

Aus der Medizinischen Tierklinik  
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

---

**Seroprävalenz von Tetanustoxoid-Antikörpern bei Pferden in  
Mitteldeutschland und Evaluierung ihrer Bestimmung mittels eines  
immunchromatographischen Schnelltestes**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)  
durch die Veterinärmedizinische Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von  
Stephan Recknagel  
aus Friedrichroda

Leipzig, 2015

*Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig*

*Dekan:*       **Prof. Dr. Manfred Coenen**

*Betreuer:*   **Prof. Dr. Gerald F. Schusser**

*Gutachter:*   **Prof. Dr. Gerald F. Schusser**

Medizinische Tierklinik

Veterinärmedizinische Fakultät

Universität Leipzig

**Prof. Dr. Marianne M. Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan**

Departement Gezondheidszorg Paard (Abteilung für Pferdewissenschaften)

Faculteit Diergeneeskunde (Veterinärmedizinische Fakultät)

Universiteit Utrecht (Universität Utrecht)

*Tag der Verteidigung: 27. Oktober 2015*

*Für Mandy, Lola und Alba*



---

**Inhaltsverzeichnis**

1	Einleitung .....	1
2	Publikationen .....	4
2.1	Publikation 1: Impfpraxis und Seroprotektion gegenüber Tetanus bei Pferden in Mitteldeutschland .....	4
2.2	Publikation 2: Evaluierung eines Schnelltestes zur Feststellung des Tetanus- Immunstatus bei Pferden .....	23
3	Diskussion .....	42
3.1	Protektive Antitoxin-Konzentration .....	42
3.2	Impfpraxis und Seroprotektion .....	43
3.3	Evaluierung des Schnelltestes.....	45
4	Zusammenfassung .....	49
5	Summary.....	51
6	Literaturverzeichnis .....	53
7	Anhang .....	56
	Verzeichnis wissenschaftlicher Veröffentlichungen und Vorträge.....	56
	Danksagung.....	60

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bpt	Bundesverband Praktizierender Tierärzte e. V.
bzw.	beziehungsweise
C.	<i>Clostridium</i>
°C	Grad Celsius
DAE	Doppel-Antigen-ELISA
d. h.	das heißt
e. V.	eingetragener Verein
evtl.	eventuell
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
et al.	und andere
GI	Grundimmunisierung
G1	erste Impfung der Grundimmunisierung
G2	zweite Impfung der Grundimmunisierung
G3	dritte Impfung der Grundimmunisierung
h	Stunde
IE	Internationale Einheit
Ig	Immunglobuline
$\kappa$	Kappa-Koeffizient nach Cohen
kDa	Kilodalton, atomare Masseneinheit
ml	Milliliter
mIE	Milli-Internationale Einheit, $IE \times 10^{-3}$
n	Anzahl
p	p-Wert, Überschreitungswahrscheinlichkeit
$r^2$	Bestimmtheitsmaß
StIKO Vet.	Ständige Impfkommision Vet.
Tab.	Tabelle
TNT	Toxinneutralisationstest
TST	Tetanus-Streifentest
TT	Tetanustoxoid
TTAK	Tetanustoxoid-Antikörperkonzentration
WHO	World Health Organization
z. B.	zum Beispiel

## 1 Einleitung

Tetanus nimmt unter den durch Vakzination vermeidbaren Infektionen eine Sonderstellung ein, da keine Übertragbarkeit der Erkrankung existiert. Der ubiquitär im Erdreich und in den Fäzes unserer Haustiere vorkommende Erreger *Clostridium (C.) tetani*, ein bewegliches, grampositives, sporenbildendes Bakterium, vermehrt sich unter Freisetzung von Toxinen im anaeroben Milieu, wie es beispielsweise bei Stichverletzungen und tiefen, verschmutzten oder stark nekrotisierenden Wunden anzutreffen ist. Tetanospasmin (ein Polypeptid mit einer Molekülmasse von 150 000 kDa) ist ein hochpotentes Neurotoxin, welches für die klinische Manifestation maßgeblich verantwortlich ist. Nach intrazellulärer Produktion während der logarithmischen Phase des Bakterienwachstums an der Eintrittspforte wird es durch Autolyse freigesetzt und gelangt über  $\alpha$ -Motorneuronen durch retrograden axonalen Transport zu inhibitorischen Interneuronen (Renshaw-Zellen) in der *Medulla oblongata* und im Rückenmark (ROPER et al. 2013). Dort verhindert es die präsynaptische Fusion der die inhibitorisch wirkenden Neurotransmitter Glycin und Gamma-Aminobuttersäure enthaltenden Vesikel mit der Plasmamembran (COOK et al. 2001). Dies führt zu einem Spasmus der Skelettmuskulatur, welcher sich in Abhängigkeit von der Schwere der Krankheit als Nickhautvorfall, starrer Gesichtsausdruck mit kaudal gerichteten Ohren (*Risus sardonius*), als Krampf der Kaumuskulatur (*Trismus*), als gestreckte Kopf-Hals-Haltung bis hin zum Opisthotonus, als Dysphagie, als steifer Gang bzw. sägebockartiger Körperhaltung, aufgestellte Schweifröhre, Überreaktion auf akustische und taktile Reize, generalisierte tonische Muskelspasmen und schließlich als Festliegen in Seitenlage mit Dyspnoe und kardiovaskulärer Insuffizienz manifestieren kann (THEIN 2009, MAC KAY 2014).

Als wirksamste Maßnahme in der Tetanusprävention gilt bei Mensch und Tier die Impfung mit inaktiviertem Toxin (Toxoid). Dank der in der modernen Pferdezucht und -haltung mittlerweile als obligat angesehenen Vakzination mit potenten Impfstoffen, ist Tetanus in den Pferdepopulationen industrialisierter Länder zu einer nur sporadisch auftretenden Infektion zurückgedrängt worden. Nicht ausreichend geschützte Individuen erfahren jedoch im Falle einer Infektion einen dramatischen Verlauf der Erkrankung mit Letalitäten von 59 bis 76 % (GREEN et al. 1994, REICHMANN et al. 2008, VAN GALEN et al. 2008). Eine unzulängliche Seroprotektion ist jedoch nicht nur aufgrund der wachsenden Zahl von Impfverweigerern, sondern auch durch Anwendungsfehler des Tierarztes bei alltäglichen Impfungen verursacht (THEIN et al. 2013). So können ebenso wie eine zu zeitig vorgenommene Erstvakzination im Fohlenalter zu kurze zeitliche Abstände zwischen den Auffrischungen und der Grundimmunisierung (GI) und auch die zeitgleiche Impfung gegen mehrere Infektionserreger zu einer Reduktion der humoralen Immunität führen. Hinsichtlich einer optimalen Tetanusprophylaxe befindet sich der evidenzbasiert arbeitende Pferdepraktiker jedoch in einer doppelten Zwickmühle. Zum einen beschränken sich ihm zugängliche Daten im

Wesentlichen auf die Packungsbeilage (mit eventuell veröffentlichten Sicherheits- und Wirksamkeitsstudien), da nur wenige wissenschaftliche Arbeiten zur Antigenität verschiedenster Impfstoffe bei einer überschaubaren Anzahl von Tieren mit sehr heterogenen Ergebnissen (LÖHRER und RADVILA 1970, JANSEN und KNOETZE 1979, LIEFMAN 1981, HELDENS et al. 2001, HOLMES et al. 2006, MÜLVERSTEDT 2006, ROSSKOPF 2007, STELZMANN 2011) existieren. Auch das sporadische Auftreten und der nicht kontagiöse Charakter der Erkrankung verhindern die Generierung von Daten aus Wirksamkeitsprüfungen von Tetanus-Impfstoffen unter Feldbedingungen, wie sie in Ausbruchssituationen ansteckender Krankheiten durchgeführt werden können (BARQUERO et al. 2007). Zum anderen besitzt die Packungsbeilage als Teil der Zulassung der Vakzine mit dem darin enthaltenen Impfschema rechtlich verbindlichen Charakter, während die Leitlinie zur Impfung von Pferden nicht rechtsverbindliche Anwendungsempfehlungen formuliert, welche zwar auf Herstellerangaben beruhen, unter Berücksichtigung aktueller wissenschaftlicher Erkenntnisse jedoch von diesen abweichen können (StlKO Vet. 2013).

Spätestens im Falle einer eingetretenen Verletzung oder vor geplanten Operationen ist dann die Kenntnis des erzeugten Tetanus-Immunistatus des Patienten erforderlich. Der Entscheidung für oder gegen eine erneute aktive und/oder passive Immunisierung diene bislang allein die Dokumentation im Equidenpass als Grundlage. Werden jedoch fehlerhafte Eintragungen vorgenommen, Impfstoffe ungekühlt oder zu lang vor der Applikation gelagert, oder die Vakzination unsachgemäß durchgeführt, können falsche Rückschlüsse auf den tatsächlichen Impfschutz gezogen werden. Selbst bei Einhaltung des empfohlenen Erstimpfungsalters und der folgenden Impfintervalle kann aufgrund der Interferenz mit über dieses Alter hinaus persistierenden homologen maternalen Antikörpern eine ausbleibende oder stark reduzierte Seroprotektion eintreten, welche sich auch durch spätere Wiederholungsimpfungen nicht zu einer protektiven Immunität steigern lässt (BALJER et al. 1982, WILSON et al. 2001). Aufschluss über den tatsächlichen humoralen Immunistatus kann daher nur eine objektive Bestimmung der Antitoxinkonzentration liefern. Bei Nachweis einer belastbaren Immunität kann somit auf eine Verabreichung von Antitoxin verzichtet und damit die geringe, aber dennoch vorhandene Gefahr der Serumhepatitis abgewendet werden (GUGLICK et al. 1995, BARTON 2009). Wird dagegen ein unzulänglicher Impfschutz festgestellt, ist dies das beste Argument für eine Immunisierung. Für die Messung der Seroprotektion stellt der auch in der Impfstoffprüfung eingesetzte und an Mäusen oder Meerschweinchen durchgeführte Toxinneutralisationstest (TNT) den Goldstandard dar (EUROPÄISCHES ARZNEIBUCH 2011). In den Bestrebungen Tierversuche durch *in vitro*-Verfahren zu ersetzen, erwiesen sich der Toxinbindungsinhibitionstest (HENDRIKSEN et al. 1988) und verschiedene ELISA-Systeme als gleichwertige Alternativen (ROSSKOPF et al. 2005). Im Unterschied zu diesen zeit- und kostenintensiven, technisch anspruchsvollen Laboruntersuchungen ist es mit der Verfügbarkeit eines immunchromatographischen Schnelltestes (Fassisi® TetaCheck) nun möglich, schnell und



unkompliziert direkt am Patienten eine qualitative Bestimmung der Antitoxinkonzentration vorzunehmen.

Die jährliche Inzidenz von zwei bis drei an generalisiertem Tetanus erkrankten Pferden aus dem Patientenaufkommen der Medizinischen Tierklinik der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig gaben Anlass, die Tetanus-Impfpraxis in dieser Population im ersten Teil der vorliegenden Arbeit zu analysieren, um mögliche Schwachstellen der Impfprophylaxe aufzudecken.

Zielstellung des zweiten Teils dieser Dissertation ist die kritische Bewertung des seit 2012 auf dem Markt befindlichen Schnelltestes (Fassisi® TetaCheck) gegenüber einem validierten Doppel-Antigen-ELISA (DAE)-Verfahren. Besonderes Augenmerk wird dabei auf die zuverlässige Identifizierung nicht ausreichend geschützter Pferde gelegt.

## **2 Publikationen**

### **2.1 Publikation 1**

Stephan Recknagel, Alice Snyder, Benjamin Brüser, Gerald Fritz Schusser

#### **Impfpraxis und Seroprotektion gegenüber Tetanus bei Pferden in Mitteldeutschland**

Pferdeheilkunde 31 (2015) 5 (Sep/Okt) 469-476

---

Medizinische Tierklinik der Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Leipzig<sup>1</sup>  
Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie, Bad Langensalza<sup>2</sup>

## **Impfpraxis und Seroprotektion gegenüber Tetanus bei Pferden in Mitteldeutschland**

### **Immunization strategies and seroprotection against tetanus in horses in central Germany**

Stephan Recknagel<sup>1</sup>, Alice Snyder<sup>1</sup>, Benjamin Brüser<sup>2</sup>, Gerald Fritz Schusser<sup>1</sup>

#### **Zusammenfassung**

Trotz der Verfügbarkeit potenter Tetanusimpfstoffe sind dramatisch verlaufende Tetanusinfektionen noch immer im Alltag des Pferdepraktikers präsent. Dies gab Anlass verschiedene Impfstrategien und die daraus resultierende humorale Immunitätslage zu überprüfen. Es standen 91 Serumproben von Pferden mit glaubhafter Impfanamnese zur Verfügung, welche mittels Doppel-Antigen-ELISA (DAE) untersucht wurden. Die Seroprävalenz protektiver Tetanustoxoid-Antikörperkonzentrationen (TTAK) von  $\geq 0,1$  IE/ml betrug 92,3 %. 89 % der Pferde waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme ihrem jeweiligen Alter entsprechend gemäß der „Leitlinie zur Impfung von Pferden“, herausgegeben von der Ständigen Impfkommision des Bundesverbandes Praktizierender Tierärzte (bpt), immunisiert. In fünf Fällen hatten diese Tiere jedoch keinen ausreichenden Impfschutz. Hierzu zählten ein fünf Monate altes Fohlen, bei welchem die maternalen Antikörper bereits unter die Schutzzgrenze abgefallen waren, zwei juvenile Pferde ohne abgeschlossene Grundimmunisierung und zwei adulte Pferde. Abweichungen von der Impfeempfehlung bestanden ausschließlich in Form verlängerter Abstände der Wiederholungsimpfungen von drei bis zu acht Jahren, wobei diese Tiere jedoch protektive TTAK aufwiesen. Unter alleiniger Betrachtung des Patientenalters wiesen alle Pferde über 20 Jahre ( $n = 12$ ) TTAK weit oberhalb der Schutzzgrenze auf. Hinsichtlich der Anwendung unterschiedlicher Boosterintervalle unterschieden sich die TTAK nicht signifikant ( $p = 0,117$ ). Der zeitliche Abstand zwischen letzter Tetanusimpfung und Probenahme ließ keine Prognose über die zu erwartenden TTAK zu. Selbst Pferde mit einheitlichem Impfbereitschaft reagierten sehr heterogen. Entgegen der Meinung, die Immunantwort sei effektiver, je weniger Komponenten zeitgleich geimpft werden, unterschieden sich die TTAK nach Impfung mit monovalenten Vakzinen nicht signifikant von denen nach Durchführung einer Kombinationsimpfung ( $p = 0,63$ ).

Basierend auf diesen Ergebnissen und experimentellen Daten aus Vakzinationsversuchen empfehlen wir zur Vermeidung fehlerhafter Immunisierungen vor der Erstvakzination eine Bestimmung der TTAK mit Vollendung des fünften Lebensmonats, welche zuverlässig und schnell mittels eines Streifenfestes vor Ort vorgenommen werden kann. Im zweijährlichen

Intervall vorgenommene Wiederholungsimpfungen führen zu keiner besseren Immunitätslage. Die Impfpfempfehlung könnte daher ein acht- bis 10-jähriges Intervall für Auffrischungsimpfungen ausweisen. Die Tetanusimmunität betreffend ergeben sich keine Nachteile bei gleichzeitiger Impfung weiterer Komponenten. Gewissheit über den tatsächlichen Immunstatus kann nur über die Bestimmung der TTAK erlangt werden, da auch die Dokumentation der Impfungen selbst fehlerhaft sein kann.

### *Schlüsselwörter*

Impfung, Prophylaxe, maternale Antikörper, Immunitätsdauer, Schnelltest

### **Summary**

Despite the availability of potent tetanus vaccines, fatal tetanus cases are still part of equine practitioners' everyday business. In light of this, the present study set out to critically evaluate different immunization strategies and their resulting humoral immune response. In total 91 serum samples from horses with reliable vaccination histories were analyzed using a double-antigen-ELISA. Protective tetanus toxoid antibody concentrations of  $\geq 0.1$  IE/ml were obtained in 92.3% of the cases. In the vast majority of horses (89%), veterinarians followed an official German guideline for tetanus vaccination in horses ('Leitlinie zur Impfung von Pferden'). In spite of fulfilling those criteria, five horses did not develop a protective level of immunity. One of those cases was a foal in which maternal antibodies waned to a non-protective level before it reached the age of six months, i.e. the time at which the first vaccination should be performed. Two other unprotected juvenile horses had not completed their course of three ground immunizations by the time of sampling. The remaining two adult horses had already received regular booster vaccinations. The discrepancy between those horses in which the guideline was followed and those in which it was not consisted only in prolonged booster intervals lasting from three to eight years. Interestingly these horses all showed protective antibody levels. Focusing exclusively on the age of our patients, all individuals older than 20 years ( $n=12$ ) had antibody levels way above the protective level. The application of different booster intervals did not result in statistically significant differences between groups ( $p=0.117$ ). Time intervals from the last vaccination event to the date of blood sampling did not correlate with the tetanus toxoid antibody concentration. Even eight identically vaccinated horses responded very heterogeneously in their postvaccinal antibody production. Contrary to beliefs that the injection of single antigens results in a more effective immune response, tetanus antibody concentrations did not differ statistically significantly between horses which were vaccinated with monovalent vaccines and those in which multiple antigens were injected simultaneously ( $p=0.63$ ).

Based on our results and data obtained from experimental vaccination studies, several recommendations can be made. For the prevention of vaccine failures (non- or low-

responders), foals should be tested for their tetanus antibody levels around the age of five months, which is the recommended age for the first ground immunization. This can reliably be done on site using a rapid immunochromatographic dipstick test (Fassisi® TetaCheck). If the test yields a negative result, interference of persistent maternal antibodies with the onset of immunoglobulin syntheses is minimal. Booster vaccinations with tetanus toxoid in two-year intervals do not result in a superior level of protection. Instead, eight- to ten-year intervals should be implemented in vaccination guidelines. No disadvantages regarding tetanus immunity are to be expected if vaccinations with multiple components are used. Reliable information on the actual seroprotection against tetanus in an individual horse can only be obtained by determining the antibody level, as the vaccination documents themselves can be erroneous.

#### *Keywords*

Vaccination, Tetanus prevention, maternal antibodies, duration of immunity, dipstick test

### **Einleitung**

Tetanus ist in den Pferdepopulationen industrialisierter Länder eine selten auftretende Infektionskrankheit. Bei nicht geschützten Individuen jedoch ist der Verlauf der Erkrankung mit Letalitätsraten von 59 bis 76 % lebensbedrohlich (Green et al. 1994, Reichmann et al. 2008, van Galen et al. 2008). Wirksamste Maßnahme in der Bekämpfung ist die Immunisierung mit Tetanustoxoid (TT). In dem Bestreben patientenorientierte Entscheidungen nach Möglichkeit auf Grundlage empirisch nachgewiesener Wirksamkeit zu treffen („evidenzbasierte Medizin“), befindet sich der praktisch tätige Tierarzt hinsichtlich der optimalen Tetanusprophylaxe in einem doppelten Dilemma. Zum einen beschränken sich die ihm zugänglichen Daten auf die Informationen aus der Packungsbeilage der jeweils verwendeten Vakzine (mit eventuell veröffentlichten Sicherheits- und Wirksamkeitsstudien) und auf wenige wissenschaftliche Arbeiten zur Antigenität verschiedenster Impfstoffe bei einer überschaubaren Anzahl von Tieren mit sehr heterogenen Ergebnissen (Löhner und Radvila 1970, Jansen und Knoetze 1979, Liefman 1981, Heldens et al. 2001, Holmes et al. 2006, Mülverstedt 2006, Roßkopf 2007, Stelzmann 2011). Zum anderen sind es das sporadische Auftreten und der nicht kontagiöse Charakter der Erkrankung, die eine Bewertung der Wirksamkeit von Vakzinen unter Feldbedingungen unmöglich machen, da so wichtige epidemiologische Messgrößen wie die Erkrankungsrate und das relative Risiko nicht wie im Falle eines Feldausbruchs einer ansteckenden Infektionskrankheit berechnet werden können (Barquero et al. 2007). Die Ständige Impfkommission Vet. des Bundesverbandes Praktizierender Tierärzte e.V. empfiehlt in ihrer Leitlinie zur Impfung von Pferden, die Grundimmunisierung bestehend aus drei Impfungen im Alter von sechs (G1), sieben bis siebeneinhalb (G2) und 18 bis 20 Monaten (G3), gefolgt von Wiederholungsimpfungen im zweijährlichen Intervall durchzuführen (StIKo Vet. 2013).

Trotz der längst etablierten und flächendeckenden Anwendung dieses Impfregimes in Deutschland beträgt die jährliche Inzidenz an unserer Klinik zwei bis drei Fälle von generalisiertem Tetanus. Oft bedient man sich der Vakzinationsrate als indirektem Parameter für die Bewertung des Impfschutzes einer Population. Im besonderen Falle einer Tetanusinfektion ist es jedoch die Serumkonzentration protektiver Antikörper, welche eine objektive Bewertung der Immunität des Individuums erst ermöglicht. Ziel dieser retrospektiven Querschnittsstudie war es daher, die Prävalenz protektiver Tetanustoxoid-Antikörperkonzentrationen (TTAK) von  $\geq 0,1$  IE/ml in einer repräsentativen Pferdepopulation zu untersuchen und mögliche Schwachstellen der Tetanusprophylaxe zu identifizieren.

## **Material und Methoden**

### *Pferde und Serumproben*

Über den Zeitraum eines Jahres (September 2011 bis September 2012) wurden aus dem Patientengut der Medizinischen Tierklinik 83 Pferde verschiedener Groß- und Kleinpferdrassen mit den unterschiedlichsten Impfanamnesen für die Studie gezielt ausgewählt, um möglichst viele Aspekte der Tetanusimpfprophylaxe beleuchten zu können. Wie bei allen anderen Patienten auch wurde bei Aufnahme neben dem Alter der Tiere (zwei Tage bis 32 Jahre) das Datum der letzten Tetanusimpfung (und damit der zeitliche Abstand zwischen letzter Vakzination und Vorstellung) sowie das vorausgegangene Impfintervall dokumentiert. Zusätzlich wurde erfasst, ob eine monovalente Vakzine verwendet wurde, oder ob zeitgleich mehrere Komponenten verimpft wurden. Patienten mit klinischem Tetanus und Pferde, welche vorberichtlich Tetanus-Antiserum erhielten, wurden aus der Studie ausgeschlossen. Ergänzt wurde das Probenmaterial durch acht Pferde eines geschlossenen Bestandes mit einheitlichem Impfregime. Für die Untersuchungen standen somit 91 Serumproben zur Verfügung. Bis zur Durchführung der Untersuchungen lagerten diese bei  $-20$  °C.

