

Experimentelle Untersuchungen zur Tetanusimmunantwort von Fohlen und erwachsenen Pferden unter Einsatz des Fassisi TetaCheck®

Peter Thein¹, Albert Röhm jun.² und Joern Voss³

Altomünster¹, Tierärztliche Praxis Bernloch² und Fassisi GmbH Göttingen³

Zusammenfassung

Die fehlerhafte Durchführung von Impfungen in der Pferdepraxis basiert auf unterschiedlichen Grundlagen. Diese bestehen zum einem in den nicht immer den jeweiligen wissenschaftlichen Erkenntnissen entsprechenden Informationen seitens der Pharmaindustrie, zum anderen im mangelnden Grundwissen der Anwender. Auf diese Situation wird im speziellen hinsichtlich der Durchführung korrekter Tetanusimpfungen eingegangen. Zur Untersuchung der postvazinalen Immunreaktion haben wir unter Verwendung des Fassisi TetaCheck®, der die grenzwertigen, protektiven, antitoxischen Tetanusantikörper aus Vollblut oder Serum erfasst, 24 Mutterstuten mit ihren Saugfohlen und 69 Absetzfohlen, 31 davon mit ihren Mutterstuten, auf Transfer und Persistenz maternalen Tetanusantikörper getestet. Die Impfungen der Mutterstuten lagen zum Zeitpunkt der Untersuchungen mindestens 2,5 Jahre zurück. Der Nachweis des Antikörpertransfers aus den Stuten zu ihren Saugfohlen innerhalb des untersuchten Zeitraums von 10 Stunden bis 5 Tagen p.n. gelang zu 100%. Die Untersuchungen zur Persistenz dieser maternalen Kolostrumantikörper ergaben, dass diese bei der Einstellungsuntersuchung bei 45% der 69 untersuchten Fohlen im Immunschutz verleihenden Bereich von 0,1 bis 1 i.E./ml bis in den 7. Lebensmonat hinein nachzuweisen waren. Die weiteren Untersuchungen dazu ergaben eine maximale Persistenz maternalen, schutzverleihender Antikörper bis zur Mitte des 8. Lebensmonats. 24 Fohlen im Alter von 6 bis 8 Monaten, 12 davon seronegativ, 12 seropositiv, wurden mit monovalenter Tetanustoxoidvaccine 2x im Abstand von 8 Wochen grundimmunisiert (G I und G II), um den Einfluss der Kolostrumantikörper auf die Impfung vergleichend serologisch zu überprüfen. Die zum Zeitpunkt von G I seropositiven Fohlen beantworteten diese deutlich schlechter als die seronegativen Fohlen – unabhängig vom Lebensalter. Bei 4 der stark positiven Probanden ging der Abbau der maternalen Antikörper trotz G I offensichtlich weiter, was bis zu einem Monat p. G I nachzuweisen war. Die seronegativen Erstimpflinge reagierten dagegen zu 100% seropositiv auf G I. G II, acht Wochen nach G I vorgenommen, wurde von allen Fohlen 4 Wochen nach der Impfung mit seropositiver Reaktion beantwortet. Diese Ergebnisse belegen die lange Persistenz maternalen Antikörper und bestätigen deren interferierenden Einfluss auf die parenterale Applikation von homologem Antigen. In einer weiteren Untersuchung prüften wir die Dauer der Persistenz von Antikörpern bei Pferden, deren verlässlich dokumentierte und letzte Tetanusimpfungen 4 bis 11 Jahre zurücklagen. Alle 8 hierzu ermittelten Pferde im Alter von 8 bis zu 21 Jahren reagierten im Test positiv mit schutzverleihenden Antikörpertitern. Eine Stute, im Alter von 25 Jahren und verlässlich nie geimpft, reagierte dagegen im Test negativ. Dieses Resultat bestätigt die seit Jahrzehnten beschriebene Halbwertszeit des humoralen Tetanusantitoxins von 8 bis 15 Jahren beim Pferd wie auch beim Menschen. Beide beschriebenen Versuchsergebnisse, die der Fohlen als auch die der erwachsenen Pferde, sollten dazu anregen, die derzeit üblichen, meist zu früh im Leben der Fohlen, in zu kurzen zeitlichen Abständen zwischen G I und G II und viel zu häufig vorgenommenen Wiederholungsimpfungen der erwachsenen Pferde sowie Impfungen auch völlig geschützter Pferde kritisch zu überdenken. Als letzte Fragestellung interessierte die nach dem Vorkommen klinisch inapparent verlaufender Auseinandersetzung von Equiden mit *Clostridium tetani* und entsprechender Immunreaktion. Hierzu stand eine Herde noch nie schutzgeimpfter Esel im Alter von 3 bis 20 Jahren zur Verfügung. 2 von 10 der getesteten Tiere reagierten in Doppeluntersuchungen eindeutig positiv, was als Hinweis auf das Vorkommen klinisch inapparent verlaufender Infektionen gewertet werden kann. Empfehlungen zur Indikationserweiterung und Einsatzoptimierung des TetaCheck® werden gegeben.

Schlüsselwörter: Tetanusimpfung / maternale Antikörper-Transfer / Persistenz / Interferenz mit der Grundimmunisierung / Halbwertszeit Tetanusantitoxin / klinisch inapparente Infektion / Fassisi TetaCheck® / Innovations-Optimierungspotential / Immunologie

Experimental investigations to the immune response of foals and adult horses to tetanus toxoid using the Fassisi TetaCheck®

Mistakes within vaccinating of horses are common and mainly based on misinstructions by the pharmaceutical companies as well as on limited knowledge of the practitioners. This concerns the vaccination against tetanus especially in foals, but also in adult horses. As a contribution to the immune response to tetanus toxoid we tested the transfer of post vaccination antibodies from vaccinated mares to their suckling foals. 100% of the investigated 24 mares and their foals showed immediate transfer of colostral globulins into the foals within the investigated time frame from 10 hours to five days p.n.. In all the investigations we used the horse side test "Fassisi TetaCheck®". In repeated investigations on 69 weaned foals we could demonstrate that the colostral tetanus antibodies persisted at least till 8,5 month p.n.. In 45% of the investigated foals maternal antibodies were present till mid of the 7th month of their live. The registered titers were in the immunoprotective range between 0,1 and 1 i.E./ml serum. In order to investigate the influence of this maternally derived antibodies to the tetanus vaccination we immunized 24 foals, at age from 6 to 8 month, 50% with and 50% without antibodies. Two shots, 8 weeks apart (G I and G II) of a monovalent tetanus toxoid vaccine were given. The seropositive foals responded serologically clearly reduced to G I in comparison to the seronegative foals. This was not related to the different age of the weanlings in both groups. In 4 of the strong positive vaccinates at the time of G I we could observe an elimination of the maternal antibodies despite G I. In contrast, 100% of seronegative foals had responded with seroconversion to G I. 4 weeks past G II all foals under investigation reacted with immunoprotective levels of antibodies. In another trial we investigated the half life time of antitoxin titers in 8 horses at age from 8 to 21 years. These horses had the last tetanus vaccination between 4 to 11 years ago. All of them responded with immunoprotective levels of antibodies. One 25 years old mare that never had been vaccinated against tetanus toxoid reacted negative. This confirms the half life time of 8 to 15 years in horses – same as in human beings. The described results of our investigations in foals as well as in adult horses should stimulate to reflect on the practised vac-

ination programmes using tetanus vaccines: First vaccinations too early in the foals' life, time between GI and GII too short, too many vaccinations and redundant vaccinations in completely immune protected horses. The last point of our investigation was the question of clinically inapparent infections and the possibly resulting immune response. For this reason we investigated 10 donkeys out of a herd of 35 animals – never in their life vaccinated against anything. 2 of the 10 donkeys clearly responded positive in a double investigation 11 weeks later. We value this result as the consequence of an inapparent exposition with *Clostridium tetani* and the hereby stimulated humoral response. Anamnestic inquiries to the 2 donkeys concerning injuries etc. were negative. At last, recommendations and possibilities for improvement and new indications for the Fassisi TetaCheck® were elaborated.

Keywords: Vaccinations against tetanus, maternal antibodies-transfer / persistence / influence to foal vaccination / half life time of tetanus antitoxin / inapparent infection / TetaCheck®-potential for innovation / optimization / immunology

Einleitung

Eine der häufigsten, fehlerhaften Medikationen in der Pferdepraxis betrifft die Anwendung von Impfstoffen. Dies beruht ganz generell zum einem auf dem offenbar noch immer ungenügenden Wissen in der Praxis um die immunologischen Grundvoraussetzungen der zu impfenden Pferde verschiedener Alters- und Nutzungskategorien sowie Zusammensetzung und Potenz der verfügbaren Impfstoffe, zum anderen auf den Angaben einiger Impfstoffhersteller zu ihren Produkten, mit der offenkundigen Absicht vor allem der Umsatzmaximierung (Thein 2012, 2013). Dies dann auch auf Seiten der Anwender mit Berufung auf diese Hersteller.

Dies betrifft auch die Impfung gegen Tetanus, da in diesem Anwendungsbereich die beiden genannten Ursachen i.a. gemeinsam als Argument für die Durchführung immunologisch unkorrekter Impfungen benutzt werden (Thein 2009, 2011).

