vor eine der effektivsten Methoden zur Kontrolle der Krankheit (Paillot 2014, Paillot et al. 2006) und sie reduziert signifikant die Zahl der Neuinfektionen, die klinischen Symptome, sowie die Virusausscheidung (Cullinane & Newton 2013, Paillot 2014).

Laut den Herstellerangaben von Influenzaimpfstoffen besteht die Grundimmunisierung aus zwei Impfungen (V1 und V2), die mit einem Abstand von vier bis sechs Wochen geimpft werden sollen (Paillot 2014), gefolgt von einer dritten Impfung (V3), die fünf bis sechs Monate nach der zweiten Impfung V2 appliziert wird. Anschließend sollten je nach aktuellem Infektionsrisiko halbjährliche (oder jährliche) Booster-Impfungen durchgeführt werden (Colgate & Newton 2023, Newton et al. 2023).

Eine Impfpflicht gegen EI wird auch von vielen Behörden im Pferdesport, sowie für Importe von Pferden, vorgeschrieben (Cullinane et al. 2020). Die nationalen und internationalen Pferdesportverbände (z.B. FN, FEI, International Federation of Horseracing Authorities, Deutscher Galopp e.V.) haben alle eine eigene Regelung zur Impfung von Pferden gegen EIV und auch die Ständige Impfkommision (StlKo Vet) formuliert und aktualisiert regelmäßig diesbezüglich Empfehlungen.

Die Literaturübersicht bzw. zweite Publikation soll einen Überblick über die bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnisse zur Immunantwort von Fohlen, zu Qualität und Inhaltsstoffen des Kolostrums und zur Grundimmunisierung gegen das equine Influenzavirus bei Fohlen geben. Ziel war es auch die aktuellsten Ergebnisse von wissenschaftlichen Studien zusammenzufassen und es somit Tierärzten und Tierärztinnen zu erleichtern, ihre Kunden bzgl. Zeitpunkt der Erstimpfung (V1), sowie bzgl. des Impfschemas für die Grundimmunisierung von Fohlen gegen das equine Influenzavirus auf wissenschaftlicher Basis zu beraten.

Die Entwicklung der Immunität vom Zeitpunkt der Geburt bis zum Erwachsenenalter des Pferdes ist komplex und ist nach wie vor nicht vollständig erforscht. Die Immunantwort von neonaten und jungen Fohlen unterscheidet sich aufgrund von zahlreichen Einflussfaktoren deutlich von der Immunantwort der erwachsenen Pferde.

Die Fohlen zeigen z.B. eine verminderte Antikörper-Antwort (Holznagel et al. 2003, Sheoran et al. 2000, Wagner et al. 2006) und T-Zellen-Antwort (Wagner et al. 2010a), andere Zytokin-Profile auf die meisten Pathogene usw. (Boyd et al. 2003, Breathnach et al. 2006, Wagner et al. 2010a, Wagner et al. 2010b). Die angeborene (natürliche, unspezifische) Immunität scheint bereits von Geburt an voll funktionsfähig zu sein, wohingegen die Entstehung der adaptiven (erworbenen, spezifischen) Immunität verzögert abläuft.

Dementsprechend stellt das Kolostrum und damit verbunden die Aufnahme von maternalen Antikörpern (maternally derived antibodies = MDA) die erste und initial einzige „Immunabwehr“ dar (Paillot et al. 2006). Eine schnellstmögliche Aufnahme des Kolostrums ist wichtig, da das Kolostrum zum Zeitpunkt des Abfohlens durchschnittlich 70 g/L IgG enthält. Diese Konzentrationen sinken jedoch bereits nach zwei bis drei Stunden deutlich und fallen auf Konzentrationen unter 5 g/L nach 24 Stunden (Perkins & Wagner 2015). Es ist jedoch nicht nur wichtig, dass neugeborene Fohlen schnellstmöglich eine ausreichende Menge Kolostrum aufnehmen, sondern auch dessen Qualität spielt eine entscheidende Rolle (McCue 2014).

Ein Fohlen, das in ausreichender Menge Kolostrum von guter Qualität getrunken hat, sollte Serum-IgG-Konzentrationen von > 8 g/L aufweisen (Liepman et al. 2015).

Wenn das Fohlen keine ausreichende Menge an kolostralem IgG aufnimmt bzw. absorbiert, kommt es zu einem teilweisen (PFPT, Serum-IgG-Konzentration zwischen 4 und 8 g/L) oder vollständigen „failure of passive transfer“ (FPT, Serum-IgG-Konzentration < 4 g/L) (Liepman et al. 2015, Ujvari et al. 2017). Die passive Immunität ist essenziell, um das Neugeborene vom Zeitpunkt der Geburt bis zur Entwicklung der „eigenen“ Immunabwehr vor Pathogenen der Umwelt zu schützen. Fohlen mit „FPT“ sind sehr anfällig für Infektionskrankheiten, haben ein erhöhtes Risiko eine Sepsis zu entwickeln und sind dementsprechend potenziell lebensbedrohlichen Folgen ausgesetzt (Abraham & Bauquier 2021, Davis & Giguere 2005).

Mit dem Kolostrum werden aber auch noch andere maternale Immunkomponenten wie Immunzellen und Zytokine auf das Neugeborene übertragen. Diese spielen wahrscheinlich ebenfalls eine Rolle in der neonatalen Entwicklung des Immunsystems und beim Schutz gegen Pathogene (Perkins & Wagner 2015).

Bis zu einem Alter von vier Monaten zeigen die Fohlen eine noch unzureichende eigene Immunantwort. Des Weiteren geht man davon aus, dass noch bestehende maternale Antikörper (MDA) einen hemmenden Effekt auf die humorale Immunantwort

auf inaktivierte Influenza-Antigene haben (Wilson et al. 2001). Passiv aufgenommene maternale Antikörper haben also das Potenzial, die Immunantwort von Fohlen auf inaktivierte Impfstoffe zu beeinflussen (Cullinane et al. 2001). Auch einige ältere Studien stellten die Theorie auf, dass Fohlen unter sechs Monaten keine ausreichende serologische Immunantwort auf inaktivierte Influenzaimpfstoffe zeigen (Cullinane et al. 2001, Oirschot et al. 1991, van Maanen et al. 1992).