Basierend auf der Impfhistorie anhand der Dokumentation im Equidenpass wurden die Pferde einer geschützten oder einer ungeschützten Gruppe zugeordnet. Mindestanforderung für die Annahme einer ausreichenden Immunität war dabei in Abhängigkeit vom Alter der Patienten eine korrekt durchgeführte GI und eine Zeitspanne von maximal zwei Jahren zwischen den letzten beiden Impfungen (StiKo Vet. 2013). Fohlen, welche zum Zeitpunkt der Erstvakzination jünger als sechs Monate waren, gehörten der geschützten Gruppe an, da in diesem Alter eine ausreichende Protektion durch maternale Antikörper angenommen wird.

Um feststellen zu können, ob allein anhand des Patientenalters eine Prognose über den Tetanusimmunstatus formuliert werden kann, wurden alle vakzinierten Pferde unabhängig von der verwendeten Vakzine und des jeweiligen Impfregimes folgenden Altersgruppen zugeordnet: Fohlen vor Erstimmunisierung (jünger als sechs Monate), junge heranwachsende Pferde (0,5 bis 5 Jahre), adulte Pferde im Alter von sechs bis 20 Jahren und geriatrische Pferde über 20 Jahre.

Für die Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Impfintervalle auf die TTAK wurden von den ursprünglich 91 Proben die von ungeimpften Pferden stammenden Seren (acht Fohlen und zwei adulte Pferde) ausgeschlossen. Ebenso wurde mit denjenigen Patienten verfahren, welche bis zur Blutentnahme noch keine Wiederholungsimpfung erhalten hatten (zehn Pferde), sodass 71 Proben für die Analyse verblieben.

#### *Equiner anti-Tetanustoxoid-IgG-ELISA*

Die TTAK wurden mittels eines zweistufigen Doppel-Antigen-ELISA (DAE) in Doppelbestimmung gemessen. Die Kavitäten der Mikrotiterplatten wurden zunächst mit TT beschichtet, anschließend wurden die ausgewählten Serumproben in Verdünnungsstufen von 1:10 bis 1:60 000 dazu gegeben. Je Mikrotiterplatte wurden Standards (32 mIE/ml, Verdünnungsfaktor 2), ein internes Kontrollserum und eine Negativkontrolle mitgeführt. Nach Entfernung der nichtgebundenen Antikörper wurde das ebenso als Detektorantigen fungierende TT hinzu pipetiert. Die Umwandlung des farblosen Chromogens Tetramethylbenzidin in einen blauen Farbstoff wurde durch Meerrettichperoxidase-Konjugat erzeugt. Es folgte die photometrische Zweifachmessung. Die Nachweisgrenze des DAE betrug 0,01 mIE Anti-Tetanustoxoid-IgG/ml. Details des verwendeten DAE sind Recknagel et al. 2015 zu entnehmen.

#### *Protektive Antitoxin-Konzentration*

Alle Analysen in dieser Arbeit geschahen in der Annahme, dass Antitoxinkonzentrationen von 0,1 IE/ml und darüber einen ausreichenden Schutz gegenüber einer Tetanusinfektion bieten. Die Definition einer Schutzzgrenze ist dabei ein sehr grundsätzliches Problem und an die jeweilige Bestimmungsmethode gebunden. So ist der für den Menschen generell akzeptierte Schwellenwert von 0,01 IE/ml aus Toxinneutralisationstests mit Mäusen und Meerschweinchen abgeleitet (Roper et al. 2013). Aufgrund der geringeren Spezifität von Standard-ELISA-Verfahren gegenüber dem Toxinneutralisationstest liegt die Schutzzgrenze hier um den Faktor zehn höher (WHO 2006). Für eine verlässliche Aussage beim Pferd existieren nach Kenntnisstand der Autoren keine experimentellen Daten. Wie in anderen Studien zur Tetanusimmunität bei Pferden (Löhner und Radvila 1970, Liefman et al. 1981, Baljer et al. 1982) adaptierten wir daher eine Antitoxinkonzentrationen von  $\geq 0,1$  IE/ml als protektiv für den verwendeten DAE.

#### **Statistik**

Die Datenanalyse erfolgte zunächst deskriptiv (Häufigkeiten, Mittelwert mit 95 % Konfidenzintervall, Median mit 25. und 75. Perzentil). Zur Bestimmung von Unterschieden in der TTAK zwischen den Gruppen wurde der Kruskal-Wallis- bzw. der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt und mit der Bonferroni-

Methode korrigiert, um einer bei Mehrfachvergleichen auftretenden Alphafehler-Kumulierung entgegenzuwirken. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm IBM® SPSS® Statistics, Version 22.0 (IBM, Armonk, USA).

## **Ergebnisse**

### *Tetanustoxoid-Antikörper-Seroprävalenz*

Zusammengenommen wiesen 84 der 91 (92,3 %) untersuchten Pferde eine protektive humorale Immunität auf. Die TTAK in den Serumproben betrugen 0,29 - 209,00 IE/ml (Mittelwert 23,52 IE/ml, 95 % Konfidenzintervall 15,80 - 31,24 IE/ml). Zu den ungeschützten Individuen zählten drei nachweislich ungeimpfte Pferde (ein Fohlen im Alter von fünf Monaten und zwei Adulte im Alter von 3,5 bzw. 18 Jahren). Bei den vier verbliebenen Patienten ohne eine protektive TTAK wurde eine dem jeweiligen Alter entsprechende regelrechte Impfung im Pferdepass dokumentiert.

### *Beurteilung der Tetanusimmunität anhand der Impfhistorie und des DAE*

Die große Mehrheit unserer Patienten (81 von 91, 89 %) war gemäß Impfleitlinie geimpft. Von diesen als geschützt angesehenen Pferden wiesen jedoch nur 76 (93,8 %) protektive TTAK auf. Die fünf ungeschützten Individuen dieser Gruppe (6,2 %) waren das bereits erwähnte fünf Monate alte Fohlen, welches damit das empfohlene Mindestalter für die erste Vakzination noch nicht erreicht hatte, und die im vorausgegangenen Abschnitt genannten vier Pferde. Von diesen Patienten waren in zwei Fällen bis dato nur eine zweimalige Injektion mit der Vakzine vorgenommen worden (G1 und G2); die dritte Impfung (G3) war zum Zeitpunkt der Probenahme (termingerecht) noch nicht erfolgt. Im Unterschied zu diesen Pferden mit noch nicht abgeschlossener Grundimmunisierung wiesen alle Pferde, welche nach der Auffrischungsimpfung (G3) und vor den Wiederholungsimpfungen beprobt wurden (n=5) einheitlich schutzverleihende TTAK auf. Laut Impfanamnese konnte zehn Pferden (11 %) keine ausreichende Tetanusimmunität attestiert werden. In acht Fällen erfolgte die Zuordnung zu dieser Gruppe aufgrund unregelmäßig durchgeführter Wiederholungsimpfungen mit Intervallen von bis zu acht Jahren. Ein ausreichender Schutz bestand laut DAE jedoch bei allen acht Pferden. Die übrigen zwei Pferde (3,5 und 18 Jahre) waren im Laufe ihres Lebens nachweislich nicht geimpft worden, welches durch TTAK von 0,04 IE/ml bzw. 0,01 IE/ml bestätigt wurde.

### *Tetanusimmunität und Alter*

Die TTAK in den verschiedenen Altersgruppen unterschieden sich nicht signifikant (Abb. 1,  $p = 0,377$ ). Bis auf die Gruppe der alten Pferde waren in den übrigen Altersgruppen vereinzelt ungeschützte Individuen zu finden. Die aus acht Fohlen bestehende Gruppe wies eine sehr heterogene Verteilung der TTAK auf (Tab. 1). Mit einem Alter von fünf Monaten und



zwei Wochen war es das älteste Tier in dieser Gruppe noch nicht vakzinierter Fohlen, welches eine nicht messbare TTAK aufwies.

#### *Auswirkung unterschiedlicher Impfindervalle auf die TTAK*

Das Auffrischen der Immunität im zweijährigen Intervall erfolgte in der großen Mehrheit unserer Klinikpatienten (52 von 71 Pferde, 73,2%). Fünf Tiere (7,0%) wurden im Sechsmonatsintervall geimpft, auf die übrigen Kategorien entfielen je sieben Pferde (9,9%). Die Anwendung unterschiedlicher Impfindervalle führte dabei zu keinen signifikanten Unterschieden in den TTAK (Abb. 2,  $p = 0,117$ ). Auffällig war jedoch, dass die in dieser Population verbliebenen zwei Pferde mit TTAK unterhalb der Nachweisgrenze des DAE im empfohlenen zweijährlichen Abstand geimpft wurden. Ausreichende Seroprotektion bestand dagegen bei der Gruppe von Pferden mit deutlich längeren Impfindervallen. So wies das Pferd mit dem längsten Abstand zweier Impfungen von sechs Jahren mit 35,10 IE/ml noch einen weit über der minimal protektiven TTAK liegenden Wert auf.

#### *Zeitlicher Verlauf der TTAK nach Vakzination*

Abbildung 3 zeigt die TTAK in Relation zu den zeitlichen Abständen zur letzten Vakzination aller mindestens einmal geimpften Pferde. Ein Zusammenhang beider Parameter ließ sich nicht erkennen. Die dem geschlossenen Bestand zugehörigen Pferde wurden am selben Tag 15 Monate nach der letzten Tetanusimpfung (strikt alle zwei Jahre vorgenommene Kombinationsimpfung gegen Tetanus und Equine Influenza) beprobt und wiesen ebenso eine deutliche Streuung der Messwerte auf (Median 6,98 IE/ml; 25. und 75. Perzentil 5,44 IE/ml bzw. 17,08 IE/ml). Der kürzeste Zeitabstand eines nicht geschützten Tieres betrug fünf Monate und drei Wochen; der längste eines Geschützten 8,5 Jahre.

#### *Monovalenter Adsorbatimpfstoff vs. Kombinationsimpfung*

Bei 28 (34,6%) der bis zum Zeitpunkt der Blutentnahme mindestens einmalig geimpften 81 Pferde wurde ein monovalenter Adsorbatimpfstoff angewendet. Die übrigen Patienten (53 Pferde bzw. 65,4%) erhielten eine Kombinationsimpfung in Form der Impfung einer zusätzlichen Komponente in derselben Vakzine oder einer zusätzlichen Injektion eines weiteren Präparates. Der Vergleich der TTAK ergab auch hier keinen signifikanten Unterschied ( $p = 0,63$ ) zwischen beiden Gruppen (Abb. 4), wobei es in der ersteren ein Pferd (3,6%) und in der letzteren drei Pferde (5,7%) mit nichtprotektiven TTAK gab.

## **Diskussion**

Die vorliegende Arbeit ist ein Beitrag zur kritischen Hinterfragung der Effektivität derzeit propagierter und weitverbreitet angewandter Tetanus-Impfschemata.

Aufgrund der gezielten Selektion der Proben ist die festgestellte Seroprävalenz protektiver TTAK von 92,3 % einseitig beeinflusst und kann daher nicht als repräsentativ für die Pferdepopulation im mitteldeutschen Raum angesehen werden. Für die Beantwortung der übrigen Fragestellungen war es jedoch aufgrund des limitierten Probenvolumens für den DAE erforderlich, eine vollständige und glaubhafte Impfhistorie vorliegen zu haben und ein möglichst breites Spektrum der unterschiedlichen Einflussgrößen (Alter, Impfintervalle, Art der verwendeten Vakzine, zeitlicher Abstand zur letzten Impfung) abzudecken. So konnten nur zwei nachweislich nicht geimpfte Pferde in die Studie aufgenommen werden. In einer 535 Pferde umfassenden Studie aus Niedersachsen machten jedoch Pferde ohne Pass oder anderweitige Impfdokumente mit 35,3 % die größte Gruppe der untersuchten Population aus. Zugleich war es auch diese Gruppe, welche mit 12,7 % die meisten ungeschützten Pferde aufwies (Bonetto et al. 2014). Die wahre Seroprävalenz protektiver TTAK ist demzufolge deutlich niedriger anzusetzen.

Mit 89 % der ausgewählten Patienten folgten die Praktiker mehrheitlich der rechtlich nicht verbindlichen Leitlinie zu Impfung von Pferden (StlKo Vet. 2103) des Bundesverbandes Praktizierender Tierärzte e.V. (bpt), welche im Wesentlichen mit derjenigen der British Equine Veterinary Association (BEVA) und der American Association of Equine Practitioners (AAEP) konform geht. Trotz Befolgung der Empfehlung wiesen fünf Tiere keine protektiven TTAK auf. Eine mögliche Erklärung für das Impfversagen in den vier adulten Pferden dieser Gruppe wäre das Phänomen der Non- bzw. Lowresponder. Diesem liegt eine Hemmung der Produktion eigener Immunglobuline in Gegenwart passiv erworbener, maternaler Antikörper zugrunde, wie Jansen und Knoetze 1979 in Vakzinationsversuchen an neugeborenen und zehn bis 18 Wochen alten Fohlen aus gegen Tetanus geimpften Mutterstuten demonstrieren konnten. Dies konnte auch bei vier bis sechs Wochen alten Erstimpflingen nachgewiesen werden, bei welchen auch durch Wiederholungsimpfungen im juvenilen Alter keine adäquate Immunantwort festgestellt werden konnte (Baljer et al. 1982). Neuere Untersuchungen zur Interferenz maternaler Antikörper mit TT bestätigten ein signifikant besseres Ansprechen auf die Impfung von Jährlingen gegenüber 3-monatigen Fohlen (Wilson et al. 2001). So konnte bei den 3-monatigen Fohlen auch nach zwei Impfdosen keine Serokonversion festgestellt werden. Erst nach fünf Impfdosen entsprachen die IgGa-, IgGb- und IgG(T)-Konzentrationen denen der Jährlinge nach nur einer Impfdosis. Die Immunantwort 6-monatiger Fohlen fiel quantitativ etwas geringer aus, was auf die Persistenz maternaler Antikörper selbst in diesem Alter zurückgeführt wurde. Erst kürzlich wurden diese Ergebnisse durch Untersuchungen an 24 Fohlen ergänzt (Thein et al. 2013). Unabhängig vom Alter reagierten die zum Zeitpunkt der Erstimpfung mittels Schnelltest (Fassisi® TetaCheck) identifizierten seropositiven Fohlen deutlich schlechter als die seronegativen Impflinge. Da das Alter unserer Patienten zum Zeitpunkt der Primärvakzination nicht mit erfasst wurde, kann eine zu früh vorgenommene Erstimpfung in dieser Studie nicht bestätigt werden, bleibt aber als wahrscheinlichste Ursache für die

nichtvorhandene Seroprotektion trotz Vakzination zu vermuten. Ein alternativer Erklärungsversuch könnte das partiell inkompetente Immunsystem sehr junger Fohlen sein. Denkbar wären auch abnorm ablaufende immunologische Vorgänge, welche vom spezifischen Antigen und der individuellen genetischen Prädisposition des Impflings abhängig sind. Gegenstand aktueller humanmedizinischer Studien in der Ursachenforschung des Impfversagens ist daher der genetische Einfluss auf die Zytokinexpression (IL-10) und die Funktion regulatorischer T- und B-Zellen nach Vakzination (Garner-Spitzer et al. 2013).

Von insgesamt acht Fohlen vor Erstvakzination wiesen sieben protektive maternale TTAK auf. Das älteste Fohlen besaß zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine nachweisbaren Antikörper gegen TT. Ältere noch nicht vakzinierte Fohlen waren in unserem Patientengut nicht vorhanden. Die Literatur zum Verlauf der maternalen tetanusspezifischen Antikörperkonzentrationen ist sehr heterogen. So stellte Mülverstedt (2006) lediglich eine 66-tägige Protektion bei elf Fohlen fest. Liu et al. (1982) fanden vier Monate post partum bei 81,1 % ihrer Fohlen keine schützenden tetanusspezifischen Antikörper. In einer anderen Arbeit wies nur eines von 101 4- bis 6-monatigen Fohlen eine protektive TTAK auf (Rosskopf 2007). Eine deutlich längere Persistenz maternaler Antikörper über den sechsten Lebensmonat hinaus wiesen dagegen Wilson et al. (2001) nach. Neueste Daten belegen eine vom sechsten bis zum abgeschlossenen achten Lebensmonat anhaltende Persistenz bei zwölf von 24 Fohlen (Thein et al. 2013). Folglich existieren unterschiedliche Empfehlungen zum Erstimpfingsalter von sechs (StiKo-Vet. 2013, Wilson et al. 2001, Thein 2011) bis neun Monaten (Thein et al. 2013). Verschiedene Faktoren, wie die peripartale TTAK in Blut und Kolostrum der Mutterstute, Menge und Zeitpunkt der Kolostrumaufnahme sowie die Resorption der Immunglobuline im Verdauungstrakt wirken sich dabei auf die Antikörperkonzentration im Neonaten aus (Tizard 2000). Das Absinken der maternalen TTAK im heranwachsenden Fohlen wird maßgeblich durch die 35 bis 39 Tage betragende Halbwertszeit der Immunglobuline (IgGb) beeinflusst (Wilson et al. 2001), während die endogene IgGb-Synthese erst mit etwa vier Monaten einsetzt und selbst mit 51 Wochen noch kein Maximum erreicht hat (Holznagel et al. 2003). Folglich befinden sich Fohlen vom dritten bis in den achten Lebensmonat hinein in einer kritischen immunologischen Phase. Dem praktischen Tierarzt obliegt es zu entscheiden, ob die Gefahr einer zu zeitigen Vakzination mit der Konsequenz eines unzureichenden oder völlig ausbleibenden Impferfolges oder das Infektionsrisiko durch Absinken der maternalen Immunglobuline unter die Schutzzgrenze größer einzuschätzen ist, zumal schutzverleihende Antikörperkonzentrationen erst nach der zweiten Vakzination im Abstand von vier bis sechs Wochen vorhanden sind. Abhilfe kann hier ein zuverlässig und robust arbeitender Schnelltest (Fassisi® TetaCheck) schaffen (Recknagel et al. 2015). Basierend auf unseren Ergebnissen ist dessen Einsatz mit Vollendung des fünften Lebensmonats sinnvoll. Bei Positivität können im vierwöchigen Intervall Wiederholungsuntersuchungen vorgenommen werden, bis der Test ein negatives Resultat liefert.

Bei zwei der fünf gemäß Leitlinie immunisierten Pferde war die GI noch nicht abgeschlossen (G1 und G2), während alle Pferde mit abgeschlossener GI (G1, G2 und G3) vor Beginn der Wiederholungsimpfungen ausreichend geschützt waren. Ob bei den erstgenannten durch weitere Impfdosen zu einem späteren Zeitpunkt ein ausreichender Schutz erreicht werden kann bleibt spekulativ, da hier keine Verlaufsuntersuchung vorgenommen wurde. Der zeitliche Abstand zwischen G1 und G2 bei beiden ungeschützten Individuen lag innerhalb des von der StIKo-Vet. empfohlen 4- bis 6-wöchigen Abstands. Zahlreiche Studien lieferten jedoch Resultate, welche eine Verlängerung dieses Intervalls auf sechs bis acht Wochen (Wilson et al. 2001), sechs bis zwölf Wochen (Radvila 1975), oder gar mindestens acht Wochen (Thein 2003, Thein et al. 2013) nahelegen. Bei derartigem Vorgehen kann selbst ohne die Auffrischungsimpfung (G3) eine lebenslange Immunität aufgebaut werden (Löhner und Radvila 1970, Radvila 1975). Ursachen einer besseren postvakzinalen Immunität bei Anwendung dieses verlängerten Intervalls werden in dem weiteren Abbau maternalen Antikörper, welche zur G1 noch vorhanden sein können, der Eliminierung neutralisierenden Antigens aus der G1 und in der erforderlichen Zeitspanne für die B-Zell-Proliferation und Maturation gesehen (Thein 2011, Thein et al. 2013). Leider fanden sich in unserem Patientengut keine Pferde mit verlängertem Zeitabstand zwischen G1 und G2, um dies bestätigen zu können.