Die Tetanusimpfung ist die einzige Impfung des Pferdes in unseren Breiten, die als obligat angesehen werden muss auf Grund der permanenten Anwesenheit von *Cl. tetani* in der Umwelt der Pferde und deren Sensibilität gegenüber dem hoch pathogenen Tetanospasmin (Thein 2007). Um die Population vor der Gefahr des manifesten Tetanus sicher zu schützen, ist das Wissen um die Immunogenität von *Cl. tetani* und seiner Toxine sowie der entsprechenden Impfstoffe und dem über die Zeitachse daraus resultierenden Immunschutz genau so wichtig wie das um die Immunkompetenz des Fohlens, die sich daraus ergebenden Konditionen der Erstimpfungen sowie die immundepressiven Stressfaktoren des Pferdes, um Impfungen richtig terminieren und durchführen zu können. Dieses Wissen besteht darin, dass Fohlen mit maternalen Antikörpern nicht geimpft werden sollen, da sie auf derartige Impfungen mit Reaktionen vergleichbar einer Immuntoleranz – also gestörtem wie auch ausbleibendem immunologischem priming und Antikörperbildung – reagieren können, dass die Abstände zwischen den beiden Impfungen der Grundimmunisierung mindestens 6, besser ≥ 8 Wochen betragen sollten und dass die Halbwertszeit des Antitoxins bei Pferd und Mensch 8 bis 15 Jahre beträgt, Wiederholungsimpfungen also nur in entsprechend großem, zeitlichem Abstand erforderlich sind, um lebenslangen Infektionsschutz zu induzieren.

Die Berufung auf die den verfügbaren Impfstoffen beigelegten Produktinformationen (Waschzettel) mit daraus resultierenden, zu früh im Leben der Fohlen, in zu kurzen zeitlichen Abständen und zu häufig im Leben der Pferde vorgenommenen Impfungen, kann nur als rückversichernde Alibihandlung verstanden werden unter Außerachtlassung des angeführten Grundwissens. Waschzettel informieren auch im Interesse der

Hersteller, sie geben damit nicht notwendigerweise den seit Jahrzehnten gültigen Wissensstand zur Immunologie des Tetanus bei Pferd und Mensch wieder. Die Angaben zur postvaxinalen Immunität in den Beipackzetteln reflektieren lediglich die zulassungsrelevante Dauer der durch den jeweiligen Hersteller vorgenommenen Prüfzeit nicht in der jeweiligen Zieltierart und sind nicht relevant für eine ausgetestete und belastbare Immunitätsdauer im Pferd.

Zusammenfassend zu den genannten Kriterien seien die häufigsten Anwendungsfehler bei Impfungen in der täglichen Pferdepraxis wiederholt:

- Zu frühe Impfung der Saugfohlen in Gegenwart homologer, maternaler Kolostralantikörper.
- Zu kurze zeitliche Abstände zwischen den erforderlichen Wiederholungsimpfungen der Grundimmunisierung (G I und G II).
- Zu kurze Impfindervalle bezüglich der nur immunologisch begründbaren Wiederholungsimpfungen und damit viel häufigere Impfungen als zum Aufbau und Erhalt eines lebenslangen Immunschutzes erforderlich.
- Unkritische und überflüssige Impfungen bei banalen medizinischen Interventionen und auch trotz nachweisbar (Equidenpass) belastbarem Immunstatus des jeweiligen Pferdes.
- ‚Missbrauch‘ des Tetanusantigens bei permanenter Anwendung von Influenza- Tetanus- Kombinationsimpfstoffen in viel zu kurzen zeitlichen Intervallen (6 Monate).
- Generelle Unsicherheit in der Handhabung der Impfungen infolge mangelnder Sachkenntnis.

Im Rahmen des vorgestellten Versuches wurden unter Einsatz des Fassisi TetaCheck® folgende Fragestellungen an Fohlen, erwachsenen Pferden und Eseln unterschiedlicher Altersklassen und Impfanamnesen untersucht:

- Abgabe von Tetanus spezifischen Kolostralantikörpern aus geimpften Mutterstuten an ihre bis 6 Tage alten Saugfohlen sowie Quantität und Transfer dieser Antikörper in den Kreislauf der Neonaten.
- Vergleichender Antikörperstatus von Mutterstuten und ihren 4 bis 7 Monate alten, ungeimpften Fohlen sowie Verfolgung der Persistenz der maternalen Antikörper in diesen Fohlen.
- Persistenz maternaler Antikörper in Absetzfohlen im Alter von 5 bis 9 Lebensmonaten.
- Erstimpfung von Absetzfohlen im Alter von 6 bis 9 Monaten mit und ohne maternale Antikörper zum Zeitpunkt dieser Impfung sowie die daraus resultierende Seroreaktion.
- Seroreaktion nach Primovakzination zur Ermittlung des optimalen Zeitpunktes der Erstimpfung im Verhältnis zum Alter und Antikörperstatus der Fohlen.

- Zweitimpfung und Kontrolle der Seroreaktion der Impflinge zur Ermittlung des optimalen Abstandes zwischen Erst- und Zweitimpfung, Untersuchung der Persistenz der Impfantikörper.
- Untersuchung der Antikörper von Pferden mit >3 Jahren zurückliegender Tetanusimpfung.
- Antikörperstatus bei Eseln aus einem Bestand nachweislich nie gegen Tetanus oder andere Infektionserreger geimpfter Tiere.

Innerhalb dieser Untersuchungen wurden zur möglichen Optimierung bezüglich Anwendung und Aussagekraft des verwendeten Fassisi TetaCheck® die folgenden Fragestellungen berücksichtigt:

- Wie relevant ist der relativ hohe Cut off-Wert von 1 i. E./ml?
- Verfügt der Test über eine homogene Sensibilität?
- In welchem Zeitraum liefert der Test endgültig verwertbare, ablesbare Ergebnisse?
- Wie sind differente Reaktionsbanden zu beurteilen?
- Wie verhält es sich mit der Praxisrelevanz und ergibt sich Optimierungspotential?
- Kann der Test auch zur Ermittlung des generellen Globulintransfers via Kolostrum von der Mutterstute in das Saugfohlen zur Anwendung kommen?

Material und Methoden

Pferde

Alle Untersuchungen wurden in der Zeit vom 18.10.2012 bis 16.7.2013 an Blutproben von insgesamt 148 Pferden des Württembergischen Haupt- und Landgestütes Marbach a. d. Lauter vorgenommen. Hierbei handelte es sich um 24 Stuten und ihre Fohlen des Jahrgangs 2013, 31 Stuten und ihre Fohlen des Jahrgangs 2012, 38 Fohlen des Jahrgangs 2012, dazu 9 Pferde aus der Praxis und 10 Esel aus einer Eselhaltung mit 35 Tieren.

ad 1

Zur Untersuchung des Antikörpertransfers von der Mutterstute in das Fohlen standen uns in der Abfohlsaison 2013 24 Mutterstuten und ihre Fohlen zur Verfügung. Es handelte sich hierbei um 14 Stuten der Rasse Deutsches Warmblut (DW), 9 Stuten des Arabischen Vollblutes (OX) und eine des Englischen Vollblutes (XX). Das Alter der Stuten reichte von 4 bis 23 Jahren. Die Untersuchungen zum Transfer maternaler Antikörper via Kolostrum in die Saugfohlen wurden nach satter Kolostrumaufnahme im Bereich von 10 Stunden bis 5 Tage p.n. durchgeführt. Gleichzeitig erfolgte an den Kolostren aller Stuten vergleichsweise eine refraktometrische Untersuchung zur Erfassung des Gesamteiweißgehaltes und an Seren der Fohlen der IDEXX-SNAP Test – zur semiquantitativen Erfassung des Gesamtgammaglobulingehaltes.

ad 2

Zur Untersuchung des vergleichenden Antikörperstatus der Mutterstuten und ihrer zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung 4

bis 7 Monate alten Fohlen der Abfohlsaison 2012 standen uns 31 Stuten mit ihren Fohlen zur Verfügung. 19 dieser Stuten und Fohlen gehörten der Rasse Deutsches Warmblut (DW) an, 11 dem Arabischen Vollblut (OX) und 1 Stute dem Englischen Vollblut (XX). Die Altersverteilung der Stuten entsprach der unter Punkt 1 genannten.

ad 3

Zur Untersuchung der Persistenz maternaler Antikörper (ohne Vergleich zu den jeweiligen Mutterstuten) standen 38 Fohlen der Abfohlsaison 2012 im Alter von 5 bis 9 Lebensmonaten der folgenden Rassen zur Verfügung: 22 DW, 15 OX und 1XX

ad 4 bis 6

Im Immunisierungsversuch befanden sich 24 dieser Fohlen des Jahrgangs 2012 mit unterschiedlichem, passivem Tetanusantikörperstatus zum Zeitpunkt der Erstimpfung (GI, 05.01.2013). Diese Fohlen rekrutierten sich aus den Gruppen 2 und 3, zur Immunisierung kam der Impfstoff Essex Equip T zum Einsatz; die Applikation erfolgte tief intramuskulär in den M. pectoralis. Die Zweitimpfung (GII) wurde acht Wochen nach der Erstimpfung, am 05.03.2013 durchgeführt. Am 16. und am 30. Tag post GI sowie am Tag von GI und 4 Wochen danach wurden die Seren aller Fohlen untersucht.

ad 7

8 Pferde im Alter von 8 bis 21 Jahren, deren letzte Impfung gegen Tetanus nachgeprüft 4 bis 11 Jahre zurücklag sowie eine nie gegen Tetanus geimpfte Warmblutstute konnten in die Untersuchung zur Dauer der Persistenz der Tetanusantikörper einbezogen werden.

ad 8

Aus einem ungeimpften Eselbestand mit 35 Tieren im Alter von 3 bis 20 Jahren wurden 10 Esel unterschiedlichen Alters ausgewählt und einer Untersuchung zur Bestimmung ihres Antikörperspiegels unterzogen. 9 der untersuchten Tiere stammten aus eigener Zucht, 1 Tier (20 Jahre) war im April 2004 in den nachgeprüft ungeimpften Bestand eingestellt worden.