Etwas anders sieht es beim Einsatz des modifizierten Kanarienvirus-Impfstoffs ProteqFlu® (Boehringer Ingelheim) aus. Bei diesem Impfstoff gibt es widersprüchliche Ansichten und Studien dazu, ob maternale Antikörper bzw. das Alter der Fohlen bei der Erstimpfung langfristig einen negativen Effekt auf die Antikörperkonzentrationen haben (Fougerolle et al. 2016, Gildea et al. 2011c, Minke et al. 2011, Minke et al. 2007b). Zusammenfassend ist aber zu sagen, dass die Beeinträchtigung der Immunantwort durch maternale Antikörper mehrfach beschrieben wurde (Cullinane et al. 2001, van Maanen et al. 1992), aber die Auswirkung dieser Interaktion vom Impfstoff-Typ abhängig ist. Des Weiteren sind fast alle zugelassenen Impfstoffe dahingehend optimiert, eine Immunität in adulten Pferden auszulösen und berücksichtigen dabei nicht die spezifischen Eigenschaften des neonatalen Immunsystems. Von inaktivierten und/oder Sub-Unit Impfstoffen ist bekannt, dass sie von maternalen Antikörpern neutralisiert werden (Niewiesk 2014).

Die Grundimmunisierung von unter vier Monate alten Fohlen scheint wie eben ausgeführt nicht den „Optimalschutz“ in Bezug auf die humorale Immunantwort zu bieten. In Einzelfällen kann eine solche Impfstrategie jedoch nötig sein, z.B. angesichts eines akuten Influenzaausbruchs oder eines erhöhten Kontaktrisikos mit EIV, um die Zeitspanne der Empfänglichkeit für eine EI Infektion zu reduzieren.

Auch bei Fohlen, deren Mutterstuten nicht geimpft sind, sollte die Grundimmunisierung gegen EIV nach aktuellen Empfehlungen der StIKo Vet bereits mit vier Monaten erfolgen, unabhängig von der Art des Impfstoffes.

Auch bei der Frage welches Impfschema bei der Grundimmunisierung gegen EIV zu empfehlen ist gibt es verschiedene Ansätze, unterschiedliche Vorgaben der Pferdesportverbände und der Impfstoffhersteller, und natürlich zahlreiche Studien bzw. wissenschaftliche Erkenntnisse. Nach dem „Erstschutz“ vor EI durch aufgenommene maternale Antikörper von geimpften Mutterstuten direkt nach der Geburt stellt die Grundimmunisierung, bestehend aus drei Impfungen, die nächste Schutzmaßnahme gegen EIV dar und bewirkt die Bildung von spezifischen Antikörpern.

Es ist wichtig zu wissen, dass Fohlen nach der Applikation einer einmaligen Impfdosis (Erstimpfung V1) keine ausreichenden Antikörpermengen entwickeln, die einen Schutz vor EI bieten (Fougerolle et al. 2016, Gildea et al. 2011b). In den ersten zwei bis vier Wochen nach der zweiten Impfung (V2) steigen die EIV Antikörperkonzentrationen (normalerweise – ausgenommen bei sog. „Impfversagern“) deutlich an und sinken dann zwischen V2 und V3 wieder (Gildea et al. 2011b, Paillot et al. 2018). Innerhalb von drei Monaten nach V2 reduzieren sich die Antikörper von einer Konzentration mit virologischem Schutz auf eine Konzentration, die nur noch einen klinischen Schutz bietet (Cullinane et al. 2014, Cullinane et al. 2001, Mumford et al. 1994b, Mumford et al. 1994c, Paillot et al. 2018, Paillot et al. 2013b). Daraus ergibt sich ein Zeitfenster für eine mögliche Empfänglichkeit für EI bzw. Infektion mit EIV, die sog. „Immunity Gap“ (= SRH-Antikörperkonzentrationen $< 85\text{mm}^2$) (Paillot et al. 2018, Wood et al. 2007). Trotz dieser „Immunitätslücke“ sind Fohlen in den Lebensmonaten drei bis sechs nicht vollständig ungeschützt. In zahlreichen Studien wurde die Effektivität verschiedener Impfstoffe durch experimentelle Infektion mit EIV zu verschiedenen Zeitpunkten der Grundimmunisierung getestet und stets wurde ein guter oder zumindest partieller Schutz vor EI nachgewiesen (Heldens et al. 2009, Minke et al. 2007a, Paillot et al. 2015, Paillot et al. 2018, Paillot et al. 2010, Paillot et al. 2013a, Paillot et al. 2013b, Paillot et al. 2016, Soboll et al. 2010).

In weiteren Studien wurde der optimale zeitliche Abstand zwischen den ersten drei Impfungen für einen bestmöglichen Schutz untersucht (Cullinane et al. 2014, Dilai et al. 2021, Paillot et al. 2015).

Zusammenfassend gilt also, dass ein verkürztes Intervall zwischen V1 und V2 keinerlei negative Effekte verursacht (Cullinane et al. 2014, El-Hage et al. 2013, Paillot et al. 2015), aber der Versuch den Zeitraum zwischen V2 und V3 („Immunity Gap“) zu reduzieren (z.B. auf nur zwei Monate) eher kontraproduktiv ist und mit einer geringeren humoralen Immunantwort, hervorgerufen durch die folgenden Booster-Impfungen, einhergeht (Heldens et al. 2007). Es wird angenommen, dass vorhandene (noch hohe) EIV-spezifische Antikörperkonzentrationen zum Zeitpunkt der Impfung signifikant mit einer verringerten oder fehlenden Immunantwort auf die Booster-Impfung korrelieren (Gildea et al. 2011b, Heldens et al. 2007).

