

Aus der Chirurgischen Tierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Innere Medizin und Chirurgie des Pferdes sowie Gerichtliche Tiermedizin
Vorstand: Prof. Dr. H. Gerhards

Gibt es eine asymptomatische intraokulare Leptospireninfektion beim Pferd?

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Stefan Gesell
aus Tettwang

München 2004

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent: Univ.-Prof. Dr. H. Gerhards
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. O.-R. Kaaden

Tag der Promotion: 23. Juli 2004

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATUR	2
2.1	ERU	2
2.1.1	Definition und Vorkommen der ERU	2
2.1.2	Symptome und Verlauf der ERU	3
2.1.3	Einteilung der ERU	4
2.1.4	Ursachen der ERU beim Pferd	4
2.1.5	Diagnose	6
2.1.6	Differenzialdiagnose	6
2.1.7	Pathogenese	7
2.1.8	Therapie und Prognose	7
2.2	Auge und Immunreaktion	8
2.3	Leptospiren	8
2.3.1	Taxonomie	8
2.3.2	Morphologie	10
2.3.3	Motilität	10
2.3.4	Übertragungswege und Tenazität	10
2.3.5	Klinik	10
2.3.6	Pathogenese	11
2.3.7	Nachweis von Leptospireninfektionen	12
2.3.7.1	Antikörpernachweis	12
2.3.7.2	Erregernachweis	13
3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	15
3.1	Untersuchungsgut	15
3.2	Anamnese	15
3.3	Augenuntersuchung	16

3.4	Einteilung der Pferdeaugen anhand ihrer klinischen Befunde	16
3.4.1	Gesunde	16
3.4.2	ERU	16
3.5	Probengewinnung	16
3.5.1	Serumproben	16
3.5.2	Kammerwasser- und Glaskörperproben	17
3.5.2.1	Euthanasie oder Schlachtung	17
3.5.2.2	Therapeutische und diagnostische Eingriffe	17
3.6	Untersuchung der entnommenen Proben auf Leptospiren	17
3.6.1	MAR (Mikroagglutinationsreaktion)	18
3.6.1.1	Untersuchungsgut	18
3.6.1.2	Einleitung	18
3.6.1.3	Material	19
3.6.1.4	Durchführung	20
3.6.2	ELISA	21
3.6.2.1	Untersuchungsgut	21
3.6.2.2	Einleitung	21
3.6.2.3	Material	22
3.6.2.4	Antigenbeschichtung der Mikrotiterplatten	23
3.6.2.5	ELISA-Durchführung	23
3.6.2.6	ELISA-Auswertung	23
3.6.3	Leptospirenkultur	24
3.6.3.1	Untersuchungsgut	24
3.6.3.2	Einleitung	24
3.6.3.3	Material	25
3.6.3.4	Herstellung der Transportmedien mit Hemmstoff	26
3.6.3.5	Herstellung der Nährmedien	26
3.6.3.6	Verimpfen der Proben auf Transportmedien	27
3.6.3.7	Überimpfen der Proben auf halbflüssige Nährmedien	27
3.6.3.8	Bebrütung und Überprüfung der Kulturen	27
3.6.3.9	Leptospirenisolation und Serovarbestimmung	28

3.6.4	PCR – Untersuchung auf Leptospiren-DNA	28
3.7	Statistische Auswertung	28
4	ERGEBNISSE	31
4.1	Leptospirenbefunde	31
4.1.1	Antikörpertiter gegen Leptospiren im Serum	31
4.1.1.1	Vorkommen von Antikörpertitern ab 1:100 in der MAR	31
4.1.1.2	Vorkommen von Antikörpern gegen die einzelnen Serovare in der MAR	33
4.1.2	Nachweis von Antikörpern gegen Leptospiren in intraokularen Proben	34
4.1.2.1	Vorkommen von Antikörpern in Augen von Pferden ohne Anzeichen für eine ERU und von Pferden mit ERU	34
4.1.3	Leptospiren-Erregernachweis	36
4.2	Zusammenfassung der einzelnen Untersuchungsergebnisse	38
4.2.1	Vergleich der Ergebnisse zwischen gesunden und an ERU erkrankten Augen	38
4.2.2	Vergleich der Ergebnisse eines gesunden Auges mit positivem Antikörper-Nachweis	39
4.2.3	Vergleich der Ergebnisse der Augen mit ERU	39
5	DISKUSSION	41
5.1	Antikörpertiter gegen Leptospiren im Serum	41
5.2	Antikörpertiter in der MAR gegen Leptospiren in intraokularen Proben	42
5.3	Antikörpernachweis im ELISA gegen Leptospiren in intraokularen Proben	42
5.4	Zusammenfassung der Ergebnisse der indirekten Nachweismethoden MAR und ELISA	42
5.5	Kultur	44
5.6	PCR	45
5.7	Zusammenfassung der Ergebnisse	45

INHALTSVERZEICHNIS	IV
5.7.1 Vergleich der Ergebnisse zwischen gesunden und an ERU erkrankten Augen	45
5.7.2 Vergleich der Ergebnisse eines gesunden Auges mit positivem Antikörper-Nachweis	46
5.7.3 Vergleich der Ergebnisse der Augen mit ERU	46
5.8 Schlussfolgerung	47
6 ZUSAMMENFASSUNG	49
7 SUMMARY	51
8 LITERATURVERZEICHNIS	53

Abkürzungen

AK	Antikörper
BSA	bovines Serumalbumin
DNA	desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay, enzymgebundener Adsorptionstest
EMJH	Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris
ERU	equine rezidivierende Uveitis
Fu	Fluorouracil
GK	Glaskörper
IgG	Immunglobulin, Klasse G (Gammaglobulin)
IgM	Immunglobulin, Klasse M (Makroglobulin)
KW	Kammerwasser

Leptospiren-Serovare:

aust	=	<i>Leptospira interrogans</i> Serovar <i>australis</i>
brat	=	<i>Leptospira interrogans</i> Serovar <i>bratislava</i>
can	=	<i>Leptospira interrogans</i> Serovar <i>canicola</i>
gripp	=	<i>Leptospira interrogans</i> Serovar <i>grippotyphosa</i>
hard	=	<i>Leptospira interrogans</i> Serovar <i>hardjo</i>
ict	=	<i>Leptospira interrogans</i> Serovar <i>icterohaemorrhagiae</i>
jav	=	<i>Leptospira interrogans</i> Serovar <i>javanica</i>
pom	=	<i>Leptospira interrogans</i> Serovar <i>pomona</i>
pyr	=	<i>Leptospira interrogans</i> Serovar <i>pyrogenes</i>
sax	=	<i>Leptospira interrogans</i> Serovar <i>saxkoebing</i>
sej	=	<i>Leptospira interrogans</i> Serovar <i>sejroe</i>
tar	=	<i>Leptospira interrogans</i> Serovar <i>tarassovi</i>
MAR/MAT		Mikroagglutinationsreaktion/microscopic agglutination test
MHC		major histocompatibility complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
PBS		Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR		polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
TGF		transforming growth factor
Va		Vancomycin

1 EINLEITUNG

Etwa 8 % der Pferde zeigen klinische Symptome der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU) (SZEMES u. GERHARDS, 2000). Die Etablierung und routinemäßige Durchführung der Vitrektomie an uveitischen Pferdeaugen hat große Fortschritte zum Verständnis sowie zur Diagnostik und Therapie der ERU ermöglicht. Glaskörperproben von Pferden mit ERU weisen in der Mikroagglutinationsreaktion (MAR) zu 90 % Antikörper gegen Leptospiren auf. Bei über 50 % der an ERU erkrankten Pferde wurden Leptospiren sowohl aus Augen, die lediglich einen Entzündungsschub gezeigt hatten als auch aus schwer geschädigten Pferdeaugen, die zahlreiche Schübe erlitten hatten, angezüchtet. Die rezidivierende Uveitis beim Pferd wird deshalb als Folge einer intraokular persistierenden Leptospireninfektion angesehen (WOLLANKE, 2002).

Unbekannt ist, welche Umstände dazu führen, dass Leptospiren in das Auge gelangen und wie sie dort über lange Zeit persistieren können. Es wird berichtet, dass nach spontaner (ROBERTS, 1958) oder experimenteller Infektion von Pferden (WILLIAMS et al., 1971) erst Monate bis Jahre später die typischen Anzeichen einer ERU auftraten. Dies, obwohl Leptospiren nur etwa neun Tage aus dem Blut anzüchtbar sind, während Antikörper z. T. lebenslang im Serum nachgewiesen werden können (FAINE, 1994). Es liegt also die Vermutung nahe, dass die Bakterien im Stadium der Leptospirämie in das Augennere gelangen (BREM et al., 1999a) und, da offenbar nicht sofort eine Reaktion bemerkbar ist, zunächst nicht von der körpereigenen Abwehr wahrgenommen werden. Dies könnte bedeuten, dass Leptospiren in gesunden Pferdeaugen auch nachweisbar sein müssten. Untersuchungen gesunder Pferdeaugen auf Antikörper gegen Leptospiren bei gleichzeitigem direktem Erregernachweis liegen bisher nicht in größerem Umfang vor.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, anhand von Glaskörper- und Kammerwasserproben ophthalmologisch gesunde Augen neben den klassischen Methoden MAR und Kultur auch mittels indirektem enzymgebundenem Adsorptionstest (ELISA, enzyme linked immunosorbent assay) und Polymerase-Kettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction) auf eine asymptomatische Leptospireninfektion zu untersuchen, um weitere Hinweise zur Pathogenese der ERU als intraokulare Leptospirose zu erhalten.