Fassisi TetaCheck®

Der Test wurde zur „zuverlässigen Kontrolle des Tetanus-Antikörper-Titers bei Pferden“ als sog. Horse-side-Schnelltest entwickelt und ist seit dem Jahr 2012 im Handel. Der Schnelltest wurde in einer Studie mit Seren von Pferden, deren Tetanus-Antikörpertiter mittels eines ELISA bestimmt worden war, validiert. Zudem wird jede hergestellte Charge des Tests mit verschiedenen Konzentrationen eines Tetanus-Antitoxins geprüft.

Der Fassisi TetaCheck® beruht auf einem Antigenkonjugat (Gold markiertes Tetanustoxoid) mit einem cut off Wert von >0,1 i.E./ml Antikörper im Serum, resp. 0,2 i.E./ml im Voll-

blut in einer Testkassette (Probenfeld), versehen mit einer Kontrollzone. Die zu untersuchende Probe (Blut oder Serum) passiert nach Zugabe ein Feld mit Gold-markiertem Tetanus-toxoid und bildet je nach Antikörpergehalt – im Vergleich zur Kontrolllinie – eine schwache oder starke Bande. Abbildung 1 zeigt drei Testkassetten mit unterschiedlich stark ausgeprägten Banden in der Testlinienregion (Kassette 1: keine Bande, Kassette 2: schwache Bande, Kassette 3: starke Bande), wobei die Intensität der Banden in der Testlinienregion (T) von der Konzentration an Tetanus-Antitoxin im Untersuchungsgut abhängig ist, damit ist die semi-quantitative Arbeitsweise des Schnelltests belegt.

Laut Hersteller bedeutet eine schwache Bande einen Antikörpertiter im Bereich von >0,1 bis <1 i.E./ml. Als Ablesezeit werden 5 Minuten angegeben. Postuliert wird dieser Test vom Hersteller als sichere Methode zur Ermittlung des serologisch überprüfbaren Tetanusimmunstatus beim Pferd. Demzufolge besitzt das untersuchte Pferd mit einer starken Testlinie einen hohen Antikörperschutz im Bereich eines Antikörpertiters >1 i.E./ml, das Pferd mit nur schwach ausgebildeter Testlinie „einen genügenden Antikörperschutz; eine Impfung sollte



Abb. 1 Reaktionsmuster des Fassisil TetaCheck®: 0 IE/ml: keine Bande in Testlinienregion, 0,1 IE/ml: schwache Bande in Testlinienregion; 2 IE/ml: starke Bande in Testlinienregion im Vergleich zu der intensiv gefärbten Kontrolllinie (C).
Reaction patterns of the Fassisil Teta Check: 0 i.U./ml: no reaction, 0,1 i.U./ml: weak reaction, 2 i.U./ml: strong reaction.

allerdings zeitnah stattfinden. Der Antikörpertiter liegt im Bereich >0,1 und <1 i.E./ml“.

Die in Abbildung 1 dargestellten Reaktionsbanden bildeten die Grundlage für die in vorliegender Arbeit bewerteten Proben. Diese wurden in einem Zeitraum von 1 bis 5 Stunden nach Entnahme untersucht. Der Zeitraum zwischen Entnahme der Probe und Auswertung hatte keinerlei Auswirkung auf die erhaltenen Ergebnisse.

Ergebnisse

ad 1

Die vergleichende Untersuchung der Blutproben von 24 Mutterstuten und ihren Saugfohlen des Jahrgangs 2013 im Bereich von 10 Stunden bis 5 Tagen p.n. ergab eine 100%ige Übereinstimmung der Resultate von Stuten und Fohlen. Dies betraf sowohl die Reaktionszeit als auch die homogenen Stärken der Testlinien im Teta Check. Stuten und Fohlen reagierten übereinstimmend „stark positiv“ innerhalb der angegebenen 5 Minuten (s. Tab.1). Die Stuten hatten die Tetanusaufrischungsimpfung im Oktober 2011 erhalten. Die Untersuchungen ihrer Saugfohlen p.n. fanden im Bereich von 05.03.2013 bis 15.05.2013 statt. Bei keinem der 24 Fohlen war eine Malabsorption oder ein anderer der möglichen Immunmängel zu diagnostizieren gewesen. Mit diesem Resultat erscheint es praktikabel, den Teta-Check als spezifisches Testsystem auch zur Kontrolle des Immunglobulintransfers via Kolostrum in das Saugfohlen einzusetzen.

ad 2

Die Untersuchung der 31 Mutterstuten und ihrer Fohlen des Jahrgangs 2012, die zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung am 18.10.2012 zwischen abgeschlossenem 4. bis abgeschlossenem 7. Lebensmonat alt waren, erbrachte die folgenden Ergebnisse der Einstellungsuntersuchung der Fohlen (Tab.2). Die Mutterstuten hatten zu 100% im Test stark positiv reagiert, ihre letzte Impfung war im Oktober 2010 vorgenommen worden. 21 der untersuchten Fohlen reagierten zu diesem Zeitpunkt im TetaCheck® negativ, insgesamt 10 unterschiedlich positiv.

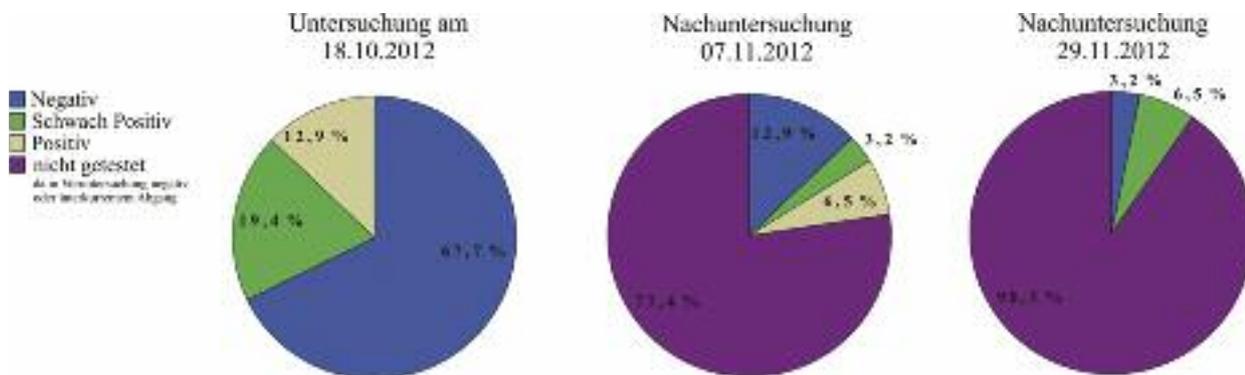


Abb. 2 Graphische Darstellung der Einstellungsuntersuchung und der Ergebnisse aus den Nachuntersuchungen / *Percentage of foals with maternal antibodies at the time of different investigations.*

Tab. 1 Ergebnis des Vergleichs des Antikörpergehalts von Mutterstuten und ihren Saugfohlen im Zeitraum 10 Stunden bis 5 Tage p.n.. SNAP-Test positiv = ≥ 800 mg Gesamtglobulin/dl Serum / *Comparison of the content of antibodies in mares and their suckling foals 10 hours to 5 days p.n.. SNAP test positive = ≥ 800 mg total globulines/ dl.serum*

Stute Nr.	Rasse	Fohlen Abfohlung	Ergebnis Fassisi TetaCheck® (stark positiv)			SNAP Tag 1 p.n.	Kolostrum Refraktometrie
			Zeitpunkt post natum	Stute	Fohlen		
1	OX	28.02.2013	5d	+	+	positiv	25 %
2	OX	28.02.2013	5d	+	+	positiv	25 %
3	OX	01.03.2013	4d	+	+	positiv	20 %
4	DW	01.03.2013	4d	+	+	positiv	34 %
5	OX	04.04.2013	12h	+	+	positiv	26 %
6	DW	05.04.2013	24h	+	+	positiv	30 %
7	OX	06.04.2013	12h	+	+	positiv	23 %
8	DW	08.04.2013	11h	+	+	positiv	30 %
9	DW	09.04.2013	12h	+	+	positiv	31 %
10	DW	13.04.2013	14h	+	+	positiv	16 %
11	DW	15.04.2013	14h	+	+	positiv	28 %
12	DW	15.04.2013	11h	+	+	positiv	20 %
13	DW	17.04.2013	10h	+	+	positiv	14 %
14	XX	20.04.2013	15h	+	+	positiv	16 %
15	DW	23.04.2013	13h	+	+	positiv	21 %
16	OX	26.04.2013	10h	+	+	positiv	23 %
17	OX	05.05.2013	11h	+	+	positiv	24 %
18	DW	07.05.2013	10h	+	+	positiv	28 %
19	DW	09.05.2013	12h	+	+	positiv	29 %
20	DW	09.05.2013	11h	+	+	positiv	20 %
21	DW	10.05.2013	12h	+	+	positiv	24 %
22	DW	12.05.2013	11h	+	+	positiv	31 %
23	OX	14.05.2013	13h	+	+	positiv	24 %
24	OX	14.05.2013	15h	+	+	positiv	19 %

Tab. 2 Ergebnis der Einstellungsuntersuchung von Fohlen unterschiedlichen Alters auf maternale Tetanusantikörper am 18. 10.2012 / *Maternal antibodies in foals of different age at the time of their recruiting*