Studien belegen wiederum auch, dass ein höheres Infektionsrisiko für EI besteht, wenn die Auffrischungsimpfung länger als sechs Monate her ist, unabhängig vom genutzten Impfstoff (Barquero et al. 2007, Colgate & Newton 2023, Gildea et al. 2011a).

Des Weiteren ist es wichtig zu wissen, dass ein Wechsel des Impfstoffes im Zuge der Grundimmunisierung keinen nachteiligen Einfluss auf den Schutz vor einer EIV-Infektion, sondern vielmehr einen positiven Effekt auf die SRH-Antikörperkonzentrationen hat (Dilai et al. 2018).

Auch die Simultan-Impfung gegen Influenza, Herpes und Tetanus kann bei der Grundimmunisierung von Fohlen empfohlen werden, wie in der ersten Publikation gezeigt werden konnte (Allkofer et al. 2021).

4.3. Schlussfolgerungen

Um Fohlen bestmöglich vor der Equinen Influenza zu schützen, sowie Züchter und Pferdebesitzer bzgl. des Zeitpunktes der Erstimpfung sowie des Impfprotokolls der Grundimmunisierung gegen Equine Influenza optimal beraten zu können, müssen viele Gegebenheiten bedacht werden. Es ist immer eine individuelle Entscheidung abhängig vom Impfstatus der Stute vor der Geburt, vom geplanten Alter des Fohlens bei der Erstimpfung (V1), vom aktuellen Infektionsdruck und natürlich zu guter Letzt von der Verfügbarkeit der Impfstoffe und der Praktikabilität. Es lässt sich dementsprechend kein allgemein gültiges „Standardschema“ für die Grundimmunisierung gegen EI festlegen.

Allerdings lassen sich neue nützliche Erkenntnisse in Bezug auf die Grundimmunisierung von Fohlen gegen Influenza zusammenfassen:

- das Verkürzen des Impfindervalls zwischen V2 – V3 führt zu einer geringeren humoralen Immunantwort gegen EI
- das Wechseln der Impfstoff-Typen führt zu einer höheren humoralen Immunantwort gegen EI
- eine Simultan-Impfung gegen Influenza, Herpes und Tetanus wirkt sich nicht nachteilig auf die humorale Immunantwort gegen EI aus

5. Zusammenfassung

Allkofer, Alexandra: Untersuchung zur Antikörperkinetik gegen Equines Influenzavirus bei der Grundimmunisierung von Fohlen: Vergleich zweier Impfprotokolle.

In der durchgeführten Studie (erste Publikation) wurde die gleichzeitige und zeitlich getrennte Grundimmunisierung gegen die equinen Alphaherpesviren 1 und 4, Gattung *Varicellovirus*, Unterfamilie *Alphaherpesvirinae*, Familie *Herpesviridae*, und das equine Influenza-A-Virus, Gattung *Alphainfluenzavirus*, Familie *Orthomyxoviridae*, miteinander verglichen. Ihre umgangssprachlichen Bezeichnungen sind equines Herpesvirus 1 und 4 (EHV-1/4) und equines Influenzavirus (EIV).

Eine Infektion mit diesen Erregern führt zu deutlichen klinischen respiratorischen Beschwerden, Leistungseinbußen, Unterbrechungen der Trainingspläne und gelegentlich zur Absage von Pferdesportveranstaltungen. Die Impfung wird dringend empfohlen und ist von vielen Pferdesportverbänden vorgeschrieben.

Da es nur wenige Studienergebnisse über die Auswirkungen einer gleichzeitigen Impfung auf die Antikörperreaktion auf EHV- und EIV-Impfstoffe gibt, werden diese in der Regel getrennt verabreicht, oft im Abstand von zwei Wochen. In einer früheren Studie zur Auffrischungsimpfung bei adulten Vollblut-Rennpferden hatte die gleichzeitige Impfung mit inaktivierten EHV- und EIV-Impfstoffen, die beide jeweils ein Carbopol-Adjuvans enthielten, keine negativen Auswirkungen auf die Antikörperreaktion.

In der vorliegenden Studie wurden die Untersuchungen auf die gleichzeitige bzw. zeitlich getrennte Grundimmunisierung von Warmblutfohlen ausgedehnt. In dieser Feldstudie wurde die Immunantwort auf einen EHV-Impfstoff mit Carbopol-Adjuvans (Equip EHV-1,4[®] - Zoetis Deutschland GmbH, Berlin) und einen ISCOM-basierten EI-Impfstoff (Equip FT[®] - Zoetis Deutschland GmbH, Berlin) verglichen, die im Abstand von zwei Wochen oder gleichzeitig verabreicht wurden.

Es wurden keine unerwünschten Nebenwirkungen beobachtet, das Muster der EI- und EHV-Antikörperantwort war in beiden Gruppen ähnlich, und es gab keinen Hinweis darauf, dass eine simultane Grundimmunisierung von Fohlen die humorale Immunantwort negativ beeinträchtigt.

Die Ergebnisse sind für Pferdebesitzer und vor allem Züchter von Bedeutung, die durch eine Simultan-Impfung gegen Influenza, Herpes und Tetanus die Tierarztkosten sowie den personellen und bürokratischen Aufwand reduzieren können.

Um es den Tierärzten und Tierärztinnen zu erleichtern, ihre Kunden bzgl. Zeitpunkt und Impfschema für die Grundimmunisierung gegen das equine Influenzavirus bei Fohlen anhand der individuellen Situation (Impfstatus der Stute vor der Geburt, Alter des Fohlens bei der Erstimpfung, Infektionsdruck, Verfügbarkeit der Impfstoffe und Praktikabilität) auf wissenschaftlicher Basis zu beraten, wurde zudem eine Literaturübersicht (zweite Publikation) angefertigt.