2 LITERATUR

2.1 ERU

2.1.1 Definition und Vorkommen der ERU

Die equine rezidivierende Uveitis ist eine serohaemorrhagische Entzündung der Uvea, die akut auftreten, chronisch rezidivierend verlaufen und durch progrediente Zerstörung der intraokularen Strukturen zur Erblindung führen kann (GERHARDS u. WOLLANKE, 2001). Am häufigsten erkranken Pferde zwischen vier und sechs Jahren, wobei Pferde jeden Alters betroffen sein können (WOLLANKE, 2002). Nach ZWIERZCHOWSKI (1967) erkrankten Pferde zwischen einem und 23 Jahren, die meisten im Alter von drei bis elf Jahren. Die Häufigkeit des Auftretens der ERU wird mit 8–12 % angegeben (CROSS, 1966; GELATT, 1972; BISTNER u. SHAW, 1980; LAVACH, 1990; SPIESS, 1997). Im Großraum Köln-Bonn wiesen Ende der 90er Jahre unter 1014 Pferden etwa 8 % Veränderungen im Sinne einer ERU auf (SZEMES u. GERHARDS, 2000). Bei den Untersuchungen von WOLLANKE (2002) waren bei 23 % der an ERU erkrankten Pferde beide Augen betroffen. Neuere Untersuchungen fanden keine Grundfarbe, die (signifikant) häufiger mit einer Uveitis einherging (HASSENKAMP, 1974; WOLLANKE, 1995; WOLLANKE 2002). Wallache erkranken häufiger an Uveitis als Stuten und Hengste, was durch einen bindegewebsstabilisierenden Effekt der Sexualhormone erklärbar wäre. Dieser könnte eine geringere Infektionsanfälligkeit des Glaskörpers bewirken (WOLLANKE, 2002). FABER et al. (2000) fanden keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Rasse, Geschlecht oder Alter und dem Auftreten der rezidivierenden Uveitis, während WOLLANKE (2002) herausfand, dass Islandpferde, Quarter Horses und Warmblüter relativ häufig betroffen sind. ALEXANDER und KELLER (1990) und DWYER et al. (1995) vermuten eine genetische Prädisposition für die Erkrankung an ERU. Warmblüter, die Träger des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC, major histocompatibility complex) Klasse I ELA-A9 Haplotyps sind, scheinen für die ERU anfälliger zu sein als Nichtträger (DEEG et al., 2004).

2.1.2 Symptome und Verlauf der ERU

Die Symptome und der Verlauf der ERU werden wie folgt stichwortartig beschrieben (BERNHARDT-GUDWALLEN, 1900; REBHUN, 1979; COOK, 1983; SPIESS, 1997; GERHARDS u. WOLLANKE, 2001):

Akute Uveitis:

- Abwehrtrias (Epiphora, Fotophobie, Blepharospasmus)
- Bindehautrötung
- Hornhauttrübung mit Vaskularisation
- Entzündungsprodukte in der vorderen Augenkammer (meist fibrinös, selten hämorrhagisch oder Hypopyon)
- Miosis
- Rubeosis iridis
- Glaskörpertrübung (diffus, zellulär und serös)
- selten Papillenrötung oder -ödeme.

Der akute Schub kann bis zu drei Wochen andauern. Diese akut verlaufenden Entzündungsreaktionen können in unregelmäßigen Abständen rezidivieren.

Folgen chronisch-rezidivierender Verläufe sind:

- Bulbusatrophie (im Endstadium Phthisis bulbi)
- chronische Hornhautentzündungen
- hintere und (seltener) vordere Synechien
- Irisresiduen auf der Linsenvorderfläche
- Präzipitate auf der Linsenrückfläche
- bläschenförmige „Katarakt“ (meist Linsenrückfläche, selten Vorderfläche)
- von der Kapsel (besonders Synechien, Präzipitaten) ausgehende, zunehmende Kataraktbildung
- Linsenluxationen oder -subluxationen

- Glaskörperverflüssigung und zunehmende diffuse, gelbliche Glaskörpertrübung
- zunehmende Glaskörpereinlagerungen (fusselig, wolkig, membranös, strangartig)
- Netzhautablösungen (peripapillare Streifen, blasige Abhebungen, vollständige Ablatio retinae)
- chorioretinitische Narben (meist peripapillär)
- selten Sekundärglaukom

2.1.3 Einteilung der ERU

WOLLANKE (2002) teilt die ERU in a) vordere Uveitiden, mit serofibrinösen, seltener serohaemorrhagischen oder leukozytenreichen (Hypopyon) Ergüssen sowie b) intermediäre Uveitiden mit weniger schmerzhaften Verläufen und c) Panuveitiden, ein. Da die hinteren Augensegmente nicht sensibel innerviert sind, können unbemerkt vollständige Erblindungen eintreten, ohne dass Entzündungsschübe bemerkt werden (ERRINGTON, 1941; BRUNS, 1967; STADES et al., 1996).

2.1.4 Ursachen der ERU beim Pferd

Es wurden infektiöse als auch nicht infektiöse Ursachen beschrieben. WOODS und CHESNEY (1930 u. 1931) vermuteten nach Infektionsversuchen mit Kammerwasser ein „filtrierbares Virus“ als Auslöser der ERU. Verschiedene bakterielle und virale Infektionen einschließlich systemischer Erkrankungen wurden mit der Uveitis in Verbindung gebracht (RIIS, 1981; BURGESS et al., 1986; MILLER u. WHITLEY, 1987; DAVIDSON, 1991, 1992; BARNETT et al., 1995; WOLLANKE, 1995). Nachdem sich viele der beschriebenen ursächlichen Faktoren nicht nachweisen ließen (ATTENBURROW et al., 1983; WOLLANKE et al., 1998), wurde in der Literatur angegeben, die Ätiologie der ERU bleibe in der Regel ungeklärt (BISTNER u. SHAW, 1980; HINES, 1984; DEEG et al., 2004). DEEG et al. (2001) wiesen Autoimmunreaktionen gegen retinale Antigene bei ERU-Patienten nach und schon früher wurden autoimmun vermittelte Geschehen als Ursache der ERU vermutet (STUBBS u. LOVE, 1941; MILLER u. WHITLEY, 1987; MAIR u. CRISPIN, 1989). Die Anzeichen der Autoimmunerkrankung werden von WOLLANKE (2002) als Epiphänomene gewertet, da nach Vitrektomien keine Entzündungsschübe mehr auftreten.

Als Ergebnis ihrer umfangreichen Untersuchungen sieht WOLLANKE (2002) die ERU als Folge einer intraokular persistierenden Leptospireninfektion an. In 22 % bis über 50 % der an ERU erkrankten Augen konnten in allen Krankheitsstadien Leptospiren aus intraokularen Proben nachgewiesen werden (BREM et al., 1999a; FABER et al., 2000; WOLLANKE 2002) während bei früheren Untersuchungen der Lebendnachweis oft scheiterte (BOHL u. FERGUSON, 1952; HEUSSER, 1952; KEMENES u. TAMAS, 1952; BRYANS, 1955; TOMASEK, 1954; KEMENES et al., 1961; MORTER et al., 1964; WILLIAMS, 1968). Die PCR verlief bei etwa 70 % der Proben aus an ERU erkrankten Augen positiv (FABER et al., 2000; WOLLANKE, 2002). In fast allen betroffenen Augen waren in der MAR Antikörpertiter nachweisbar und die Spezifität der Antikörper entsprach in 96 % der angezüchteten Serogruppe.

Antikörpertiter gegen Leptospiren waren in der MAR im Glaskörper von an ERU erkrankten Pferden signifikant höher als in den zugehörigen Serumproben. Über den Vergleich des Antikörpergehaltes von Serum und Kammerwasser in Bezug auf den Immunglobulingehalt in diesen Flüssigkeiten (mittels Bildung eines modifizierten Goldmann-Witmer-Koeffizienten) wurde in 94 % der untersuchten an ERU erkrankten Augen eine intraokulare Antikörperproduktion bestätigt (WOLLANKE, 2002). Diese gilt daher als eine durch die intraokulare Leptospireninfektion induzierte und gegen den Erreger gerichtete Reaktion (WOLLANKE, 2002), während HALLIWELL und HINES (1985) sowie EULE et al. (1999) die intraokular vorhandenen Antikörper auf eine erhöhte Gefäßpermeabilität in erkrankten Augen zurückführten.

KEMENES et al. (1961) untersuchten Glaskörper und Kammerwasser aus 366 gesunden Augen auf Antikörper gegen Leptospiren, allerdings nur gegen *Leptospira pomona*. Bei diesen Untersuchungen waren keine Antikörper nachweisbar. GSELL et al. (1946) fanden bei Kammerwasseruntersuchungen von gesunden Augen (n = 7) mit der MAR in zwei Proben Antikörpertiter ab 1:100. Bei anderen Autoren, die nur wenige gesunde Augen untersuchten, verliefen die Antikörperbestimmungen negativ (HEUSSER, 1948; BRYANS, 1955). In neuerer Zeit wurde nur eine geringe Anzahl gesunder Augen auf Antikörper gegen Leptospiren bzw. in der Kultur (WOLLANKE, 2002) oder der PCR (FABER et al., 2000) direkt auf diesen Erreger untersucht. WOLLANKE (2002) wies in 7,5 % der ophthalmologisch gesunden Augen Antikörper in der MAR nach, was in etwa der in der Literatur angegebenen Häufigkeit des

Auftretens der ERU entspricht (CROSS, 1966; GELATT, 1972; BISTNER u. SHAW, 1980; LAVACH, 1990; SPIESS, 1997; SZEMES u. GERHARDS, 2000). Eine von 29 Kammerwasserproben aus ophthalmologisch gesunden Augen zeigte in der PCR einen positiven DNA-Nachweis (FABER et al., 2000). Kulturversuche mit intraokularen Proben aus 41 gesunden Augen waren nach WOLLANKE (2002) in allen Ansätzen negativ.