Fohlen		Ergebnis Fassisi TetaCheck® (Testung 18.10.2012)		
Abfohldatum	Anzahl	Negativ	Schwach positiv	Stark positiv
März 2012	8	7	1	0
April 2012	10	8	2	0
Mai 2012	9	3	3	3
Juni 2012	2	1	0	1
Ohne Angabe	2	2	0	0
Summe	31	21	6	4

Tab.3 Ergebnis der Nachuntersuchungen bzgl. der Persistenz der maternalen Antikörper der bei der Einstellungsuntersuchung positiven Fohlen / *Persistence of maternal antibodies at different investigations*

Fohlen		Ergebnis Fassisi TetaCheck®					
Abfohldatum	Anzahl	Untersuchung 07.11.2012			Untersuchung 29.11.2012		
		negativ	schwach positiv	stark positiv	negativ	schwach positiv	stark positiv
März	1	1	0	0	0	0	0
April	2	2	0	0	0	0	0
Mai	3	1	1	1	1	1	0
Juni	1	0	0	1	0	1	0
Summe	7	4	1	2	1	2	0

Die Nachuntersuchung der am 18.10.2012 positiv getesteten 10 Fohlen erfolgte am 07.11.2012, die der hierbei noch positiven 3 Fohlen am 29.11.2012. 3 Fohlen der ursprünglich 10 positiven konnten bereits am 07.11.2012 wegen interkurrentem Abgang (Verletzungen, Operationen) nicht mehr untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Tests sind in Tab. 3 und graphisch in Abb. 2 dargestellt. In beiden Tests konnten maternale Antikörper bis zum Ende des 7. Lebensmonats nachgewiesen werden.

ad 3

An 38 weiteren Fohlen des gleichen Jahrgangs, die ohne die Untersuchung ihrer Mutterstuten in den Versuch gegangen waren, wurde die Persistenz der maternalen Antikörper vom Ende des 4. Lebensmonats bis maximal zum Ende des 7. Lebensmonats (Test vom 29.11.2012) untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tab.4 aufgezeichnet.

Die 25 Fohlen aus beiden Gruppen, die im Test vom 29.11.2012 noch positiv reagiert hatten, wurden weiter untersucht. Im Test vom 20.12.2012 reagierten noch 18 von ihnen (78%) positiv, davon 12 stark positiv, was einem Schutztiter von >1 i.E./ml Blut und einer Persistenz bis Ende des 7. Lebensmonats entspricht (Tab.5). Damit war zu diesem Zeitpunkt bis maximal Ende des 7. Lebensmonats Persistenz der maternalen Tetanusantikörper auf hohem Niveau nachgewiesen. Am 05.01.2013 wurden diese 24 Fohlen (ein interkurrenter Abgang) in das Immunisierungsprogramm aufgenommen und zum Zweck der Ermittlung ihrer Antikörperspiegel zum Zeitpunkt der Grundimmunisierung (GI am 5.1.2013) am 04.01.2013 im TetaCheck® nachuntersucht. Das Ergebnis der individuellen, auf das jeweilige Geburtsdatum bezogenen Antikörperreaktion und damit der individuellen Persistenz maternalen Antikörper reflektiert Tabelle 6. 50% aller bis zu diesem Zeitpunkt noch antikörperpositiv gebliebenen Fohlen reagierten positiv, 37,5% von allen sogar stark positiv bis maximal zum abgeschlossenen 8. Lebensmonat.

ad 4 bis 6

Einen Tag nach diesem Test erfolgte am 05.01.2013 die Erstimpfung der Grundimmunisierung (GI) dieser 24 Fohlen. Kontrollen mit dem Fassisi TetaCheck® erfolgten am 21.1.2013, am 05.02.2013 und am 05.03.2013. An diesem Tag wurde die Zweitimpfung (GII) vorgenommen, deren Resultat am 06.04.2013 überprüft wurde (s. Tab 7). In dieser Tabelle sind die im Test befindlichen Fohlen, entgegen der Nummerierung der Tab 6, nach ihrem Antikörperstatus zum Zeitpunkt der Primovakzination aufgelistet. Daraus ergibt sich eine Änderung der numerischen Zuordnung.

Wie dieser Tabelle zu entnehmen ist, reagierten die zum Zeitpunkt der Erstimpfung noch seropositiven Fohlen auf die Impfung deutlich schlechter als die seronegativen Impflinge (Test vom 21.01.2013, 17 Tage p. GI), unabhängig vom Lebensalter. Bei 4 der positiven Probanden (Fohlen Nr.2,3,9,12) ging der Abbau der maternalen Antikörper trotz GI offensichtlich weiter, bei dem Junifohlen Nr. 12 dauerte dies bis zum 05.02.2013, also bis zu einem Monat nach GI. Fohlen Nr. 2 reagierte 4 Wochen p. GI zunächst schwach positiv und am Tag von GII wieder negativ, um dann erst diese zweite Immunisierung 4 Wochen später mit einem deutlichen Titeranstieg zu beantworten. Dagegen reagierten alle seronegativen Erstimpflinge – bei vergleichbarem Altersspektrum – mit Ausnahme des Fohlens Nr. 22 am Tag 16 p. GI positiv, 7 der Fohlen schon mit einer starken Antikörperreaktion, die auf einen belastbaren Immunschutz mit Titern >1 i.E./ml Serum 16 Tage p. vacc. schließen lässt. Fohlen Nr.2 reagierte dann 4 Wochen nach GI im Test stark positiv.

Die Revakzination (GII), die auf Grund langjähriger, eigener Erfahrungen 8 Wochen nach GI vorgenommen wurde, beantworteten alle Fohlen im Test 4 Wochen nach GII (06.04.2013) mit einer stark positiven Reaktion. Dies betraf auch das Fohlen Nr.2 aus der Gruppe der Probanden mit zum Zeitpunkt der Erstimpfung stark positiven, maternalen Antikörpern. Diesen Ergebnissen zufolge baute dieses Fohlen

Tab. 4 Ergebnis der Einstellungsuntersuchung von 38 Fohlen des Jahrgangs 2012. 2 der Maifohlen wurden in einer externen Klinik wegen vorzunehmender OP Tetanus geimpft. Dieser Wert ist durch die Klammer dargestellt, diese Fohlen wurden im Weiteren nicht berücksichtigt. / *Maternal antibodies in 38 foals born 2012 at the time of their recruiting. 2 foals (may 2012) have been externally immunized against tetanus and were excluded from this investigations. Number in brackets.*

Fohlen		Ergebnis Fassisi TetaCheck® (Testung 29.11.2012)		
Abfohldatum	Anzahl	Negativ	Schwach positiv	Stark positiv
April 2012	3	2	1	0
Mai 2012	29	11	8	8 (10)
Juni 2012	5	1	2	2
Juli 2012	1	0	0	1

Tab. 5 Ergebnis der Untersuchung zur Antikörperpersistenz bei 25 Fohlen / *Persistence of maternal antibodies in 25 foals.*

Fohlen		Ergebnis Fassisi TetaCheck® (Testung 20.12.2012)		
Abfohldatum	Anzahl	Negativ	Schwach positiv	Stark positiv
April 2012	1	1	0	0
Mai 2012	18	4	4	10
Juni 2012	5	2	2	1
Juli 2012	1	0	0	1
Summe	25	7	6	12

trotz Erstimpfung seine maternalen Antikörper bis zum Ende seines 10 Lebensmonats ab, um dann GI mit einer starken, aktiven Antikörperbildung zu beantworten.

ad 7

8 Pferde konnten ermittelt werden, deren überprüfte Tetanus - Impfanamnesen ergaben, dass diese sowohl inkomplett waren als vor allem auch die letzten Impfungen bis zu 11 Jahre zurücklagen, dazu eine 25 Jahre alte, nachgeprüft nie geimpfte Stute. Die Daten dieser unterschiedlich alten Pferde und das Resultat der Überprüfung ihres Antikörperstatus sind in Tab. 8 zusammengefasst. Die Spanne der impffreien Intervalle betrug 4 bis 11 Jahre, dennoch reagierten alle Pferde im Test positiv. 5 dieser Probanden mit 4, 5 und 11 Jahre zurückliegender Tetanusimpfung reagierten stark, also mit voll belastbarem Immunschutz von >1i.E./ml, 3 dieser Pferde mit 5, 9 und 10 Jahren impffreien Intervalls reagierten mit ausreichendem Immunschutz von <1 i.E./ml. Eine 25 Jahre alte, aus Einzelhaltung stammende, verlässlich nie gegen Tetanus geimpfte Stute reagierte dagegen im Test negativ. Diese Ergebnisse bestätigen einmal mehr die sehr lange Schutzwirkung der Tetanusimpfung auf Basis der Halbwertszeit des Tetanus- Antitoxins beim Pferd von 8 bis 15 Jahren und damit die bereits

1970 von *Löhner* und *Radvilla* (1975) experimentell bestätigte Tatsache, dass bereits die Grundimmunisierung – im entsprechend höheren Alter der Fohlen und Abständen zwischen GI und GII bis zu 12 Wochen vorgenommen – einen lebenslangen Immunschutz bewirkt.

ad 8

Aus einer 35-köpfigen Herde von Eseln, die nachweislich nie gegen Tetanus oder andere Infektionserreger geimpft worden waren, untersuchten wir 10 Tiere unterschiedlichen Alters im TetaCheck®. Mit Ausnahme des Esels Nr.1, der im September 2002 aus Spanien importiert worden war, stammten alle anderen Tiere aus eigener Zucht. 8 Tiere reagierten negativ, 2 positiv. Zur Kontrolle des Antikörperverlaufs und zur Absicherung des Ergebnisses der beiden positiv getesteten Tiere Nr.4 und Nr. 9 (Test v.2.4.2013) wurde der Test am 25.06.2013 wiederholt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tab.9 dargestellt.