Das equine Influenzavirus (EIV) ist hochgradig ansteckend und verursacht fast weltweit Ausbrüche von Atemwegserkrankungen bei Pferden. Besonders gefährdet für eine Infektion mit EIV sind vor allem „naive“ Pferde, die bisher noch keinen Kontakt zu EIV hatten oder die keine oder nur eine unvollständige Grundimmunisierung erhalten haben. Es soll ein Überblick über die bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnisse zur Immunantwort von Fohlen auf eine Impfung gegeben werden, die sich aufgrund von zahlreichen Einflussfaktoren von der unterscheidet, die erwachsene Pferde zeigen. Es wird auf die Qualität und die Inhaltsstoffe des Kolostrums (Antikörper, Zytokine und andere maternale Zellen) und deren Einfluss bei der Immunantwort von Fohlen eingegangen. Auch die Fragen in welchem Alter ein Fohlen die erste Impfung der Grundimmunisierung gegen EIV bekommen sollte, sowie welches Impfschema dabei zu empfehlen ist, werden durch eine Zusammenfassung der Ergebnisse zahlreicher wissenschaftlicher Studien diskutiert.

Aufgrund der durchgeführten Studie sowie aufgrund von zahlreichen neuen Erkenntnissen in Bezug auf die Grundimmunisierung von Fohlen gegen Influenza ist zusammenfassend zu sagen, dass das Verkürzen der Impfintervalle zu einer geringeren humoralen Immunantwort gegen EI führt, dass das Wechseln der Impfstoff-Typen zu einer höheren humoralen Immunantwort gegen EI führt und eine Simultan-Impfung gegen Influenza, Herpes und Tetanus sich nicht nachteilig auf die humorale Immunantwort gegen EI auswirkt.

6. Summary

Allkofer, Alexandra: Study of antibody kinetics against equine influenza virus during primary vaccination of foals: Comparison of two vaccination protocols.

In the study conducted (first publication), concurrent and separate primary vaccination against equid alphaherpesviruses 1 and 4, genus *Varicellovirus*, subfamily *Alphaherpesvirinae*, family *Herpesviridae*, and equine influenza A Virus, genus *Alphainfluenzavirus*, family *Orthomyxoviridae*, was compared. Their usual names are equine herpesvirus 1 and 4 (EHV-1/4) and equine influenza virus (EIV).

Infection with these pathogens is associated with severe respiratory signs, loss of performance, interruption of training schedules, and on occasion, cancellation of equestrian events. Vaccination is highly recommended, and for some disciplines it is a mandatory requirement of the relevant authorities.

As there is a lack of information relating to the impact of concurrent vaccination on the antibody response to EHV and EIV vaccines, they are usually administered separately, often two weeks apart. In a previous study of booster vaccination in adult Thoroughbred racehorses, concurrent vaccination with whole-virus inactivated carbopol-adjuvanted EHV and EIV vaccines did not impact the antibody response negatively.

In the current study, investigations were extended to concurrent versus separate primary vaccination of warmblood foals. In this field study, the immune response to an EHV vaccine with carbopol adjuvant (Equip EHV-1,4® - Zoetis Deutschland GmbH, Berlin) and an ISCOM-based EI vaccine (Equip FT® - Zoetis Deutschland GmbH, Berlin) administered two weeks apart or concurrently was compared.

No adverse clinical reactions were observed, the pattern of EI and EHV antibody response was similar for both groups, and there was no evidence that concurrent primary vaccination of foals compromised the humoral immune response. The results are of relevance for horse owners and especially breeders, who wish to reduce veterinary costs as well as personnel and bureaucratic efforts by vaccinating concurrently against influenza, herpes and tetanus.

In order to make it easier for veterinarians to advise their clients on the timing and vaccination schedule for primary vaccination against equine influenza virus in foals based on the individual situation (vaccination status of the mare before foaling, age of the foal at first vaccination, infection pressure, availability of vaccines and practicability) on a scientific basis, a literature review (second publication) was written.

Equine influenza virus (EIV) is highly contagious and causes outbreaks of respiratory disease in horses almost all over the world. Particularly at risk for infection with EIV are "naïve" horses that have had no previous contact with EIV or that have received no or only incomplete primary vaccination.

An overview will be given of the scientific findings to date on the immune response of foals to vaccination, which differs from that shown by adult horses due to numerous influencing factors. It will deal with the ingredients of the colostrum (antibodies, cytokines and other maternal cells) and their influence on the immune response of foals. The questions at which age a foal should receive the first vaccination of the primary vaccination against EIV, as well as which vaccination schedule is recommended, are also discussed by summarising the results of numerous scientific studies.

Based on the study conducted as well as on numerous new scientific findings regarding the primary vaccination of foals against influenza, it can be summarised that shortening the vaccination intervals leads to a lower humoral immune response against EI, that switching vaccine types leads to a higher humoral immune response against EI and that simultaneous vaccination against influenza, herpes and tetanus does not compromise the humoral immune response against EI.