2.1.5 Diagnose

Meist kann die Diagnose ERU präoperativ durch eine gewissenhafte Anamneseerhebung und klinische Untersuchung mit dem Ophthalmoskop gestellt werden. Die Untersuchung von Kammerwasser mittels MAR auf Antikörper von Leptospiren wird in unklaren Fällen als brauchbare Methode zur Diagnose der ERU angesehen (WOLLANKE, 2002).

Serumuntersuchungen sind für die Ätiologie einer Uveitis beim Pferd wenig aussagekräftig. Von 796 Pferden (664 mit ERU, 132 ohne ERU) wiesen über 80 % der Pferde in der MAR einen Antikörpertiter von 1:100 oder höher auf, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen bestand (WOLLANKE, 2002). Ähnliche Ergebnisse erhielten FABER et al. (2000) bei 40 Pferden (28 mit ERU, 16 ohne ERU).

2.1.6 Differenzialdiagnose

Differenzialdiagnostisch muss an andere schmerzhaftes Augenerkrankungen gedacht werden. Etwa 90–95 % aller schmerzhaften Augenerkrankungen von Pferden sind entweder eine Uveitis oder eine Keratitis (REBHUN, 1979). Beim Vorliegen eines Glaukoms bei Pferdeaugen handelt es sich häufig um ein sekundäres Geschehen nach Uveitis (GILGER, 2003). Allerdings waren nur bei 14 % der an Glaukom erkrankten Augen intraokulare Antikörper gegen Leptospiren nachweisbar. WOLLANKE (2002) vermutet bei diesen Pferden neben ungewöhnlichen Verläufen von Uveitiden, z. T. andere Erreger oder eine anhaltende Immunreaktion nach Erregereliminierung als Auslöser für diese Krankheit.

2.1.7 Pathogenese

BREM (1999a) und WOLLANKE (2002) zeigen mögliche Pathomechanismen für Rezidive der ERU auf, die wie folgt zusammengefasst werden können:

Es wird vermutet, dass die Leptospiren im Stadium der Leptospirämie in das Auge gelangen und dort vor humoralen Antikörpern geschützt sind, deren Entstehen im Zuge der Leptospirämie zu erwarten ist (BREM, 1999a). Leptospiren können über Jahre im Glaskörper persistieren und auch bei klinisch gesunden Augen, die vorberichtlich Anzeichen für eine akute Uveitis zeigten, nachgewiesen werden. Durch langsame Vermehrung der Keime könnten eine zunehmende Schädigung intraokularer Gewebe und die Wahrnehmung der Leptospiren durch die körpereigene Abwehr erfolgen. Die dadurch einsetzende intraokulare Antikörperproduktion zusammen mit der aktiven Gewebs- und Zellschädigung durch Leptospiren würde sich dann als klinisch sichtbare Uveitis zeigen. Es wäre möglich, dass Leptospiren nur bis zur Einstellung des immunologischen Gleichgewichts eliminiert würden und eine Maskierung der Leptospiren in Glaskörperfibrillen, Hyalozyten und Fibrin stattfände (WOLLANKE, 2002). Ein weiterer Entzündungsschub könnte durch die erneute Vermehrung der Leptospiren erfolgen.

2.1.8 Therapie und Prognose

Die konservative Therapie mit Mydriatika (Atropin-Augensalbe) und Antiphlogistika (Dexamethason-Augensalbe, Phenylbutazon systemisch) ist beim akuten Schub das Mittel der Wahl, kann aber die Erblindung meist nicht dauerhaft verhindern (GERHARDS und WOLLANKE, 2001). Wiederkehrende Uveitisschübe und damit verbundene Schädigungen können durch die Vitrektomie höchst effektiv verhindert werden. Bei rechtzeitiger Operation besteht eine sehr gute Prognose für den Erhalt der Sehfähigkeit (GERHARDS u. WOLLANKE, 1996; WINTERBERG, 1997; WINTERBERG u. GERHARDS, 1997; FRÜHAUF et al., 1998; GERHARDS et al., 1998, 1999; WOLLANKE et al., 2001). Kammerwasseruntersuchungen von Augen, die in unterschiedlichen Abständen vor der Kammerwasseruntersuchung vitrektomiert worden waren, zeigten, dass die hohen Leptospirenantikörpertiter stark vermindert oder nicht mehr vorhanden waren. Dieser Befund ist nur durch eine Elimination der Leptospiren aus dem Glaskörperaum durch die Vitrektomie zu erklären (WOLLANKE, 2002). Therapieversuche mit Antibiotika blieben erfolglos (HEUSSER, 1952; TOMASEK, 1954; ROBERTS, 1958), während DIXON und COPPACK (2002) von erfolgreichen intravitrealen und subkonjunktivalen

Injektionen von Ceftazidime, einem Cephalosporin der dritten Generation, berichten, ohne allerdings nähere Angaben zu machen. Bei Versuchen mit der intraokularen Verbringung eines Cyclosporin A (ein Immunsuppressivum) abgebenden Implantats über Sklerotomie traten bei 3 von 16 Pferden Rezidive auf (GILGER et al., 2001).

2.2 Auge und Immunreaktion

Das innere Auge ist ein immunologisch privilegierter Ort, da bestimmte im Auge befindliche Strukturen für die Immunerkennung schlechter zugänglich sind, als im gut durchbluteten Gewebe. Es gibt verschiedene Mechanismen, die unerwünschte oder überschießende Entzündungen verhindern oder abmildern (NUSSENBLATT u. GERY, 1996). COUSINS et al. (1991) erwähnen z. B., dass Kammerwasser von Menschen, Ratten und Mäusen eine hohe Konzentration eines Zytokins (transforming growth factor- β , TGF- β) enthält. ALLEN et al. (1996) wiesen die immunsupprimierende Wirkung von TGF- β 2 in der vorderen Augenkammer nach. Allogene Transplantate überleben in der vorderen Augenkammer länger als an anderen Orten des Körpers, was auf eine Supprimierung der T-Zell-Antwort zurückgeführt wird. (NUSSENBLATT u. GERY, 1996).

2.3 Leptospiren

2.3.1 Taxonomie

Leptospiren werden in der Bakterientaxonomie von GARRITY et al. (2001) wie folgt eingeteilt:

Reich: Bacteria

Abteilung: Spirochaetes

Ordnung: Spirochaetales

Familie: Leptospiraceae

Gattung: *Leptospira*

Leptospiren wurden bis 1989 in die pathogene Spezies *Leptospira interrogans* und die apathogene Spezies *Leptospira biflexa* eingeteilt. Die Spezies *Leptospira interrogans* ließ sich in

über 200 Serovare weiter unterteilen. Einzelne Serovare wurden aufgrund ihrer antigenetischen Eigenschaften in Serogruppen zusammengefasst, die taxonomisch keine Bedeutung haben. Einige Serovare mit ihrer Serogruppen-Zugehörigkeit sind in Tabelle 2.1. gezeigt (LEVETT, 2001).

Auf Grund molekular-biologischer Untersuchungen wird die Gattung *Leptospira* heute in Genospezies eingeteilt, die z. T. sowohl pathogene als auch nicht pathogene Serovare beinhalten (LEVETT, 2001; vgl. NCBI-Taxonomiebrowser). Solange keine einfachen (für klinische Labors nutzbare) auf DNA-Ebene arbeitenden Testmethoden vorhanden sind, ist eine Beibehaltung der Einteilung in Serogruppen mit ihren Serovaren für klinische Labors sinnvoll (LEVETT, 2001).

Tab. 2.1.: Einige Serogruppen mit einigen zugehörigen Serovaren von *L. interrogans* (LEVETT, 2001).

Serogruppe	Serovar
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>icterohaemorrhagiae, copenhageni</i>
<i>Pyrogenes</i>	<i>pyrogenes</i>
<i>Grippotyphosa</i>	<i>grippotyphosa</i>
<i>Canicola</i>	<i>canicola</i>
<i>Australis</i>	<i>australis, bratislava</i>
<i>Pomona</i>	<i>pomona</i>
<i>Javanica</i>	<i>javanica</i>
<i>Sejroe</i>	<i>sejroe, saxkoebing, hardjo</i>
<i>Tarassovi</i>	<i>tarassovi</i>

2.3.2 Morphologie

Leptospiren sind schraubenförmig gewundene gramnegative Bakterien. Die Länge beträgt 6–20 µm bei einem Durchmesser von 0,1–0,15 µm (FAINE et al., 2000). Sie bestehen aus einem Protoplasmazyliner, der sich um ein zentrales Axialfilament windet, und einer äußeren Hülle. Die Enden sind in flüssigem Medium hakenförmig eingebogen oder knopfartig verdickt, was ihnen ein kleiderbügel- oder spazierstockähnliches Aussehen verleiht (JOHNSON u. FAINE, 1984; SELBITZ, 2001).