Mit den erhaltenen Ergebnissen ist ein weiterer Hinweis auf das Vorkommen klinisch inapparent verlaufender Auseinandersetzung mit *Cl. tetani*, gefolgt von der Bildung schutzverleihender Antikörper gegeben (*Habermann* und *Dimpfel* 1973, *Habermann* et al. 1973, *Jansen* and *Knoecke* 1979, *Thein* 2009, 2011).

Tab. 6 Individuelle, altersmäßige Verteilung maternaler Antikörper und deren Persistenz bei 24 Fohlen zum Zeitpunkt der Grundimmunisierung. *Individual age related distribution of maternal antibodies and their persistence in 24 foals at the time of their first vaccination.*

Fohlen		Ergebnis Fassisi TetaCheck® vor Grundimmunisierung G1 (Datum: 04.01.2013)		
Nr.	Abfohldatum	Negativ	Schwach positiv	Stark positiv
1	02.05.2013	x		
2	07.05.2012	x		
3	10.05.2012			x
4	12.05.2012			x
5	13.05.2012		x	
6	15.05.2012			x
7	17.05.2012			x
8	17.05.2012	x		
9	20.05.2012	x		
10	20.05.2012	x		
11	21.05.2012	x		
12	22.05.2012			x
13	24.05.2012		x	
14	26.05.2012	x		
15	27.05.2012			x
16	29.05.2012			x
17	29.05.2012	x		
18	30.05.2012	x		
19	01.06.2012	x		
20	01.06.2012			x
21	08.06.2012		x	
22	11.06.2012	x		
23	13.06.2012	x		
24	14.07.2012			x

Fassisi TetaCheck®

Hinsichtlich der Praxistauglichkeit des Fassisi TetaCheck® unter den vom Hersteller vorgegebenen Anwendungs- Ablesevorschriften und Interpretation der Resultate vor Ort ergaben sich einige Einschränkungen. In erster Linie ist dies die vorgegebene Ablesezeit von 5 Minuten nach Einbringen der zu untersuchenden Probe mit dem Anspruch auf ein verwertbares Resultat. Hier ergaben sich in den 436 ausgewerteten Untersuchungen, die wir an Pferden unterschiedlichen Alters und unterschiedlichen Antikörpergehalts durchführten, erhebliche Abweichungen. Als minimale Ablesezeit bis zur Ausprägung einer endgültigen Testlinie konnten wir bei stark positiv reagierenden Blutproben 10 Minuten ermitteln. Bei den – hinsichtlich der Vornahme immunpräventiver Maßnahmen – besonders wichtigen, schwach positiven Pferden ergaben sich dagegen in Einzelfällen Ablesezeiten bis maximal 40 min bis zur Ausprägung endgültig verwertbarer Banden. Hierauf scheint auch die individuelle Fließgeschwin-

digkeit des Blutes der Probanden einen Einfluss zu haben, wobei zu berücksichtigen ist, dass theoretisch die langsamer fließende Probe mit der daraus resultierenden längeren Kontaktzeit zum Antigen die leicht intensiver gefärbte Testlinie bedingen könnte. Ein weiterer Problempunkt kann eine sehr schwach positive Reaktion im Vergleich zur Kontrolllinie sein. Daraus können Interpretationsschwierigkeiten bezüglich der Aussage negativ oder noch positiv mit entsprechenden, praktischen Konsequenzen entstehen. Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, dass diese Kontrolllinie lediglich als interne Funktionskontrolle des Teststreifens dient und daher nicht als Referenz für die Testlinie verwendet werden sollte. Diese Punkte betreffen ausschließlich die Maßnahmen, für die der Test lt. Hersteller eingesetzt werden soll – zur Ermittlung von Pferden mit belastbarem Immunschutz und solchen mit grenzwertigem, für die in der Gebrauchsanweisung dann eine „zeitnahe“ Tetanusimpfung empfohlen wird. Allein diese Empfehlung ist immunologisch fragwürdig, da der hohe Cut-off-Level des Tests, auf den sich

Tab. 7 Verlauf der Antikörperbildung nach Grundimmunisierung – GI und GII – bei zum Zeitpunkt der Erstimpfung seropositiven und seronegativen Fohlen / *Course of antibody formation after basic vaccination (G1 and G2) in seronegative and seropositive vaccinates*

Fohlen	Abfohldatum	Ergebnis Fassisi TetaCheck®				
		GI 05.01.2013		GII 05.03.2013		
		04.01.2013	21.01.2013	05.02.2013	05.03.2013	06.04.2013
1	15.05.2012	+	+	n.t.	+	+
2	10.05.2012	+	-	(+)	-	+
3	27.05.2012	+	-	+	+	+
4	22.05.2012	+	+	n.t.	+	+
5	12.05.2012	+	+	n.t.	+	+
6	17.05.2012	+	(+)	(+)	(+)	+
7	14.07.2012	+	(+)	(+)	(+)	+
8	29.05.2012	+	+	n.t.	+	+
9	01.06.2012	+	-	+	+	+
10	13.05.2012	(+)	(+)	(+)	Abgang	
11	24.05.2012	(+)	+	n.t.	+	+
12	08.06.2012	(+)	-	-	(+)	+
13	20.05.2012	-	(+)	(+)	(+)	+
14	11.06.2012	-	+	n.t.	(+)	+
15	29.05.2012	-	(+)	(+)	+	+
16	30.05.2012	-	+	n.t.	+	+
17	07.05.2012	-	(+)	(+)	+	+
18	26.05.2012	-	(+)	(+)	(+)	+
19	17.05.2012	-	+	n.t.	+	+
20	01.06.2012	-	+	n.t.	+	+
21	20.05.2012	-	+	n.t.	+	+
22	21.05.2012	-	-	+	+	+
23	13.06.2012	-	+	n.t.	+	+
24	02.05.2012	-	+	n.t.	+	+

GI: 5.1.2013, GII: 5.3.2013 + = stark positiv, (+) = schwach positiv, n. t. = nicht getestet

diese Aussage begründet, über dem Antikörpergehalt liegt, der dem betreffenden Pferd noch einen belastbaren Immunschutz vermittelt. Auch Pferde ohne ermittelte Antikörper (ELISA) erwiesen sich in experimentellen Infektionen noch gegen *Cl. tetani* geschützt (Löhner und Radvila 1970, Radvila 1975).

Ein interessanter Aspekt, der sich aus den Untersuchungen der neugeborenen Fohlen nach erster, satter Kolostrumaufnahme ergab, ist die mögliche Verwendung des TetaCheck®

als Diagnostikum für den Nachweis des genügenden Transfers maternaler Gammaglobuline via Kolostrum in das Saugfohlen. In allen Fällen hatten diese Fohlen wie ihre Mutterstuten einheitlich schnell und stark reagiert. Damit ist neben der Spezifität der Tetanusantikörper gleichzeitig ein eindeutiger, diagnostischer Hinweis darauf gegeben, dass mit den Isotypen auch quantitativ genügend Subisotypen mit Antigen-spezifität, wie IgG_a, IgG_b und Ig(T) per Kolostrum in das Saugfohlen gelangt waren.

Tab. 8 Überprüfung des Antikörperstatus bei Pferden mit 4 bis 11 Jahre zurückliegender Tetanusimpfung / *Status of antibodies in horses vaccinated against tetanus between 4 and 11 years ago*

Pferd	Rasse	Geburtsdatum	Impfanamnese	Ergebnis Fassisi TetaCheck®			Testdatum
				Negativ	Schwach positiv	Stark positiv	
1	Warmblut	1993	2003, 2004, 2006 April 2008			x	02.03.2013
2	Kaltblut	20.04.2002	20.03.2004 22.04.2004		x		22.03.2013
3	Kaltblut	28.04.1992	29.12.2000 09.05.2002			x	22.03.2013
4	Pony	2005	vor 2008		x		07.05.2013
5	Warmblut	1999	09.08.2001 29.08.2001 18.08.2003		x		26.06.2013
6	Warmblut	2000	März 2001, Mai 2001, Mai 2002, Oktober 2004, Oktober 2006, Oktober 2009			x	27.06.2013
7	Warmblut	2002	Januar 2006, Februar 2006, Mai 2007, September 2009			x	27.06.2013
8	Warmblut	1996	regulär letzte Impfung 2008			x	16.07.2013
9	Warmblut	1988	nie geimpft	x			16.07.2013

Tab. 9 Ergebnis der Untersuchung auf Tetanusantikörper nie geimpfter Esel / *Status of antibodies in donkeys never been vaccinated against tetanus*

Nr.	Esel	Geburtsdatum	Ergebnis Fassisi TetaCheck® (Testung 02.04.2013)			Ergebnis Fassisi TetaCheck® (Testung 25.06.2013)		
			Negativ	Schwach positiv	Stark positiv	Negativ	Schwach Positiv	Stark positiv
1.		1993	x				x	
2.		15.04.2004	x				x	
3.		08.06.2004	x				x	
4.		03.09.2006			x		x	
5.		23.09.2008	x				x	
6.		15.10.2008	x				x	
7.		06.01.2009	x				x	
8.		10.05.2009	x				x	
9.		19.09.2009		x			x	
10.		27.07.2010	x				x	

Diskussion der Ergebnisse

Mit Hilfe des Fassisi TetaCheck® war es erstmals möglich, zeitgleich zu den Probenentnahmen an einer Vielzahl von Fohlen und erwachsenen Pferden unterschiedlichen Alters und verschiedener Impfanamnesen in Sequenzuntersuchungen deren aktuellen Tetanus-Antikörperstatus zu ermitteln. Innerhalb dieser Untersuchungen konnte damit ein wesentlicher Beitrag zur Klärung der wichtigen Fragen nach dem Antikörpertransfer über das Kolostrum der Mutterstute in das Saugfohlen, Quantität und Dauer der Persistenz der passiv erworbenen, maternalen Antikörper in Absetzfohlen, deren Einfluss auf die Immunreaktion nach Grundimmunisierung und damit auch dem optimalen Zeitpunkt der Erstimpfung und dem zeitlichen Abstand zwischen GI und GII dieser Impfung geleistet werden. Die Untersuchung der Dauer der Persistenz von Impfantikörpern in erwachsenen Pferden mit nachweislich 4 bis 11 Jahre zurückliegender Schutzimpfung ergab erwartungsgemäß eine langjährige, bis zu 11 Jahren p. vacc. nachweisbare, schutzverleihende Antikörperpersistenz, was die derzeit praktizierten Impfgewohnheiten mit 2- bis 3-jährigen und kürzeren zeitlichen Abständen zwischen den Wiederholungsimpfungen deutlich konterkariert. Die Untersuchung völlig ungeimpfter Esel auf deren Antikörperstatus lieferte den Hinweis auf eine antitoxische Immunreaktion nach klinisch inapparent verlaufender Auseinandersetzung mit *Cl. tetani* bei 2 von 10 untersuchten Tieren.