Die anhand ihrer Impfhistorie unkorrekt als „ungeschützt“ eingeordneten Pferde wiesen allein verlängerte Impfintervalle von drei bis sechs Jahren auf. Zu ähnlichen Resultaten gelangten Thein et al. (2013) mit acht Pferden im Alter von acht bis 20 Jahren, welche trotz letzter Impfung vor vier bis elf Jahren allesamt protektive TTAK aufwiesen. Legt man die für Pferd und Mensch gleichermaßen geltende Halbwertszeit des Antitoxins von sechs bis zwölf Jahren zugrunde (Radvila 1975), ist das empfohlene Impfintervall von zwei Jahren als viel zu kurz anzusehen. Bereits im Jahre 1938 publizierten Monnier und Lebasque, dass nach dreimaliger Vakzination mit TT nicht eines von 35 000 französischen Militärpferden über einen Beobachtungszeitraum von zehn Jahren an Tetanus erkrankte. Die Autoren schließen sich daher der Forderung von Thein (2007, 2009, 2011) an, eine Ausdehnung der Wiederholungsimpfung auf 8- bis 10-jährliche Intervalle vorzunehmen. Neuere Studien zur Immunitätsdauer gegenüber Tetanus beim Menschen stellen gar das Zehnjahresintervall für die Boosterungen infrage, da seroepidemiologische Studien eine mindestens 20 Jahre andauernde Immunität annehmen lassen (Roper et al. 2013). Im Unterschied zum Menschen, welcher aufgrund ausgelassener Wiederholungsimpfungen im Alter von 60 bis 70 Jahren durch einen rapiden Abfall der TTAK gegenüber einer Tetanusinfektion erneut empfänglich werden kann (Schröder und Kuhlmann 1991), waren die geriatrischen Pferde in unserer Studie ausnahmslos geschützt. Dies ist vermutlich auf die vielen kurzfristigen Impfintervalle (alle Pferde über 20 Jahre wurden im 2-jährlichen Intervall geimpft) und der damit verbundenen hohen Anzahl an Boosterungen zurückzuführen. Zum gleichen Schluss gelangten Bonetto et al. (2014), in deren Studie ein Zusammenhang zwischen protektiver TTAK und einem Alter von >20 Jahren

festzustellen war. Wenn auch ohne jedes immunologische Rationale hat die Empfehlung der 2-jährlichen Wiederholungsimpfung den positiven Nebeneffekt, dass selbst bei versehentlicher Auslassung eines oder mehrerer Impftermine kein Verlust der Seroprotektion zu befürchten ist. Gleichzeitig entbehrt die erneute Durchführung einer Grundimmunisierung bei Auslassung einer Boosterung jeder immunologischen Grundlage. Entgegen anderer Auffassungen (Thein 2007, Thein 2009, Thein 2011) bleibt festzuhalten, dass sich kürzere Impfintervalle nicht negativ auf die TTAK auswirkten. Bei den beiden negativ getesteten, im 2-jährlichen Abstand vakzinieren Pferde führten möglicherweise zu früh vorgenommene Erstvakzinationen zum Impfversagen, da der Einfluss des Impfintervalls auf die gemessene TTAK in unseren Untersuchungen vernachlässigbar erscheint.

Beide nicht vakzinieren adulten Tiere wiesen mit 0,04 bzw. 0,01 IE/ml messbare, aber nicht als protektiv anzusehende TTAK auf. Da beide Pferde in der Vergangenheit weder klinisch an Tetanus erkrankten, noch Tetanus-Antiserum erhielten, muss ein alternativer Antigenkontakt mit *C. tetani* stattgefunden haben. Denkbar wären subklinische Tetanusinfektionen, welche zur Sensibilisierung des Immunsystems mit Antikörpersynthese geführt haben (Habermann und Dimpfel 1973, Habermann et al. 1973, Thein 2009). Die Aufnahme von *C. tetani* mit dem Futter und nachfolgender Kolonisierung des Darmes kann ebenso in einer transienten Toxinresorption resultiert haben. Auch beim Menschen ging man zunächst von einer ‚natürlich erworbenen Immunität‘ aus. Die in zahlreichen hierzu veröffentlichten Studien aufgeführten TTAK wurden jedoch nicht mit *in vivo* Toxinneutralisationstests, der verlässlichsten Methode zur Bestimmung biologisch aktiver Antikörper, ermittelt, sondern wurden mittels Hämagglutination oder konventionellen ELISA-Verfahren bestimmt und lagen in Bereichen, die keine sichere Unterscheidung zu unspezifischen Bindungsreaktionen ermöglichten (Roper et al. 2013). Weiterhin gelang es nicht, bei diesen ‚natürlich immunen‘ Personen durch Injektion von TT einen einer anamnestischen Immunantwort entsprechenden Anstieg der TTAK auszulösen. Thein et al. (2013) konnten bei zwei von zehn sicher nicht immunisierten Eseln mit einem Schnelltest wiederholt sogar protektive TTAK feststellen. Interessant wäre, ob bei diesen ungeimpften Equiden durch Injektion von TT ein Anstieg der TTAK im Sinne einer Wiederholungsimpfung festzustellen ist.

Hinsichtlich des zeitlichen Abstandes zwischen Probenahme und letzter Impfung, konnte die Höhe der TTAK nicht prognostiziert werden. Selbst über Jahre hinweg gleichartig geimpfte Pferde reagierten mit sehr unterschiedlichen TTAK. Die wenigen nicht aus Zulassungsverfahren stammenden unabhängigen Daten zum postvakzinalen Verlauf der TTAK wurden ausschließlich an kleinen Gruppen zu immunologisch interessanten Zeitpunkten (Saugfohlen, Jährlinge nach Abschluss der GI, tragende Stuten) erhoben und sind aufgrund der Diversität verwendeter Vakzinen und unterschiedlicher Zeitpunkte der Blutentnahme nicht direkt vergleichbar (Löhner und Radvila 1970, Jansen und Knoetze 1979, Liefman 1981, Heldens et al. 2001, Holmes et al. 2006, Mülverstedt 2006, Roskopf 2007, Stelzmann 2011). In der Konsequenz ist das

Datum der letzten Impfung für die Entscheidung eine passive und/oder aktive Immunisierung im Bedarfsfall vornehmen zu müssen irrelevant. Auch hier kann der bereits angeführte Schnelltest zuverlässig Klarheit verschaffen.

Die vorliegenden Ergebnisse sprechen nicht dafür, der allgemeinen Empfehlung zu folgen, Impfantigene zur Induktion einer optimalen Immunität möglichst einzeln zu injizieren. Eine vergleichende Betrachtung mono- und polyvalenter Impfstoffe ist selbst in Vakzinationsversuchen aufgrund des von den jeweiligen Vakzinen abhängigen und damit uneinheitlichen Impfschemas schwierig. Einen Einfluss der Impfstoffkomponenten auf die Immunantwort konnte Roskopf (2007) an neun untersuchten TT enthaltenden Vakzinen mit und ohne Influenza-Virus-Antigenen nicht feststellen. Die in Deutschland erhältliche Impfstoffkombination aus TT und Influenzaantigenen kann daher gerade bei schwierig zu handhabenden Pferden dazu beitragen, eine zusätzliche Injektion einzusparen, sollte aber aus bereits genannten Gründen nicht zum alleinigen Zweck der Boosterung des Influenzaschutzes eingesetzt werden. Auch die zeitgleiche Impfung gegen alle drei wichtigen Infektionen des Pferdes (Tetanus, Influenza und Equines Herpesvirus (EHV) 1 und 4), wie sie häufig in der Praxis durchgeführt wird, führte zu einer belastbaren Tetanusimmunität, ohne dass sich im EHV-4 Infektionsversuch diese Pferde von denen durch eine monovalente Herpesimpfung immunisierten Pferden unterschieden (Heldens et al. 2001). In der Induktion einer Seroprotektion scheint das enthaltene Adjuvans eine größere Rolle als die TT-Konzentration zu spielen (Roskopf 2007). Dies konnte auch an den in Nordamerika verbreiteten Alphavirusencephalitis-Tetanus-Kombinationsimpfstoffen nachgewiesen werden (Holmes et al. 2006).

Um der vorliegenden Arbeit möglichst viel Praxisnähe zu verleihen, wurde bewusst auf die Erfassung des für die jeweilige Impfung verwendeten Produktes verzichtet, da im Unterschied zu Vakzinationsversuchen in der Realität oft im Laufe eines Pferdelebens verschiedene Tierärzte für die Impfungen konsultiert werden und diese je nach Vorliebe Impfstoffe von diversen Herstellern anwenden, Impfstoffe über die Jahre ihre Zulassungen verlieren oder seitens der Hersteller aktualisiert werden. Außerdem kann von allenfalls geringfügigen Unterschieden in der Antigenität monovalenter Adsorbatimpfstoffe ausgegangen werden (Roskopf 2007, Thein et al. 2013).

Sämtliche Ergebnisse und deren Interpretation beruhen auf der Dokumentation der Impfungen im Equidenpass. Da fehlerhafte Eintragungen nicht überprüfbar sind, stellt dies eine wichtige Limitation unserer Arbeit dar.

Abschließend kann im Allgemeinen von einer guten Seroprotektion unserer Pferdepatienten ausgegangen werden. Kritischer Punkt der Impfprophylaxe ist der Übergang von der passiven maternalen Immunität zur Bildung eigener Antikörper im Fohlenalter. Zur optimalen Erfassung dieses Zeitraumes kann ein seit 2012 verfügbarer immunchromatographischer Schnelltest nützlich sein. Dieser kann ebenso bei unklarem Impfstatus eingesetzt werden. Eine

---

Aktualisierung der Leitlinie zur Impfung von Pferden der StlKo Vet. des bpt hinsichtlich eines Zeitabstandes von sechs bis acht Wochen zwischen G1 und G2 und der alle acht bis zehn Jahre vorzunehmenden Boosterung scheint gegeben.

### Literatur

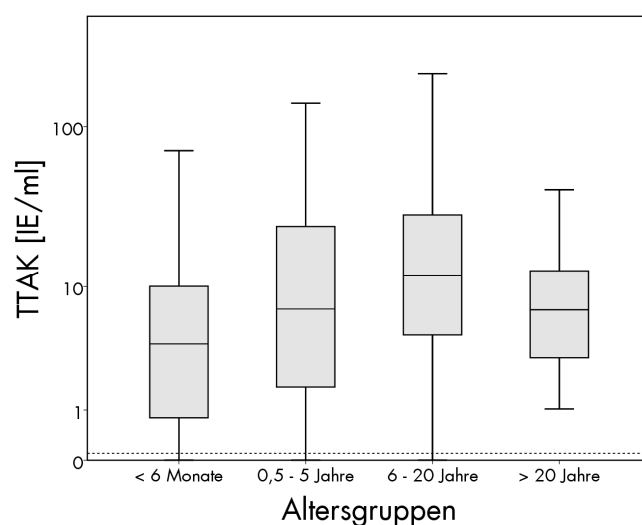
- Baljer G, Thein P, Hechler H, Cronau P, Hasslacher D, Beck G, Sailer J, Mayr A (1982) Untersuchungen zur intranasalen Schutzimpfung gegen Tetanus beim Pferd. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 95, 208-213
- Barquero N, Gilkerson JR, Newton JR (2007) Evidence-based immunization in horses. *Vet Clin Equine* 23, 481-508
- Bonetto A, Cavalleri JM, Ohnesorge B (2014) Tetanus immunity in horses in northern germany. 7<sup>th</sup> ECEIM Congress Prague 2014, Proceedings, 66
- Garner-Spitzer E, Wagner A, Paulke-Korinek M, Kollaritsch H, Heinz FX, Redlberger-Fritz M, Stiasny K, Fischer GF, Kundi M, Wiedermann U (2013) Tick-borne encephalitis (TBE) and hepatitis B nonresponders feature different immunologic mechanisms in response to TBE and influenza vaccination with involvement of regulatory T and B cells and IL-10. *J Immunol* 191, 2426-2436
- Green SL, Little CB, Baird JD, Tremblay RR, Smith-Maxie LL (1994) Tetanus in the horse: a review of 20 cases. *J Vet Intern Med* 8, 128-132
- Habermann E, Dimpfel W (1973) Distribution of <sup>125</sup>I-tetanustoxin and <sup>125</sup>I-toxoid in rats with generalized tetanus, as influenced by antitoxin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 276, 327-340
- Habermann E, Dimpfel W, Rärer KO (1973) Interaction of labelled tetanus toxin with substructures of a rat spinal cord in vivo. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 276, 361-373
- Heldens JGM, Kersten AJ, Weststrate MW, van den Hoven R (2001) Duration of immunity induced by an adjuvanted and inactivated equine influenza, tetanus and equine herpesvirus 1 and 4 combination vaccine. *Vet Quart* 23, 210-217
- Holmes MA, Townsend HGG, Kohler AK, Hussey S, Breathnach C, Barnett C, Holland R, Lunn DP (2006) Immune responses to commercial equine vaccines against equine herpesvirus-1, equine influenza virus, eastern equine encephalomyelitis, and tetanus. *Vet Immunol Immunopathol* 111, 67-80
- Holznagel DL, Hussey H, Mihalyi JE, Wilson WD, Lunn PD (2003) Onset of immunoglobulin production in foals. *Equine Vet J* 35, 620-622
- Jansen BC, Knoetze PC (1979) The immune response of horses to tetanus toxoid. *Onderstepoort J Vet Res* 46, 211-216
- Liefman CE (1981) Active immunisation of horses against tetanus including the booster dose and its application. *Aust Vet J* 57, 57-60

- Liu IK, Brown SL, Kuo J, Neeley DP, Feeley JC (1982) Duration of maternally derived immunity to tetanus and response in newborn foals given tetanus antitoxin. *Am J Vet Res* 43, 2019-2022
- Löhner J, Radvila P (1970) Aktive Tetanusprophylaxe beim Pferd und Immunitätsdauer. *Schw Arch Tierheilkd* 112, 307-314
- Monnier -, Lebasque - (1938) Les résultats de la vaccinations du cheval contre tetanos, dans l'armée, par l'anatoxine de Ramon. *Bul Acad Vét France* 11, 461-466
- Mülverstedt AJ (2006) Entwicklung und Validierung eines ELISA zur Beurteilung der Tetanusvakzinierung am Beispiel eines Pferdebestandes in Thüringen. Göttingen, Georg-August-Universität, Fakultät für Agrarwissenschaften, Diss.
- Radvila P (1975) Tetanusprophylaxe bei Mensch und Tier nach einer Verletzung. *Arch Exp Vet Med* 29, 469-481
- Recknagel S, Snyder A, Blanke A, Uhlig A, Brüser B, Schusser GF (2015) Evaluierung eines Schnelltestes zur Feststellung des Tetanus-Immunistatus bei Pferden. *Berl Münch Tierärztl Wschr* (akzeptiert, in Druck)
- Reichmann P, Lisboa JAN, Araujo RG (2008) Tetanus in equids: a review of 76 cases. *J Equine Vet Sci* 28, 518-523
- Roper MH, Wassilak SGF, Tiwari TSP, Orenstein WA (2013) Tetanus toxoid. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA (Hrsg.), *Vaccines*. Saunders Elsevier, 6. Aufl., St. Louis, 746-772
- Roßkopf U (2007) Validierung der Wirksamkeitsprüfung für Clostridium tetani Impfstoffe ad usum veterinarium durch den direkten Nachweis von Tetanus-Antitoxin im Zieltier mittels ELISA. Gießen, Justus-Liebig-Universität, Fachbereich Veterinärmedizin, Diss.
- Schröder JP, Kuhlmann WD (1991) Tetanusimmunität bei Männern und Frauen in der Bundesrepublik Deutschland. *Immun Infekt* 19, 14-17
- Stelzmann M (2011) Entwicklung eines Schnelltestsystems zum Nachweis von Equinen Antikörpern (IgG) gegen Tetanus. Berlin, Freie Universität, Diss.
- StlKo Vet. (2013) Leitlinie zur Impfung von Pferden. 2. Auflage, Beilage zum Deutschen Tierärzteblatt 09/2013, 6-7
- Thein P (2003) Wie impft man Fohlen richtig? *Tierärztl Praxis* 31, 231-236
- Thein P (2007) Schutzimpfungen beim Pferd. *Prakt Tierarzt* 88 (Suppl. 3), 18-19
- Thein P (2009) Tetanus bei Pferd und Mensch. *Prakt Tierarzt, Vet. Kolleg* 90, 36-41
- Thein P (2011) Zur Tetanusschutzimpfung des Pferdes. *Pferdespiegel* 4, 153-156
- Thein P, Röhm A, Voss J (2013) Experimentelle Untersuchungen zur Tetanusimmunantwort von Fohlen und erwachsenen Pferden unter Einsatz des Fassisi TetaCheck®. *Pferdeheilkunde* 29, 686-699
- Tizard I (2000) Immunity in the fetus and newborn. *Veterinary Immunology: an introduction*. W. B. Saunders Company Philadelphia, 6. Aufl., 210-221



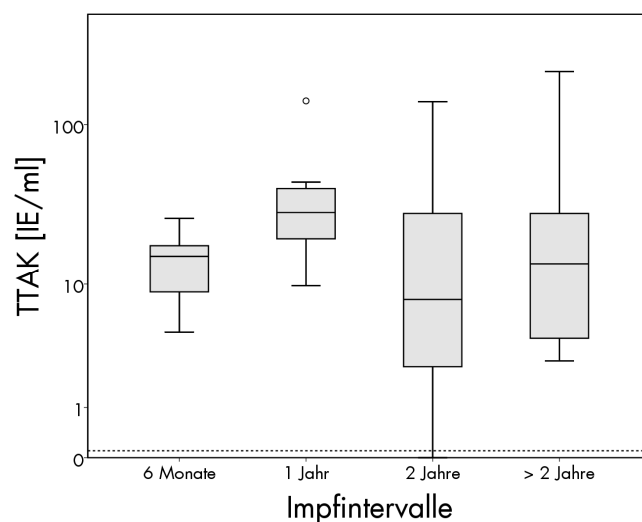
- van Galen G, Delguste C, Sandersen C, Verwilghen D, Grulke S, Amory H (2008) Tetanus in the equine species: a retrospective study of 31 cases. *Tijdschr Diergeneesk* 133, 512-517
- Wilson WD, Mihalyi JE, Hussey S, Lunn DP (2001) Passive transfer of maternal isotype antibodies against tetanus and influenza and their effect on the response of foals to vaccination. *Equine Vet J* 33, 644-650
- World Health Organization (2006) Tetanus vaccine - WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec* 81,197-208

## Abbildungen



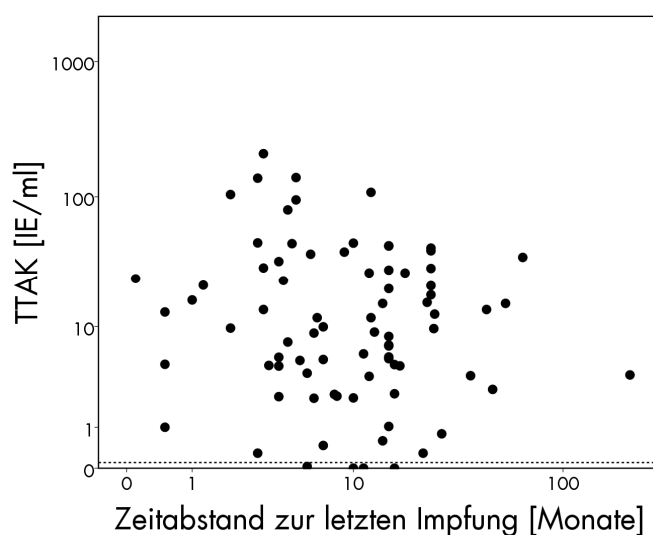
**Abbildung 1:** Vergleichende Darstellung der Tetanustoxoid-Antikörperkonzentration in den jeweiligen Altersgruppen. Die gestrichelte Linie repräsentiert die angenommene protektive Antikörperkonzentration von 0,1 IE/ml.

**Figure 1:** Comparative depiction of tetanus antibody concentrations within the different age groups. The dotted line represents the protective threshold of 0.1 IE/ml.



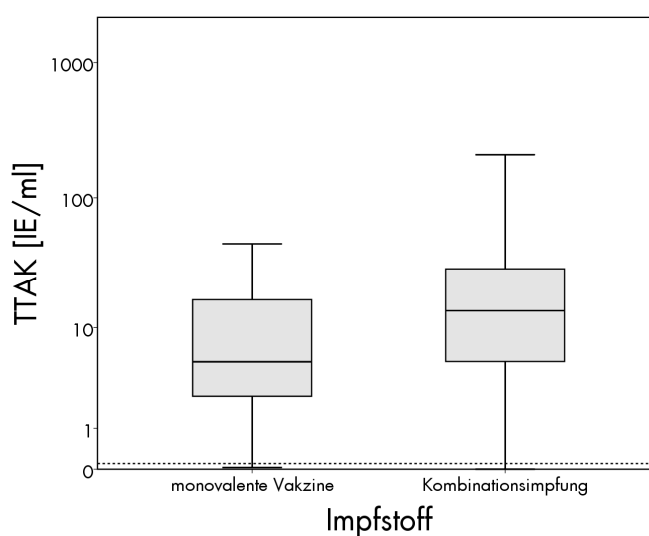
**Abbildung 2:** Vergleichende Darstellung der Tetanustoxoid-Antikörperkonzentration in Relation zum letztmalig angewendeten Impfintervall. Die gestrichelte Linie repräsentiert die angenommene protektive Antikörperkonzentration von 0,1 IE/ml.

**Figure 2:** Comparative depiction of tetanus antibody concentrations in relation to the latest revaccination interval. The dotted line represents the protective threshold of 0.1 IE/ml.



**Abbildung 3:** Streupunktdiagramm zur Veranschaulichung der dem jeweiligen Zeitabstand von der letzten Impfung bis zur Blutentnahme entsprechenden Tetanustoxoid-Antikörperkonzentration. Die gestrichelte Linie repräsentiert die angenommene protektive Antikörperkonzentration von 0,1 IE/ml.

**Figure 3:** Scatterplot showing the tetanus toxoid antibody concentrations obtained at the individual time intervals between the latest vaccination and the time of blood sampling. The dotted line represents the protective threshold of 0.1 IE/ml.



**Abbildung 4:** Vergleichende Darstellung der Tetanustoxoid-Antikörperkonzentration bei Verwendung monovalenter Vakzinen bzw. der gleichzeitigen Impfung mehrerer Komponenten. Die gestrichelte Linie repräsentiert die angenommene protektive Antikörperkonzentration von 0,1 IE/ml.

**Figure 4:** Comparative depiction of tetanus antibody concentrations in relation to the vaccine types used (monovalent vaccines versus simultaneously administered multiple antigens). The dotted line represents the protective threshold of 0.1 IE/ml.

**Tabelle**

<b>Probe - Nr.</b>	<b>TTAK [IE/ml]</b>	<b>Alter</b>
43	0,35	2 Tage
50	71,56	3 Wochen
31	7,00	4 Wochen
45	1,39	7 Wochen
27	9,72	7 Wochen
18	10,40	7 Wochen
05	2,10	14 Wochen
10	< 0,01	22 Wochen

**Tabelle 1:** Nach Alter der in der Studie enthaltenen acht Fohlen sortierte Auflistung der TTAK.

Table 1: List of the tetanus antibody concentrations of the eight foals included in our study, corresponding to their age.