2.3.3 Motilität

In flüssigen Medien sind Leptospiren aktiv beweglich. Bei zunehmender Viskosität des Mediums führen Leptospiren auch bohrende Bewegungen aus (JOHNSON u. FAINE, 1984; FAINE, 1994).

2.3.4 Übertragungswege und Tenazität

Pathogene Leptospiren siedeln und vermehren sich im proximalen Tubuluskonvolut der Niere (JOHNSON u. FAINE, 1984; WADA et al., 2003). Die Ausscheidung erfolgt über den Urin (JOHNSON u. FAINE, 1984) aber auch über Fruchtwasser, Nachgeburt, Milch, Sperma und Speichel. Eine direkte Übertragung von Tier zu Tier ist selten (ROLLE u. MAYR, 1993). Neben wilden und domestizierten Tieren stellen insbesondere Nagetiere Reservoirwirte ohne klinische Erscheinung dar (ROLLE u. MAYR, 1993; QUINN et al., 1994). Leptospiren sind in der Lage, in Wasser wochenlang zu überleben (HAHN, 1991). Durch Eintrocknung, in saurem und alkalischem Milieu und bei hohen Temperaturen gehen sie zu Grunde (ROLLE u. MAYR, 1993).

2.3.5 Klinik

Die Mehrzahl der Leptospireninfektionen bei Pferden verläuft klinisch inapparent und wird erst durch serologische Untersuchungen erkannt. Allerdings können Leptospiren Allgemeininfektionen mit Anämie, Organschädigungen und Aborten verursachen (SELBITZ, 2001).

Nach experimentellen Infektionen von 18 Pferden wurden bei 22 von 36 Augen Veränderungen beobachtet. Die Beschreibung der Symptome und Verläufe gleichen nahezu exakt mit denen der ERU (WILLIAMS et al., 1971). WILLIAMS et al. (1971) stellten bei experimentell infizierten Ponys erst am fünfzigsten Tag nach Infektion Augenveränderungen fest, während die Anzüchtung von Leptospiren aus dem Blut nur bis zum neunten Tag gelang. Ähnliche Verläufe werden von ROBERTS (1958) berichtet: Pferde, bei denen eine Leptospirose als systemische Erkrankung (Fieber, Ikterus, Apathie, Leptospirenantikörpertiter-Anstieg im Serum) diagnostiziert wurde, zeigten z.T. erst nach Jahren typische Anzeichen einer Uveitis. WOLLANKE (2002) berichtet, dass in 144 der 187 positiven Kulturen aus Glaskörperproben Leptospiren der Serogruppe *Grippotyphosa* oder *Australis* nachweisbar waren.

2.3.6 Pathogenese

Leptospiren können durch die Schleimhaut in die Blutbahn eindringen (QUINN, 1994; SELBITZ, 2001). Bis zu neun Tagen nach experimenteller Infektion lassen sich Leptospiren aus dem Blut anzüchten (WILLIAMS et al., 1971). Sie können Gewebe mechanisch penetrieren und ohne Irritation ins Auge gelangen (BARKAY u. GARZOZI, 1990). Durch Eigenbewegungen können Leptospiren aktiv in das Zytoplasma der Wirtszellen eindringen (THOMAS u. HIGBIE, 1990). Die Erreger konnten intrazellulär in Epithelzellen der Nierentubuli nachgewiesen werden (BARNETT et al., 1999). Im Auge könnten Hyalozyten Leptospiren beherbergen (WOLLANKE, 2002).

Hämolysine, Lipasen und Lipopolysaccharide werden als Virulenzfaktoren angegeben (SELBITZ, 2001; HORSCH u. NATTERMANN, 1999). Die direkt gewebescheidigende Wirkung ist bei Leptospiren allerdings nur schwach ausgeprägt, schädigende Wirkungen erfolgen in erster Linie indirekt durch die Entzündungsantwort der Wirte auf die Infektion (FAINE et al., 2000).

Gewöhnlich kommt es innerhalb der ersten Woche (drei bis zehn Tage) post infectionem zum Auftreten der ersten Antikörper, die in zwei bis drei Wochen ihre maximale Konzentration erreichen. Sie sinken im Verlauf einiger Wochen oder Monate langsam auf einen niedrigen Spiegel ab, der lebenslang nachweisbar sein kann (ROBERTS, 1958; FAINE, 1994).

Leptospiren induzieren eine Apoptose der Makrophagen (MERIEN et al., 1997) und besitzen vermutlich antiphagozytische Komponenten auf der äußeren Hülle (MCGRAWTH et al., 1984). Außerdem besitzen Leptospiren, die mit dem Urin ausgeschieden werden, eine Hülle aus wirtseigenen Proteinen oder Polysacchariden. Diese verhindern eine Agglutination durch spezifische Antikörper. Jahre nach einer Infektion lassen sich Leptospiren in den proximalen Nierentubuli, nicht aber im Blut nachweisen (FAINE, 1994). NIEDERMAIER (2002) entdeckte bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Glaskörpern bei zwei Pferden mit ERU leptospirenähnliche Gebilde, die anstatt der leptospireneigenen Hülle eine homogene feinkörnige Masse aufwiesen. Sie bemerkt, dass diese Hülle ein Bestehen von vitalen Leptospiren in der Umgebung von Antikörpern erklären könnte.

2.3.7 Nachweis von Leptospireninfektionen

2.3.7.1 Antikörpernachweis

MAR:

Die Mikroagglutinationsreaktion, bei der agglutinierende Antikörper gegen Leptospiren nachgewiesen werden, ist eine sehr sensitive serologische Nachweismethode, hat eine hohe Spezifität für den Nachweis von gruppenspezifischen Antikörpern und gilt als Gold-Standard für die Leptospirendiagnostik (LEPTOSPIROSIS REFERENCE LABORATORY, 2003). Antikörpertiter in Kammerwasser und Glaskörper entsprechen sich (WOLLANKE, 2002). Eine mögliche Erklärung für Kreuzreaktionen zwischen Leptospiren verschiedener Serogruppen (FAINE, 1982) sind gemeinsame, genuspezifische Antigenstrukturen der Leptospiren (FATHALLA u. COGHLAN, 1980).

PARMA et al. (1985) und LUCCHESI et al. (2002) berichten von Ähnlichkeiten zwischen bestimmten Antigenen der Hornhaut und von Leptospiren. Es zeigte sich aber, dass dieses Antigen bei Leptospiren intrazellulär liegt. Antikörper, die an das Hornhautantigen binden, reagieren nicht mit intakten Leptospiren (PARMA et al., 1997). Versuche, mittels Western-Blot-Analyse eine Antigenverwandtschaft zwischen Leptospiren (Serovare *grippotyphosa*, *icterohaemorrhagiae* und *pomona*) und intraokularen Strukturen (Hornhaut, Linse, Glaskörper und Netzhaut) nachzuweisen, blieben erfolglos (WOLLANKE et al., 2000).

ELISA:

Untersuchungen mit der ELISA- Technik liefern beim Nachweis von Leptospiren-Antikörpern vergleichbare Ergebnisse wie die MAR, sind jedoch etwas sensitiver (BREM et al., 1999b). Der IgM-Nachweis kann, auch bei negativer MAR, ein Zeichen für eine frische Infektion mit Leptospiren darstellen (BERNARD, 1993; LEPTOSPIROSIS REFERENCE LABORATORY, 2003). Mittels IgM- und IgG-Nachweis lassen sich Infektionszeitpunkt und -verlauf genauer bestimmen (KETTNER, 1997). Allerdings gilt der ELISA als zeitaufwändig und teuer (BREM et al., 1999b; LEPTOSPIROSIS REFERENCE LABORATORY, 2003). Dem Autor sind nur wenige Berichte von ELISA-Untersuchungen an intraokularen Proben aus Pferdeaugen mit ERU bekannt (PARMA et al., 1987; BREM et al. 1999a). KETTNER (1997) beschreibt die Etablierung eines IgM- und IgG-ELISA zum Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen *Leptospira interrogans* Serovare *grippotyphosa*, *hardjo* und *saxkoebing* anhand von Serumuntersuchungen bei Pferden.

2.3.7.2 Erregernachweis*Kultur:*

Der kulturelle Nachweis von Leptospiren kann bis zu zwei Monate beanspruchen (FAINE, 1982; BREM et al., 1988). Die Anzucht erfolgt in flüssigen oder halbflüssigen Nährmedien mit Serum- oder Albuminzusatz bei einer Temperatur von 28–30 °C im aeroben bzw. mikroaerophilen Milieu (FAINE, 1994; SELBITZ, 2001). Das langsame Wachstum erfordert den Zusatz von Hemmstoffen wie 5-Fluoracil oder Vancomycin (SELBITZ, 2001). Für die Kultivierung eignen sich die serumenthaltenden Medien nach Korthof, Stuart und Fletcher sowie das Tween-Albumin enthaltende Medium nach Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) (FAINE, 1994; SELBITZ, 2001). Nach der Anzucht können Leptospiren weiter kultiviert und typisiert werden (BREM et al., 1998).