Eine 100%-ige Übereinstimmung der maternalen Antikörpertiter im Vergleich zu dem ihrer Saugfohlen erbrachte die vergleichende Untersuchung von 24 Mutterstuten und ihren Fohlen 10 Stunden bis 5 Tage pn. nach entsprechender Kolostrumaufnahme seitens der Fohlen. Sowohl die Stuten, deren letzte Tetanusimpfung zum Zeitpunkt dieser Untersuchung im Schnitt 2,5 Jahre zurücklag als auch deren Fohlen erwiesen sich damit als voll belastbar gegen Tetanus geschützt. Auch der bei den Fohlen routinemäßig, etwa 24 Stunden p.n. durchgeführte Test zur Ermittlung des Serumgehalts an Gesamtgammaglobulinen (SNAP-Test, IDEXX) bestätigte den ausreichenden Transfer der maternalen Kolostralglobuline.

Die Gammaglobulin-Subisotypen, die maßgeblich die protektive γ -Fraktion gegenüber *Cl. tetani* Toxin/Toxoid ausmachen, gehören zum Typ IgGa, IgGb und IgG(T) als wesentliche Anteile der gesamten γ -Fraktion (Wilson et al. 2001). Damit repräsentieren sie einen Teil des Spektrums, das auch im TetaCheck® erfasst wird. Bei in diesem Test sicher positiv reagierenden Saugfohlen – wie in allen von uns untersuchten Fällen – ist daran zu denken, diesen auch zur Erfassung des generellen Transfers der maternalen Globuline aus dem Kolostrum in das Saugfohlen einzusetzen. Auch als spezifisch qualitativer Test wäre er damit den derzeit im Handel befindlichen, semiquantitativ arbeitenden, mit denen bestenfalls der protektive Grenzwert von 400 bis 800 mg Gesamtglobulin/dl Serum im Fohlen ermittelt werden kann, zumindest gleichwertig, wenn nicht überlegen.

Die auch in den vorliegenden Untersuchungen routinemäßig durchgeführte Refraktometrie zur Ermittlung des Eiweißgehaltes der Stutenkolostrum korrelierte nicht wirklich zum Gesamtglobulingehalt, wie das schon früher nachgewiesen werden konnte (Eisenhauer 1991, Thein et al. 1989). Steht kein praktischer Test zur Erfassung des Gesamtglobulingehalts im

Kolostrum, wie wir ihn entwickelt hatten (Thein et al. 1989), zur Verfügung, so bleibt nur der indirekte Weg zu dessen Ermittlung – mit erforderlichen, quantitativen Abstrichen auf Seiten des Fohlens – durch die Messung des in das Fohlen transferierten und in dessen Blut nachweisbarem, antigenun-spezifischen Gesamtglobulingehalt, darüber hinaus- wie in dieser Untersuchung erstmals nachgewiesen- durch Einsatz des qualitativ wie quantitativ arbeitenden TetaCheck® und dadurch möglicher Aussage auch zum Umfang des spezifischen Immunschutzes.

Von besonderem Interesse und praktischer Relevanz sind die Ergebnisse der sequenziellen Untersuchungen zur Persistenz der maternalen Tetanusantikörper der insgesamt 69 Absetzfohlen des Jahrgangs 2012. Die mituntersuchten Mutterstuten, deren letzte Tetanusimpfung zum Zeitpunkt des Tests mindestens 2,5 Jahre zurücklag, reagierten einheitlich am 18.10.2012 stark positiv. Auf Basis der Testergebnisse der Stuten und ihrer Saugfohlen des Jahrgangs 2013 ist anzunehmen, dass auch die Fohlen des Jahrgangs 2012 als Neonaten die gleichen Antikörperspiegel aufwiesen wie ihre Mutterstuten. Diese passiven Kolostralantikörper waren innerhalb der Erstuntersuchung noch bei 10 von 31 Fohlen – also 32,26% – nachzuweisen. Die zeitliche Spanne reichte hierbei vom abgeschlossenen 4. Lebensmonat (1 Junifohlen) bis zum abgeschlossenen 7. Lebensmonat (1 Märzfohlen). In den weiteren Untersuchungen dieser Fohlen konnte die maximale Dauer der Antikörperpersistenz bis gegen Ende des 8. Lebensmonats nachgewiesen werden. Innerhalb des absoluten Alters dieser Fohlen der Gruppe 1 in Beziehung zu ihrem Antikörperstatus konnte lediglich eine Tendenz festgestellt werden. Dies liegt wohl auch daran, dass der eingesetzte Test lediglich relevante Grenzwerte, nicht aber die absoluten Titer erfasst. Diese können also durchaus differieren; dies und das unterschiedliche Plasmavolumen der unterschiedlich stark wachsenden Fohlen mit einem entsprechenden Verdünnungseffekt der einmal via Kolostrum aufgenommenen Globulinspiegel kann hierzu beitragen (Thein 2003).

Bei den 38 Fohlen der Gruppe 2 des gleichen Jahrgangs ergab sich bezüglich der maximalen Dauer nachweisbarer, maternalen Antikörper tendenziell die gleiche Situation. In dieser Gruppe reagierten in der Untersuchung vom 20.12.2012 von 18 Maifohlen noch 10 (55%) stark positiv – bis zum abgeschlossenen 7. Lebensmonat – mit einem hohen Antikörpertiter von >1 i.E./ml Serum, was einen faktisch noch länger anhaltenden, passiv erworbenen Immunschutz impliziert.

In der Nachuntersuchung (4.1.2013) der 24 Fohlen aus den beiden Gruppen, die am 5.1.2013 in das Impfprogramm gingen, reagierten von den 10 im Test stark positiven Maifohlen noch immer 7 stark positiv, also bis über die Mitte des 8. Lebensmonats hinaus.

Zur Erstimpfung mit einer monovalenten Tetanustoxoidvaccine hatten wir die Fohlen in die Gruppe der zu diesem Zeitpunkt seronegativen und die im TetaCheck® schwach und stark positiv reagierenden unterteilt. Bei den 12 positiv reagierenden Fohlen handelte es sich um die bereits angeführten 10 Maifohlen und 2 Fohlen, die in der ersten Juniwoche geboren worden waren, bei den 12 negativen um 9 Maifohlen und 3 von Anfang bis Mitte Juni geborene.

Dass maternale Antikörper im Fohlen mit dessen durch Vakzination erzielbarem Immunitätsaufbau negativ interferieren, ist gegenüber verschiedenen Impfantigenen, wie Equinem Herpesvirus Serotyp 1 und Serotyp 4, Influenza H7/N7 und H3/N8, aber insbesondere auch gegenüber Tetanustoxoid international wiederholt beschrieben (von Oirschot et al. 1991, Cullinane et al. 1994, Breathnach et al. 1999, Holland et al. 1999, Wilson und Rossdale 1999, Wilson et al. 2001, Thein 2003).

Dazu kommt, dass Absetzfohlen auch erst gegen Ende ihres ersten Lebensjahres mit der Synthese des kompletten, funktionellen Sets der erforderlichen Subisotypen aus der Gamma-globulinfraktion auf parenteralen Antigenstimulus reagieren können, also erst zu diesem Zeitpunkt hinsichtlich ihres Immunstatus dem erwachsenen Pferd vergleichbar sind (Jeffcott 1974, Thein 1979, Thein 1983, Sheoran et al. 2000, Wilson et al. 2001, Holznagel et al. 2003). Die unterschiedliche Rolle der einzelnen IgG-Subisotypen in der Abwehr bakterieller wie viraler Infektionen ist annähernd bekannt. Von besonderer Wichtigkeit hierbei ist das IgGb; es dominiert mengenmäßig bei erwachsenen Pferden und bei Fohlen mit Kolostrantikörpern. Gerade dieses wichtige Globulin wird aktiv aber erst gegen Ende des 4. Lebensmonats im Fohlen gebildet und liegt auch bei Jährlingen noch deutlich unter den Quantitäten, die bei erwachsenen Pferden im Allgemeinen nachzuweisen sind (Holznagel et al. 2003). Dies hat Konsequenzen bezüglich der Erstimpfung der Fohlen, die auch wegen dieser biologisch funktionellen Grundlage der sich unterschiedlich verhaltenden IgG-Subisotypen des jungen Pferdes entsprechend spät vorzunehmen ist (Wilson et al. 2001, Thein 2002, 2003, 2007).