7. Literaturverzeichnis

- Abraham, M., & Bauquier, J. (2021). Causes of equine perinatal mortality. *Vet. J.*, 273, 105675; DOI 10.1016/j.tvjl.2021.105675
- Allkofer, A., Garvey, M., Ryan, E., Lyons, R., Ryan, M., Lukaseviciute, G., Walsh, C., Venner, M., & Cullinane, A. (2021). Primary vaccination in foals: a comparison of the serological response to equine influenza and equine herpesvirus vaccines administered concurrently or 2 weeks apart. *Arch. Virol.*, 166 (2), 571-579; DOI 10.1007/s00705-020-04846-6
- 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 (43), 7520-7529; DOI 10.1016/j.vaccine.2007.08.038
- Boyd, N. K., Cohen, N. D., Lim, W. S., Martens, R. J., Chaffin, M. K., & Ball, J. M. (2003). Temporal changes in cytokine expression of foals during the first month of life. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 92 (1), 75-85; DOI 10.1016/S0165-2427(03)00021-7
- Breathnach, C. C., Sturgill-Wright, T., Stiltner, J. L., Adams, A. A., Lunn, D. P., & Horohov, D. W. (2006). Foals are interferon gamma-deficient at birth. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 112 (3), 199-209; DOI 10.1016/j.vetimm.2006.02.010
- Burrows, R., Goodridge, D., & Denyer, M. S. (1984). Trials of an inactivated equid herpesvirus 1 vaccine: challenge with a subtype 1 virus. *Vet. Rec.*, 114 (15), 369-374; DOI 10.1136/vr.114.15.369
- Colgate, V. A., & Newton, J. R. (2023). Equine influenza bi-annual boosters: What does the evidence tell us? *Equine Vet. J.*, 55 (1), 147-152; DOI 10.1111/evj.13898
- Cullinane, A., Elton, D., & Mumford, J. (2010). Equine influenza - surveillance and control. *Influenza Other Respir. Viruses*, 4 (6), 339-344; DOI 10.1111/j.1750-2659.2010.00176.x
- Cullinane, A., Gahan, J., Walsh, C., Nemoto, M., Entenfellner, J., Olguin-Perglione, C., Garvey, M., Huang Fu, T. Q., Venner, M., Yamanaka, T., Barrandeguy, M., & Fernandez, C. J. (2020). Evaluation of Current Equine Influenza Vaccination Protocols Prior to Shipment, Guided by OIE Standards. *Vaccines*, 8 (1), 107; DOI 10.3390/vaccines8010107
- Cullinane, A., Gildea, S., & Weldon, E. (2014). Comparison of primary vaccination regimes for equine influenza: Working towards an evidence-based regime. *Equine Vet. J.*, 46 (6), 669-673; DOI 10.1111/evj.12214
- Cullinane, A., & Newton, J. R. (2013). Equine influenza—A global perspective. *Vet. Microbiol.*, 167 (1-2), 205-214; DOI 10.1016/j.vetmic.2013.03.029
- Cullinane, A., Weld, J., Osborne, M., Nelly, M., McBride, C., & Walsh, C. (2001). Field studies on equine influenza vaccination regimes in thoroughbred foals and yearlings. *Vet. J.*, 161 (2), 174-185; DOI 10.1053/tvj.2000.0546

- 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. *J. Gen. Virol.*, *77* (4), 661-671; DOI 10.1099/0022-1317-77-4-661
- Daly, J. M., Yates, P. J., Newton, J. R., Park, A., Henley, W., Wood, J. L., Davis-Poynter, N., & 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), 4101-4109; DOI 10.1016/j.vaccine.2004.02.048
- Davis, R., & Giguere, S. (2005). Evaluation of five commercially available assays and measurement of serum total protein concentration via refractometry for the diagnosis of failure of passive transfer of immunity in foals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, *227* (10), 1640-1645; DOI 10.2460/javma.2005.227.1640
- Dilal, M., Fassi Fihri, O., El Harrak, M., Bouchiba, A., Dehhaoui, M., Mahir, W., Dikrallah, A., Legrand, L., Paillot, R., & Piro, M. (2021). An Evaluation of Three Different Primary Equine Influenza Vaccination Intervals in Foals. *J. Equine Vet. Sci.*, *99*, 103397; DOI 10.1016/j.jevs.2021.103397
- Dilal, M., Piro, M., El Harrak, M., Fougerolle, S., Dehhaoui, M., Dikrallah, A., Legrand, L., Paillot, R., & Fassi Fihri, O. (2018). Impact of Mixed Equine Influenza Vaccination on Correlate of Protection in Horses. *Vaccines*, *6* (4), 71; DOI 10.3390/vaccines6040071
- 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 Vet. J.*, *45* (2), 235-239; DOI 10.1111/j.2042-3306.2012.00605.x
- Fougerolle, S., Legrand, L., Garrett, D., Birand, I., Foursin, M., D'Ablon, X., Bayssat, P., Newton, R. J., Pronost, S., & Paillot, R. (2016). Influential factors inducing suboptimal humoral response to vector-based influenza immunisation in Thoroughbred foals. *Vaccine*, *34* (33), 3787-3795; DOI 10.1016/j.vaccine.2016.05.068
- Garner, M. G., Cowled, B., East, I. J., Moloney, B. J., & Kung, N. Y. (2011). Evaluating the effectiveness of early vaccination in the control and eradication of equine influenza—A modelling approach. *Prev. Vet. Med.*, *99* (1), 15-27; DOI 10.1016/j.prevetmed.2010.02.007
- Gildea, S., Arkins, S., & Cullinane, A. (2011a). Management and environmental factors involved in equine influenza outbreaks in Ireland 2007–2010. *Equine Vet. J.*, *43* (5), 608-617; DOI 10.1111/j.2042-3306.2010.00333.x
- Gildea, S., Arkins, S., Walsh, C., & Cullinane, A. (2011b). A comparison of antibody responses to commercial equine influenza vaccines following annual booster vaccination of National Hunt Horses – a randomised blind study. *Vaccine*, *29* (22), 3917-3922; DOI 10.1016/j.vaccine.2011.03.003