PCR:

Mittels PCR gelingt die Identifizierung von leptospiraler DNA in Blut, Liquor und Kammerwasser am Tag des Auftretens klinischer Symptome sowie bis zu zwei Monate nach erfolgter Infektion (MERIEN et al., 1995). Der große Nachteil der PCR-Methoden ist, dass sie bislang meist keine Serovarspezifität besitzen (LEVETT, 2001), wohingegen das LEPTOSPIROSIS REFERENCE LABORATORY (2003) ebenso wie FABER et al. (2000) einen großen Vorteil der PCR darin sieht, dass der Nachweis schon kurz nach der Infektion erfolgen kann. Außerdem zeigt sich die PCR im Vergleich zur Kultur als sensitiver und schneller (FABER et al., 2000; WOLLANKE, 2002).

Andere Untersuchungsmethoden:

Erregernachweise können auch histologisch, elektronenmikroskopisch oder mittels Tierversuch geführt werden (ELLIS et al., 1983; FAINE, 1994; MILLER und WILSON, 1962; WILLIAMS et al., 1981; SELBITZ, 2001).

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Untersuchungsgut

Das Untersuchungsgut umfasste Proben aus ophthalmologisch gesunden Augen von Pferden, die in der Pferdeabteilung der Chirurgischen oder Gynäkologischen Tierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München vorgestellt wurden. Zusätzlich wurden Proben von frisch geschlachteten Pferden entnommen (Metzgerei Wörle, Widenzhausen; Metzgerei Beerwart, Waiblingen).

Insgesamt wurden intraokulare Proben aus 168 gesunden Augen von 100 Pferden untersucht:

- 70 euthanasierte (Eutha[®] 77, Essex) oder geschlachtete augengesunde Pferde
- 2 Pferde mit einseitiger rezidivierender Keratitis
- 28 Pferde mit einseitiger ERU

Zur Kontrolle der Testdurchführung konnte Glaskörpermaterial von 14 an ERU erkrankten Augen auf Leptospiren untersucht werden. Zusätzlich wurde noch Serum von 71 augengesunden und 25 Pferden mit ERU auf Leptospirenantikörper getestet. Die nicht an ERU erkrankten Pferde (30 Stuten, 35 Wallache, 7 Hengste) befanden sich im Alter von 5 Tagen (4 Fohlen) bis 29 Jahren ($\bar{\mu} = 9,9$ Jahre; $s = 6,5$) und die an ERU erkrankten (13 Stuten, 19 Wallache, 1 Hengst) zwischen 3 und 16 Jahren ($\bar{\mu} = 8,0$ Jahre; $s = 3,9$). Die Pferde kamen überwiegend aus der Bundesrepublik Deutschland, aber auch aus Österreich, der Schweiz, Holland, Tschechien und England.

3.2 Anamnese

Soweit möglich, wurde anamnestisch eine vorhergehende Augenerkrankung oder -reizung ausgeschlossen. Bei den Pferden mit ERU wurden, soweit nachvollziehbar, die Dauer der Erkrankung und ggf. Anzahl und Schwere der Entzündungsschübe festgehalten.

3.3 Augenuntersuchung

Die Augenuntersuchung wurde bei toten Pferden direkt nach der Euthanasie oder Schlachtung durchgeführt. Bei lebenden Pferden erfolgte die Untersuchung im abgedunkelten Raum bei weit gestellter Pupille. Bei Bedarf wurde ein Mydriatikum (Tropicamid) appliziert. Augenumgebung, Lider, Bindehaut, Hornhaut, vordere Augenkammer und Linsenvorderfläche wurden mit einer fokalen Lichtquelle untersucht. Die Untersuchung von Linsenrückfläche, Glaskörperraum und Augenhintergrund erfolgte mit einem Ophthalmoskop.

3.4 Einteilung der Pferdeaugen anhand ihrer klinischen Befunde

3.4.1 Gesunde

Augen, bei denen ophthalmoskopisch keine krankhaften Veränderungen erkennbar und bei denen vorberichtlich keine Krankheiten bekannt waren.

3.4.2 ERU

Augen, bei denen ophthalmoskopisch sichere Anzeichen für eine ERU bestanden (siehe 2.1.2).

3.5 Probengewinnung

Alle Proben wurden unter sterilen Kautelen entnommen.

3.5.1 Serumproben

Serumproben wurden im Rahmen der Euthanasie oder der Vollnarkose im Zuge der ohnehin erforderlichen Venenpunktion mit Blutabflußüberprüfung (Venenkatheter vor Euthanasie oder Narkoseeinleitung) oder direkt nach der Schlachtung entnommen.

3.5.2 Kammerwasser- und Glaskörperproben

3.5.2.1 Euthanasie oder Schlachtung

Glaskörper- (GK) und Kammerwasserproben (KW) wurden von augengesunden Pferden unmittelbar nach der Euthanasie mit Pentobarbital-Na (Eutha[®] 77 100 ml/Pferd, Essex) oder Schlachtung, die nicht wegen Augenerkrankungen erforderlich waren, entnommen. Kammerwasserproben wurden mittels limbaler Parazentese der vorderen Augenkammer über eine Kanüle (27 G $\frac{3}{4}$, Dispomed) gewonnen (Tunnelstich in der Hornhaut). Das meist relativ zähe Glaskörpermaterial konnte über einen großlumigen Venenverweilkatheter (12 G, Vygon), der an der wenig durchbluteten Stelle des Zuganges für die Pars-plana-Vitrektomie etwa 14 mm vom Limbus entfernt ins Augeninnere eingebracht wurde, abgesaugt werden. Eine gewissenhafte Desinfektion der Einstichstelle war am toten Pferd möglich.

3.5.2.2 Therapeutische und diagnostische Eingriffe

Therapeutische Eingriffe waren Vitrektomien oder Parazentesen, die in der Pferdeabteilung der Chirurgischen Tierklinik der LMU München durchgeführt wurden. Zu Operationsbeginn konnten über einen Dreiwegehahn unproblematisch 3 ml unverdünnter und steriler GK zu diagnostischen Zwecken entnommen werden. Bei der Parazentese der vorderen Augenkammer wurde zu diagnostischen Zwecken bzw. zur Vorsorgeuntersuchung 0,5–1 ml KW aus dem jeweils ophthalmologisch gesunden Auge von Pferden, die mit ERU oder Verdacht auf ERU an einem Auge in Vollnarkose operiert werden mussten, abgesaugt.

3.6 Untersuchung der entnommenen Proben auf Leptospiren

Die Proben wurden mittels MAR (Mikroagglutinationsreaktion) und ELISA auf Leptospirenantikörper und in der Kultur und der PCR direkt auf Leptospiren untersucht. Mikroagglutinationsreaktion, ELISA und kulturelle Untersuchungen wurden unter Anleitung und Hilfe des Leiters des Leptospirenlabors Dr. Brem und Mitarbeiter(inne)n im Landesamt für das Gesundheitswesen und Lebensmittelsicherheit Südbayern selbst durchgeführt. Für die PCR wurde Probenmaterial an das Vet-Med-Labor (Institut für klinische Prüfung, Ludwigsburg GmbH, Veterinärmedizinisches Labor, zertifiziert nach DIN EN ISO/IEC 17025) versandt und

dort ohne Mitbeteiligung des Autors auf Leptospiren-DNA getestet. Die Nachweise von Antikörpern in der MAR und lebenden Leptospiren in der Kultur erfolgten nach den Empfehlungen des Office International des Epizooties (OIE, 2000) und der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM, 1984), Antikörpernachweise im ELISA nach KETTNER (1997). Das Vet-Med-Labor in Ludwigsburg entwickelte die PCR anhand den Berichten von MERIEN et al. (1992, 1995).

3.6.1 MAR

3.6.1.1 Untersuchungsgut

Intraokulare Proben

- Proben aus 168 gesunden Augen von 100 Pferden
 - KW aus 138 gesunden Augen von 70 mit Eutha[®] 77 (100 ml/Pferd, Essex) euthanasierten oder geschlachteten Pferden
 - KW aus 2 gesunden Augen von Pferden mit einseitiger Keratitis, entnommen im Zuge einer diagnostischen Parazentese
 - KW aus 28 gesunden Augen von Pferden mit einseitiger ERU, entnommen im Zuge einer diagnostischen Parazentese
- 14 GK-Proben aus an ERU erkrankten Augen von 14 Pferden

Serumproben

- 71 Proben von „augengesunden“ Pferden
- 25 Proben von an ERU erkrankten Pferden

3.6.1.2 Einleitung

In einem Vorversuch, der als Screening-Test diente, wurden lebende Leptospiren (WHO-Standardstämme) mit den Proben zusammengebracht. Enthielt die Probe Antikörper gegen Leptospiren, erfolgte eine Agglutination der Leptospiren. Über eine Verdünnungsreihe konnte dann im Hauptversuch der Antikörpertiter, der ab einem Titer von 1:100 als positiv bewertet wurde (BERNARD, 1993; SELBITZ, 2001; WOLLANKE, 2002), bestimmt werden. Es wurde

die maximal gemessene Titerstufe in die Ergebnisse mit einbezogen. Wurden bei einer Probe Antikörper gegen mehrere Serovare mit gleicher Titerhöhe nachgewiesen, gingen diese bei der Bewertung der Häufigkeit des Auftretens eines Serovars zu gleichen Anteilen in die Untersuchung mit ein. Für die Auswertung wurden die Antikörpertiter z. T. logarithmisch in ganze Zahlen umgewandelt. Es ergeben sich damit für die einzelnen Antikörpertiter die in Tab. 3.1. aufgeführten Werte.

Tab. 3.1.: Antikörpertiter und entsprechende ganze Zahlen für die statistische Auswertung. Negative Titer wurden mit -1 angegeben.