## **2.2 Publikation 2**

Stephan Recknagel, Alice Snyder, Annemarie Blanke, Albrecht Uhlig, Benjamin Brüser, Gerald Fritz Schusser

### **Evaluierung eines Schnelltestes zur Feststellung des Tetanus-Immunitätsstatus bei Pferden**

Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 128 (2015) 5 (Sep/Okt) 376-383

Medizinische Tierklinik der Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Leipzig<sup>1</sup>  
Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie, Bad Langensalza<sup>2</sup>

## **Evaluierung eines Schnelltestes zur Feststellung des Tetanus-Immunstatus bei Pferden**

### **Evaluation of an immunochromatographic dipstick test for the assessment of tetanus immunity in horses**

Stephan Recknagel<sup>1</sup>, Alice Snyder<sup>1</sup>, Annemarie Blanke<sup>1</sup>, Albrecht Uhlig<sup>1</sup>, Benjamin Brüser<sup>2</sup>, Gerald Fritz Schusser<sup>1</sup>

#### **Zusammenfassung**

Um im Falle von Verletzungen oder geplanten Eingriffen eine sichere Verabreichung von Toxoid und/oder Antiserum vornehmen bzw. um eine effektive Grundimmunisierung durchführen zu können, ist die Kenntnis über das Vorhandensein von Antikörpern gegen Tetanustoxin erforderlich. Für diese Indikationen wurde der Fassisi® TetaCheck als vor Ort anwendbarer Schnelltest entwickelt. Ziel dieser Studie war die Evaluierung der Leistungsparameter dieses immunochromatographischen Streifentestes. Dazu wurden die durch zwei unabhängige Untersucher ermittelten qualitativen Resultate des Schnelltestes mit den mittels Doppel-Antigen-ELISA quantifizierten Antitoxinkonzentrationen in 99 Serumproben retrospektiv verglichen. Ergänzend wurde die Farbreaktion im Testfeld des Streifentestes durch Fotografieren und anschließender Analyse mittels einer Bildbearbeitungssoftware quantifiziert. Bei Annahme einer protektiven Antikörperkonzentration von  $\geq 0,1$  IE/ml ergaben sich für beide Untersucher eine Sensitivität von 83,6 % und eine Spezifität von 100 %. Die Übereinstimmung der Untersucher hinsichtlich eines binären Testergebnisses war fast vollkommen ( $\kappa = 0,88$ ). Wurde der Test vom jeweils anderen Untersucher durchgeführt, hatte dies keinen Einfluss auf die Testinterpretation ( $\kappa = 0,80$  und  $\kappa = 0,84$ ). Der vom Hersteller vorgegebene Bewertungsmaßstab „negativ“, „schwach positiv“ und „positiv“ wurde durch Definition fünf unterschiedlicher Farbintensitäten des Testfeldes erweitert, was eine sichere Differenzierung von ungeschützten Individuen und Tieren mit belastbarer Immunität ermöglichte. Zwischen der objektiv gemessenen Farbintensität und der Tetanustoxoid-Antikörperkonzentration bestand ein positiver linearer Zusammenhang ( $r^2 = 0,74$ ).

Der Fassisi® TetaCheck erwies sich als robuster und zuverlässiger Schnelltest zur Feststellung des Tetanus-Immunstatus in Pferdeseren. Seine routinemäßige Anwendung in der Pferdepraxis kann dazu beitragen, Immunisierungen möglichst effektiv und nebenwirkungsarm zu gestalten.

#### *Schlüsselwörter*

Schnelltest, Tetanusprophylaxe, protektive Antikörperkonzentration, Tetanus-Antitoxin

## Summary

Knowledge of tetanus immunity in equine patients is crucial in cases of injuries, elective surgeries, or when effective vaccination protocols are to be designed.

The Fassisi® TetaCheck is a stall-side rapid test which was developed to address these issues. The purpose of the present study was to evaluate its performance parameters. To this end, the qualitative test results obtained by two blinded observers were compared to tetanus toxoid antibody levels from 99 serum samples, measured with a double antigen ELISA. Additionally the colour intensities of the test window were quantified using a camera and photo editing software.

Assuming that the protective level of tetanus toxoid antibodies is  $\geq 0.1$  IE/ml, the tetanus quick stick (TQS) showed a sensitivity of 83.6% and a specificity of 100%. Observer agreement in terms of a binary test result (positive and negative) was almost perfect ( $\kappa = 0.88$ ). Exchanging the observer did not affect the interpretation of the TQS ( $\kappa = 0.80$ ;  $\kappa = 0.84$ ). The definition of five distinct colour intensities of the „test window“ enabled a clear differentiation of unprotected individuals from those with a protective immunity. There was a linear relationship between the objectively measured colour intensities and the tetanus toxoid antibody concentration ( $r^2 = 0.74$ ).

The TQS thus proved to be a robust and reliable test in the stall-side assessment of tetanus immunity in horses. Its implementation in equine daily practice can help to avoid unnecessary immunizations in adult horses and therefore minimize vaccination side effects.

## Keywords

Tetanus Quick Stick (TQS), Tetanus prevention, protective antibody levels, Tetanus antitoxin

## Einleitung

Trotz der längst etablierten und weit verbreiteten Anwendung effektiver Impfstoffe in den Pferdepopulationen industrialisierter Länder, ist die Tetanusinfektion als dramatisch verlaufende Erkrankung mit Mortalitätsraten von 59 bis 76 % noch immer allgegenwärtig (Green et al., 1994; Reichmann et al., 2008; van Galen et al., 2008). Betroffene Pferde leiden an einem Spasmus der Skelettmuskulatur, welcher sich in Abhängigkeit von der Schwere der Krankheit als Nickhautvorfall, starrer Gesichtsausdruck mit kaudal gerichteten Ohren, als Krampf der Kaumuskulatur (Trismus), als gestreckte Kopf-Hals-Haltung bis hin zum Opisthotonus, als Dysphagie, als steifer Gang bzw. sägebockartige Körperhaltung, aufgestellte Schweifröhre, Überreaktion auf akustische und taktile Reize, generalisierte tonische Muskelspasmen und schließlich als Festliegen in Seitenlage mit Dyspnoe und kardiovaskulärer Insuffizienz manifestieren kann (Thein, 2009; MacKay, 2014). Für die klinischen Symptome maßgeblich verantwortlich ist die Wirkung des von dem anaeroben, grampositiven Sporenbildner *Clostridium tetani* produzierten Exotoxin Tetanospasmin, welches an inhibitorischen

Interneuronen (Renshaw-Zellen) in der Medulla oblongata und im Rückenmark die Freisetzung der inhibitorisch wirkenden Neurotransmitter Glycin und Gamma-Aminobuttersäure (GABA) hemmt (Cook et al., 2001). Als Eintrittspforte dienen dem ubiquitär im Erdreich vorkommenden Erreger Stichverletzungen, die Nabelschnur, der postpartale Uterus, der Gastrointestinaltrakt oder kontaminierte chirurgische Wunden. Für die Keimung der Sporen und die weitere Proliferation des Erregers mit Toxinfreisetzung ist dabei eine niedrige Sauerstoffspannung, wie sie in tiefen, verschmutzten oder stark nekrotisierenden Wunden zu erwarten ist, essentiell. Die wirksamste Maßnahme in der Bekämpfung der Infektion ist die Prophylaxe in Form einer Impfung mit inaktiviertem Toxin (Toxoid). Kenntnis über den Immunstatus des Patienten ist insbesondere bei der Versorgung von Verletzungen oder bei elektiven Eingriffen erforderlich. Die Dokumentation im Pferdepass ist dabei nicht in jedem Fall als absolut verlässliche Quelle anzusehen. Neben einer fehlerhaften Eintragung kann z. B. auch der verwendete Impfstoff durch falsche oder zu lange Lagerung zum Zeitpunkt der Impfung unwirksam gewesen sein; die Wahl eines zu frühen Impfzeitpunktes kann zur Ausprägung einer Immuntoleranz geführt haben, obwohl die empfohlene Anzahl an Impfungen und die entsprechende Impfindervalle eingehalten wurden (Baljer et al., 1982; Wilson et al., 2001). Andererseits kann beim Nachweis einer belastbaren Immunität auf eine Verabreichung von Antiserum verzichtet und damit die geringe, aber dennoch vorhandene Gefahr der Serumhepatitis abgewendet werden (Guglick et al., 1995; Barton, 2009). Aufschluss über den tatsächlichen Immunstatus des Patienten kann nur eine objektive Messung der Antitoxinkonzentration erbringen. Aufgrund seiner hohen Spezifität stellt dabei der auch in der Impfstoffprüfung eingesetzte Toxinneutralisationstest (TNT) den Goldstandard dar (Europäisches Arzneibuch, 2011). Dabei wird an Mäusen oder Meerschweinchen diejenige Menge an Tetanustoxoid bestimmt, die erforderlich ist, um eine paralyisierende Dosis Tetanustoxin zu neutralisieren. Eine Tetanustoxoid-Antikörperkonzentration (TTAK) von  $\geq 0,01$  IE/ml gilt bei Anwendung dieses Verfahrens als protektiv für den Menschen (Roper et al., 2013). In den Bestrebungen, Tierversuche durch in vitro-Verfahren zu ersetzen, erwiesen sich der Toxinbindungsinhibitionstest (Hendriksen et al., 1988) und verschiedene ELISA-Systeme (ECVAM, 2000; Roßkopf et al., 2005) als gleichwertige Alternativen. Gegenüber dem Neutralisationstest wird bei Anwendung dieser Verfahren aufgrund des Auftretens falsch-positiver Testergebnisse im niedrigtitrigen Bereich im Allgemeinen ein zehnfacher Sicherheitsaufschlag angewendet und damit ein Antitoxin-Gehalt von  $\geq 0,1$  IE/ml als schützender Grenzwert angesehen. Eine Übertragung dieses Grenztiters auf das Pferd ist problematisch, da hierüber nur ein Toxinbelastungsversuch verlässlich Auskunft geben kann. Löhner und Radvila stellten bei 19 bzw. 24 geimpften Pferden fest, dass nach Injektion einer dreifachen Letaldosis keines der Pferde erkrankte (Radvila und Löhner, 1965; Löhner und Radvila, 1970). Die mittleren Antitoxinkonzentrationen betragen 0,47 bzw. 0,59 IE/ml. In beiden Experimenten waren jedoch auch Individuen mit TTAK von 0,005 bzw.



< 0,0025 IE/ml geschützt. Im Unterschied zu den bisherigen zeit- und kostenintensiven, technisch anspruchsvollen Laboruntersuchungen, ist es mit der Verfügbarkeit eines immunchromatographischen Schnelltestes (Fassisi® TetaCheck) nun möglich, schnell und unkompliziert vor Ort eine qualitative Bestimmung des Antitoxingehaltes durchzuführen. Ziel der Studie ist die Validierung dieses Testsystems gegenüber einem ELISA-Verfahren als Referenzmethode.

## **Material und Methoden**

### *Serumproben*

Um einen möglichst großen Bereich unterschiedlicher Antikörperkonzentrationen in die Untersuchung einbeziehen zu können, wurde von den Patienten, die innerhalb eines Jahres (September 2011 bis September 2012) in der Medizinischen Tierklinik vorstellig wurden, 91 Pferde mit den unterschiedlichsten Impfanamnesen ausgewählt. Ergänzt wurde das Probenmaterial durch acht Pferde mit generalisiertem Tetanus aus den Jahren 2008 und 2010, welche nachweislich nicht gegen Tetanus geimpft waren. Für die Untersuchungen standen somit 99 Serumproben zur Verfügung. Bis zur Durchführung der Untersuchungen lagerten diese bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### *Tetanus-Streifentest*

Der Tetanus-Streifentest (TST) ist ein einstufiger immunchromatographischer Test zur qualitativen Bestimmung der TTAK in equinem Vollblut, Serum oder Plasma (EDTA bzw. Heparin). Der Testaufbau folgt dem Prinzip eines Lateral Flow Assays, wie er beispielsweise auch in Schwangerschaftstest Anwendung findet. Innerhalb des Plastikgehäuses der Testkassette (Abb. 1 a) befindet sich der Teststreifen, welcher im Bereich des Proben- und des Reaktionsfensters sichtbar ist. Das Testprinzip beruht auf einer Kombination aus Tetanustoxoid (TT), konjugiert mit kolloidalem Gold im Bereich des Konjugatpads (Abb. 1 b) und festphasengebundenem Tetanustoxoid im Bereich des „T“ (Test)-Feldes der Reaktionsmatrix. Die Serumprobe wird mit der mitgelieferten Pufferlösung mittels Einwegpipette und Mikroreaktionsgefäß (ebenfalls Komponenten des TST) versetzt und anschließend auf das Probenfeld gegeben. Während des Testablaufs passiert das Probenmaterial zunächst das Konjugatpad. Sind Tetanustoxoid-Antikörper (Antitoxin) in der Probe vorhanden, so bilden sie hier mit dem Tetanustoxoid-Gold-Konjugat Komplexe, welche durch die Kapillarkraft weiter in Richtung Reaktionsmatrix migrieren. Diese Komplexe werden dann durch immobilisiertes Tetanustoxoid im Bereich des „T“-Feldes gebunden, eine pinkfarbene Linie erscheint und zeigt somit ein positives Testergebnis an. Überschüssige Komplexe binden an ein Kontrollreagenz im „C“ (Control)-Feld der Testkassette und zeigen somit die korrekte Durchführung des Tests an. Befindet sich kein Antitoxin in der Probe, bleibt das Testfeld frei und die Probe gilt als „negativ“. Laut Gebrauchsinformation des Herstellers lässt die Auswertung des Tests nur ein binäres Ergebnis

(positiv oder negativ) zu. In Abhängigkeit von der Intensität der Anfärbung des Testfeldes wird jedoch ein unterschiedliches Vorgehen empfohlen. So wird bei einer schwachen Anfärbung eine „zeitnahe Impfung“ angeraten, da zwar noch eine Antikörperkonzentration oberhalb des protektiven Grenztiters von  $\geq 0,1$  IE/ml zu erwarten ist, ein „genügend hoher Antikörperschutz“ von  $\geq 1$  IE/ml (wie im Falle einer starken Färbung des Testfeldes) aber nicht gegeben ist.

Der TST wurde gemäß der Herstellerangaben durch zwei unabhängige Untersucher (A. S. und A. B.) ohne vorherige Schulung im Blindverfahren durchgeführt. Neben der Interpretation als „positives“, „schwach positives“ oder „negatives“ Resultat (qualitative Auswertung) wurde eine zusätzliche Bewertung der Farbintensität des Testfeldes anhand fünf definierter Kategorien (Abb. 2) abgegeben, um den Grenzbereich zwischen negativen und schwach positiven Testergebnissen genauer zu untersuchen (semiquantitative Auswertung). Nachdem die Untersucher die selbst durchgeführten Tests befundet hatten, erfolgte die Interpretation des vom jeweils anderen Untersucher angefertigten TST. Alle für die Studie verwendeten TST entstammten ein und derselben Charge.

Im Anschluss an diesen Versuchsteil erfolgte die objektive Messung der Farbintensitäten aller Teststreifen. Hierzu wurden die 198 Teststreifen aus ihren Kassetten entfernt und unter identischen Beleuchtungsverhältnissen mit denselben Einstellungen (Empfindlichkeit ISO-100, Blende 8,0, Brennweite 50 mm, Belichtungszeit 1/10 s) mit einer digitalen Spiegelreflexkamera (Canon, EOS 40D mit Canon EF 50mm f/1.4 USM, Krefeld, Deutschland) fotografiert. Die Analyse erfolgte über die Histogrammfunktion einer Bildbearbeitungssoftware (Adobe Systems, Photoshop CS3, San José, USA) nach vorausgegangener Umwandlung in ein 8 Bit-Graustufenbild mit Farbumkehr. Der Messbereich umfasste jeweils ein 1520 Pixel großes Rechteck. Pro Testfeld und in dem Bereich zwischen Test- und Kontrollfeld wurden je drei Messungen durchgeführt. Durch Bildung der Differenz der so erhaltenen Mittelwerte wurden evtl. vorhandene Einflüsse der unterschiedlich starken Färbungen der Seren auf die Teststreifen minimiert.

#### *Equiner anti-Tetanustoxoid-IgG-ELISA*

Die ausgewählten Serumproben wurden am Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie (fzmb GmbH, Bad Langensalza, Deutschland) mit einem dort entwickelten und validierten zweistufigen Doppel-Antigen-ELISA untersucht, ohne dass dem Untersucher (B. B.) die Ergebnisse des TST bekannt waren.

Die Kavitäten der Mikrotiterplatten wurden zunächst mit dem Coatingantigen (Tetanustoxoid) beschichtet. Für die erste Analyse wurden die Serumproben 1:250 verdünnt. Als Standard wurde anti Tetanus Toxin Ig-Standard verwendet. Die Auftragung der Standards (0,25-32 mIE/ml, serielle 1:2 Verdünnung) und Proben erfolgte dabei in Doppelbestimmung. Je Mikrotiterplatte wurden ein internes Kontrollserum und eine Negativkontrolle mitgeführt. An die

Inkubation über 1 h bei 25 °C schlossen sich nach Absaugen der Flüssigkeit fünf Waschungen an. Nach Zugabe des Detektorantigens (markiertes Tetanustoxoid) und erneuter Inkubation über 1 h bei 25 °C wurde Meerrettich-Peroxidase (HRP)-Konjugat zugesetzt und für weitere 30 min inkubiert. Es folgten fünf Waschschrte mit anschließender Zugabe einer Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung. In Anwesenheit der Sandwich-Immunkomplexe hydrolysiert das gebundene HRP-Konjugat das bislang farblose Chromogen TMB, so dass eine Blaufärbung entsteht. Nach lichtgeschützter Inkubation über 15 min bei Raumtemperatur wurden 100 µl einer Stopplösung (Schwefelsäure) hinzugegeben. Innerhalb von 30 min erfolgte die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 450 nm unter Verwendung einer Referenzwellenlänge von 630 nm. Die Auswertung der photometrischen Messung erfolgte mit Hilfe der Software Revelation (Dynex Technologies, Chantilly, USA). Es wurden der OD-Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient (CV) der Doppelbestimmungen errechnet. Die OD-Mittelwerte der eingesetzten Standards wurden graphisch gegen deren Konzentrationen aufgetragen. Die Berechnung der Probenkonzentrationen erfolgte aus der Trendgeraden der Standardreihe. Hierzu wurde eine nicht-lineare Regressionsgleichung vom Typ Four parameter logistic (4-PL) genutzt. Die aus der so erstellten Standardkurve ermittelten Konzentrationen wurden mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert, um die Konzentration in der Serumprobe zu erhalten. Proben, die außerhalb des linearen Messbereiches von 1-30 mIE/ml lagen, bzw. einen CV von > 10 % aufwiesen, wurden einer erneuten Analyse unterzogen. In Abhängigkeit vom Resultat der ersten Untersuchung wurden die Proben in weiteren Verdünnungsstufen eingesetzt. Die Verdünnung der Proben lag dabei zwischen 1:10 und 1:60 000. Die Nachweisgrenze des beschriebenen Doppel-Antigen-ELISA betrug 0,01 mIE Anti-Tetanustoxoid-IgG/ml.

### *Statistik*

Für den ersten Teil der Studie wurden die Sensitivität und Spezifität des TST gegenüber dem Doppel-Antigen-ELISA als Referenzmethode für beide Untersucher bestimmt. Da ein binäres Ergebnis für diese Berechnungen erforderlich war, wurden die „schwach positiven“ und „positiven“ Testergebnisse zu einer Gruppe zusammengefasst. Die niedrigste der „schwach positiven“ Kategorie zugeordnete TTAK betrug 0,79 IE/ml, was eine solche Vorgehensweise rechtfertigte. Die Sensitivität wurde als Anteil der mittels TST korrekt als positiv klassifizierten Pferde an der Gesamtheit der Pferde mit einer protektiven Ak-Konzentration von > 0,1 IE/ml definiert. Die Spezifität wurde als Anteil der korrekt als negativ klassifizierten Pferde an der Gesamtheit der Pferde mit TTAK ≤ 0,1 IE/ml bezeichnet. Als Maß der Übereinstimmung beider Untersucher hinsichtlich der Befundung der Testergebnisse in den unterschiedlichen Bewertungsmaßstäben diente Cohens Kappa.

Unterschiede in der TTAK-Konzentration zwischen den Kategorien wurden mit dem Kruskal-Wallis- und anschließend mit dem Mann-Whitney-U-Test bestimmt. Das Signifikanzniveau

wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt. Da es sich um einen Mehrfachvergleich handelte, wurde das Signifikanzniveau mit der Bonferroni-Methode korrigiert, um einer Alphafehler-Kumulierung entgegenzuwirken.

Der Vergleich der gemessenen Farbintensitäten mit den TTAK des Doppel-Antigen-ELISA erfolgte nach Logarithmieren der Daten durch Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson mit anschließender univariabler linearer Regressionsanalyse. Die statistische Auswertung wurde durch Verwendung der Software IBM® SPSS® Statistics, Version 22.0 (IBM, Armonk, USA) unterstützt.

## Ergebnisse

Beide Untersucher befundeten 77 von 99 Patienten (77,8 %) mittels des selbst durchgeführten TST als positiv und die verbleibenden 22 (22,2 %) als negativ. Die Zuordnung der Seren zu diesen beiden Kategorien unterschied sich jedoch in vier Fällen. Der Kappa-Koeffizient nach Cohen betrug 0,88 und bewies damit eine fast vollkommene Übereinstimmung in der Befundung durch beide Untersucher.

Die mittels Doppel-Antigen-ELISA gemessenen TTAK zeigten an, dass 92 (92,9 %) der getesteten Patienten eine als protektiv angenommene Immunität aufwiesen. Der Anteil geschützter Pferde lag somit um 15,1 % höher als durch den TST erfasst. Der Mittelwert der von Untersucher 1 positiv befundeten Seren betrug 25,86 IE/ml (95 % Konfidenzintervall [KI] 17,56-34,15); der der negativ befundeten Seren 0,68 IE/ml (95 % KI 0,29-1,06). Für Untersucher 2 waren dies 25,89 IE/ml (95 % KI 17,60-34,18) bzw. 0,56 IE/ml (95 % KI 0,28-0,85). Die TTAK der negativ getesteten Seren unterschieden sich signifikant von den positiven, wobei es keine Unterschiede zwischen den Untersuchern gab. Gegenüber dem Doppel-Antigen-ELISA als Referenzmethode ergab sich für den TST bei beiden Untersuchern eine Sensitivität von 83,7 %. Da keine falsch-positiven Testergebnisse auftraten, betrug die Spezifität 100 %.

