

Slutrapport

Antikroppar mot hästinfluensa i verkligheten – en studie av vaccinerade svenska travhästar i träning

Antibodies to equine influenza in real life – a study of Swedish trotters in training

Projektnummer: H-16-47-174

Projektperiod: 2017-01-01 - 2018-06-30

Huvudsökande:

Eva Wattrang, Statens Veterinärmedicinska Anstalt (SVA)

Medsökande:

Helena Back, Läkemedelsverket

Louise Treiberg-Brendtsson, SVA

Siamak Zohari, SVA

Del 1: Utförlig sammanfattning

The general aim of this study was to increase knowledge on the outcome of influenza vaccination in competition horses. Specifically, we monitored the influenza antibody levels in Standardbred trotters in training vaccinated twice yearly during a 13-month period.

The study comprised 56 horses from four trainer's yards, 21 mares, 27 stallions and 8 geldings aged between 2 and 8 years at the start of sampling. The horses were trained and raced as usual during the study and were high to average performers according to the trainers. Horses were vaccinated twice yearly, in December and in June, with a commercial equine influenza vaccine according to the trainers' standard procedures. Serum samples were collected monthly, from August year 1 to August year 2 and in total 549 serum samples were available for the present study. Influenza antibody levels to A/equi 2/Borlänge/91 (an antigen included in the vaccine) were determined with an in-house ELISA.

Results showed that all horses were seropositive to influenza virus throughout the study period although antibody levels showed a large variation between individuals.

Significant increases in antibody levels were observed at sampling occasions one and two months after vaccinations where after antibody levels declined to near pre-vaccination levels. During the present study period the December vaccination induced significantly higher increases in antibody levels compared to the June vaccination. The December vaccination was also preceded by the lowest antibody levels during the study. Moreover, a correlation between low pre-vaccination and high post-vaccination antibody levels was observed. A selection of 105 samples with the highest and lowest antibody levels according to the ELISA were also tested using SRH-methodology that is

considered to give correlates of protection against virus shedding and clinical disease. From these results it was calculated that the antibody levels detected in our material at infection with virus strains in the vaccine confer protection against clinical disease in 100 – 94 % of the horses and protection against virus shedding in 97 – 45 % of the horses during the 13 month period.

Taken together, the kinetics of vaccination induced antibodies in this study differ from what has earlier been reported from experimental studies with this vaccine type as we observed more rapid declines in antibody levels in the present material. This is the first report of long-term kinetics of influenza vaccine induced antibody responses in competition horses and the results will contribute to the evaluation and design of vaccination regimes.

This summary is published on the SVA website

(<https://www.sva.se/en/research/researches/antibodies-to-equine-influenza-in-real-life-a-study-of-swedish-trotters-in-training-1538>).

Del 2: Rapporten (max 10 sidor)

Inledning

Syfte

Projektets syfte var att öka kunskapen om vad som sker när man vaccinerar tävlingshästar mot hästinfluensa. Det specifika målet var att studera hur antikropps nivåerna mot hästinfluensavirus hos travhästar som vaccinerats två gånger årligen förändras under en 13-månadersperiod.

Bakgrund

Infektion med influensavirus orsakar övre luftvägsinfektion hos häst. Hos hästar utan, eller med otillräcklig, immunitet ger infektionen upphov till allvarliga kliniska symptom med hög feber, respiratoriska symptom och nedsatt allmäntillstånd. Hästarna drabbas vanligen också av sekundära bakteriella luftvägsinfektioner. Infektionen orsakar stora ekonomiska förluster för hästnäringen och förebyggande behandling, profylax, genom vaccination är den viktigaste metoden för att förhindra sjukdom och begränsa smittspridning. Att förhindra denna sjukdom anses så angeläget att både nationella, t.ex. Svenska Travsportens Centralförbund (STC) och Svenska Ridsportförbundet, och internationella, t.ex. Fédération Equestre Internationale (FEI), hästsportorganisationer har infört obligatorisk vaccination för tävlande hästar.