Die Interferenz der Kolostrantikörper mit einer aktiven Immunisierung und die langsame Entwicklung des IgGb tragen dazu bei, dass der Impferfolg nach zu früher Impfung, wie er in der Praxis üblich und Teil der meisten Impfpfehlungen ist, unzureichend bis völlig ausbleibend sein kann. Radvila (1975) schlägt auf Grund seiner Erfahrungen zum Aufbau einer postvazinal belastbaren Immunität des Pferdes gegenüber Tetanus zeitliche Abstände zwischen G I und G II von 12 Wochen vor. Dies entspricht den Impfpfehlungen der Humanmedizin (Mayr 1995). Auf Grund eigener, jahrzehntelanger Untersuchungen zu diesem Problem wird im Haupt- und Landgestüt Marbach erst ab einem Fohlenalter im 9. Lebensmonat und mit Abständen von ≥ 8 Wochen zwischen G I und G II mit nachgeprüft gutem Erfolg geimpft, ein Konzept, das auch international bestätigt ist (Wilson et al. 2001, Thein 2003, Thein et al. 2005). Diese verlängerten Zeitintervalle haben zudem den Vorteil, dass bei Fohlen, die zum Zeitpunkt von G I noch über maternale Antikörper verfügen, diese bis G II abgebaut werden, was auch die vorliegende Untersuchung bestätigt. Dies hat einen günstigen Effekt auf die Immuninduktion dieser Zweitimpfung im älteren Fohlen auch wegen der erforderlichen Zeitspanne, die die B-Zellen zu ihrer genetischen Synthese im Hinblick auf eine spezifische Antikörperbildung benötigen.

Wie die vorliegende Untersuchung belegt, reagierten die Fohlen mit Kolostrantikörpern erkennbar schlechter auf die Primovakzination als die seronegativen Impflinge, obwohl sie zum Zeitpunkt dieser Impfung bereits 7 bis 8 Monate alt waren. Bei 4 dieser seropositiv geimpften Fohlen ging der Abbau der

maternalen Antikörper trotz G I offensichtlich noch bis zu einem Monat p. vacc. weiter. Die seronegativen Impflinge dagegen beantworteten G I alle mit Antikörperbildung, die Mehrzahl von ihnen mit hohen, schutzverleihenden Titern im Bereich von > 1 i.E./ml. Die Anbildung der Antikörper bei den seropositiv geimpften Fohlen bis zu ihrer Untersuchung am 5.3.2013, 8 Wochen nach G I und dem Tag der Revakzination, ging deutlich langsamer vor sich als dies bei den zum Zeitpunkt der Primovakzination seronegativen Fohlen der Fall war.

Wahrscheinlich auf Grund des Alters und der altersabhängigen Komplettierung der Subisotypen beantworteten alle Fohlen im Alter von 9 bis 10 Monaten die Zweitimpfung mit schutzverleihenden Antikörpern 4 Wochen p. vacc.. Im Zusammenhang mit dem Erstimpfalter wurde bereits 1979 von Jansen und Knoecke nachgewiesen, dass Fohlen aus gegen Tetanus geimpften Mutterstuten, die im 3./4. Lebensmonat oder noch früher erstmals gegen Tetanus vakziniert wurden, zum Problem der sog. „Nonresponder“ führten. Diese Fohlen blieben trotz weiterer aktiver Impfungen empfänglich gegenüber Wundstarrkrampf, da sie nur geringe oder keine Antitoxine entwickelt hatten. In eigenen Untersuchungen zu diesem Problem konnten wir in Immunisierungs- und Infektionsexperimenten mit Tetanustoxoidimpfstoffen an Fohlen und erwachsenen Pferden diese Ergebnisse bestätigen. Bei zu jungen Erstimpflingen mit geringen maternalen Antikörpertitern (ELISA 1:2) konnten trotz 2x intramuskulärer Impfungen keine nennenswerten Titeranstiege induziert werden. Die absoluten Titer der maternalen Antikörper allein konnten nicht die Ursache für den ausbleibenden Impferfolg gewesen sein, da bei erwachsenen Pferden mit gleichen Ausgangstitern zum Zeitpunkt der Erstimpfung eine signifikante Boosterung erfolgte. Der Einfluss der maternalen, homologen Antikörper als Ursache dieser auch in der vorliegenden Untersuchung bestätigten reduzierten bis ausbleibenden Reaktion auf das Impfantigen scheint nicht absolut Titerabhängig und wohl auch nur ein funktioneller Anteil im nicht ausgereiften, spezifischen Immunsystem des Saugfohlens zu sein. Es wird auch vermutet, dass über diese Antikörper eine Maskierung des homologen Antigenerkennungsdienstes mit der Folge negativer Interferenz zur aktiven Bildung eigener Antikörper induziert wird (Tizard 1988). Dass derartige Fohlen trotz späterer, wiederholt vorgenommener Tetanusimpfungen nicht mit entsprechenden Antitoxintitern reagieren und ein Leben lang ungeschützt bleiben können, ist experimentell bewiesen (Baljer et al. 1982, Jansen und Knoecke 1979).

Auch in Untersuchungen von Wilson et al. (1999, 2001) wurde die Persistenz maternaler Antikörper der Subisotypen IgGa und IgGb über den sechsten Lebensmonat der Fohlen hinaus nachgewiesen und deren Einfluss auf die Impfung mit Tetanus- und Influenzaimpfstoff untersucht. Hierbei erwies sich, dass Jährlinge signifikant besser auf die Erstimpfungen reagierten als jüngere Fohlen; die Antikörperbildung war bei Jährlingen postvazinal deutlich höher als bei sechsmonatigen Fohlen und bei sechsmonatigen Erstimpflingen deutlich höher als bei dreimonatigen. Darüber hinaus genügte bei Tetanus bereits eine einzige Impfung zur Induktion höchster Antitoxintiter vom Typ IgG (T) aber auch IgGa und IgGb. Dieses Ergebnis deckt sich mit den von uns im Impfvorsuch gemachten Beobachtungen.

Im Gegensatz zu den angeführten Ergebnissen stehen die im Leben der Fohlen auf Basis vorgegebener Empfehlungen

diverser Institutionen in der Regel viel zu früh und in viel zu kurzen Abständen vorgenommenen Impfungen der Grundimmunisierung in der täglichen Praxis. Gleiches gilt für die Wiederholungsimpfungen und deren zeitliche Abstände bei den erwachsenen Pferden. Seit Jahrzehnten ist bekannt, dass die Halbwertszeit des Tetanusantitoxins bei Mensch und Pferd 8 bis 15 Jahre beträgt, die Impfpläne beim Menschen sind – wie bereits angeführt – mit Wiederholungsimpfungen in 8-jährigem Abstand darauf abgestellt, beim Pferd wird entgegen diesem fundamentalen Wissen in wesentlich kürzeren Abständen geimpft und meist zusätzlich bei jeder Bagatelleverletzung und Klinikeinweisung.

Die untersuchten 8 Pferde im Alter von 8 bis 20 Jahren mit dokumentierter und nachgeprüfter Tetanusimpfanamnese und letzter Impfung vor 4 bis 11 Jahren zum Zeitpunkt ihrer Untersuchung reagierten zu 100% antikörperpositiv mit schutzverleihenden Titern. 4 der Pferde mit bis zu 11 Jahren Abstand zur letzten Impfung antworteten mit einer starken Reaktion, also mit weit über dem protektiven Level liegendem, spezifischen Globulingehalt.

Allein diese Untersuchung stellt die in den Produktinformationen der meisten Hersteller von Tetanusvakzinen gegebenen Empfehlungen zur Wiederholungsimpfung in 2- bis 3-jährigem Abstand in Frage, von den gepflogenen Wiederholungsimpfungen in 6-monatigem Abstand bei der Verwendung der Kombinationsimpfstoffe Influenza mit Tetanus ganz zu schweigen. Diese zu oft vorgenommenen Impfungen führen ganz und gar nicht zu einer Potenzierung des Immunschutzes – sie können diesen eher stören. Auch die Befürchtung mancher Praktiker, wenn sie nicht in den dem jeweiligen Tetanusimpfstoff vom Hersteller vorgeschriebenen, kurzen zeitlichen Abständen revakzinieren würden, könnten sie „forensisch auffällig“ werden, bedarf keiner weiteren Erörterung. Es existieren keine antigenen Unterschiede zwischen den monovalenten Tetanustoxoidimpfstoffen. Die in den Gebrauchsanweisungen gegebenen Empfehlungen für Wiederholungsimpfungen in zwei- oder dreijährigem Abstand beruhen nicht auf Produktunterschieden, sondern auf zulassungsrelevanten Daten, die in der Regel an kleinen Versuchstieren erarbeitet wurden.

Eine Fragestellung, die in der vorliegenden Untersuchung interessierte, war die nach dem Vorkommen von „Normalantitoxin“ im Blut von Equiden. Ungeimpfte, erwachsene Pferde standen uns hierfür in ausreichender Anzahl nicht zur Verfügung, dafür aber 35 sicher nicht geimpfte Esel. 10 dieser Tiere konnten wir in 2 Tests, durchgeführt im Abstand von 2,5 Monaten im TetaCheck® untersuchen. 2 dieser Esel reagierten in beiden Untersuchungen positiv. Über tetanusverdächtige Wunden/Verletzungen bei diesen Tieren war in der Praxis nichts bekannt. Mit diesem Resultat ist ein Hinweis auf die Möglichkeit inapparent verlaufender Infektion mit Sensibilisierung und Antikörperbildung gegen *Cl. tetani* gegeben (Habermann und Dimpfel 1973, Habermann et al. 1973, Thein 2009).