Hinsichtlich der vom Hersteller des TST vorgegebenen qualitativen Auswertung wurden 87 Seren (87,9 %) identisch befundet. Wie aus Tabelle 1 zu entnehmen, unterschieden sich die nicht übereinstimmenden Serumproben (12,1 %) um höchstens eine Kategorie, sodass es keine Überschneidungen von „positiven“ und „negativen“ Testergebnissen gab. Mit einem Kappa-Koeffizienten von 0,79 ergab sich für die Zuordnung in drei Kategorien eine sehr gute Übereinstimmung beider Untersucher. Bei Erweiterung des Bewertungsmaßstabes auf fünf Kategorien (semiquantitative Befundung) wurden 69 Proben (69,7 %) identisch beurteilt. Auch hier unterschieden sich die abweichenden Zuordnungen (30,3 %) um höchstens eine Kategorie (Tab. 2.), was ebenso zu einer guten Übereinstimmung der Untersucher führte ( $\kappa = 0,61$ ).

Das Ablesen des selbst durchgeführten TST im Vergleich zum Ablesen des vom jeweils anderen Untersucher angefertigten TST ergab in der qualitativen Befundung für Untersucher 1 eine Übereinstimmung bei 88 von 99 Proben (88,9 %,  $\kappa = 0,80$ ) und für Untersucher 2 bei 90 von

99 Proben (90,9 %,  $\kappa = 0,84$ ). In der semiquantitativen Interpretation waren es 79,8 % identische Befundungen für Untersucher 1 ( $\kappa = 0,74$ ) und 77,8 % für Untersucher 2 ( $\kappa = 0,71$ ). Abweichungen erstreckten sich auch hier auf nur jeweils eine Kategorie in den unterschiedlichen Bewertungsmaßstäben bei beiden Untersuchern.

Die mittels Doppel-Antigen-ELISA gemessenen TTAK lagen zwischen  $< 0,01$  und 209,00 IE/ml. Sowohl bei Untersucher 1, als auch bei Untersucher 2 unterschieden sich die TTAK hinsichtlich ihrer Zuordnung in der qualitativen und semiquantitativen Testinterpretation in allen Kategorien signifikant. Unterschiede zwischen den Untersuchern bestanden dagegen nicht. TTAK unterhalb der protektiven Konzentration von 0,1 IE/ml waren in der qualitativen Interpretation allein der „negativen“ Testergebnisse zugeordnet worden. Alle als „schwach positiv“ bewerteten Tests wiesen TTAK  $\geq 0,79$  IE/ml auf. Der niedrigste gemessene Wert eines eindeutig positiven Testergebnisses lag mit 2,11 IE/ml um das mehr als 20fache über der protektiven Ak-Konzentration. In den Kategorien 0 und 1 der semiquantitativen Befunderhebung waren bei beiden Untersuchern TTAK unterhalb 0,1 IE/ml zu finden. Ab der Kategorie 2 wurden TTAK  $\geq 0,79$  IE/ml gemessen (Abb. 3).

Die objektiv gemessenen Farbintensitäten und die logarithmierten TTAK korrelierten signifikant positiv miteinander ( $r = 0,86$ ; 95 % Konfidenzintervall 0,813-0,891;  $p < 0,01$ ). Die Regressionsanalyse ergab einen linearen Zusammenhang, welcher in Abbildung 4 dargestellt ist.

## Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde ein neu entwickelter Streifentest zur Feststellung des Tetanus-Immunstatus gegenüber einem ELISA-Verfahren als Referenzmethode validiert. Die Sensitivität des TST betrug 83,7 % unter der Annahme einer minimalen protektiven Antikörperkonzentration von  $\geq 0,1$  IE/ml. Vergleichbare Werte wurden in humanmedizinischen Studien zur Validierung gleichartiger Testsysteme publiziert (Colombet et al., 2005; Stubbe et al., 2007; Elkharrat et al., 2009; Hatamabadi et al., 2011) und sind nicht nachteilig zu werten, stellen sie doch ein großzügiges Sicherheitsfenster in der Erfassung ausreichend geschützter Individuen dar. Die Falsch-Negativ-Rate von 13,6 % erscheint zunächst recht hoch, stellt aber bei näherer Betrachtung keine wesentliche Beeinträchtigung der Effizienz des TST dar. Falsch negativ getestete Individuen hatten mediane TTAK von 0,59 IE/ml (25. Perzentil 0,35 IE/ml; 75. Perzentil 1,67 IE/ml) bei Untersucher 1 bzw. 0,59 IE/ml (25. Perzentil 0,35 IE/ml; 75. Perzentil 1,03 IE/ml) bei Untersucher 2 und wiesen somit einen intermediären Immunstatus auf. Eine unnötige Verabreichung von Toxoid an diese Pferde würde somit einer nebenwirkungsarmen Boosterung gleichkommen. Mögliche Erklärungen für die hohe Falsch-Negativ-Rate wären die Festlegung der protektiven TTAK auf  $\geq 0,1$  IE/ml, die Technologie des Streifentestes oder beide Faktoren. Die Festlegung eines wirksamen Schutztiters ist dabei ein grundsätzliches Problem. Unter Verwendung von Standard-ELISA-

Verfahren werden im Allgemeinen Antitoxinkonzentrationen von  $\geq 0,1-0,2$  IE/ml für den Menschen als protektiv angesehen (WHO, 2006). Es wurden jedoch auch Tetanusfälle dokumentiert, bei denen die Antitoxinkonzentrationen oberhalb dieses Schwellenwertes lagen (Livorsi et al., 2010; Vollman et al., 2014). Protektion liegt dann vor, wenn ausreichend Antikörper vorhanden sind, die in der Lage sind, Toxin zu neutralisieren, was sich jedoch nicht quantitativ erfassen lässt. Die Aussagekraft der TTAK als Indikator für eine belastbare Immunität erscheint vor diesem Hintergrund eingeschränkt. Auch beim Pferd wird eine Konzentration von  $\geq 0,1$  IE/ml erfahrungsgemäß als schützend angenommen (Thein, 2007), weshalb dieser Maßstab hier zugrunde gelegt wurde. Aufgrund der hohen Empfänglichkeit der Pferde gegenüber einer Tetanusinfektion und der Abhängigkeit der Toxinbildung von der Quantität der aufgenommenen Sporen, welche beim Pferd im Vergleich zum Menschen vermutlich größer ist, erscheint eine Anhebung der als protektiv angenommenen TTAK sinnvoll. Eine Neuberechnung der Leistungsparameter des TST basierend auf einem Wert von  $\geq 0,5$  IE/ml führte zu einem Anstieg der als „ungeschützt“ identifizierten Pferde von sieben auf 14; die Falsch-Negativ-Rate verringerte sich von 13,6 % auf 9,4 % (Ergebnisse nicht dargestellt). Damit einhergehend war ein Anstieg der Sensitivität auf 90,6 % bei unveränderter Spezifität von 100 % zu verzeichnen. Da trotz Anpassung des Schwellenwertes vier Serumproben mit TTAK von 1,00, 1,03, 1,67 und 1,80 IE/ml von beiden Untersuchern übereinstimmend „negativ“ befundet wurden, scheint auch ein technologiebedingter Einfluss auf die Falsch-Negativ-Rate möglich. Falsch-positive Testresultate traten bei beiden Untersuchern nicht auf. Da jedoch nur sieben der 92 getesteten Tiere TTAK unterhalb des Grenztiters aufwiesen, ist die Spezifität des TST von 100% vorsichtig zu bewerten. Vergleichbare humanmedizinische Studien mit wesentlich größerem Umfang von 311 (Stubbe et al., 2007) bzw. 1018 (Elkharrat et al., 2009) Patienten wiesen 14 bzw. lediglich drei falsch-positive Testergebnisse auf. Mit einer Vergrößerung der Probenanzahl oder unter Einschluss einer größeren Proportion von Pferden ohne ausreichende Protektion ist das vereinzelte Auftreten falsch-positiver Testergebnisse nicht unwahrscheinlich. Von einer 100%igen Zuverlässigkeit des TST kann somit zwar nicht ausgegangen werden, mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit verhindert der TST jedoch, dass bei ungeschützten Individuen ein ausreichender Impfschutz angenommen wird und damit auf eine aktive und/oder passive Immunisierung verzichtet wird.

Lediglich bei vier Testseren stimmten die beiden Untersucher hinsichtlich der binären Testinterpretation anhand der selbst durchgeführten TST nicht überein ( $\kappa = 0,88$ ). Diese hohe Interrater-Reliabilität kann noch dahingehend bekräftigt werden, dass die Untersucher allein nach mitgelieferter Gebrauchsanweisung arbeiteten und keine gesonderte Schulung im Umgang mit dem Test erhielten, um eine möglichst praxisnahe Situation nachzuahmen. Bei Aufteilung der positiven Kategorie in eine „positive“ und „schwach positive“ Unterkategorie nahm die Übereinstimmung naturgemäß etwas ab ( $\kappa = 0,79$ ), was sich in der weiteren Aufteilung des Bewertungsmaßstabes in fünf Kategorien fortsetzte ( $\kappa = 0,61$ ). Die exakte

Definition der verschiedenen Farbintensitäten ermöglichte den Untersuchern offenbar das Ergebnis des TST einer dieser Kategorien relativ sicher zuzuordnen. Das spiegelte sich zum einen in der sehr guten Übereinstimmung beider Untersucher wider. Zum anderen wurde dies aber auch anhand der signifikanten Unterschiede in den TTAK, die diesen Farbintensitäten durch beide Untersucher gleichartig zugeordnet wurden, deutlich (Abb. 3). Sowohl für die Praktikabilität der semiquantitativen Auswertung als auch für die Robustheit des TST spricht, dass sich die Abweichungen der Untersucher auf jeweils nur eine benachbart liegende Kategorie erstreckten. Um den Einfluss der Testdurchführung auf die Interpretation des Ergebnisses zu untersuchen, wurden zusätzlich die vom jeweils anderen Untersucher durchgeführten TST ausgewertet. Die hohen und eng beieinander liegenden Kappa-Koeffizienten deuteten hier auf eine starke Unempfindlichkeit des TST bei korrekt durchgeführtem Testablauf ( $\kappa = 0,80$  bzw.  $0,84$  in der qualitativen Befundung,  $\kappa = 0,74$  bzw.  $0,71$  in der semiquantitativen Befundung) hin. Da im direkten Vergleich der gepaarten Teststreifen mit dem bloßen Auge keine Unterschiede in der Anfärbung der Testfelder erkennbar waren (S. R.), konnten die Abweichungen in den Interpretationen nicht auf Unterschiede in der Qualität der einzelnen Teststreifen zurückgeführt werden, sondern reflektieren vermutlich kleine Unsicherheiten in der Zuordnung der Farbintensitäten zu den jeweiligen Kategorien.

Im Unterschied zu den Angaben in der Gebrauchsanweisung wurden in den einzelnen Kategorien deutlich höhere TTAK gemessen, wobei nicht bekannt ist, welcher ELISA seitens des Herstellers verwendet wurde. Kritisch ist dies vor allem bei den „schwach positiven“ Testergebnissen zu sehen. Die Vorhersage, dass in diesen Fällen TTAK von  $\geq 0,1$  bis  $\leq 1,0$  IE/ml vorliegen und damit eine intermediäre Immunität bei diesen Pferden vorhanden ist, traf nur teilweise zu. Im Median wiesen diese Tiere TTAK von  $2,80$  bzw.  $3,85$  IE/ml und damit einen zuverlässigen Impfschutz auf. Eine unnötige Verabreichung von Toxoid und/oder Antiserum an diese Tiere würde neben den nicht zu vernachlässigenden Nebenwirkungen unnötige Kosten verursachen. Die ausführlichere Charakterisierung der Grauzone zwischen negativen und positiven Testergebnissen konnte hier Abhilfe schaffen. So wiesen mit einer Ausnahme ( $0,79$  IE/ml) alle der Farbintensität 2 und höher zugeordneten Testseren zuverlässig schützende Antikörperkonzentrationen auf. Lediglich bei einer gerade so wahrnehmbaren Farbreaktion an der vorderen Begrenzung des Testfeldes ohne erkennbaren Farbverlauf (Farbintensität 1) waren intermediäre Antikörperkonzentrationen vorhanden. Festzuhalten bleibt, dass auch in dieser Kategorie nicht geschützte Individuen mit nicht nachweisbaren Ak-Konzentrationen zu finden waren. Da eine derartige Farbreaktion auch als „schwach positives“ Resultat fehlinterpretiert werden kann, besteht die Gefahr, dass von einer genügenden Immunität ausgegangen wird, obwohl diese nicht gegeben ist. Es empfiehlt sich daher, den semiquantitativen Bewertungsmaßstab anstelle des vom Hersteller propagierten Beurteilungsschemas zu verwenden, und alle Pferde mit den Farbintensitäten 0 und 1 je nach

Situation aktiv und/oder passiv zu immunisieren. Wie den Tabellen 1 und 2 zu entnehmen ist, führt dieses Vorgehen zu einer deutlichen Verringerung der Applikation von Immunsera oder TT. So hätte Untersucher 1 zunächst bei 41 Pferden (negative und fragliche Testergebnisse) eine Immunisierung vorgenommen. Basierend auf dem semiquantitativen Bewertungsmaßstab dagegen nur noch bei 23 Individuen (44 % Reduktion). Bei Untersucher 2 waren es 41 bzw. 24 Pferde (41 % Reduktion). Das Auftreten von Nebenwirkungen (z. B. Urtikaria sofort nach Applikation von Immunsereum = Typ-I-Reaktion, spätere Reaktion in Form der Serumhepatitis = Typ-III-Reaktion) kann somit noch effektiver gesenkt werden.

Die objektive Quantifizierung der Farbintensität des Testfeldes gelang mittels der beschriebenen Methode sehr zuverlässig. Anhand der gemessenen Farbintensitäten scheint eine relativ genaue Vorhersage der TTAK möglich ( $r^2 = 0,74$ ), eine Aussage über die Präzision der Farbintensitätsmessung gegenüber dem Doppel-Antigen-ELISA als Referenzmethode ist jedoch aufgrund des verwendeten Versuchsablaufes nicht zu treffen. Sollte sich in anschließenden Untersuchungen eine ausreichend hohe Präzision der immunchromatographischen Methode herausstellen, erscheint eine Messung der TTAK mittels eines Teststreifen-Lesegerätes möglich. Wie erst kürzlich für die Bestimmung von Vitamin D und Cholesterol berichtet (Lee et al., 2014; Oncescu et al., 2014), könnte dies auch in Form einer Smartphone-Anwendung geschehen und somit ein kostengünstiges Forschungswerkzeug darstellen. Ablesefehler ließen sich bei der Testdurchführung am Patienten verhindern.

Bestimmte Einschränkungen der vorliegenden Arbeit bedürfen einer Diskussion. Aufgrund des retrospektiven Charakters der Studie konnten nur Serumproben als Substrat dienen. Aus Zeitgründen wird der praktisch tätige Tierarzt den TST bevorzugt mit Vollblut durchführen. Der Testhersteller gibt an, dass bei Verwendung von Vollblut ein positives Testergebnis ab einer TTAK von  $\geq 0,2$  IE/ml zu erwarten ist. Inwiefern dies aber in der Realität zutrifft, ist unklar. In einer humanmedizinischen Arbeit ergab sich bei Verwendung von Vollblut gegenüber Serum eine niedrigere Sensitivität (Colombet et al., 2005), was in der Konsequenz jedoch einen zusätzlichen Sicherheitsfaktor in der Erkennung ausreichend geschützter Tiere bedeuten würde. Eine Auswirkung auf die objektive Farbintensitätsmessung erscheint aufgrund einer vermutlich intensiveren Anfärbung des Teststreifenhintergrundes wahrscheinlich. Möglicherweise hatte auch die Lagerungsdauer der Proben einen Einfluss auf die Resultate. Laut Gebrauchsinformation des TST ist eine Analyse bis zu zwei Monate alter Serumproben möglich. Die älteste verwendete Serumprobe lagerte tiefgefroren für ein Jahr und wies mit 2,36 IE/ml eine mittlere TTAK auf. Da es sich um einen Vergleich zweier Methoden zum Nachweis der Ak-Konzentrationen handelte, ist die eigentliche Konzentration in der Probe jedoch nur von untergeordneter Bedeutung.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der Fassisi® TetaCheck ein geeignetes Instrument zur schnellen und zuverlässigen Bestimmung der TTAK im Pferdeserum darstellt. Eine Erweiterung des Bewertungsmaßstabes auf fünf definierte Farbintensitäten erlaubt es,



Individuen mit einer protektiven Immunität besser von potentiell ungeschützten Tieren zu differenzieren. Es besteht das Potential, den Streifentest mittels automatischer Analyse zur Quantifizierung des Antitoxingehaltes nutzbar zu machen.

### **Conflict of interest**

Die in der Studie verwendeten Tetanus-Streifentests wurden vom Hersteller zur Verfügung gestellt. Dieser hatte keinen Einfluss auf die Art der Durchführung der Studie oder die Interpretation der Resultate.

### **Literatur**

- Baljer G, Thein P, Hechler H, Cronau P, Hasslacher D, Beck G, Sailer J, Mayr A (1982): Untersuchungen zur intranasalen Schutzimpfung gegen Tetanus beim Pferd. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 95: 208-213.
- Barton MH (2009): Disorders of the liver. In: Reed S, Bayly WM, Sellon DC (Hrsg.), *Equine Internal Medicine*. Saunders Elsevier, 3. Aufl., St. Louis, 939-975.
- Colombet I, Saguez C, Sanson-Le Pors MJ, Coudert B, Chatellier G, Espinoza P (2005): Diagnosis of Tetanus Immunization Status: Multicenter Assessment of a Rapid Biological Test. *Clin Diagn Lab Immunol* 12: 1057-1062.
- Cook TM, Protheroe RT, Handel JM (2001): Tetanus: a review of the literature. *Br J Anaesth* 87: 477-487.
- European centre for the validation of alternative methods (ECVAM) (2000): Statement on the applications of the ELISA procedure for batch potency of tetanus vaccines for human use. European Commission Joint Research Centre; Institute for Health and Consumer Protection, ECVAM Unit.
- Elkharrat D, Sanson-Le Pors MJ, Arrouy L, Beauchet A, Benhamou F (2009): Evaluation of a bedside immunotest to predict anti-tetanus seroprotection: a prospective concordance study of 1018 adults in an emergency department. *Emerg Med J* 27: 36-42.
- Europäisches Arzneibuch (2011): 2.7.8 Bestimmung der Wirksamkeit von Tetanus-Adsorbat-Impfstoff. Deutscher Apotheker Verlag, 7. Ausgabe, Band 1, Stuttgart, 301.
- Green SL, Little CB, Baird JD, Tremblay RR, Smith-Maxie LL (1994): Tetanus in the horse: a review of 20 cases. *J Vet Intern Med* 8: 128-132.
- Guglick MA, MacAllister CG, Ely RW, Edwards WC (1995): Hepatic disease associated with administration of tetanus antitoxin in eight horses. *J Am Vet Med Assoc* 206: 1737-1740.
- Hatamabadi HR, Abdalvand A, Safari S, Kariman H, Dolatabadi AA, Shahrami A, Alimohammadi H, Hosseini M (2011): Tetanus Quick Stick as an applicable and cost-effective test in assessment of immunity status. *Am J Emerg Med* 29: 717-720.

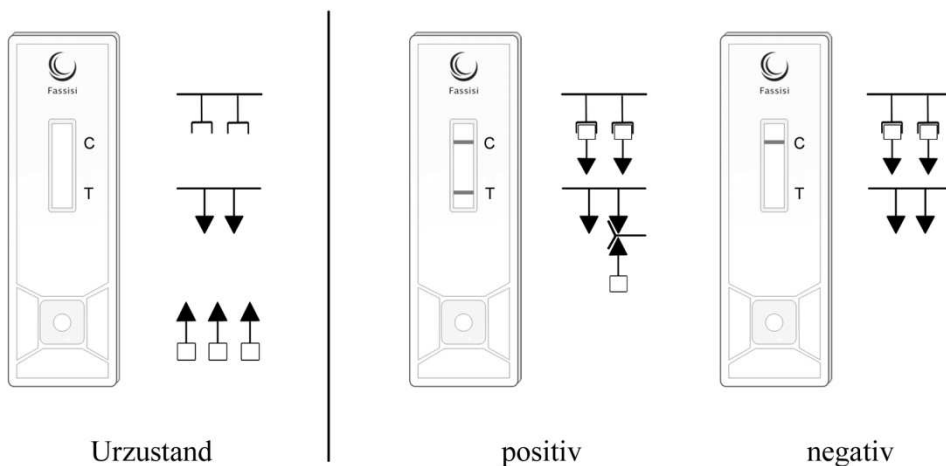
- Hendriksen CFM, Vandergun JW, Nagel J, Kreeftenberg JG (1988): The toxin-binding-inhibition test as a reliable invitro alternative to the toxin neutralization test in mice for the estimation of tetanus antitoxin in human-sera. *J Biol Stand* 16: 287-297.
- Lee S, Oncescu V, Mancuso M, Mehta S, Erickson D (2014): A smartphone platform for the quantification of vitamin D levels. *Lab Chip* 14: 1437-1442.
- Löhner J, Radvila P (1970): Aktive Tetanusprophylaxe beim Pferd und Immunitätsdauer. *Schw Arch Tierheilkd* 112: 307-314.
- Livorsi DJ, Eaton M, Glass J (2010): Generalized tetanus despite prior vaccination and a protective level of anti-tetanus antibodies. *Am J Med Sci* 339: 200-201.
- MacKay RJ (2013): Tetanus. In: Sellon DC, Long MT (Hrsg.), *Equine infectious diseases*. Saunders Elsevier, 2. Aufl., St. Louis, 368-372.
- Mülverstedt AJ (2006): Entwicklung und Validierung eines ELISA zur Beurteilung der Tetanusvakzinierung am Beispiel eines Pferdebestandes in Thüringen. Göttingen, GAU, Fakultät für Agrarwissenschaften, Diss.
- Oncescu V, Mancuso M, Erickson D (2014): Cholesterol testing on a smartphone. *Lab Chip* 14: 759-763.
- Radvila P, Löhner J (1965): Passive und aktive Tetanusimmunität und ihr Verlauf. *Schw Arch Tierheilkd* 107: 123-157.
- Reichmann P, Lisboa JAN, Araujo RG (2008): Tetanus in equids: a review of 76 cases. *J Equine Vet Sci* 28: 518-523.
- Roper MH, Wassilak SGF, Tiwari TSP, Orenstein WA (2013): Tetanus toxoid. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA (Hrsg.), *Vaccines*. Saunders Elsevier, 6. Aufl., St. Louis, 746-772.
- Roßkopf U, Noeske K, Werner E (2005): Replacement of the in vivo neutralization test for efficacy demonstration of tetanus vaccines ad us. vet. *ALTEX* 22: 169-174.
- Roßkopf U (2007): Validierung der Wirksamkeitsprüfung für Clostridium tetani Impfstoffe ad usum veterinarium durch den direkten Nachweis von Tetanus-Antitoxin im Zieltier mittels ELISA. Gießen, JLU, FB Veterinärmedizin, Diss.
- Stubbe M, Swinnen R, Crusiaux A, Mascart F, Lheureux PE (2007): Seroprotection against tetanus in patients attending an emergency department in Belgium and evaluation of a bedside immunotest. *Eur J Emerg Med* 14: 14-24.
- Thein P (2007): Schutzimpfungen beim Pferd - Tetanus (Wundstarrkrampf). *Prakt Tierarzt* 88 (Suppl. 3): 18-19.
- Thein P (2009): Tetanus bei Pferd und Mensch. *Prakt Tierarzt* 90: 36-41.
- van Galen G, Delguste C, Sandersen C, Verwilghen D, Grulke S, Amory H (2008): Tetanus in the equine species: a retrospective study of 31 cases. *Tijdschr Diergeneesk* 133: 512-517.
- Vollman KE, Acquisto NM, Bodkin RP (2014): A case of tetanus infection in an adult with a protective tetanus antibody level. *Am J Emerg Med* 32: 392.e3.