Många faktorer kan påverka det skydd som erhålls vid vaccination. Egenskaper hos vaccinet såsom vilken variant av viruset det innehåller och vilken ”hjälpstans”, s.k. adjuvans som används ger grundförutsättningarna för vilket immunsvaret som stimuleras. Vaccinationsintervallet både för grundvaccinationen och efterföljande revaccinationer är avgörande för bl.a. hur immunsvaret ”mognar” och hur länge ett effektivt skydd kvarstår. Vilket vaccinationsintervall som ger optimalt skydd beror på egenskaper hos vaccinet och hur immunsystemet har svarat. Det är t.ex. sedan länge känt att alltför täta vaccinationer, t.ex. medan antikropps svaren är under ökning eller ligger på hög nivå är ineffektiva och till och med kan resultera i lägre antikropps nivåer och otillräckliga immunsvaret. I extrema fall kan även s.k. tolerans framkallas och individen blir oförmögen att skapa immunsvaret. Hur en individ svarar vid vaccination påverkas också andra faktorer såsom stress och nutritions- och hälsostatus.

Beträffande vaccinationsintervall rekommenderar tillverkarna av alla hästinfluensavacciner som används i Sverige idag efter grundvaccinationsprogrammet en årlig revaccination. STCs och Svenska ridsportförbundets regler stipulerar också årlig revaccination mot hästinfluensa efter grundvaccination. Det förekommer dock bl.a. hos svenska travtränare att man istället vaccinerar hästarna med 6 månaders intervall. Även regimer med ännu frekventare influensavaccinationer har beskrivits (A. Ekfalk, personligt meddelande). Vidare anbefaller det internationella ridsportförbundet FEI vaccination mot hästinfluensa med 6 månaders intervall. Vad vi känner till har det dock inte publicerats någon studie över utfallet beträffande antikropps nivåerna hos hästar som vaccinerats två gånger om året med moderna hästinfluensavacciner.

Materiell och metoder

Hästar, provtagning och tillgängliga prover

Hästar och försöksupplägg har tidigare beskrivits utförligt av Back et al. (2015) ⁽¹⁾.

Totalt omfattade materialet 66 varmblodiga travare i träning hos fyra tränare. Hästarna var vid studiens början 2-8 år gamla och ansågs av tränarna vara normal- till högpresterande. Alla hästar vaccinerades mot hästinfluensa två gånger/år med vaccinet Equip® F vet. (Orion Pharma Animal Health), i slutet av december och i slutet av juni, enligt tränarnas normala rutiner. Under studieperioden tränades och tävlades hästarna normalt. De genomgick även klinisk undersökning och genomförde standardiserade arbetsprov 1 gång/månad. Provtagningarna utfördes mellan augusti 2010 (år 1) och augusti 2011 (år 2), d.v.s. under 13 månader.

Serumprover togs 1 gång/månad från varje häst och förvarades vid -20°C. I denna studie inkluderades 56 hästar där serumprover från minst 4 provtagningstillfällen fanns tillgängliga. Materialet inkluderade då totalt 549 st serumprover från 28 st 2-åriga, 18 st 3-åriga, 4 st 4-åriga, 4 st 5-åriga och 2 st 8-åriga hästar varav 21 st ston, 27 st hingstar och 8 st vallacker.