Titer	Negativ	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400
Logarithmische Kodierung	-1	0	1	2	3	4	5	6

3.6.1.3 Material

Proben (Serum/KW/GK)

Leptospiren in Flüssignährmedium

- *Leptospira interrogans* Serovar *hardjo* = hard
- *Leptospira interrogans* Serovar *canicola* = can
- *Leptospira interrogans* Serovar *grippotyphosa* = gripp
- *Leptospira interrogans* Serovar *icterohaemorrhagiae* = ict
- *Leptospira interrogans* Serovar *pomona* = pom
- *Leptospira interrogans* Serovar *bratislava* = brat
- *Leptospira interrogans* Serovar *saxkoebing* = sax
- *Leptospira interrogans* Serovar *sejroe* = sej
- *Leptospira interrogans* Serovar *tarassovi* = tar
- *Leptospira interrogans* Serovar *australis* = aust
- *Leptospira interrogans* Serovar *javanica* = jav
- *Leptospira interrogans* Serovar *pyrogenes* = pyr

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

- 8,5 g Natriumchlorid (NaCl; Merck, 6404)
- 0,85 g di-Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$; Merck 6580)
- 0,25 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4 ; Merck 4873)
- ad 1000 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$.

Mikrotiterplatte (8 x 12 Vertiefungen, flach; Sarstedt, Nümbrecht 82.1584)

Dunkelfeldmikroskop (Labolux K, Leitz, Wetzlar)

Schüttelapparat (DSG-Titertek, Flow Laboratories)

3.6.1.4 Durchführung*Vorversuch:*

Es wurden 40 μl einer Probe mit 980 μl PBS vermischt (1:25) und 50 μl der jeweiligen Probenverdünnung senkrecht in je 8 Cups einer Mikrotiterplatte pipettiert. Nach Zugabe der Leptospirenstämmen (50 μl) wurden die Platten auf dem Schüttler gemischt und eine Stunde bei 30 °C inkubiert (pro Mikrotiterplatte konnten 12 Proben auf 8 Serovaren untersucht werden). Im Dunkelfeld wurde bei 100facher Vergrößerung überprüft, ob eine Agglutination der Stämme zu erkennen war. Waren über 50 % der Leptospiren agglutiniert, galt dies **im Vorversuch** als positiver Nachweis (bei einer Verdünnung von 1:50).

Hauptversuch:

Fünfundzwanzig μl der im Vorversuch als positiv bestimmten Proben wurden mit 575 μl PBS verdünnt (1:12,5) und daraus in Mikrotiterplatten Verdünnungsreihen erstellt (1:12,5 bis 1:1600). In Einzelfällen war eine weitere Verdünnung der Proben über 1:1600 hinaus erforderlich. Durch Zugabe einer aliquoten Menge an lebenden Leptospiren in Flüssigmedium entstanden Endverdünnungen von 1:25 bis 1:3200. Nach dem Durchmischen auf dem Schüttler und einer Stunde Inkubationszeit bei 30 °C wurde unter dem Dunkelfeldmikroskop (250fache Vergrößerung) die Probe auf Agglutination der Leptospiren überprüft und bewertet. Diejenige Serumverdünnung, bei der gerade noch eine 50 %ige Agglutination auftrat, stellte den Endtiter dar.

3.6.2 ELISA

3.6.2.1 Untersuchungsgut

Intraokulare Proben

- Proben aus 168 gesunden Augen von 100 Pferden
 - KW aus 138 gesunden Augen von 70 mit Eutha[®] 77 (100 ml/Pferd, Essex) euthanasierten oder geschlachteten Pferden
 - KW aus 2 gesunden Augen von Pferden mit einseitiger Keratitis, entnommen im Zuge einer diagnostischen Parazentese
 - KW aus 28 gesunden Augen von Pferden mit einseitiger ERU, entnommen im Zuge einer diagnostischen Parazentese
- 14 GK-Proben aus an ERU erkrankten Augen von 14 Pferden

3.6.2.2 Einleitung

Es wurde ein indirekter ELISA mit antigenbeschichteten Mikrotiterplatten durchgeführt. Nach Zugabe der Probe bilden in der Probe vorhandene Antikörper mit dem Antigen einen Antigen-Antikörper-Komplex. Diese Antigen-Antikörper-Komplexe können dann mittels enzymmarkierter Anti-Antikörper über eine enzymatische Reaktion, die eine Farbveränderung bewirkt, im Photometer nachgewiesen werden.

Bei der Ausführung des ELISA wurden die Mikrotiterplatten mit Vollantigen von den intraokular am häufigsten vorkommenden Serogruppen *Grippotyphosa* (Serovar *grippotyphosa*) und *Australis* (Serovar *bratislava*) beschichtet. Es wurden je Probe zwei Ansätze mit antigenbeschichteten Cups einer Mikrotiterplatte und daneben zwei Ansätze in Cups ohne Antigenbeschichtung durchgeführt. Als Positiv- bzw. Negativproben dienten bekannt positive bzw. negative Kammerwasserproben vom Landesamt für das Gesundheitswesen Südbayern. Als Konjugate kamen Peroxidase-markierte Kaninchen-anti-Pferd-IgM und Ziegen-anti-Pferd-IgG zum Einsatz.

3.6.2.3 Material

Antigen (Leptospiren-Vollantigen, *Leptospira interrogans* Serovar *grippotyphosa* und *Leptospira interrogans* Serovar *bratislava*, hergestellt vom Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Südbayern wie bei KETTNER (1997) beschrieben)

Immuno-Platten-Microlon (8 x 12 Vertiefungen, U-Form, Polystyrol, Greiner, 650061)

Carbonatpuffer, pH 9,6, 0,1 M

- 4,24 g Natriumcarbonat (Na_2CO_3 ; Merck 6392)
- 5,04 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3 ; Merck 6329)
- ad 1000 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$

Antigenverdünnungspuffer

- 152 mg Natriumtetrathionat-Dihydrat (= 5 mM) ($\text{Na}_6\text{O}_6\text{S}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$; Sigma S-5758)
- 78 mg Benzamidin-Hydrochlorid (=5 mM) ($\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_2 \times \text{HCl}$; Sigma B-6506)
- ad 100 ml Carbonatpuffer

Puffer A

- 1,725 g Natriumhydrogenphosphat-Monophosphat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$; Merck 6346)
- 13,400 g di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat ($\text{HNa}_2\text{O}_4\text{P} \times 12 \text{H}_2\text{O}$ (Merck 6579)
- 42,370 g Natriumchlorid (NaCl ; Merck 6404)
- 0,5 g Thimerosal (Sigma T-5125)
- ad 5000 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$

Waschpuffer

- Tween 20 (RdH Laborchemikalien 63158) + Puffer A = 1:1000

Blockpuffer

- Antigenverdünnungspuffer + Carbonatpuffer = 1:20

Konjugat

- Kaninchen-anti-Pferd-IgM (Rockland, 208-4307)
- Ziegen-anti-Pferd-IgG (KPL, 14-21-06, über Fa. Dunn, Oberschleißheim)

ABTS Peroxidase Substrat (KPL, 50-66-01, über Fa. Dunn, Oberschleißheim)

Stopplösung (Chekit, Nr. 14.991.0011)

Mikrotiterplattenwascher (Easy Washer SLT, Labinstruments)

Photometer (ELISA Processor II, Behring)

Vakuumschweißgerät (Multivac 380, 1mbar, Hörmannsdörfer)

3.6.2.4 Antigenbeschichtung der Mikrotiterplatten

Antigen wurde mit Antigenverdünnungspuffer im Verhältnis 1:10 verdünnt und die Cups der ungeraden Reihen der 96-Loch-Rundbodenplatten mit 100 µl der Verdünnung beschichtet, abgedeckt und 16–18 Stunden in der feuchten Kammer im Kühlschrank inkubiert. Nach Ausklopfen und viermaligem Waschen der Platten mit Puffer A wurden sie getrocknet, bei 1 mbar eingeschweißt und innerhalb von sechs Monaten verwendet. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

3.6.2.5 ELISA-Durchführung

Die zur Hälfte mit Antigen beschichteten 96-Loch-Rundbodenplatten wurden vollständig mit Blockpuffer beschickt (200 µl/Cup) und 45 min. bei Zimmertemperatur inkubiert, viermal gewaschen und ausgeklopft. Aus Probenmaterial und Antigenverdünnungspuffer wurde eine Probenverdünnung im Verhältnis 1:50 hergestellt, jeweils 100 µl der Probenverdünnungen in die vorgesehenen Cups gegeben und eine Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach viermaligem Waschen und anschließendem Ausklopfen der Platten wurden jeweils 100 µl des mit Antigenverdünnungspuffer angesetzten Konjugats (Anti-IgM 1:3000, Anti-IgG 1:3000) in die Vertiefungen gegeben und 30 min. bei Zimmertemperatur inkubiert, anschließend nochmals viermal gewaschen und ausgeklopft. Dann wurden 100 µl ABTS Peroxidase Substrat in die Cups gegeben und die Platten im Dunkeln bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach 30 min. erfolgten die Zugabe der Stopplösung (50 µl/Cup) und die Bestimmung der optischen Dichte (OD-Wert) im Photometer bei 492 nm. Durch Multiplikation der OD-Werte mit 1000 wurden ganzzahlige ELISA-Einheiten für die Auswertung errechnet.