- Gildea, S., Arkins, S., Walsh, C., & Cullinane, A. (2011c). A comparison of antibody responses to commercial equine influenza vaccines following primary vaccination of Thoroughbred weanlings—A randomised blind study. *Vaccine*, 29 (49), 9214-9223; DOI 10.1016/j.vaccine.2011.09.101
- Gildea, S., Quinlivan, M., Murphy, B. A., & Cullinane, A. (2013). Humoral response and antiviral cytokine expression following vaccination of thoroughbred weanlings-- a blinded comparison of commercially available vaccines. *Vaccine*, 31 (45), 5216-5222; DOI 10.1016/j.vaccine.2013.08.083
- Gildea, S., Sanchez Higgins, M. J., Johnson, G., Walsh, C., & Cullinane, A. (2016). Concurrent vaccination against equine influenza and equine herpesvirus - a practical approach. *Influenza Other Respir. Viruses*, 10 (5), 433-437; DOI 10.1111/irv.12396
- Gilkerson, J. R., Whalley, J. M., Drummer, H. E., Studdert, M. J., & Love, D. N. (1999a). Epidemiological studies of equine herpesvirus 1 (EHV-1) in Thoroughbred foals: a review of studies conducted in the Hunter Valley of New South Wales between 1995 and 1997. *Vet. Microbiol.*, 68 (1-2), 15-25; DOI 10.1016/S0378-1135(99)00057-7
- Gilkerson, J. R., Whalley, J. M., Drummer, H. E., Studdert, M. J., & Love, D. N. (1999b). Epidemiology of EHV-1 and EHV-4 in the mare and foal populations on a Hunter Valley stud farm: are mares the source of EHV-1 for unweaned foals. *Vet. Microbiol.*, 68 (1), 27-34; DOI 10.1016/S0378-1135(99)00058-9
- 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. *Epidemiol. Infect.*, 128 (3), 491-502; DOI 10.1017/S0950268802006829
- Goehring, L., van Maanen, C., Berendsen, M., Cullinane, A., de Groot, R. J., Rottier, P. J. M., Wesselingh, J. J. C. M., & Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M. M. (2010a). Experimental infection with neuropathogenic equid herpesvirus type 1 (EHV-1) in adult horses. *Vet. J.*, 186 (2), 180-187; DOI 10.1016/j.tvjl.2009.08.007
- Goehring, L., Wagner, B., Bigbie, R., Hussey, S. B., Rao, S., Morley, P. S., & Lunn, D. P. (2010b). Control of EHV-1 viremia and nasal shedding by commercial vaccines. *Vaccine*, 28 (32), 5203-5211; DOI 10.1016/j.vaccine.2010.05.065
- Heldens, J. G., Hannant, D., Cullinane, A. A., Prendergast, M. J., Mumford, J. A., Nelly, M., Kydd, J. H., Weststrate, M. W., & van den Hoven, R. (2001). Clinical and virological evaluation of the efficacy of an inactivated EHV1 and EHV4 whole virus vaccine (Duvaxyn EHV1,4). Vaccination/challenge experiments in foals and pregnant mares. *Vaccine*, 19 (30), 4307-4317; DOI 10.1016/S0264-410X(01)00131-1
- Heldens, J. G., Pouwels, H. G., Derks, C. G., Van de Zande, S. M., & Hoeijmakers, M. J. (2009). The first safe inactivated equine influenza vaccine formulation adjuvanted with ISCOM-Matrix that closes the immunity gap. *Vaccine*, 27 (40), 5530-5537; DOI 10.1016/j.vaccine.2009.06.085

- Heldens, J. G. M., van Loon, A. A. W. M., & van de Zande, S. (2007). Is there a benefit from an early booster vaccination in the control of equine influenza? *Vet. J.*, *174* (3), 592-598; DOI 10.1016/j.tvjl.2007.03.004
- Holznagel, D. L., Hussey, S., Mihalyi, J. E., Wilson, W. D., & Lunn, D. P. (2003). Onset of immunoglobulin production in foals. *Equine Vet. J.*, *35* (6), 620-622; DOI 10.2746/042516403775467153
- Kydd, J. H., Townsend, H. G. G., & Hannant, D. (2006). The equine immune response to equine herpesvirus-1: The virus and its vaccines. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, *111* (1), 15-30; DOI 10.1016/j.vetimm.2006.01.005
- Lai, A. C. K., Chambers, T. M., Holland, R. E., Morley, P. S., Haines, D. M., Townsend, H. G. G., & Barrandeguy, M. (2001). Diverged evolution of recent equine-2 influenza (H3N8) viruses in the Western Hemisphere. *Arch. Virol.*, *146* (6), 1063-1074; DOI 10.1007/s007050170106
- Liepman, R. S., Dembek, K. A., Slovis, N. M., Reed, S. M., & Toribio, R. E. (2015). Validation of IgG cut-off values and their association with survival in neonatal foals. *Equine Vet. J.*, *47* (5), 526-530; DOI 10.1111/evj.12428
- McCue, P. M. (2014). Colostrum Banking. In *Equine Reproductive Procedures* (S. 299-301). John Wiley & Sons, Inc DOI 10.1002/9781118904398.ch90
- Minke, J. M., El-Hage, C. M., Tazawa, P., Homer, D., Lemaitre, L., Cozette, V., Gilkerson, J. R., & Kirkland, P. D. (2011). Evaluation of the response to an accelerated immunisation schedule using a canarypox-vectored equine influenza vaccine, shortened interdose intervals and vaccination of young foals. *Aust. Vet. J.*, *89* (S1), 137-139; DOI 10.1111/j.1751-0813.2011.00767.x
- Minke, J. M., Toulemonde, C. E., Coupier, H., Guigal, P. M., Dinic, S., Sindle, T., Jessett, D., Black, L., Bublot, M., & Pardo, M. C. (2007a). Efficacy of a canarypox-vectored recombinant vaccine expressing the hemagglutinin gene of equine influenza H3N8 virus in the protection of ponies from viral challenge. *Am. J. Vet. Res.*, *68* (2), 213-219; DOI 10.2460/ajvr.68.2.213
- Minke, J. M., Toulemonde, C. E., Dinic, S., Cozette, V., Cullinane, A., & Audonnet, J. C. (2007b). Effective Priming of Foals Born to Immune Dams against Influenza by a Canarypox-Vectored Recombinant Influenza H3N8 Vaccine. *J. Comp. Pathol.*, *137* (Suppl. 1), 76-80; DOI 10.1016/j.jcpa.2007.04.016
- Mumford, J. A. (1985). Equid herpesvirus 1 (EHV 1) latency: More questions than answers. *Equine Vet. J.*, *17* (5), 340-342; DOI 10.1111/j.2042-3306.1985.tb02515.x
- Mumford, J. A., Jessett, D. M., Rollinson, E. A., Hannant, D., & Draper, M. E. (1994a). Duration of protective efficacy of equine influenza immunostimulating complex-tetanus vaccines. *Vet. Rec.*, *134* (7), 158-162; DOI 10.1136/vr.134.7.158
- Mumford, J. A., Jessett, D., Dunleavy, U., Wood, J., Hannant, D., Sundquist, B., & Cook, R. F. (1994b). Antigenicity and immunogenicity of experimental equine influenza ISCOM vaccines. *Vaccine*, *12*, 857-863; DOI 10.1016/0264-410x(94)90297-6