Antikroppsanalys

Kvantifiering av antikropps nivåerna i serum bestämdes med ELISA-metodik. En ELISA för detektion av antikroppar mot hästinfluensavirus A/equi 2/Borlänge/91 (H3N8) sattes upp för detta ändamål. Viruset odlades på embryonerade hönsägg och koncentrerades sedan med ultracentrifugering. Därefter preparerades en suspension av virusproteiner med hjälp av sonikering och behandling med detergent (Triton™ X-100, Sigma-Aldrich, www.sigmaaldrich.com) och proteinkoncentrationen bestämdes med Bradfordanalys. Proteinsuspensionen användes som coatingantigen vid en koncentration av 5 µg/ml i 0.05 M Na₂CO₃/NaHCO₃ coatingbuffert, pH 9.6, i flatbottnade 96-brunns ELISA-plattor (PolySorp, Nunc™, ThermoFisher Scientific, www.thermofisher.com). Fosfatbuffrad koksaltlösning med 0.05 % Tween 20 (Sigma-Aldrich) användes för blockering, för provspädning och som tvättbuffert. Serumsproverna analyserades vid en initial spädning på 1:1000 som sedan titrerades 1:2 ytterligare sju gånger. I varje platta analyserades som positiv kontroll även ett referensserum mot A/equi2/Newmarket/2/93 (#E0850022, European Pharmacopoeia, European Directorate for the Quality of Medicine & HealthCare, www.edqm.eu) och som negativ kontroll ett serumprov från en oinfekterad och ovaccinerad försökshäst ⁽²⁾. Antikroppar som bundit virusproteinerna detekterades med peroxidaskonjugerad get anti-häst IgG antikropp (#108-035-008, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., www.jacksonimmuno.com) och bindningen visualiserades med substratlösning (1-Step™ Turbo TMB-ELISA, ThermoFisher Scientific). Reaktionen stoppades vid en standardiserad tidpunkt med 2 M H₂SO₄ och absorbansen vid 450 nm, A₄₅₀, mättes i en ELISA-spektrofotometer. Absorbanskurvan för varje prov plottades och en teoretisk spädning (titer) för att erhålla ett absorbansvärde på 1 räknades ut med hjälp av regressionsanalys av kurvans linjära del.

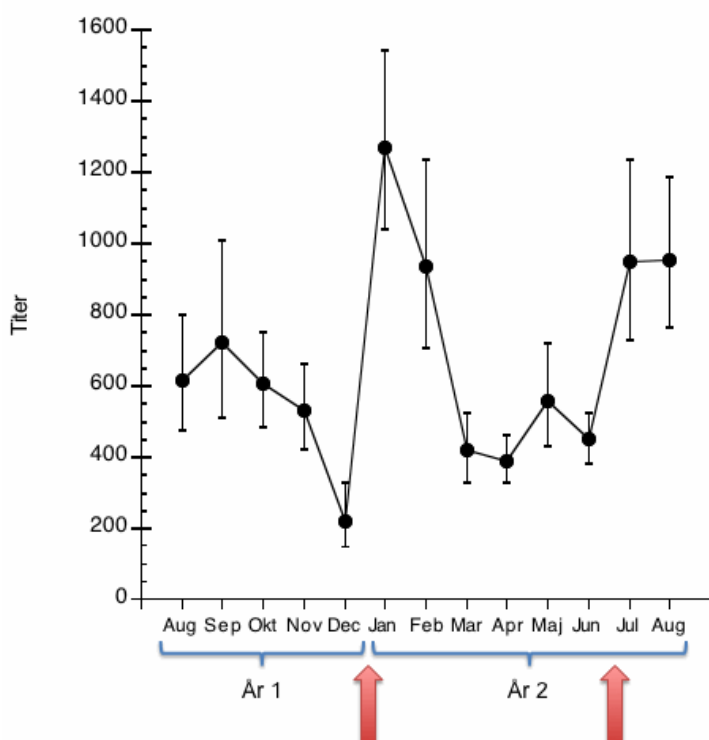
Dataanalys

Resultaten från antikroppsanalyserna (titrar) presenteras som geometriska medelvärden ± 95% konfidensintervall som båda beräknades med hjälp av programvaran R ⁽³⁾.

Värden där konfidensintervallen inte överlappar varandra ansågs vara statistiskt signifikant skilda åt. Spearmans rangkorrelationsanalys av relativa antikropps nivåer inom individ före och efter vaccination utfördes också med programvaran R.