World Health Organization (2006): Tetanus vaccine - WHO position paper. Wkly Epidemiol Rec 81: 197-208.

Wilson WD, Mihalyi JE, Hussey S, Lunn DP (2001): Passive transfer of maternal isotype antibodies against tetanus and influenza and their effect on the response of foals to vaccination. Equine Vet J 33: 644-650.

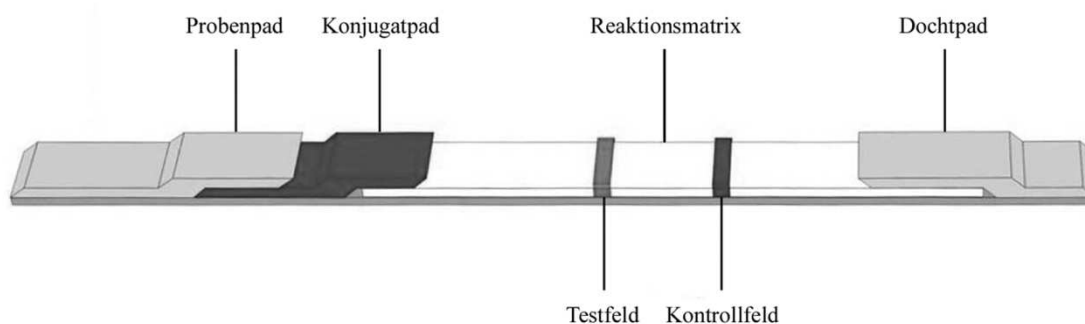
## Abbildungen

### a) Prinzip des Tetanus-Streifen-Tests

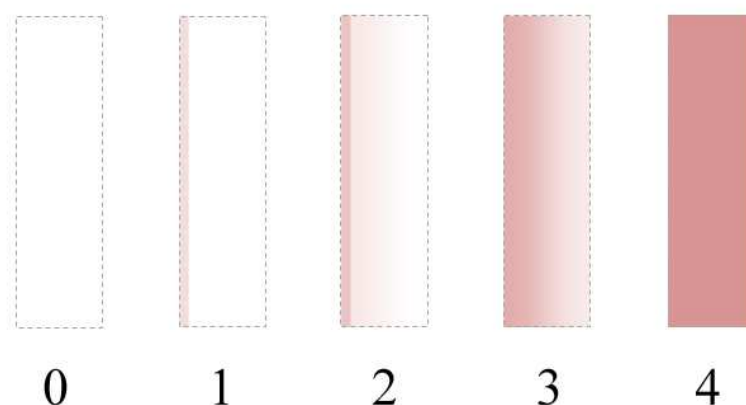


$\uparrow$  : TT-Gold-Konjugat (löslich),  $\downarrow$  : festphasengebundenen TT,  $\square$  : festphasengebundenen Kontrollreagenz,  $\text{—}$  : TT-Antikörper

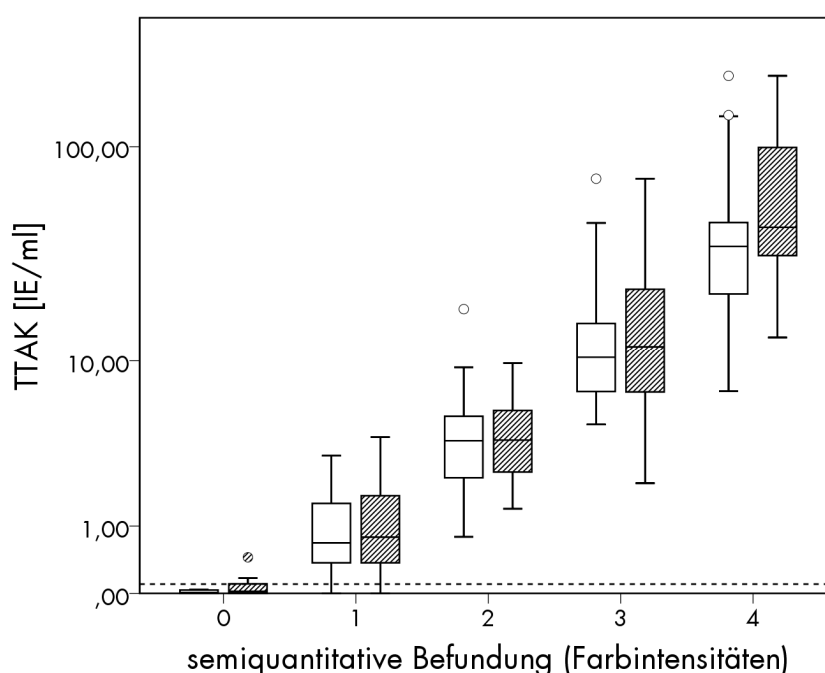
### b) Aufbau eines Teststreifens



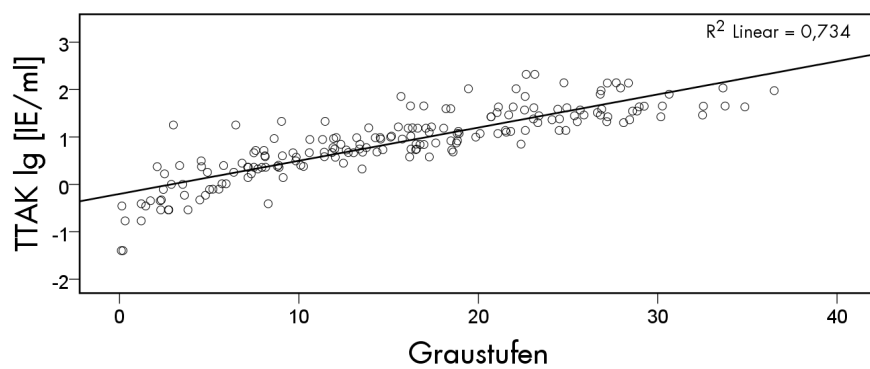
**Abbildung 1:** a) Funktionprinzip des Fassisi® TetaCheck. b) Aufbau des Teststreifens (Lateral Flow-Verfahren).



**Abbildung 2:** Definition der semiquantitativen Farbintensitäten: 0 – ohne Farbreaktion; 1 – gerade so wahrnehmbare Farbreaktion an der vorderen Begrenzung des Testfeldes, kein Farbverlauf; 2 – deutlich sichtbare Linie mittlerer Intensität an der vorderen Begrenzung, davon deutlich abgesetzter schwacher Farbverlauf, hintere Begrenzung des Testfeldes nur zu erahnen; 3 – deutliche, aber nicht homogene Anfärbung mit scharfer hinterer Begrenzung des Testfeldes; 4 – intensive homogene Anfärbung des gesamten Testfeldes.



**Abbildung 3:** Für Untersucher 1 ( $\square$ ) und Untersucher 2 ( $\text{▨}$ ) getrennt dargestellte Zuordnung der Tetanustoxoid-Antikörperkonzentration zu den Farbintensitäten 0 bis 4. Die gestrichelte Linie markiert die angenommene protektive Antikörperkonzentration von 0,1 IE/ml.



**Abbildung 4:** Tetanustoxoid-Antikörperkonzentration in Abhängigkeit von der objektiv gemessenen Farbintensität (lineare Regression:  $y = -0,2 + 0,7 \times x$ ;  $r^2 = 0,734$ ;  $p < 0,001$ ).

## Tabellen

		Untersucher 2		
		<i>negativ</i>	<i>schwach positiv</i>	<i>positiv</i>
Untersucher 1	<i>negativ</i>	20	2	0
	<i>schwach positiv</i>	2	13	4
	<i>positiv</i>	0	4	54

**Tabelle 1:** Vergleichende Darstellung der Befundung der Tetanus-Streifentests hinsichtlich eines negativen, schwach positiven oder positiven Testergebnisses.

		Untersucher 2				
		Farbintensität 0	Farbintensität 1	Farbintensität 2	Farbintensität 3	Farbintensität 4
Untersucher 1	Farbintensität 0	7	0	0	0	0
	Farbintensität 1	1	11	4	0	0
	Farbintensität 2	0	5	11	6	0
	Farbintensität 3	0	0	2	22	1
	Farbintensität 4	0	0	0	11	18

**Tabelle 2:** Vergleichende Darstellung der Befundung der Tetanus-Streifentests anhand fünf definierter Farbintensitäten.

### **3 Diskussion**

Durch die Anwendung eines effektiven Impfprotokolls ist Tetanus beim Pferd vollständig vermeidbar. Sensible Punkte der optimalen Immunprophylaxe sind der Zeitpunkt der ersten Vakzination und die zeitlichen Abstände zwischen den Impfterminen der Grundimmunisierung (THEIN et al. 2013). Vor dem Hintergrund, dass auch bei vakzinierten Menschen (LIVORSI et al. 2010, VOLLMAN et al. 2014) und vakzinierten Pferden (eigene Daten aus der Medizinischen Tierklinik) die generalisierte Form des Tetanus zur Ausprägung gelangt, wurden die derzeitige Impfpraxis und die daraus resultierende Seroprävalenz protektiver Tetanusantikörper kritisch analysiert. Weiterhin gibt es Situationen, in denen der Tierarzt eine begründete Entscheidung hinsichtlich der Notwendigkeit des Verabreichens oder des Unterlassens einer Immuntherapie treffen muss. Da dem Pferdepraktiker bislang nur der Equidenpass Informationen über den Immunstatus des Patienten liefern konnte, wurden die Untersuchungen auf Basis der Eintragungen in dieses Dokument durchgeführt. Die von der StiKO-Vet. des Bundesverbandes Praktizierender Tierärzte (bpt) ausgearbeitete ‚Leitlinie zur Impfung von Pferden‘ (StiKO-Vet. 2013) diente dabei als Ausgangspunkt. Mit dieser Empfehlung konform gehende Impfschemata wurden mit davon abweichenden verglichen. Weitere untersuchte Aspekte der Impfprophylaxe waren der Einfluss des Patientenalters, die Auswirkung unterschiedlicher Impfindervalle, der zeitliche Abstand zur letzten Impfung und die Art der verwendeten Vakzine auf die zu erwartende Tetanustoxoid-Antikörperkonzentration. Mit der Verfügbarkeit eines Schnelltestes (Fassisi® TetaCheck) ist es nunmehr aber auch möglich, unmittelbar am Patienten den humoralen Immunstatus zu überprüfen. Dieser Streifentest wurde gegenüber einem anti-Tetanustoxoid-IgG-Doppel-Antigen-ELISA als Referenzmethode evaluiert. Um auch diesem Teil der Arbeit eine hohe Praxisrelevanz zu verleihen, lagen die Schwerpunkte dabei auf der zuverlässigen Identifizierung nicht ausreichend geschützter Individuen und der Unempfindlichkeit des Testes von der nicht zuvor geschulten durchführenden Person.

#### **3.1 Protektive Antitoxin-Konzentration**

Alle Analysen in dieser Arbeit geschahen in der Annahme, dass Antitoxinkonzentrationen von 0,1 IE/ml und darüber einen ausreichenden Schutz gegenüber einer Tetanusinfektion bieten. Die Festlegung der Schutzgrenze auf diese Tetanustoxoid-Antikörperkonzentration (TTAK) ist dabei ein sehr grundsätzliches Problem. Im Allgemeinen liegt ein Impfschutz vor, wenn ausreichend Antikörper vorhanden sind, die in der Lage sind, eingedrungenes Toxin zu neutralisieren, welches wiederum mit der Quantität der aufgenommenen Sporen korreliert (THEIN 2009). Dies lässt sich jedoch nicht quantifizieren, weshalb tierexperimentelle Daten für



die Spezies Pferd nicht vorhanden sind. Der für den Menschen generell akzeptierte Schwellenwert von 0,01 IE/ml stammt aus an Mäusen und Meerschweinchen durchgeführten TNT (ROPER et al. 2013). Aufgrund der geringeren Spezifität von Standard-ELISA-Verfahren gegenüber dem TNT liegt die Schutzgrenze bei diesen Testsystemen um den Faktor zehn höher (WHO 2006). Wie in anderen ELISA-Untersuchungen zur Tetanusimmunität bei Pferden (LÖHRER und RADVILA 1970, LIEFMAN et al. 1981, BALJER et al. 1982) wurde daher auch für den in dieser Arbeit verwendeten DAE eine Antitoxinkonzentrationen von  $\geq 0,1$  IE/ml als protektiv angenommen.

### 3.2 Impfpraxis und Seroprotektion

Die bei 92,3 % der Pferde festgestellte Seroprävalenz protektiver TTAK erscheint zunächst sehr hoch, muss aber im Kontext des Versuchsaufbaus interpretiert werden. Da aufgrund monetärer Restriktionen nur eine begrenzte Probenanzahl untersucht werden konnte, wurden die Patienten hinsichtlich einer möglichst großen Diversität an Impfhistorien selektiert. Da nur zwei nachweislich nicht geimpfte Pferde in die Studie aufgenommen werden konnten und alle übrigen eine gewisse Immunisierung erfuhren, ist folglich ein hoher Grad protektiver TTAK in der untersuchten Population zu erwarten. Der Anteil an Pferden, welche ohne Pass oder anderweitige Impfdokumente in einer Tierklinik vorstellig werden, ist jedoch im Allgemeinen sehr viel höher und lag bei einer von BONETTO et al. 2014 durchgeführten Studie bei 35,3 %. Die wahre Prävalenz protektiver TTAK ist demzufolge deutlich niedriger anzusetzen, zumal dieser Patientengruppe die meisten ungeschützten Individuen angehörten.

Einweisende Kollegen folgten in 89 % der Fälle der Impfleitlinie der StIKO des bpt. Da sich diese inhaltlich nicht wesentlich von den Packungsbeilagen der Impfstoffe unterscheidet, ist kein sicherer Rückschluss auf die zu Rate gezogene Informationsquelle möglich. Trotz der überwiegenden Einhaltung dieser Empfehlung wiesen fünf Tiere keine protektiven TTAK auf. Dazu zählten neben einem 5-monatigen Fohlen auch vier adulte Pferde. Bei letzteren könnte das immunologische Phänomen der Non- bzw. Lowresponder für ein Ausbleiben des Impfschutzes verantwortlich sein. Diesem liegt im Fohlenalter eine Hemmung der Synthese körpereigener Immunglobuline (Ig) in Gegenwart passiv erworbener, maternalen Antikörper zugrunde (JANSEN und KNOETZE 1979), welche selbst durch spätere Wiederholungsimpfungen nicht in adäquater Form induziert werden kann (BALJER et al. 1982, WILSON et al. 2001, THEIN et al. 2013). Bei zwei dieser Pferde war zum Zeitpunkt der Probenahme die GI noch nicht abgeschlossen, das vorausgegangene Impfintervall von vier bis sechs Wochen jedoch war eingehalten wurden. Da es sich nicht um eine Verlaufsuntersuchung handelte, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob sich nach Abschluss der GI eine belastbare Immunität entwickelt hätte. Ebenso bleibt es spekulativ, ob die Anwendung eines

längeren Intervalls zwischen erster (G1) und zweiter Grundimmunisierung (G2) unter Annahme einer nicht zu zeitig durchgeführten Erstimpfung in einer protektiven TTAK resultiert hätte. Bereits in den siebziger Jahren ist jedoch nachgewiesen worden, dass mit nur zwei GI im Abstand von mindestens sechs Wochen eine lebenslange Immunität aufgebaut werden kann (LÖHRER und RADVILA 1970, RADVILA 1975).

Das 5-monatige Fohlen ohne ausreichende Seroprotektion war das älteste aus einer Gruppe von insgesamt acht Fohlen, welche vor dem empfohlenen Erstimpfalter von sechs Monaten beprobt wurden. Die sehr heterogene Literatur zur Persistenz tetanusspezifischer maternalen Antikörper weist Zeitspannen von 66 Tagen bis zum achten Lebensmonat aus (LIU et al. 1982, MÜLVERSTEDT 2006, WILSON et al. 2001, ROSSKOPF 2007, THEIN et al. 2013). Folglich existieren unterschiedliche Empfehlungen zum Erstimpfalter von sechs (WILSON et al. 2001, THEIN 2011) bis neun Monaten (THEIN et al. 2013). Auf den vorliegenden Ergebnissen basierend und unter der Berücksichtigung, dass sich auch andere Faktoren, wie z. B. die peripartale TTAK im Kolostrum der Mutterstute, Menge und Zeitpunkt der Kolostrumaufnahme sowie die enterale Resorption der Ig auf die Antikörperkonzentration im Neonaten auswirken (TIZARD 2000) und die endogene Ig-Synthese erst mit etwa vier Monaten einsetzt (HOLZNAGEL et al. 2003), ist es im Alter von fünf Monaten erforderlich, eine Bestimmung der TTAK vorzunehmen. Nur so kann ausgeschlossen werden, dass auf der einen Seite durch zu zeitiges Impfen ein Impfversagen provoziert wird, andererseits die Konzentration maternalen Antikörper unter die Schutzgrenze abfällt. Dafür bietet sich der im zweiten Teil der Arbeit evaluierte Schnelltest als vor Ort einsetzbare kostengünstige Alternative zur sonst aufwändigen Laboruntersuchung an.

Abweichungen von der Impfeempfehlung bestanden bei geimpften Pferden allein in der Form verlängerter Impfindervalle von drei bis sechs Jahren. Ähnlich zu THEIN et al. 2013 wurden bei all diesen Pferden protektive TTAK gemessen. Dies ist nicht verwunderlich, ist doch längst bekannt, dass die Halbwertszeit des Antitoxins sechs bis 12 Jahre beträgt (RADVILA 1975). Die Autoren befürworten daher die Forderung von Thein (2007, 2009, 2011), eine Ausdehnung der Wiederholungsimpfung auf 8- bis 10-jährige Intervalle vorzunehmen. Die erneute Durchführung einer GI nach einer Überschreitung des Zweijahresintervalls ist damit ebenfalls obsolet.

Zieht man ausschließlich das Alter der geimpften Pferde ins Kalkül, so waren es in der untersuchten Population die geriatrischen Pferde, welche ausnahmslos geschützt waren. Dies ist vermutlich auf die vielen kurzfristigen Impfindervalle (alle Pferde über 20 Jahre wurden im 2-jährlichen Intervall geimpft) und der damit verbundenen hohen Anzahl an Wiederholungsimpfungen zurückzuführen.

Der Vergleich unterschiedlich langer Impfindervalle (sechs Monate, ein Jahr, alle zwei Jahre, mehr als zwei Jahre) ergab entgegen anderer Auffassungen (Thein 2007, Thein 2009, Thein 2011) keine negativen Auswirkungen kurzer Impfindervalle auf die TTAK. Da der Einfluss des

Impfintervalls vernachlässigbar erscheint, kann dieses nicht die Erklärung für die beiden negativ getesteten, aber im 2-jährlichen Intervall vakzinieren Pferde liefern.

Auch anhand des zeitlichen Abstandes zur letzten Impfung konnte die Höhe der TTAK nicht prognostiziert werden. Selbst über Jahre hinweg gleichartig geimpfte Pferde reagierten mit sehr unterschiedlichen postvakzinalen TTAK. In der Konsequenz ist das Datum der letzten Impfung als alleiniges Kriterium für die Entscheidung eine passive und/oder aktive Immunisierung im Bedarfsfall vornehmen zu müssen irrelevant.

Ausgehend von den vorliegenden Ergebnissen ist es nicht erforderlich der allgemeinen Empfehlung zu folgen, Impfantigene zur Induktion einer belastbaren Immunität einzeln und zeitlich getrennt zu injizieren. Dies deckt sich mit Untersuchungen von ROSSKOPF 2007, in welchen das Hinzufügen von Influenza-Virus-Antigenen zum Toxoidimpfstoff keinen Einfluss auf die Immunantwort hatte. Auch die zeitgleiche Impfung gegen Tetanus, Equine Influenza und das Equine Herpesvirus (Typen 1 und 4), induzierte im Vakzinationsversuch eine der monovalenten Vakzine vergleichbare Seroprotektion (HELDENS et al. 2001).