3.6.2.6 ELISA-Auswertung

Für den Nachweis von Antikörpern wurden 100 Kammerwasserproben aus ophthalmologisch gesunden Augen, die in der MAR keinen Antikörpertiter aufwiesen, als negativ eingestuft. Aus dem Mittelwert der bei diesen Proben gemessenen ELISA-Einheiten zuzüglich der dreifachen Standardabweichung konnte der ELISA Grenzwert (Cut-off-Wert) berechnet werden (TIJSSEN, 1985).

3.6.3 Leptospirenkultur

3.6.3.1 Untersuchungsgut

Intraokulare Proben

- Proben aus 168 gesunden Augen von 100 Pferden
 - KW und GK aus 138 gesunden Augen von 70 mit Eutha[®] 77 (100 ml/Pferd, Essex) euthanasierten oder geschlachteten Pferden
 - KW aus 2 gesunden Augen von Pferden mit einseitiger Keratitis, entnommen im Zuge einer diagnostischen Parazentese
 - KW aus 28 gesunden Augen von Pferden mit einseitiger ERU, entnommen im Zuge einer diagnostischen Parazentese
- GK aus 14 an ERU erkrankten Augen von 14 vitrektomierten Pferden

(Anmerkung: Eine Beeinträchtigung des Leptospirenwachstums durch Eutha[®] 77 (Pentobarbital-Natrium, 400 mg/ml; Isopropanol, Polyethylenglykol 200, Wasser für Injektionszwecke) wurde über eine Verdünnungsreihe ausgeschlossen. Leptospirenkulturen wurden mit unterschiedlichen Mengen Eutha[®] 77 versetzt und über einen Zeitraum von einer Woche beobachtet. Bei der errechneten **Blut**konzentration von Eutha[®] 77 nach Euthanasie zeigte sich das Wachstum der Leptospiren unbeeinträchtigt. Für den Versuch wurden insgesamt 2 ml Eutha[®] 77 benötigt.)

3.6.3.2 Einleitung

Die steril entnommenen Proben wurden zunächst auf flüssige Transportmedien verimpft. Nach Verbringung der beimpften Transportmedien in das Labor erfolgte die Weiterverimpfung auf halbflüssige Nährmedien und die Bebrütung. Über einen Zeitraum von sechs Monaten wurde auf das Wachstum von lebenden Leptospiren kontrolliert.

3.6.3.3 Material

EMJH- (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris-) Grundmedium (2,3 g EMJH-Medium der Fa. Difco, 141734, in 900 ml H₂O_{dest.}, 5 min. bei 121–124 °C autoklaviert)

Leptospiren-Enrichment

Zur Herstellung des Enrichment werden folgende Grundlösungen benötigt:

- 1,0 g Brenztraubensäure Natriumsalz (C₃H₃NaO₃; Merck 6619) ad 10 ml H₂O_{bidest.}
- 10,0 g Glycerin (C₃H₈O₃) ad 90 ml H₂O_{bidest.}
- 1,5 g Magnesiumchlorid (MgCl₂; Merck 5833) und
1,5 g Calciumchlorid-2-hydrat krist. (CaCl₂ x 2 H₂O; Merck 2382)
ad 100 ml H₂O_{bidest.}
- 0,4 g Zinksulfat-7-hydrat (ZnSO₄ x 7 H₂O; Merck 8883) ad 100 ml H₂O_{bidest.}
- 0,02 g Cyanocobalamin (Vit. B12; Merck 524950) ad 100 ml H₂O_{bidest.}
- 10 g Tween-40 (Merck-Schuchardt 8.22185.0500) ad 90 ml H₂O_{bidest.}
- 10 g Tween-80 (Merck-Schuchardt 8.22187.1000) ad 90 ml H₂O_{bidest.}
- 0,5 g Eisen(II)-sulfat (FeSO₄ x 7 H₂O; Merck 3965)

Nun wurden 10,0 g bovines Serumalbumin (BSA, Serva, Art.-Nr. 1193002) in 50 ml A. bidest. gelöst, danach zu der BSA-Lösung die Grundlösungen in Reihenfolge und Menge wie folgt zugegeben:

- 1,0 ml Brenztraubensäure-Lösung
- 1,0 ml Glycerin
- 1,0 ml Magnesium-/Calciumchlorid
- 1,0 ml Zinksulfat
- 1,0 ml Cyanocobalamin
- 3,5 ml Tween-40
- 9,0 ml Tween-80
- 10,0 ml Eisensulfat
- ad 100 ml H₂O_{bidest.}

Der pH-Wert wurde auf 7,25–7,30 eingestellt.

BSA-Tween-Medium (Leptospirengrundnährmedium) wurde aus einem Teil **Enrichment** und neun Teilen **EMJH** hergestellt (1:10).

Kaninchenserum 2 % (Sigma, R-4505)

Fluorouracil (Sigma, F-6627)

Vancomycin (Vancomycin-HCl; LILLY Deutschland GmbH, 657)

- 500 mg Vancomycin-HCl wurden in 25 ml H₂O_{dest.} aufgelöst und steril filtriert, in Portionen zu 20 mg/ml abgefüllt und bei -20 °C eingefroren.

Seitz-Filter (EK Art. Nr. 08690, Größe 14 D)

Agar, Purified (BBL-Agar, Becton, Dickinson und Company, 4311853)

Impfstoff-Flaschen (10 ml, Neutralglas, Fa. Rosa Heinz, 901-FIIB-010)

Sterile Schraubkappenröhrchen PS/PE SI (Nunc, 348224)

3.6.3.4 Herstellung der Transportmedien mit Hemmstoff

500 ml BSA-Tween-Medium mit 5 ml Kaninchenserum wurden mit 50 mg Fluorouracil (im Wasserbad bei 56 °C auflösen) und 5 mg Vancomycin (d.h. 0,25 ml der eingefrorenen Verdünnung) versetzt und der pH-Wert auf 7,25–7,30 eingestellt. Dann erfolgte die Sterilfiltration (Seitz-Filter) und nach einer Stunde im Wasserbad (56 °C) die Befüllung der Impfstoff-Flaschen mit jeweils 10 ml. Die Lagerung konnte bei Zimmertemperatur stattfinden.

3.6.3.5 Herstellung der Nährmedien

Für die Herstellung der **halbflüssigen Nährmedien** wurden 200 ml **EMJH** mit 0,75 g **Agar** autoklaviert. In die noch warme Agarmischung wurden 500 ml **BSA-Tween-Medium** mit 5 ml **Kaninchenserum** und mit oder ohne Hemmstoff (50 mg **Fluorouracil** und/oder 5 mg **Vancomycin**) steril filtriert, gemischt und zu etwa 7 ml in sterile Schraubkappenröhrchen abgefüllt:

1. Nährmedien ohne Hemmstoff (∅)
2. Nährmedien mit Fluorouracil (Fu)
3. Nährmedien mit Fluorouracil und Vancomycin (FuVa)

3.6.3.6 Verimpfen der Proben auf Transportmedien

Aus Augen von euthanasierten Pferden wurden jeweils 0,5 und 1,0 ml Kammerwasser und 0,5 und 1,0 ml Glaskörper steril auf die Impfstoff-Flaschen mit Transportmedien verimpft (vier Ansätze pro Auge), bei Pferden, die einer Vitrektomie oder Parazentese unterzogen wurden, 0,5 und/oder 1,0 ml intraokulares Probenmaterial (1–2 Ansätze pro Auge).

3.6.3.7 Überimpfen der Proben auf halbflüssige Nährmedien

Im Labor wurden die beimpften flüssigen Transportmedien steril auf halbflüssige Nährmedien ohne (\emptyset) bzw. mit Hemmstoff (FuVa, Fu) in die Schraubkappenröhrchen mit halbflüssigen Nährmedien überimpft:

Transportmedium mit 0,5 ml Probenmaterial:

1. \emptyset 0,2 ml
2. FuVa 0,2 ml
3. Fu 0,2 ml

Transportmedium mit 1,0 ml Probenmaterial:

4. Fu 0,2 ml
5. Fu 1,0 ml
6. Fu 0,5 ml

aus Schraubkappenröhrchen Nr. 6 wurden dann zur weiteren Verdünnung 0,5 und 1,0 ml entnommen und steril in Nährmedien ohne Hemmstoff gegeben:

7. (1) \emptyset 0,5 ml
8. (2) \emptyset 1,0 ml

3.6.3.8 Bebrütung und Überprüfung der Kulturen

Die Kulturen wurden bei 30 °C bebrütet und sechs Wochen lang alle zwei Wochen sowie nach drei und sechs Monaten unter dem Dunkelfeldmikroskop (Labolux K, Leitz, Vergrößerung 250fach) auf das Vorhandensein von lebenden Leptospiren überprüft.

3.6.3.9 Leptospirenisolation und Serovarbestimmung

Die weitere Anzucht der Leptospiren in den positiven Kulturen mit Bestimmung der Serovar mit spezifischen Antiseren wurde vom Landesamt für das Gesundheitswesen und Lebensmittelsicherheit Südbayern durchgeführt.