Resultat och diskussion

I den här studien analyserades serumprover från 56 varmblodiga travhästar i träning för mängden antikroppar mot hästinfluensavirus. Hästarna vaccinerades rutinmässigt två gånger om året med det kommersiella vaccinet Equip® F vet. Detta vaccin är ett subenhetsvaccin av ISCOM-typ⁽⁴⁾ vilket innebär att vaccin-antigenen är inkorporerade i komplex som består av Quil A (saponin), fosfatidylkolin och kolesterol vilka agerar adjuvans. Antigenen i detta vaccin är hemagglutinin (ett ytprotein) från hästinfluensavirusstammarna: A/equi 1/Newmarket/77 (H7N7, "A1-virus"), A/equi 2/Borlänge/91 och A/equi 2/Kentucky/98 (H3N8, "A2-virus"). Ingen av dessa virusstammar anses vara i cirkulation i hästpopulationen för närvarande⁽⁵⁾. Vid influensautbrott isoleras nu vanligen stammar som tillhör s.k. klad 1 eller klad 2 av Florida-sublinjen som bland de aktuella vaccinstammarna är mest släkt med A/equi 2/Kentucky/98. För att få ett bra mått på antikroppar som producerats i första hand som svar på vaccinationen valde vi i denna studie därför A/equi 2/Borlänge/91 som målstim för att mäta mängden antikroppar.



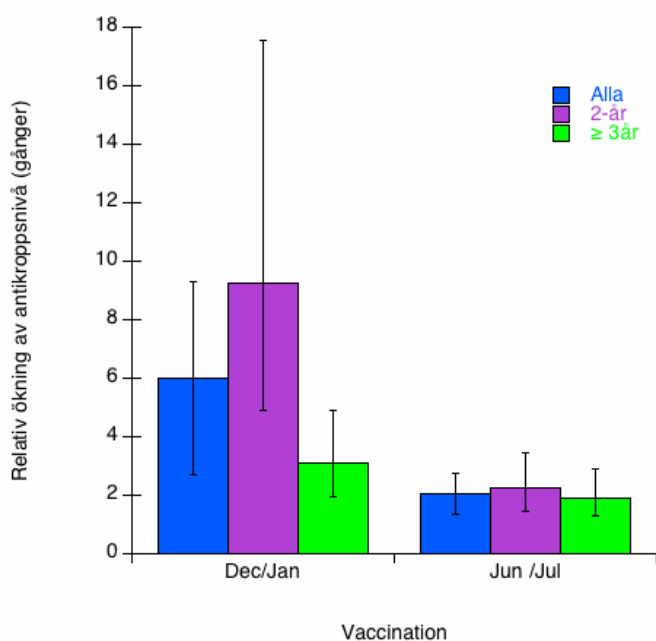
Figur 1. Antikropstitrar mot influensavirus (A/equi 2/Borlänge/91) i serum från travhästar som vaccinerats i december år 1 respektive juni år 2 (röda pilar). Geometrisk medelvärden \pm 95% konfidensintervall ($53 \geq n \leq 25$).

Resultaten av antikroppsanalyserna visade att alla prover från alla hästar i studien var positiva för antikroppar mot hästinfluensavirus (Figur 1). Mängden antikroppar visade stor variation mellan individer och en signifikant ökning av mängden antikroppar observerades för majoriteten av hästarna efter båda vaccinationstillfällena i studien. De högre antikropps nivåerna kvarstod i genomsnitt minst vid två provtagningstillfällen efter vaccinationerna under studien. Endast vaccinationen i december år 1 följdes både före

vaccinationen och vid fler tillfällen efter vaccinationen och efter denna hade antikropps nivåerna sjunkit till signifikant lägre nivåer vid provtagningstillfället 3