Beide nicht vakzinieren adulten Tiere wiesen mit 0,04 bzw. 0,01 IE/ml nichtprotektive, aber dennoch messbare TTAK auf. Da diese Tiere anamnestisch weder Antiserum erhielten, noch klinisch erkrankten, wären subklinische Krankheitsverläufe, mit Sensibilisierung des Immunsystems und folgender Antikörpersynthese eine mögliche Ursache (HABERMANN und DIMPFEL 1973, HABERMANN et al. 1973, THEIN 2009). Ebenso können die Aufnahme von *C. tetani* mit dem Futter und die nachfolgende Kolonisierung des Darmes zu einer transienten Toxinresorption führen. THEIN et al. (2013) stellten bei zwei von zehn nachweislich nicht immunisierten Eseln wiederholt sogar protektive TTAK fest. Interessant wäre, ob bei diesen ungeimpften Equiden durch Injektion von Tetanustoxoid (TT) ein Anstieg der TTAK im Sinne einer anamnestischen Immunantwort festzustellen ist.

Sämtliche Ergebnisse und deren Interpretation beruhen auf der nicht überprüfaren Dokumentation der Impfungen im Pferdepass, welches eine wichtige Limitation der Studie darstellt. Desweiteren konnte jede mögliche Einflussgröße auf die zu erwartende TTAK nur einzeln betrachtet ausgewertet werden, obwohl eine gegenseitige Beeinflussung dieser Parameter zu erwarten ist. Bei ausreichend großem Stichprobenumfang wäre dies mittels einer multivariablen Regressionsanalyse zu überprüfen.

### **3.3 Evaluierung des Schnelltestes**

Die Leistungsparameter des im zweiten Teil der Arbeit evaluierten Streifentestes decken sich mit denen aus humanmedizinischen Publikationen (COLOMBET et al. 2005, STUBBE et al. 2007; ELKHARRAT et al. 2009, HATAMABADI et al. 2011). Die ermittelte Sensitivität betrug 83,7 %. Aufgrund der Ausrichtung des Tetanus-Streifentestes (TST) auf die Erkennung ausreichend

geschützter Pferde, ist dieser moderate Wert nicht nachteilig zu werten, sondern bietet vielmehr ein großzügiges Sicherheitsfenster in der Testbefundung. Ebenso erscheint die Falsch-Negativ-Rate von 13,6 % zunächst recht hoch, stellt aber bei genauerer Betrachtung keine wesentliche Beeinträchtigung des TST dar. So wiesen „falsch negativ“ getestete Patienten nur leicht über der protektiven Schwelle liegende TTAK auf. Eine unnötige Injektion von TT bei diesen Pferden würde somit einer nebenwirkungsarmen Auffrischung der Immunität gleichkommen. Mögliche Ursachen für die dennoch hohe Falsch-Negativ-Rate könnten in der Festlegung der protektiven TTAK auf  $\geq 0,1$  IE/ml oder der Technologie des Streifentestes bestehen. Die hohe Empfänglichkeit der Equiden gegenüber einer Tetanusinfektion und die direkte Beziehung zwischen der Quantität der aufgenommenen Sporen, welche beim Pferd vermutlich größer ist als beim Menschen, und der anschließenden Toxinfreisetzung lässt eine Anhebung der als protektiv angenommenen TTAK sinnvoll erscheinen. Auf der Basis einer protektiven TTAK von  $> 0,5$  IE/ml ließ sich bei unveränderter Spezifität von 100 % die Sensitivität auf 90,6 % steigern; die Falsch-Negativ-Rate dagegen verringerte sich auf 9,4 %. Trotz dieser Anpassung wurden vier Serumproben mit TTAK von 1,00, 1,03, 1,67 und 1,80 IE/ml von beiden Untersuchern übereinstimmend „negativ“ befundet. Daher scheint auch ein technologiebedingter Einfluss auf die Falsch-Negativ-Rate möglich. Von größerer Bedeutung ist jedoch, dass bei beiden Untersuchern keine falsch-positiven Testresultate auftraten, d. h. alle Pferde, welche TTAK unterhalb der Schutzgrenze aufwiesen, wurden auch als solche erkannt. In der untersuchten Population waren jedoch nur sieben von 92 Tieren mit insuffizienten TTAK vorhanden, was in die Bewertung der Spezifität mit einfließen muss. Vergleichbare humanmedizinische Studien mit wesentlich größeren Patientenzahlen von 311 (Stubbe et al. 2007) bzw. 1018 (Elkharrat et al. 2009) wiesen 14 bzw. lediglich drei falsch-positive Testergebnisse auf. Mit einer Vergrößerung der Population oder unter Einschluss einer größeren Proportion an niedrigtitrigen Seren ist das vereinzelt Auftreten falsch-positiver Testergebnisse daher nicht unwahrscheinlich. Mit sehr hoher Sicherheit verhindert der TST jedoch die Annahme eines ausreichenden Impfschutzes bei ungeschützten Individuen und damit den Verzicht auf eine aktive und/oder passive Immunisierung.

Der Fassisi® TetraCheck erwies sich als sehr unempfindlich hinsichtlich der Interpretation des Testergebnisses. Abweichungen in der binären Testinterpretation durch zwei Untersucher traten in lediglich vier Fällen auf ( $\kappa=0,88$ ). Dieses hohe Maß an Übereinstimmung wird noch dahingehend bekräftigt, dass beide Untersucher ohne vorherige Schulung, sondern lediglich der Gebrauchsinformation folgend die Tests durchführten. Auch nach Erweiterung des Bewertungsmaßstabes auf fünf Kategorien betrug die Interrater-Reliabilität ( $\kappa$ ) noch 0,61. Offenbar ermöglichte die exakte Definition der verschiedenen Farbtintensitäten den Untersuchern das Ergebnis des TST einer dieser Kategorien sicher zuzuordnen, was sich auch in den statistisch signifikanten Unterschieden der diesen Kategorien zugeordneten Seren widerspiegelte. Für die Robustheit des TST spricht weiterhin, dass sich die Abweichungen der

Untersucher auf jeweils nur eine benachbart liegende Kategorie erstreckten. Auch bei der Interpretation des vom jeweils anderen Untersucher angefertigten TST erwies sich der Fassisi® TetaCheck als unempfindlich gegenüber dieser Einflussgröße. Da im direkten Vergleich der gepaarten Teststreifen keine Unterschiede in der Anfärbung der Testfelder erkennbar waren, wurden die geringen Abweichungen in den Interpretationen nicht auf Unterschiede in der Qualität der einzelnen Teststreifen zurückgeführt, sondern reflektierten vermutlich kleine Unsicherheiten in der Zuordnung der Farbintensitäten zu den jeweiligen Kategorien. Somit ist nicht nur aufgrund der Simplizität der Testdurchführung, sondern auch aufgrund der hohen Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nicht zwangsläufig die fachliche Expertise eines Tierarztes vonnöten.

Entgegen den Angaben des Herstellers wurden in den einzelnen Kategorien deutlich höhere TTAK gemessen. Möglicherweise wurde von diesem ein weniger sensitives ELISA-Verfahren verwendet. Die Aussage, dass im Falle eines „schwach positiven“ Testergebnisses eine TTAK von  $\geq 0,1$  bis  $\leq 1,0$  IE/ml und damit eine intermediäre Immunität vorliegt, traf somit nur teilweise zu. Im Median wurden in diesen Seren TTAK von 2,80 bzw. 3,85 IE/ml gemessen und den Tieren ein zuverlässiger Impfschutz attestiert. Eine nicht notwendige Verabreichung von Toxoid und/oder Antiserum an diese Pferde würde neben den nicht zu vernachlässigenden Nebenwirkungen unnötige Kosten verursachen. Abhilfe konnte hier geschaffen werden, indem die Grauzone zwischen negativen und positiven Testergebnissen ausführlicher charakterisiert wurde. So ist es ausreichend, alle Pferde mit einer Farbintensität des TST von null oder eins je nach Situation aktiv und/oder passiv zu immunisieren, was zu einer deutlichen Verringerung des Einsatzes von Immunsera oder TT führen kann.

Als Alternative zur subjektiven Auswertung des TST durch einen Untersucher gelang auch die objektive Quantifizierung der Farbintensität des Testfeldes mittels einer Kombination aus Fotografie und Auswertung durch eine Bildbearbeitungs-Software sehr zuverlässig. Anhand der gemessenen Farbintensitäten ist eine relativ genaue Vorhersage der TTAK möglich ( $r^2 = 0,74$ ). Bei ausreichender Präzision des verwendeten Verfahrens scheint sogar eine Messung der TTAK mittels eines Teststreifen-Lesegerätes möglich. Wie beispielhaft bereits an der Bestimmung von Vitamin D (LEE et al. 2014) und Cholesterol (ONCESCU et al. 2014) bewiesen, könnte dies auch in Form einer Smartphone-Anwendung geschehen. Somit stünde ein kostengünstiges Forschungswerkzeug zur Verfügung. Durch Vermeidung von Ablesefehlern ließe sich die Patientensicherheit erhöhen.

Aufgrund des retrospektiven Charakters der Studie konnten nur asservierte Serumproben für die Untersuchungen verwendet werden. Im Unterschied dazu wird der praktisch tätige Tierarzt aus Gründen der Praktikabilität und aus Zeitmangel den TST bevorzugt mit Vollblut durchführen. Bei vergleichender Betrachtung der Testsubstrate Vollblut und Serum wurde dem TST in einer humanmedizinischen Studie eine geringere Sensitivität bei Verwendung von Vollblut bescheinigt (COLOMBET et al. 2005). In der Konsequenz bedeutet dies jedoch einen

zusätzlichen Sicherheitsfaktor in der Erkennung ausreichend geschützter Tiere. Eine weitere Limitation dieser Arbeit ist in der Lagerungsdauer der Proben zu sehen. Seitens des Herstellers ist eine Analyse bis zu zwei Monate alter Serumproben möglich. Die älteste verwendete Serumprobe lagerte tiefgefroren für die Dauer eines Jahres und wies dennoch eine mittlere TTAK auf (2,36 IE/ml). Da hier ein und dieselbe Probe vergleichend mit beiden Methoden untersucht wurde, ist die ursprüngliche TTAK aber auch nur von untergeordneter Bedeutung.

Eine wichtige Indikation für den Einsatz des Fassisi® TetaCheck ist die im ersten Teil der Arbeit herausgestellte Überprüfung der humoralen Tetanusimmunität bei allen mit Verwundungen vorstellig werdenden Pferden oder Patienten, an denen chirurgische Eingriffe vorgenommen werden sollen, die eine Kontamination mit *C. tetani* befürchten lassen. Zweites wichtiges Einsatzgebiet ist die Bestimmung des optimalen Zeitpunktes der ersten Vakzination im Fohlenalter, um eine möglichst effektive Immunität zu induzieren.

## 4 Zusammenfassung

Stephan Recknagel

### **Seroprävalenz von Tetanustoxoid-Antikörpern bei Pferden in Mitteldeutschland und Evaluierung ihrer Bestimmung mittels eines immunchromatographischen Schnelltestes**

Medizinische Tierklinik der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Eingereicht im Juni 2015

52 Seiten, 2 Publikationen, 8 Abbildungen, 3 Tabellen, 39 Literaturangaben, 1 Anhang

*Schlüsselwörter: Impfung, maternale Antikörper, Persistenz, Doppel-Antigen-ELISA, Fassisi® TetaCheck, Streifentest*

Trotz der längst etablierten und weit verbreiteten Impfprophylaxe mit potenten Toxoidimpfstoffen sind dramatisch verlaufende Tetanusinfektionen noch immer im Alltag des Pferdepraktikers präsent. Dies gab Anlass, verschiedene Impfprotokolle und die daraus resultierende humorale Immunitätslage zu überprüfen. Kenntnis über die durch Vakzination erwirkte Tetanusimmunität ist im Falle der Versorgung von Verletzungen oder vor elektiven Eingriffen hinsichtlich der Entscheidung für oder gegen eine neuerliche aktive und/oder passive Immunisierung erforderlich. Weiterhin ermöglicht die Kontrolle auf Persistenz homologer maternalen Antikörper vor Durchführung der Erstvakzination eine optimale Impfprophylaxe. Für diese beiden Indikationen wurde der Fassisi® TetaCheck als direkt am Patienten anwendbarer Schnelltest entwickelt. Dieser Streifentest wurde mit besonderem Augenmerk auf der zuverlässigen Identifizierung nicht ausreichend geschützter Individuen und der Unempfindlichkeit gegenüber der Testdurchführung und Interpretation durch ungeschulte Personen evaluiert.

Zunächst wurden 91 Serumproben von Klinikpatienten mit glaubhafter Impfanamnese mittels Doppel-Antigen-ELISA (DAE) untersucht. Neben der Bestimmung der Seroprävalenz protektiver Tetanustoxoid-Antikörperkonzentrationen (TTAK) von  $\geq 0,1$  IE/ml in dieser Population wurden mögliche Einflussgrößen auf die Höhe der TTAK zum Zeitpunkt der Blutentnahme analysiert. Zu diesen zählten das Alter der Tiere, die Impfintervalle, der Zeitabstand zur letzten Vakzination und das gleichzeitige Verimpfen weiterer Komponenten. Der Tetanus-Streifentest (TST) wurde evaluiert, indem die durch zwei unabhängige Untersucher ermittelten qualitativen Resultate des Schnelltestes mit den mittels DAE quantifizierten Antitoxinkonzentrationen in 99 Serumproben retrospektiv verglichen wurden. Ergänzend erfolgte die objektive Quantifizierung der

Farbreaktion im Testfeld des TST durch Fotografieren und anschließender Analyse mittels einer Bildbearbeitungssoftware.

Die Seroprävalenz protektiver TTAK betrug 92,3 %. 89 % der untersuchten Pferde waren ihrem jeweiligen Alter entsprechend gemäß der ‚Leitlinie zur Impfung von Pferden‘, herausgegeben von der Ständigen Impfkommision Vet. des Bundesverbandes Praktizierender Tierärzte immunisiert. Fünf dieser Pferde waren jedoch nicht ausreichend geschützt. Hierzu zählten ein fünf Monate altes Fohlen, bei welchem die maternalen Antikörper bereits unter die Schutzgrenze abgefallen waren, zwei juvenile Pferde ohne abgeschlossene Grundimmunisierung und zwei adulte Pferde. Abweichungen von der Impfpflicht bestanden ausschließlich in Form verlängerter Abstände der Wiederholungsimpfungen von drei bis zu acht Jahren. Trotzdem wiesen diese Tiere protektive TTAK auf. Unter alleiniger Betrachtung des Patientenalters wiesen alle geriatrischen Patienten ( $n = 12$ ) TTAK weit oberhalb der Schutzgrenze auf. Hinsichtlich der Einhaltung unterschiedlicher Boosterintervalle unterschieden sich die TTAK nicht signifikant ( $p = 0,117$ ). Der zeitliche Abstand zur letzten Tetanusimpfung ließ keine Prognose über die zu erwartenden TTAK zu. TTAK nach Impfung mit monovalenten Vakzinen unterschieden sich nicht signifikant von denen nach Durchführung einer Kombinationsimpfung ( $p = 0,63$ ). Für den TST ergaben sich eine Sensitivität von 83,6 % und eine Spezifität von 100 %. Die Übereinstimmung der Untersucher hinsichtlich eines binären Resultats war fast vollkommen ( $\kappa = 0,88$ ). Die Durchführung des TST durch den jeweils anderen Untersucher hatte keinen maßgeblichen Einfluss auf die Auswertung des Teststreifens ( $\kappa = 0,80$  und  $\kappa = 0,84$ ). Durch Erweiterung des vom Hersteller vorgegebenen Bewertungsmaßstabes „negativ“, „schwach positiv“ und „positiv“ auf fünf unterschiedliche Farbintensitäten konnte eine bessere Differenzierung ungeschützter Individuen von Tieren mit belastbarer Immunität ermöglicht werden. Zwischen der objektiv gemessenen Farbintensität und der TTAK bestand ein positiver linearer Zusammenhang ( $r^2 = 0,74$ ).

Auf diesen Ergebnissen basierend sollte zur Vermeidung ineffektiver Immunisierungen vor der Erstvakzination eine Bestimmung der TTAK mit Vollendung des fünften Lebensmonats erfolgen. Hierzu erwies sich der Fassisi® TetaCheck aufgrund seiner Zuverlässigkeit und Unempfindlichkeit als überaus geeignet. Da auch das strikte Einhalten der Impfpflicht keine ausreichende Seroprotektion garantiert und die Eintragungen im Pferdepass fehlerhaft sein können, kann nur über eine Bestimmung der TTAK Gewissheit über den tatsächlichen Immunstatus erlangt werden. Die routinemäßige Implementierung des TST in die Pferdepraxis kann dazu beitragen, die Notwendigkeit einer Immuntherapie zu diagnostizieren und damit unnötige und nebenwirkungsbehaftete TT- oder Antiserumgaben zu minimieren. Im zweijährlichen Abstand vorgenommene Wiederholungsimpfungen führen zu keiner besseren Immunitätslage gegenüber wesentlich längeren Impfintervallen. Die Impfpflicht könnte daher ein acht- bis zehnjähriges Boosterintervall ausweisen. Die humorale Tetanusimmunität betreffend ergeben sich keine Nachteile bei gleichzeitiger Impfung weiterer Komponenten.



## 5 Summary

Stephan Recknagel

### **Seroprevalence of tetanus toxoid antibodies in horses in central Germany and evaluation of an immunochromatographic dipstick test for their determination**

Large Animal Clinic for Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in June 2015

52 pages, 2 publications, 8 figures, 3 tables, 39 references, 1 appendix

*Keywords: Vaccination, Maternal antibodies, Persistence, Double-antigen ELISA, Fassisi® TetaCheck, Quick stick*

Despite the well-established and widespread tetanus prevention with potent toxoid vaccines, fatal tetanus cases are still part of equine practitioners' everyday business. In light of this, different immunization strategies and their resulting humoral immune response were reviewed. Knowledge of the achieved level of protection is crucial in cases of injuries and elective surgeries, where the veterinarian needs to decide whether or not to refresh immunity by active and/or passive immunization. Furthermore the investigation of the persistence of homologous maternal antibodies before the first vaccination allows for the optimal immune prophylaxis. For these two indications, the Fassisi® TetaCheck, a stall-side rapid test, was developed. This dipstick test was critically evaluated by two untrained investigators, with special regard to the reliable identification of unprotected individuals and to the susceptibility of the test procedure and subsequent interpretation.

First of all 91 serum samples from horses with reliable vaccination histories were analyzed using a double-antigen ELISA (DAE). Beside the measurement of the seroprevalence of protective tetanus toxoid antibodies ( $\geq 0.1$  IE/ml) within this population, variables possibly influencing the anti-tetanus antibody levels at the time of blood collection were investigated. Amongst them were the age of the horses, applied vaccination intervals, the time intervals to the latest vaccination and the simultaneous use of other vaccine components. The tetanus quick stick test (TQS) was validated by comparison of the qualitative results obtained by two blinded observers using the TQS, with the measured antitoxin concentrations obtained by the DAE in 99 serum samples. Additionally the colour intensities within the test windows of the TQS were objectively quantified using photography and following graphical analysis.

92.3% of the horses included in this study had a sufficient level of protection against tetanus. In 89% of the cases, horses were vaccinated according to an official German guideline for tetanus vaccination in horses ('Leitlinie zur Impfung von Pferden'). In spite of fulfilling those

criteria, five horses did not develop a protective level of immunity. One of those cases was a foal in which maternal antibodies waned to a non-protective level, two juveniles in which the ground immunization had not yet been completed, and two adult horses who had already received booster vaccinations. The discrepancy between those horses in which the guideline was followed and those in which it was not consisted only in prolonged booster intervals lasting from three to eight years. Nevertheless these horses all showed protective antibody levels. Taking only the age of our patients into consideration, all individuals older than 20 years ( $n=12$ ) had antibody levels way above the protective threshold. The application of different booster intervals did not result in statistically significant differences between groups ( $p=0.117$ ). The antitoxin concentrations could not be predicted based on the time intervals from the last vaccination event to the date of blood sampling. Furthermore tetanus antibody concentrations did not differ statistically significantly between horses which were vaccinated with monovalent vaccines and those in which multiple antigens were injected simultaneously ( $p=0.63$ ). The TQS showed a sensitivity of 83.6% and a specificity of 100%. In terms of a binary test result, observer agreement was almost perfect ( $\kappa=0.88$ ). The interpretation of the TQS was not significantly affected by exchanging the observer ( $\kappa=0.80$ ;  $\kappa=0.84$ ). By extending the measurement scale provided by the manufacturer ('negative', 'weakly positive' and 'positive') into five distinct colour intensities of the test window, a better differentiation of unprotected individuals from those with protective immunity was achieved. There was a linear relationship between the tetanus toxoid antibody concentrations and the objectively measured colour intensities ( $r^2=0.74$ ).

Based on the results of the study, it is recommended that antitoxin levels be determined in foals five months of age (before the first vaccination is to be performed) to prevent the future eventuality of a vaccination failure. Because of its reliability and robustness the Fassisi® TetaCheck turned out to be very suitable for this purpose. Information on the actual level of protection can only safely be obtained by the determination of the antibody level, since even the strict adherence to the vaccination guideline does not guarantee a sufficient seroprotection, and the vaccination documents themselves can be erroneous. The implementation of the TQS in equine daily practice can help to diagnose the need for an immunotherapy and can thus contribute to the avoidance of unnecessary toxoid and antiserum injections, which do have side-effects, after all. Boostering tetanus immunity in two year intervals does not lead to a better level of protection in comparison to substantially longer intervals between vaccinations. Thus eight- to ten-year intervals should be recommended in the vaccination guideline instead. Regarding the humoral tetanus immunity, no disadvantages are to be expected if further vaccine components are injected simultaneously.