- Mumford, J. A., Rossdale, P. D., Jessett, D. M., Gann, S. J., Ousey, J., & Cook, R. F. (1987). Serological and virological investigations of an equid herpesvirus 1 (EHV-1) abortion storm on a stud farm in 1985. *J. Reprod. Fert.*, *35*, 509-518; PMID: 2824770
- Mumford, J. A., Wilson, H., Hannant, D., & Jessett, D. M. (1994c). Antigenicity and Immunogenicity of Equine Influenza Vaccines Containing a Carbomer Adjuvant. *Epidemiol. Infect.*, *112* (2), 421; DOI 10.1017/s0950268800057848
- Mumford, J. A., & Wood, J. (1992). Establishing an acceptability threshold for equine influenza vaccines. *Dev. Biol. Stand.*, *79* (79), 137-146; PMID 1286748
- Newton, J. R., Rendle, D. I., Mountford, D. R., & Marr, C. M. (2023). Equine influenza vaccination catches an autumn cold! But must get over it as soon as it can. *Equine Vet. J.*, *55* (1), 142; DOI 10.1111/evj.13885
- Newton, J. R., Townsend, H. G. G., Wood, J. L. N., Sinclair, R., Hannant, D., & Mumford, J. A. (2000). Immunity to equine influenza: relationship of vaccine-induced antibody in young Thoroughbred racehorses to protection against field infection with influenza A/equine-2 viruses (H3N8). *Equine Vet. J.*, *32* (1), 65-74; DOI 10.2746/042516400777612116
- Niewiesk, S. (2014). Maternal antibodies: clinical significance, mechanism of interference with immune responses, and possible vaccination strategies. *Front. Immunol.*, *5*, 446; DOI 10.3389/fimmu.2014.00446
- OIE. (2010). Expert Surveillance Panel on Equine Influenza Vaccine Composition - Conclusions and Recommendations. *Off. Int. Epizoot. Bull.*, *2*, 44-45
- Oirschot, J. T., Bruin, G., Boer-Luytze, E., & Smolders, G. (1991). Maternal Antibodies against Equine Influenza Virus in Foals and their Interference with Vaccination. *J. Vet. Med. (Serie B)*, *38* (1-10), 391-396; DOI 10.1111/j.1439-0450.1991.tb00887.x
- Osterrieder, N., & Van de Walle, G. R. (2010). Pathogenic potential of equine alphaherpesviruses: The importance of the mononuclear cell compartment in disease outcome. *Vet. Microbiol.*, *143* (1), 21-28; DOI 10.1016/j.vetmic.2010.02.010
- Paillot, R. (2014). A Systematic Review of Recent Advances in Equine Influenza Vaccination. *Vaccines*, *2* (4), 797-831; DOI 10.3390/vaccines2040797
- Paillot, R., Fraser, S., Prowse-Davis, L., Rash, N., Montesso, F., Sloomans, N., Thomas, A., Besognet, B., Meinert, T., Ons, E., & Salt, J. (2015). ISCOM-based equine influenza vaccine: Duration of immunity and randomised clinical trials to assess an accelerated schedule of immunisation and efficacy. *Trials Vaccinol.*, *4*, 61-70; DOI 10.1016/j.trivac.2015.07.002
- Paillot, R., Garrett, D., Lopez-Alvarez, M. R., Birand, I., Montesso, F., & Horspool, L. (2018). The Immunity Gap Challenge: Protection against a Recent Florida Clade 2 Equine Influenza Strain. *Vaccines*, *6* (3), 38; DOI 10.3390/vaccines6030038

- Paillot, R., Hannant, D., Kydd, J. H., & Daly, J. M. (2006). Review: Vaccination against equine influenza: Quid novi? *Vaccine*, 24 (19), 4047-4061; DOI 10.1016/j.vaccine.2006.02.030
- Paillot, R., Prowse, L., Donald, C., Medcalf, E., Montesso, F., Bryant, N., Watson, J., Jeggo, M., Elton, D., Newton, R., Trail, P., & Barnes, H. (2010). Efficacy of a whole inactivated EI vaccine against a recent EIV outbreak isolate and comparative detection of virus shedding. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 136 (3-4), 272-283; DOI 10.1016/j.vetimm.2010.03.019
- Paillot, R., Prowse, L., Montesso, F., Huang, C. M., Barnes, H., & Escala, J. (2013a). Whole inactivated equine influenza vaccine: Efficacy against a representative clade 2 equine influenza virus, IFN γ synthesis and duration of humoral immunity. *Vet. Microbiol.*, 162 (2-4), 396; DOI 10.1016/j.vetmic.2012.10.019
- Paillot, R., Prowse, L., Montesso, F., Stewart, B., Jordon, L., Newton, J. R., & Gilkerson, J. R. (2013b). Duration of equine influenza virus shedding and infectivity in immunised horses after experimental infection with EIV A/eq2/Richmond/1/07. *Vet. Microbiol.*, 166 (1-2), 22-34; DOI 10.1016/j.vetmic.2013.04.027
- Paillot, R., Rash, N. L., Garrett, D., Prowse-Davis, L., Montesso, F., Cullinane, A., Lemaitre, L., Thibault, 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 (4), 64; DOI 10.3390/pathogens5040064
- 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. *Proc. Biol. Sci.*, 271 (1548), 1547-1555; DOI 10.1098/rspb.2004.2766
- Patel, J. R., & Heldens, J. (2005). Review: Equine herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) – epidemiology, disease and immunoprophylaxis: A brief review. *Vet. J.*, 170 (1), 14-23; DOI 10.1016/j.tvjl.2004.04.018
- Perkins, G. A., & Wagner, B. (2015). The development of equine immunity: Current knowledge on immunology in the young horse. *Equine Vet. J.*, 47 (3), 267-274; DOI 10.1111/evj.12387
- Sack, A., Cullinane, A., Daramragchaa, U., Chuluunbaatar, M., Gonchigoo, B., & Gray, G. C. (2019). Equine Influenza Virus—A Neglected, Reemergent Disease Threat. *Emerg. Infect. Dis.*, 25 (6), 1185-1191; DOI 10.3201/eid2506.161846
- Sheoran, A. S., Timoney, J. F., Holmes, M. A., Karzenski, S. S., & Crisman, M. V. (2000). Immunoglobulin isotypes in sera and nasal mucosal secretions and their neonatal transfer and distribution in horses. *Am. J. Vet. Res.*, 61 (9), 1099-1105; DOI 10.2460/ajvr.2000.61.1099
- Soboll, G., Hussey, S. B., Minke, J. M., Landolt, G. A., Hunter, J. S., Jagannatha, S., & Lunn, D. P. (2010). Onset and duration of immunity to equine influenza virus