månader efter vaccinationen och förblev vid dessa nivåer till följande vaccination, d.v.s. i juni år 2. Efter vaccinationen som föregick studieperioden, d.v.s. juni år 1, verkar vaccinationssvaret vara något lägre än efter de övriga vaccinationerna (antikroppsniivåerna för augusti år 1 var signifikant lägre än de för januari år 2 men skiljde sig inte signifikant från de för februari, juli eller augusti år 2). Den snabba reduceringen av antikroppsniivåerna som vi observerade 3 månader efter vaccination överinstämmer inte med den kinetik som rapporterats efter avslutad grundvaccination med detta vaccin där antikroppsniivåerna avtar gradvis till studiens slut vid 27 veckor efter den sista (tredje) vaccinationen ⁽⁶⁾. Likaledes uppvisade antikroppsniivåerna ett mer gradvis avtagande både efter avslutad grundvaccination och efter re-vaccination när hästar vaccinerades med ett liknande influensavaccin med ISCOM-Matrix adjuvans ⁽⁷⁾. Faktorer som kan ha medverkat i att antikroppsmängden verkar avta snabbare i vårt material än vad som rapporterats i experimentella studier är bland annat att hästarna i vårt material tränades och tävlades aktivt. Det är känt att fysisk aktivitet påverkar immunsystemet och studier i t.ex. människor har visat att intensiv träning kan påverka immunsvaret negativt medan mer moderat aktivitet har positiva effekter ⁽⁸⁾. En experimentell studie i häst har också visat att influensavaccinerade hästar som genomgick intensiv träning under en 5-dagars period uppvisade nedsatt immunsvaret mot influensavirus och ökad känslighet när de infekterades experimentellt med viruset ⁽⁹⁾. Vidare kan det tätare vaccinationsintervallet, var sjätte månad, i vårt material också påverkat antikroppsniivåernas kinetik. Vi skall nu undersöka antikroppsniivåerna i vår studie mer kvalitativt (se nedan) för att få en uppfattning om skyddet mot infektion.

I vårt material var antikroppsniivåerna överlag signifikant lägre vid provtagningen före vaccinationen i december år 1 än vid övriga tillfällen i studien. Den relativa ökningen av antikroppsniivåerna efter vaccination (Figur 2) var också signifikant högre efter vaccinationen i december år 1 än efter vaccinationen i juni år 2. Korrelationsanalys av de relativa antikroppsniivåerna före och efter de två vaccinationerna i studien visade att lägre antikroppsniivåer före vaccination var signifikant korrelerade till högre



Figur 2. Relativ ökning av antikroppsniivåer (titer före vaccination/titer efter vaccination) mot influensavirus (A/equi 2/Borlänge/91) inom häst efter vaccination i december år 1 respektive juni år 2. Geometrisk medelvärden \pm 95% konfidensintervall för: alla hästar i studien (n=45 Dec/Jan; n=35 Jun/Jul), 2-åriga hästar (n=27 Dec/Jan; n=17 Jun/Jul) respektive 3-åriga och äldre hästar (n=18 för båda).

antikropps-nivåer efter vaccination (Spearman's rho=-0.241, p=0,03). Dessa resultat är i linje med den vedertagna uppfattningen att de initiala antikropps-nivåerna inte får vara för höga för att ett kraftigt antikropps-svar ska kunna erhållas vid en revaccination⁽¹⁰⁾. En studie av fullblodshästar i träning har också visat att hästar som vaccinerats mot influensavirus med ett intervall av 3-6 månader mellan vaccinationerna hade lägre antikropps-nivåer en månad efter senaste vaccination än de som hade mer än 6 månader mellan vaccinationerna⁽¹¹⁾.

Hälften av hästarna i vår studie var unga, 2 år, och nyligen tagna i träning vid studiens början vilket eventuellt skulle kunna ha inflytande på både antikropps-nivåerna vid studiens början och på vaccinationssvaren. Resultaten visade dock inte några signifikanta skillnader i antikropps-nivåer mellan 2-åriga och äldre hästar vid någon tidpunkt under studien (data ej visade). För den relativa ökningen av antikropps-nivåerna efter vaccination tenderade de 2-åriga hästarna att ha en högre ökning efter vaccinationen i december år 1 (Figur 2) men skiljde sig inte statistiskt signifikant från de äldre hästarna. Rapporter från influensautbrottet bland vaccinerade hästar i Newmarket, England, 2003 visade att 2-åriga hästar generellt hade en lägre risk för att utveckla klinisk sjukdom trots likvärdiga antikropps-nivåer som äldre hästar vilket indikerar att en kvalitativ skillnad i immunsvaren mellan de olika åldersgrupperna^(12, 13).