Zu den momentanen Limitierungen bezüglich der technischen Handhabung des Fassisi TetaCheck® wurde Stellung genommen. Hinsichtlich der Aussagekraft des Testergebnisses bezüglich belastbarem Immunschutz und/oder Empfehlung zu einer „zeitnahen Impfung“ auf Grund dieses Resultates und dem hohen Cut off-Wert des Tests wäre vom Hersteller über eine Absenkung der derzeitigen unteren Nachweisgren-

ze von 0,1 i.E./ml Serum auf 0,05 i.E. nachzudenken. Dies wäre durch eine Erhöhung der Antigenkonzentration, die für das spezifische Signal auf der Testlinie verantwortlich ist, zu erreichen. Durch diese Erhöhung würde zum einen die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion zwischen dem verwendeten Antigen und den nachzuweisenden Antikörpern verbessert, zum anderen könnte dadurch die Intensität des Testliniensignals in allen Konzentrationsbereichen verstärkt werden. Dies hätte auch das Erkennen geringerer Antikörperkonzentrationen in kürzerer Zeit nach Einbringen des Untersuchungsmaterials und damit effektiv eine Testoptimierung zur Folge.

Im Zusammenhang mit der vom Hersteller exklusiv empfohlenen Anwendung zur Ermittlung des Impfstatus des untersuchten Pferdes ergeben sich Einschränkungen. Diese bestehen, wie besprochen, in der noch sehr variablen Zeit vom Einbringen der Probe bis zu ihrer endgültigen Reaktion und den unterschiedlich stark ausgeprägten Testlinien, die nicht immer deutlich zwischen den Kriterien „schwach oder stark positiv“ und damit der im Test gegebenen Empfehlung „geschützt“ oder „zeitnah zu impfen“ unterscheiden lassen. Nur eine Negativreaktion rechtfertigt die Empfehlung einer Impfung, auch die schwache Reaktion mit dem angegebenen Titer < 1 i.E./ml garantiert noch einen belastbaren Immunschutz. In diesen Fällen – speziell unter den Bedingungen der ambulanten Pferdepraxis – muss man das Risiko sehen, dass der Test lediglich im Sinne einer Alibifunktion verwendet werden könnte, um eine vorzunehmende Impfung damit zu begründen, nicht aber, um diese zu einem unbekanntem Zeitpunkt später und nach erneuter Testung mit negativem Resultat in entsprechendem Zeitintervall vorzunehmen, was die korrekte Vorgehensweise wäre. Damit besteht die Gefahr, dass den angesprochenen, viel zu häufig vorgenommenen Wiederholungsimpfungen in der üblichen Pferdepraxis durch falsche Anwendung des Tests Vorschub geleistet wird. Der TetaCheck® gehört in die Hände von verantwortungsbewusst Immunpräventive betreibenden Tierärzten, die – wie angeführt – z.B. Gestüte mit Fohlenmedizin betreuen, in Kliniken zur Klärung der Frage, ob von der üblicherweise gepflegten, routinemäßigen Impfung bei stationär eingewiesenen Patienten Abstand genommen werden kann sowie zur Anwendung bei verletzten Pferden zur sofortigen Ermittlung von deren Immunstatus, um diesen fachgerecht in die Präventive oder Therapie einbeziehen zu können.

Literatur

- Baljer G., Thein P., Hechler H., Cronau P., Hasslacher D., Beck G., Sailer J. und Mayr A. (1982) Untersuchungen zur intranasalen Schutzimpfung gegen Tetanus beim Pferd. Berl. Münchn. Tierärztl. Wschr. 95, 208-213
- Breathnach C. C., Allen G. P., Holland R. E., Conboy H. S., Berry D. D. jr. und Chambers T. M. (1999) Problems associated with vaccination of foals against Equine Herpesvirus-4 and the role of anti EHV-4 maternal antibodies. Equ. Inf. Dis. VIII, 426-427
- Cullinane A., Weld J., Nelly M. und Mc Bride C. (1994) Interference of maternal antibodies with the immune response of Thoroughbred foals and yearlings to vaccination against equine influenza. Equ. Inf. Dis. VII, 52-54
- Eisenhauer P. (1981) Methodisch vergleichender Nachweis von Immunglobulinen G und M bei Mutterstuten und Fohlen mittels Nephelometrie und radialer Immundiffusion. Vet. med. Diss. Universität Wien

- Habermann E. und Dimpfel W. (1973) Distribution of 125 I-tetanustoxin and 125 I toxoid in rats with generalized tetanus, as influenced by antitoxin. Naunyn Schiedeborg's Arch. Pharmacol. 276, 327-340
- Habermann E., Dimpfel W. und Räker K. O. (1973) Interaction of labeled tetanus toxin with substructures of a rat spinal cord in vivo. Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 276, 361-373
- Holland R. E., Conboy H. S., Berry D. B., Fallon E. H., Powell D. G., Tudor L. R. and Chambers T. A. (1999) Age dependence on foal vaccination for equine influenza: new evidence from the U.S.A. Equ. Inf. Dis. VIII, 547-548
- Holznagel D. L., Hussey S., Mihalyi J. E., Wilson W. D. und Lunn P. D. (2003) Onset of immunoglobulin production in foals. Equ. Vet. J. 35, 6, 620-622
- Jansen B. C. und Knoecke P. C. 1979. The immune response of horses to tetanus toxoid. Onderstepoort J. Vet. Res. 46, 211
- Jeffcott L. B. (1974) Studies on passive immunity in the foal: 1. - Globulin and antibody variations associated with the maternal transfer of immunity and the onset of active immunity. J. Comp. Path. 84, 93101
- Löhner J. und Radvillla P. (1970) Aktive Tetanusprophylaxe beim Pferd und Immunitätsdauer. Schweizer Arch. Thkd. 112, 307-314
- Mayr A. (1995) Konventionelle Impfungen: Tetanus. In: Schutzimpfungen. Heidelberg: Heidelberger Verlagsanstalt, Universitätsverlag C. Winter, 149-156
- Oirschot van J. T., Bruin G., de Boer Luytze E. D. und Smolders G. 1991. Maternal antibodies against equine influenza virus in foals and their interference with vaccination. J. Vet. Med. Series B 38, 391-439
- Radvila P. (1975) Tetanusprophylaxe bei Mensch und Tier nach einer Verletzung. Arch. Exp. Vet. Med. 29, 469-481
- Sheoran A. S., Timoney J. F., Holmes M. A., Karzenski S. S. und Crisman M. v. (2000) Immunglobulin isotypes in sera and nasal mucosal secretions and their neonatal transfer and distribution in horses. Am. J. Vet. Res. 61, 1099-1105
- Thein P. (1979) Experimentelle Untersuchungen über Reoviren beim Pferd. Vorkommen, Verbreitung, Klinik, Pathogenese, Infektketten, Schutzimpfung. Vet. Med. Habil. LMU München.
- Thein P. (1983) Zur Muttertierimpfung beim Pferd. Tierärztl. Umsch. 38, 783-790
- Thein P. (2002) Tetanusimpfung beim Fohlen. Ges. f. Pferdemed., Mitteilg. 6,7
- Thein P. (2003) Wie impft man Fohlen richtig? Tierärztl. Praxis 31, 231-236
- Thein P. (2007) Schutzimpfungen beim Pferd. Prakt Tierarzt. 3 ,Supplement für ATF: 3-24
- Thein P. (2009) Tetanus bei Pferd und Mensch. Prakt. Tierarzt, Vet. Kolleg. 90,1, 36-41
- Thein P. (2011) Zur Tetanusschutzimpfung des Pferdes. Pferdespiegel, 4,153-156
- Thein P. (2012) Virusinfektionen der Atemwege des Pferdes – Ätiologie, Epidemiologie, Klinik und Immunpräventive – Teil 1: Equine Influenzaviren und Equine Herpesviren. Pferdeheilkunde 28, 675-696
- Thein P. (2013) Virusinfektionen der Atemwege des Pferdes- Ätiologie , Epidemiologie, Klinik und Immunpräventive – Teil 2: Equine Adenoviren, Equine Rhinitis A- und B- Viren, Säugerreoviren und Parainfluenza 3- Virus. Pferdeheilkunde 29, 65-82
- Thein P., Essich G., Grunmach J. und Abar B. (1989) Grundlagen und Kontrolle des Immunstatus beim Saugfohlen. Prakt. Tierarzt. 11, 15-28
- Thein P., Essich G. und Röhm A. (2005) Fohlenerkrankungen und Fohlenverluste – ein Beitrag zur Ursache von Aborten im Zeitraum von 1972 bis 2002 im Haupt – und Landgestüt Marbach an der Lauter. Tierärztl. Umsch. 60, 115-127
- Tizard I. R. (1981) Einführung in die veterinärmedizinische Immunologie. Parey Studentexte 30, Parey Verlag Berlin und Hamburg.
- Wilson W. D. und Rossdale P. D. (1999) Effect of age on the serological response of thoroughbred foals to vaccination with an inactivated EHV-1/ EHV-4 vaccine. Equ. Inf. Dis. VIII, 428
- Wilson W. D., Mihalyi L. E., Hussey S. und Lunn D. P. (2001) Passive transfer of maternal antibodies against tetanus and influenza and their effect on the response of foals to vaccination. Equine Vet. J. 33, 644-650

Prof. Dr. Dr. habil. Peter Thein
Fachtierarzt für Pferde
Fachtierarzt für Mikrobiologie
Lindenstraße 2
85250 Altomünster