## 6 Literaturverzeichnis

- Baljer G, Thein P, Hechler H, Cronau P, Hasslacher D, Beck G, Sailer J, Mayr A. Untersuchungen zur intranasalen Schutzimpfung gegen Tetanus beim Pferd. Berl Münch Tierärztl Wschr. 1982;95:208-13.
- Barton MH. Disorders of the liver. In: Reed S, Bayly WM, Sellon DC, Hrsg. Equine Internal Medicine. 3. Aufl. St. Louis: Saunders Elsevier; 2009. p. 939-75.
- Bonetto A, Cavalleri JM, Ohnesorge B. Tetanus immunity in horses in northern germany. Proceedings of the 7<sup>th</sup> ECEIM Congress; 2014 Nov Praha 2014, Proceedings, 66
- Colombet I, Saguez C, Sanson-Le Pors MJ, Coudert B, Chatellier G, Espinoza P. Diagnosis of Tetanus Immunization Status: Multicenter Assessment of a Rapid Biological Test. Clin Diagn Lab Immunol. 2005;12:1057-62.
- Cook TM, Protheroe RT, Handel JM. Tetanus: a review of the literature. Br J Anaesth. 2001;87:477-87.
- Elkharrat D, Sanson-Le Pors MJ, Arrouy L, Beauchet A, Benhamou F. Evaluation of a bedside immunotest to predict anti-tetanus seroprotection: a prospective concordance study of 1018 adults in an emergency department. Emerg Med J. 2009;27:36-42.
- Green SL, Little CB, Baird JD, Tremblay RR, Smith-Maxie LL. Tetanus in the horse: a review of 20 cases. J Vet Intern Med. 1994;8:128-32.
- Guglick MA, MacAllister CG, Ely RW, Edwards WC. Hepatic disease associated with administration of tetanus antitoxin in eight horses. J Am Vet Med Assoc. 1995;206:1737-40.
- Habermann E, Dimpfel W. Distribution of <sup>125</sup>I-tetanus toxin and <sup>125</sup>I-toxoid in rats with generalized tetanus, as influenced by antitoxin. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 1973;276:327-40.
- Habermann E, Dimpfel W, Räker KO. Interaction of labelled tetanus toxin with substructures of a rat spinal cord in vivo. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 1973;276:361-73.
- Hatamabadi HR, Abdalvand A, Safari S, Kariman H, Dolatabadi AA, Shahrami A, Alimohammadi H, Hosseini M. Tetanus Quick Stick as an applicable and cost-effective test in assessment of immunity status. Am J Emerg Med. 2011;29:717-20.
- Heldens JGM, Kersten AJ, Weststrate MW, van den Hoven R. Duration of immunity induced by an adjuvanted and inactivated equine influenza, tetanus and equine herpesvirus 1 and 4 combination vaccine. Vet Quart. 2001;23:210-7.
- Hendriksen CFM, Vandergun JW, Nagel J, Kreeftenberg JG. The toxin-binding-inhibition test as a reliable invitro alternative to the toxin neutralization test in mice for the estimation of tetanus antitoxin in human-sera. J Biol Stand. 1988;16:287-97.

- Holmes MA, Townsend HGG, Kohler AK, Hussey S, Breathnach C, Barnett C, Holland R, Lunn DP. Immune responses to commercial equine vaccines against equine herpesvirus-1, equine influenza virus, eastern equine encephalomyelitis, and tetanus. *Vet Immunol Immunopathol.* 2006;111:67-80.
- Holznagel DL, Hussey H, Mihalyi JE, Wilson WD, Lunn PD. Onset of immunoglobulin production in foals. *Equine Vet J.* 2003;35:620-2.
- Jansen BC, Knoetze PC. The immune response of horses to tetanus toxoid. *Onderstepoort J Vet Res.* 1979;46:211-6.
- Lee S, Oncescu V, Mancuso M, Mehta S, Erickson D. A smartphone platform for the quantification of vitamin D levels. *Lab Chip.* 2014;14:1437-42.
- Liefman CE. Active immunisation of horses against tetanus including the booster dose and its application. *Aust Vet J.* 1981;57:57-60.
- Livorsi DJ, Eaton M, Glass J. Generalized tetanus despite prior vaccination and a protective level of anti-tetanus antibodies. *Am J Med Sci.* 2010;339:200-1.
- Löhner J, Radvila P. Aktive Tetanusprophylaxe beim Pferd und Immunitätsdauer. *Schw Arch Tierheilkd.* 1970;112:307-14.
- MacKay RJ. Tetanus. In: Sellon DC, Long MT, Hrsg. *Equine infectious diseases.* 2. Aufl. St. Louis: Saunders Elsevier, 2013. p. 368-72.
- Mülverstedt AJ. Entwicklung und Validierung eines ELISA zur Beurteilung der Tetanusvakzinierung am Beispiel eines Pferdebestandes in Thüringen [Dissertation sc. agr]. Göttingen: Georg-August-Univ. Göttingen; 2006.
- Oncescu V, Mancuso M, Erickson D. Cholesterol testing on a smartphone. *Lab Chip.* 2014;14:759-63.
- Reichmann P, Lisboa JAN, Araujo RG. Tetanus in equids: a review of 76 cases. *J Equine Vet Sci.* 2008;28:518-23.
- Radvila P. Tetanusprophylaxe bei Mensch und Tier nach einer Verletzung. *Arch Exp Vet Med.* 1975;29:469-81.
- Roper MH, Wassilak SGF, Tiwari TSP, Orenstein WA. Tetanus toxoid. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, Hrsg. *Vaccines.* 6. Aufl. St. Louis: Saunders Elsevier; 2013. p. 746-72.
- Roßkopf U, Noeske K, Werner E. Replacement of the in vivo neutralization test for efficacy demonstration of tetanus vaccines ad us. vet. *ALTEX* 2005;22:169-74.
- Roßkopf U. Validierung der Wirksamkeitsprüfung für Clostridium tetani Impfstoffe ad usum veterinarium durch den direkten Nachweis von Tetanus-Antitoxin im Zieltier mittels ELISA [Dissertation med. vet]. Gießen: Justus-Liebig-Univ. Gießen; 2007.
- Stelzmann M. Entwicklung eines Schnelltestsystems zum Nachweis von Equinen Antikörpern (IgG) gegen Tetanus [Dissertation med. vet]. Berlin: Freie Univ. Berlin; 2011.

- StlKo Vet. Leitlinie zur Impfung von Pferden. 2. Auflage, Beilage zum Deutschen Tierärzteblatt. 2013;9:6-7.
- Stubbe M, Swinnen R, Crusiaux A, Mascart F, Lheureux PE. Seroprotection against tetanus in patients attending an emergency department in Belgium and evaluation of a bedside immunotest. *Eur J Emerg Med.* 2007;14:14-24.
- Thein P. Tetanus bei Pferd und Mensch. *Prakt Tierarzt.* 2009;90:36-41.
- Thein P, Röhm A, Voss J. Experimentelle Untersuchungen zur Tetanusimmunantwort von Fohlen und erwachsenen Pferden unter Einsatz des Fassisi TetaCheck®. *Pferdeheilkunde.* 2013;29:686-99.
- Thein P. Zur Tetanusschutzimpfung des Pferdes. *Pferdespiegel.* 2011;4:153-6.
- Tizard IR. Immunity in the fetus and newborn. In: Tizard IR, Hrsg. *Veterinary Immunology: an introduction.* 6. Aufl. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 2000. p. 210-21.
- van Galen G, Delguste C, Sandersen C, Verwilghen D, Grulke S, Amory H. Tetanus in the equine species: a retrospective study of 31 cases. *Tijdschr Diergeneesk.* 2008;133:512-7.
- Vollman KE, Acquisto NM, Bodkin RP. A case of tetanus infection in an adult with a protective tetanus antibody level. *Am J Emerg Med.* 2014;32:392.e3.
- World Health Organization (WHO): Tetanus vaccine - WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec* 81. 2006:197-208.
- Wilson WD, Mihalyi JE, Hussey S, Lunn DP. Passive transfer of maternal isotype antibodies against tetanus and influenza and their effect on the response of foals to vaccination. *Equine Vet J.* 2001;33:644-50.

## **7 Anhang**

### **Verzeichnis wissenschaftlicher Veröffentlichungen und Vorträge**

*Weitere wissenschaftliche Veröffentlichungen in Erstautorenschaft:*

Recknagel S, Spallek A, Uhlig A, Gerstenberger U, Schusser GF. Malignes Ödem beim Pferd – Fallberichte von vier Pferden. Tierärztl Praxis. 2009;37(G):255-65.

Recknagel S, Nicke M, Schusser GF. Diagnostische Aussagekraft der Zytologie von Bauchpunktaten bei abdominalen Tumoren des Pferdes. Tierärztl Praxis. 2012;40(G):85-93.

*Weitere wissenschaftliche Veröffentlichungen in Mitautorenschaft:*

Schusser GF, Grosche A, Kyaw WO, Kölbl M, Recknagel S, Uhlig A, Beelitz P. Klinik und labormedizinische Befunde bei Pferden mit equiner granulozytärer Ehrlichiose. Pferdeheilkunde. 2007;23:351-6.

Köller G, Recknagel S, Spallek A, Breuer J, Schusser GF. Magenschleimkonzentrationen und intragastraler pH-Wert adulter Pferde während der Nahrungskarenz und nach oraler Applikation von Pronutrin®. Pferdeheilkunde. 2010;26:186-90.

Schusser GF, Uhlig A, Spallek A, Recknagel S, Breuer J, Gomaa N, Locher L, Köller G. Schilddrüsenfunktionsstörungen beim Pferd. Tierärztl Prax. 2010;38(Suppl 1):25-9.

Breuer J, Schmoll F, Spallek A, Recknagel S, Uhlig A, Schusser GF. Lawsonia intracellularis bei Fohlen - eine serologische Analyse. Pferdeheilkunde. 2010;26:697-700.

Breuer J, Müller U, Locher L, Spallek A, Recknagel S, Uhlig A, Schusser GF. Differentiation of viable, apoptotic and necrotic cells in bronchoalveolar lavage fluid of normal horses and horses with recurrent airway obstruction. Berl Münch Tierärztl Wochenschr. 2011;124:154-60.

Spallek A, Breuer J, Recknagel S, Köller G, Schusser GF. Einfluss von Laxantien auf den Wasser- und Elektrolythaushalt bei gesunden Pferden. Pferdeheilkunde. 2011;27:487-94.

Breuer J, Böttcher D, Reischauer A, Müller Ch, Spallek A, Recknagel S, Uhlig A, Schusser GF. Retrospektive Analyse von 74 Pferden mit Krankheiten des Ösophagus. Pferdeheilkunde. 2011;27:15-25.

Spallek A, Recknagel S, Breuer J, Köller G, Schusser GF. Influence of laxatives on gastric emptying in healthy Warmblood horses evaluated with the D-xylose absorption test. Berl Münch Tierärztl Wochenschr. 2013;126:10-5.

Eichentopf A, Snyder A, Recknagel S, Uhlig A, Waltl V, Schusser GF. Dysphagia caused by focal guttural pouch mycosis: mononeuropathy of the pharyngeal ramus of the vagal nerve in a 20-year-old pony mare. *Ir Vet J.* 2013;66:13.

*Wissenschaftliche Vorträge als Vortragender:*

Recknagel S, Spallek A, Uhlig A, Blessing M, Schusser GF. Localisation of transforming growth factor-beta and its receptors in normal equine gastric squamous epithelium. Abstracts of the 9<sup>th</sup> International Colic Research Symposium; 2008 Jun 15-18; Liverpool, Großbritannien; p. 31.

Recknagel S, Rodenbusch S, Spallek A, Breuer J, Uhlig A, Schusser GF. Nichtinvasive Duodenalbiopsie: Diagnostische Bedeutung beim chronisch abgemagerten Pferd. LBH: 5. Leipziger Tierärztekongress – Tagungsband 1; 2010 Jan 21-23; Leipzig, Deutschland; p. 160-3.

Recknagel S, Spallek A, Breuer J, Aupperle H, Kaiser T, Schusser GF. Labormedizin und Histologie bei einem Pferd mit blasenbildender Dermatose. LBH: 6. Leipziger Tierärztekongress – Tagungsband 2; 2012 Jan 21-23; Leipzig, Deutschland; p. 214-6.

Recknagel S, Breuer J, Uhlig A, Spallek A, Schusser GF. Epistaxis beim Sportpferd als Folge einer belastungsinduzierten ventrikulären Tachykardie. LBH: 7. Leipziger Tierärztekongress – Tagungsband 2; 2014 Jan 16-18; Leipzig, Deutschland; p. 85-6.

*Mitarbeit an wissenschaftlichen Vorträgen:*

Schusser GF, Spallek A, Recknagel S, Uhlig A, Damke C. Intragastric pH measurement in horses during feeding and in horses with severe gastric ulceration. Abstracts of the 9<sup>th</sup> International Colic Research Symposium; 2008 Jun 15-18; Liverpool, Großbritannien; p. 20.

Spallek A, Recknagel S, Uhlig A, Schusser GF. Influence of laxatives on gastric emptying in normal horses. 3<sup>rd</sup> Congress of the European College of Equine Internal Medicine Abstracts, *J Vet Int Med.* 23; 2009 Jan 28-30; Barcelona, Spanien, p. 15.

Schusser GF, Uhlig A, Spallek A, Recknagel S, Breuer J, Gomaa N, Köller G. Schilddrüsenfunktionsstörungen. LBH: 5. Leipziger Tierärztekongress – Tagungsband 1; 2010 Jan 21-23; Leipzig, Deutschland; p. 98-103.

Spallek A, Recknagel S, Reischauer A, Schusser GF. Karzinom im Bereich des Dünndarms bei einem Pferd mit Anämie. LBH: 5. Leipziger Tierärztekongress – Tagungsband 1; 2010 Jan 21-23; Leipzig, Deutschland; p. 155-9.

- Breuer J, Schmoll F, Uhlig A, Spallek A, Recknagel S, Schusser GF. Proliferative Enteropathie beim Fohlen - eine serologische Analyse. LBH: 5. Leipziger Tierärztekongress – Tagungsband 1; 2010 Jan 21-23; Leipzig, Deutschland; p. 164-6.
- Köller G, Uhlig A, Spallek A, Recknagel S, Breuer J, Gomaa N, Schusser GF. Elektrolyte, Enzyme, Metabolite und Mukus im Duodenalsaft von gesunden und kranken Pferden. LBH: 5. Leipziger Tierärztekongress – Tagungsband 1; 2010 Jan 21-23; Leipzig, Deutschland; p. 180-3.
- Uhlig A, Breuer J, Spallek A, Recknagel S, Schusser GF. Klinik des Botulismus. LBH: 5. Leipziger Tierärztekongress – Tagungsband 1; 2010 Jan 21-23; Leipzig, Deutschland; p. 207-11.
- Spallek A, Recknagel S, Breuer J, Schusser GF. Einfluss von Laxantien auf die Magenentleerung und den Wasser- und Elektrolythaushalt bei gesunden Pferden. Tagungsbericht der 21. Arbeitstagung der DVG Fachgruppe Pferdekrankheiten; 2010 Mar 12-13; Hannover, Deutschland; p. 76.
- Spallek A, Recknagel S, Schusser GF. Influence of laxatives on water and electrolyte balance in normal horses. 4<sup>th</sup> Congress of the European College of Equine Internal Medicine Abstracts, J Vet Int Med. 25; 2011 Feb 4-5; Hannover, Deutschland; p. 43.
- Merbach S, Ellenberger C, Recknagel S, Prohaska S, Breuer J, Schusser GF, Wittenbrink MM, Schoon HA. Lymphoplasmazelluläre Enteritis (LPE) bei einem adulten Warmblutwallach. Abstracts der 54. Jahrestagung der DVG Fachgruppe Pathologie, Tierärztl Prax (G) 39; 2011 Mar 12-13; Fulda, Deutschland; p. A10.
- Schusser GF, Müller C, Brühl K, Spiller C, Spallek A, Sommerauer S, Recknagel S, Breuer J, Uhlig A. Prognostische Indikatoren der Kolik. LBH: 6. Leipziger Tierärztekongress – Tagungsband 2; 2012 Jan 21-23; Leipzig, Deutschland; p. 23-5.
- Spallek A, Köller G, Mattusch J, Recknagel S, Breuer J, Schusser GF. Einfluss der Laxantien auf die Magenentleerung und Elektrolyte. LBH: 6. Leipziger Tierärztekongress – Tagungsband 2; 2012 Jan 21-23; Leipzig, Deutschland; p. 90-3.
- Uhlig A, Breuer J, Recknagel S, Spallek A, Müller K, Schusser GF. Bilaterale Facialisparesie LBH: 6. Leipziger Tierärztekongress – Tagungsband 2; 2012 Jan 21-23; Leipzig, Deutschland; p. 192-5.
- Uhlig A, Breuer J, Recknagel S, Snyder A, Schusser GF. Luftsackempyem – Behandlung ohne Antibiotika. LBH: 7. Leipziger Tierärztekongress – Tagungsband 2; 2014 Jan 16-18; Leipzig, Deutschland; p. 58.
- Bochnia M, Ziegler J, Abel S, Sander J, Uhlig A, Recknagel S, Schusser GF, Schmidt M, Zeyner A. Cases of atypical myopathy in middle Germany in 2013 caused by Hypoglycin A? Proceedings of the 18<sup>th</sup> Congress of the European Society of Veterinary and Comparative Nutrition; 2014 Sep 11-13; Utrecht, Niederlande; p. 32.



*Eigene Posterpräsentationen:*

Recknagel S, Spallek A, Uhlig A, Blessing M, Schusser GF. Transforming growth factor-beta expression under different dietary protocols in the equine gastric squamous epithelium. 3<sup>rd</sup> Congress of the European College of Equine Internal Medicine Abstracts, J Vet Int Med. 23; 2009 Jan 28-30; Barcelona, Spanien, p. 19.

Recknagel S, Protschka M, Blessing M, Spallek A, Breuer J, Uhlig A, Schusser GF. Expression von Wachstumsfaktoren in der kutanen Schleimhaut des Pferdemagens unter Ulkusinduktion durch intermittierenden Futterentzug. Tagungsbericht der 21. Arbeitstagung der DVG Fachgruppe Pferdekrankheiten; 2010 Mar 12-13; Hannover, Deutschland; p. 97.

Recknagel S, Merbach S, Wittenbrink MM, Breuer J, Spallek A, Uhlig A, Schusser GF. Lymphocytic plasmacytic enteritis (LPE) observed on duodenal biopsies associated with *Lawsonia intracellularis* in an adult horse. 4<sup>th</sup> Congress of the European College of Equine Internal Medicine Abstracts, J Vet Int Med. 25; 2011 Feb 4-5; Hannover, Deutschland; p. 59.

*Mitarbeit an Posterpräsentationen:*

Spallek A, Demiraj F, Recknagel S, Uhlig A, Schusser GF. Influence of laxatives on gastric emptying in normal adult horses. Abstracts of the 9<sup>th</sup> International Colic Research Symposium; 2008 Jun 15-18; Liverpool, Großbritannien; p. 167.

Breuer J, Reischauer A, Böttcher D, Spallek A, Recknagel S, Uhlig A, Schusser GF. Oesophagusdivertikel bei zwei adulten Pferden. Tagungsbericht der 21. Arbeitstagung der DVG Fachgruppe Pferdekrankheiten; 2010 Mar 12-13; Hannover, Deutschland; p. 82.

Fischer ML, Blanke A, Snyder A, Recknagel S, Schusser GF. Endoskopische Untersuchung des externen Gehörkanals bei Pferden – Physiologische und pathologische Befunde. 7. Leipziger Tierärztekongress; 2014 Jan 16-18; Leipzig, Deutschland.

May M, Recknagel S, Schusser GF. Endoscopic and histologic observations in gastritis of horses. Abstracts of the 11<sup>th</sup> International Equine Colic Research Symposium; 2014 Jul 7-10; Dublin Irland; p. 67.

## **Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. Schusser für die vertrauensvolle Überlassung des Themas und die Freiheiten, die er mir in dessen Bearbeitung einräumte. Ohne die zahlreichen anregenden Diskussionen, seine Geduld und sein Verständnis für die besonderen Belastungen eines Residency-Programmes, aber auch ohne den von ihm ausgeübten stetigen Druck wäre die Arbeit in dieser Form nicht zustande gekommen. Gemeinsame Kongressbesuche konnten mich immer wieder neu für die Wissenschaft begeistern.

Frau Dr. Alice Snyder und Frau Dr. Annemarie Blanke danke ich für Ihre spontane Zusage als Untersucher für die Evaluierung des Schnelltestes zur Verfügung zu stehen sehr. Mit ersterer verbindet mich weit mehr als die berufliche Entwicklung, welche nicht nur parallel verlief, sondern auch in gegenseitiger Motivation und Zuversicht bestand.

Dafür, dass er bereitwillig sein hervorragendes Englisch in diese Arbeit einbrachte, danke ich Herrn Dr. Karsten Schmidtke-Bode.

Des Weiteren gilt mein Dank Frau Dr. Silke Zachariae vom Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie der Universität Leipzig für die statistische Beratung.

Den Mitarbeitern der Medizinischen Tierklinik möchte ich für die schöne Zeit danken, die ich gemeinsam mit Ihnen verbringen durfte, und die inzwischen den Großteil meines bisherigen Berufslebens eingenommen hat. Besonders hervorheben möchte ich Herrn Dr. Albrecht Uhlig für das Teilen seiner langjährigen klinischen Erfahrung, Frau Ute Siegner, welche durch ihre frische Art so manchen Rückschlag relativieren konnte und Frau Dr. Tatjana Sattler, welche durch gemeinsame sportliche Aktivitäten für den nötigen körperlichen Ausgleich sorgte.

Fortwährend verständnisvoll stand mir meine Familie zur Seite. Meinen Eltern Annette und Ralph-Dieter Recknagel möchte ich für die bedingungslose Unterstützung meines privaten und beruflichen Werdeganges von Herzen danken. Ich bin meinen Schwiegereltern Petra und Jürgen Macholdt sehr dankbar, dass sie dies ebenso mit Rat und Tat nach Kräften tun.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meiner lieben Ehefrau, Mandy Recknagel, welche mit mir gemeinsam alle Gefühlslagen des Studiums, der Residency und dieser Dissertation durchlebte, mir geduldig und beratend zur Seite stand und mir die Freiräume verschaffte, die für das Schreiben dieser Dissertation erforderlich waren.

Meinen wundervollen Töchtern Lola Amélie und Alba Coralie Recknagel danke ich dafür, dass sie - bewusst oder unbewusst - Ihren Vater zugunsten dieser Arbeit gelegentlich entbehren konnten.