På individuell nivå visade fem av hästarna i studien inte någon ökning av antikropps-nivåerna efter en av vaccinationerna i studien och två av hästarna visade ingen höjning av antikropps-nivåerna vid någon av vaccinationerna. Detta kan bero på misstag eller tekniska problem vid vaccinationen eller att hästarna var immunosupprimerade, t.ex. på grund av stress eller medicinering vid vaccinationstillfället. Någon/några av dessa hästar kan även ha varit genetiskt betingad till låga immunsvår. En utav de äldre (8 år) hästarna i studien hade höga antikropps-titrar, titer på 2900-6900, vid alla provtagningstillfällena utan tydligt samband med vaccination. Detta skulle kunna tyda på att denna häst vid ett tidigare tillfälle genomgått en influensavirusinfektion då immunsvaren vid naturlig infektion är betydligt starkare än de vid vaccination och kvarstår under mycket längre tid^(14, 15).

Ett urval av 105 serumprover med de högsta och lägsta antikropps-nivåerna enligt ELISA metodiken analyserades också med s.k. SRH-metodik av vår samarbetspartner Dr Janet Daly, University of Nottingham, England, för antikroppsanalys med s.k. SRH-metod (single radial haemolysis test). Denna metod detekterar och kvantifierar kompletterande antikroppar mot hemagglutinin och är den metod som används för att ge värden som relateras till skyddande immunitet⁽¹⁶⁾. Med resultaten från denna analys uppskattades att antikropps-nivåerna i vårt material, vid infektion med virus som ingår i vaccinet, ger skydd mot klinisk sjukdom hos 100 – 94 % av hästarna och skydd mot virusutsöndring i 97 – 45 % av hästarna under studieperioden.

En sammanfattning av resultaten från projektet är publicerad på SVAs hemsida (<https://www.sva.se/forskning-och-utveckling/aktuella-forskningsprojekt/antikroppar-mot-hastinfluensa-i-verkligheten-en-studie-av-vaccinerade-svenska-travhastar-i-traning>) och studien håller på att sammanställas för publikation i en internationell peer-review tidskrift.

Slutsatser

Sammantaget visar resultaten från detta material på potentiella skillnader i antikroppssvaren vid influensavaccination av hästar i träning jämfört med de antikroppssvar som tidigare observerats vid experimentell utvärdering av vaccinet.

Nytta för näringen och rekommendationer

Detta är den första detaljerade långtidsstudien av antikroppssvaren vid influensavaccination av hästar i träning. Resultaten visar på skillnader mellan svaren hos denna hästpopulation jämfört med vad som tidigare var känt. De tränade hästarna i vår studie visade bland annat en kortare period med höga antikroppsnivåer efter vaccination än vad man kunde förvänta med tanke på vad som tidigare visats i visats i experimentella studier. Det verkar också som att ett högre antikroppssvar erhålls om hästarna vaccinerats när antikroppsnivåerna sjunkit en lägre nivå. Denna typ av kunskap behövs för att utforma effektiva vaccinationsprogram för tävlingshästar. I framtiden skulle en liknande studie som denna av hästar som vaccinerats enligt tillverkarens rekommendation, d.v.s. en gång per år, kunna bidra till en bättre utvärdering av utfallet vid olika vaccinationsregimer.