- resulting from canarypox-vectored (ALVAC®) vaccination. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 135 (1-2), 100-107; DOI 10.1016/j.vetimm.2009.11.007
- Thomson, G. R., Mumford, J. A., Campbell, J., Griffiths, L., & Clapham, P. (1976). Serological Detection of Equid Herpesvirus 1 Infections of the Respiratory Tract. *Equine Vet. J.*, 8 (2), 58-65; DOI 10.1111/j.2042-3306.1976.tb03291.x
- Timoney, P. J. (2014). Infectious Diseases and International Movement of Horses. *Equine Infect. Dis.*, 2, 544-551; DOI 10.1016/B978-1-4557-0891-8.00063-4
- Ujvari, S., Schwarzwald, C. C., Fouché, N., Howard, J., & Schoster, A. (2017). Validation of a point-of-care quantitative equine IgG turbidimetric immunoassay and comparison of IgG concentrations measured with radial immunodiffusion and a point-of-care IgG ELISA. *J. Vet. Intern. Med.*, 31 (4), 1170-1177; DOI 10.1111/jvim.14770
- van Maanen, C., Bruin, G., de Boer-Luijtz, E., Smolders, G., & de Boer, G. F. (1992). Interference of maternal antibodies with the immune response of foals after vaccination against equine influenza. *Vet. Q.*, 14 (1), 13-17; DOI 10.1080/01652176.1992.9694319
- van Maanen, C., & Cullinane, A. (2002). Equine influenza virus infections: an update. *Vet. Q.*, 24 (2), 79-94; DOI 10.1080/01652176.2002.9695127
- Wagner, B., Burton, A., & Ainsworth, D. (2010a). Interferon-gamma, interleukin-4 and interleukin-10 production by T helper cells reveals intact Th1 and regulatory TR1 cell activation and a delay of the Th2 cell response in equine neonates and foals. *Vet. Res.*, 41 (4), 47; DOI 10.1051/vetres/2010019
- Wagner, B., Flaminio, J. B. F., Hillegas, J., Leibold, W., Erb, H. N., & Antczak, D. F. (2006). Occurrence of IgE in foals: Evidence for transfer of maternal IgE by the colostrum and late onset of endogenous IgE production in the horse. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 110 (3), 269-278; DOI 10.1016/j.vetimm.2005.10.007
- Wagner, B., Stokol, T., & Ainsworth, D. M. (2010b). Induction of interleukin-4 production in neonatal IgE + cells after crosslinking of maternal IgE. *Dev. Comp. Immunol.*, 34 (4), 436-444; DOI 10.1016/j.dci.2009.12.002
- Webster, R. G. (1993). Are equine 1 influenza viruses still present in horses? *Equine Vet. J.*, 25 (6), 537; DOI 10.1111/j.2042-3306.1993.tb03009.x
- Wilson, W. D. (1997). Equine Herpesvirus 1 Myeloencephalopathy. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, 13 (1), 53-72; DOI 10.1016/S0749-0739(17)30255-9
- 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 Vet. J.* (7), 644; DOI 10.2746/042516401776249435
- Wood, J. L., Mumford, J. A., Mair, T. S., & Slater, J. (2007). Boosting in equine influenza vaccination schedules: Timing and time for a re-evaluation of requirements of national and international authorities. *Vet. J.*, 174 (3), 449-450; DOI 10.1016/j.tvjl.2007.06.012

8. Danksagung

Ein großes Dankeschön gilt PD Dr. Monica Venner für die Überlassung dieses interessanten Dissertationsthemas sowie für die Unterstützung und Betreuung in allen erdenklichen Phasen dieser Arbeit. Vielen Dank für die viele Zeit, die du in meine Arbeit investiert hast.

Bei Prof. Dr. Ann Cullinane und ihrem Team des Irish Equine Centre möchte ich mich ebenfalls ganz herzlich bedanken für die große Hilfe und fachliche Unterstützung bei der Laborarbeit und der Probenauswertung.

Herrn Paul Schockemöhle danke ich für die Zustimmung zur Durchführung meiner Studie, die Bereitstellung der Pferde und die großzügige finanzielle Unterstützung.

Ein großer Dank gilt außerdem allen Mitarbeitern des Gestüts Lewitz für die Zusammenarbeit und Hilfe bei der Durchführung dieser Studie. Besonders erwähnt seien an dieser Stelle meine Mit-Doktorandinnen Amelie Brauch und Denise Arnold-Lehna, die mir an den Studientagen immer den Rücken freigehalten haben und meine Zeit in der Lewitz unvergesslich gemacht haben. Des Weiteren möchte ich unserer "Bürofee" Nikola Klimova danken, die mir unermüdlich bei der Probennacharbeitung geholfen hat und natürlich den Jungs der Fohlenrunde für zahlreiche freiwillige Überstunden und die Gewährleistung eines reibungslosen und sicheren Ablaufs der Studientage.

Meiner Familie möchte ich ganz besonders Danken für die bedingungslose Unterstützung auf meinem bisherigen Werdegang.

Danke, dass ihr immer für mich da seid.