Referenser

1. Back, H., J. Penell, J. Pringle, M. Isaksson, N. Roneus, L. Treiberg Berndtsson, and K. Ståhl, *A longitudinal study of poor performance and subclinical respiratory viral activity in Standardbred trotters*. *Vet Rec Open*, 2015. 2(1): p. e000107.
2. Daly, J.M., S. MacRae, J.R. Newton, E. Watrang, and D.M. Elton, *Equine influenza: a review of an unpredictable virus*. *Vet J*, 2011. 189(1): p. 7-14.
3. RCoreTeam, *R: A language and environment for statistical computing*. 2015, R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria.
4. FASS-Djurläkemedel. *Equip® F vet. produktresumé*. 2015; Available from: <https://www.fass.se/LIF/product?userType=1&nplId=20030822000111&docType=4&scrollPosition=0>.
5. Equiflunet. 2018; Available from: www.eqiflunet.org.uk.
6. Gildea, S., S. Arkins, C. Walsh, and A. Cullinane, *A comparison of antibody responses to commercial equine influenza vaccines following annual booster vaccination of National Hunt horses - a randomised blind study*. *Vaccine*, 2011. 29(22): p. 3917-22.
7. Heldens, J.G.M., H.G.G. Pouwels, C.G.G. Derks, S.M.A. Van de Zande, and M.J.H. Hoeijmakers, *Duration of immunity induced by an equine influenza and tetanus combination vaccine formulation adjuvanted with ISCOM-Matrix*. *Vaccine*, 2010. 28(1873-2518 (Electronic)): p. 6989-6996.
8. Gleeson, M. and D.B. Pyne, *Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: exercise effects on mucosal immunity*. *Immunol Cell Biol*, 2000. 78(5): p. 536-44.
9. Folsom, R.W., M.A. Littlefield-Chabaud, D.D. French, S.S. Pourciau, L. Mistic, and D.W. Horohov, *Exercise alters the immune response to equine influenza virus and increases susceptibility to infection*. *Equine Vet J*, 2001. 33(7): p. 664-9.
10. Kroger, A.T., C.V. Sumaya, L.K. Pickering, and W.L. Atkinson, *General recommendations on immunization*. *Morbidity and Mortality weekly*. Vol. 60. 2011, Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention. 61.
11. Ryan, M., S. Gildea, C. Walsh, and A. Cullinane, *The impact of different equine influenza vaccine products and other factors on equine influenza antibody levels in Thoroughbred racehorses*. *Equine Vet J*, 2015. 47(6): p. 662-6.
12. Newton, J.R., J.M. Daly, L. Spencer, and J.A. Mumford, *Description of the outbreak of equine influenza (H3N8) in the United Kingdom in 2003, during which recently vaccinated horses in Newmarket developed respiratory disease*. *Vet Rec*, 2006. 158(6): p. 185-92.

13. Barquero, N., J.M. Daly, and J.R. Newton, *Risk factors for influenza infection in vaccinated racehorses: lessons from an outbreak in Newmarket, UK in 2003*. *Vaccine*, 2007. 25(43): p. 7520-9.
14. Hannant, D., J.A. Mumford, and D.M. Jessett, *Duration of circulating antibody and immunity following infection with equine influenza virus*. *Vet Rec*, 1988. 122(6): p. 125-8.
15. Bryant, N.A., R. Paillot, A.S. Rash, E. Medcalf, F. Montesso, J. Ross, J. Watson, M. Jeggo, N.S. Lewis, J.R. Newton, and D.M. Elton, *Comparison of two modern vaccines and previous influenza infection against challenge with an equine influenza virus from the Australian 2007 outbreak*. *Vet Res*, 2010. 41(2): p. 19.
16. OIE, *Equine Influenza in OIE Terrestrial Manual*. 2012.

Del 3: Resultatförmedling

Vetenskapliga publiceringar	Planerad artikel i den internationella peer-review tidskriften Vaccine: "Outcome of vaccination against equine influenza virus twice yearly in Standardbred trotters in training", Wattrang E, Back H, Treiberg-Brendtsson L, Daly J & Zohari S
Övriga publiceringar	Presentation av resultat vid "International Veterinary Immunology Symposium" i Seattle, USA, augusti 2019, Wattrang E, Back H, Treiberg-Brendtsson L, Daly J & Zohari S.
	Resultaten är presenterade på SVAs hemsida På svenska: https://www.sva.se/forskning-och-utveckling/aktuella-forskningsprojekt/antikroppar-mot-hastinfluensa-i-verkligheten-en-studie-av-vaccinerade-svenska-travhastar-i-traning) På engelska: https://www.sva.se/en/research/researches/antibodies-to-equine-influenza-in-real-life-a-study-of-swedish-trotters-in-training-1538
Muntlig kommunikation	
Studentarbete	
Övrigt	