3.6.4 PCR – Untersuchung auf Leptospiren-DNA

Kammerwasser aus 120 gesunden Augen von 60 euthanasierten Pferden (Alter: 1–29 Jahre, \bar{x} = 10,5 Jahre, s = 6,2; aus der Gruppe der 100 unter 3.1 genannten Pferde), bei denen nie der Verdacht auf eine Augenerkrankung bestand, und aus an ERU erkrankten Augen (n = 14) von 14 Pferden wurden nach Ludwigsburg versandt. Dort erfolgte die Untersuchung auf Leptospiren-DNA (hoch konservierte 16S-rRNA Gensequenz von *Leptospira interrogans*) durch das Vet-Med-Labor (siehe 3.6). Zusätzlich wurde eine Kammerwasserprobe aus dem gesunden Auge eines einseitig an ERU erkrankten Pferdes mit Hilfe dieser PCR auf Leptospiren getestet (unabhängig von den oben genannten 120 Proben augengesunder Pferde), da dieses Kammerwasser in der MAR und im ELISA positiv reagierte (siehe 4.1.3).

3.7 Statistische Auswertung

Die beiden Gruppen „Gesunde“ und „ERU“ wurden mit MINITAB für Windows in der Abteilung für Biometrie des Instituts für Tierzucht und Tierhygiene mittels Chi-Quadrat-Test verglichen. Bei den Untersuchungen der intraokularen Proben wurde folgende Nullhypothese aufgestellt: Die Gruppen „Gesunde“ und „ERU“ unterscheiden sich nicht im Hinblick auf labordiagnostische Hinweise für eine intraokulare Leptospireninfektion. War die Wahrscheinlichkeit der Gültigkeit der Nullhypothese p (= Überschreitungswahrscheinlichkeit des Signifikanzniveaus α) kleiner als das festgelegte Signifikanzniveau α , galt das Ergebnis als signifikant. Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha = 0,01$ festgesetzt, da durchaus Konsequenzen für Patienten mit ERU entstehen können.

4 ERGEBNISSE

4.1 Leptospirenbefunde

4.1.1 Antikörpertiter gegen Leptospiren im Serum

4.1.1.1 Vorkommen von Antikörpertitern ab 1:100 in der MAR

Die Serumuntersuchungen mittels MAR (siehe Tab. 4.1.) zeigten keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,066$) zwischen den Pferden, die keine Anzeichen einer ERU aufwiesen (75 % positiv), und Pferden mit ERU (92 % positiv).

Tab. 4.1.: Serumproben von 71 gesunden und 25 an ERU erkrankten Augen: positive und negative Reaktionen in der MAR.

MAR-Serum	Gesunde	ERU
n	71	25
positiv	75 % (53/71)	92 % (23/25)
negativ	25 % (18/71)	8 % (2/25)

Die meisten Seren reagierten bis zu einer Verdünnung von 1:200 (siehe Abb. 4.1.).

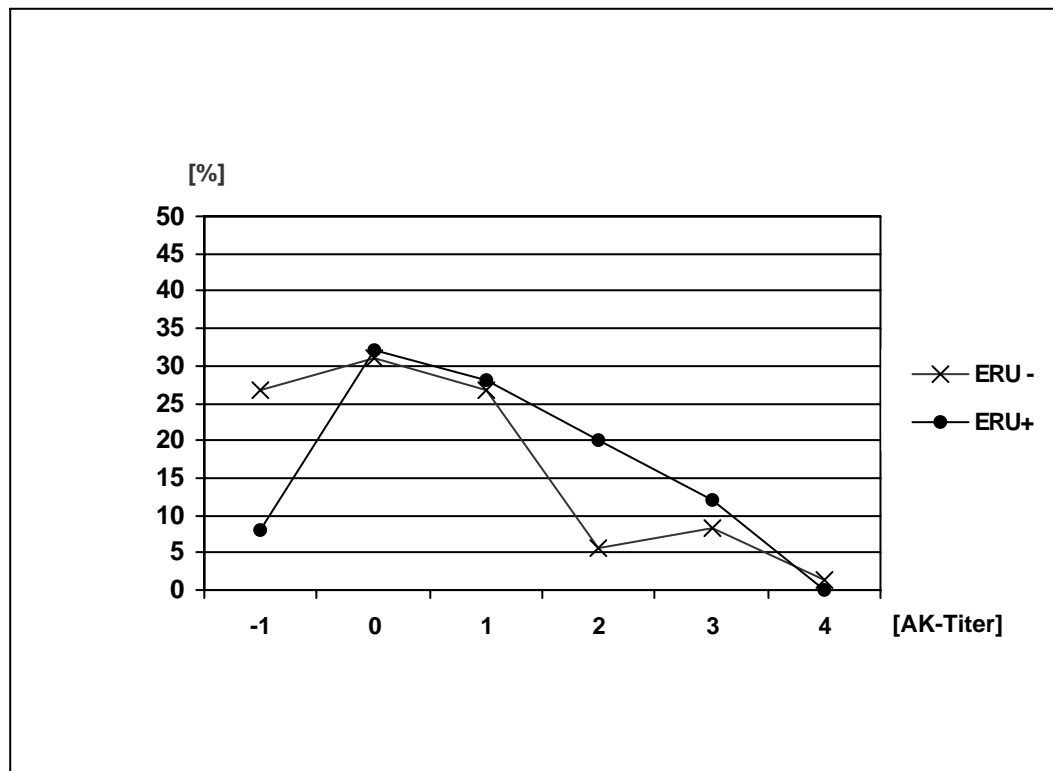


Abb. 4.1.: Vorkommen von Antikörpern gegen Leptospiren im Serum von Pferden ohne (n = 71) und mit (n = 25) ERU. Anteil der Proben, die in den jeweiligen Titerhöhen positiv reagierten in [%] (Antikörpertiter als ganze Zahlen nach Tab. 3.1. angeben).

4.1.1.2 Vorkommen von Antikörpern gegen die einzelnen Serovare in der MAR

Bei Pferden ohne ERU war im Serum die Serovar *icterohaemorrhagiae* am häufigsten nachweisbar, während bei an ERU erkrankten Pferden die Serovar *grippotyphosa*, gefolgt von *bratislava*, im Vordergrund stand. Bei den Serovaren *icterohaemorrhagiae* ($p = 0,003$) und *grippotyphosa* ($p = 0,002$) bestanden signifikante Unterschiede zwischen Pferden ohne und mit ERU (siehe Abb. 4.2.).

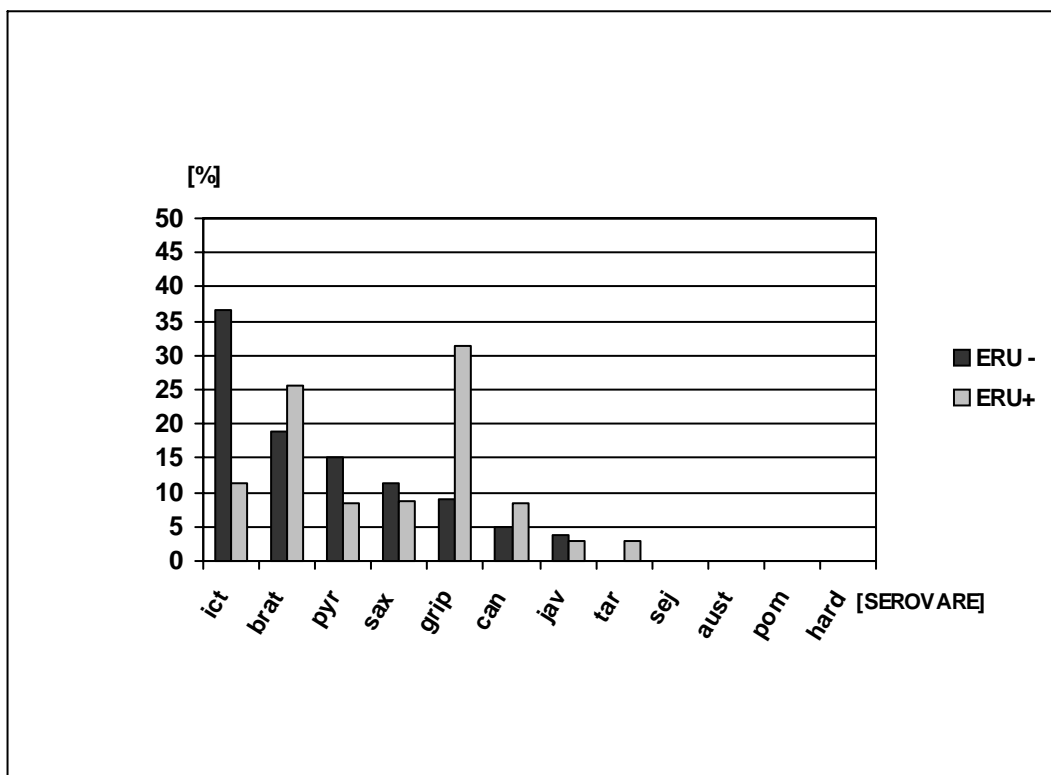


Abb. 4.2.: Vorkommen von Antikörpern gegen die einzelnen Leptospiren-Serovare im Serum von Pferden ohne ($n = 71$) und mit ($n = 25$) ERU in [%].

4.1.2 Nachweis von Antikörpern gegen Leptospiren in intraokularen Proben

4.1.2.1 Vorkommen von Antikörpern in Augen von Pferden ohne Anzeichen für eine ERU und von Pferden mit ERU

MAR:

Bei Antikörpernachweis-Versuchen in Kammerwasser aus 168 klinisch gesunden Augen von 100 Pferden war ein Ansatz in der MAR positiv. Die positive Probe wurde im Zuge einer diagnostischen Parazentese bei einem 4-jährigen dunkelbraunen Araberhengst, der am anderen Auge an ERU erkrankt war, gewonnen. Es konnte ein Antikörpertiter von 1:200 gegen die Serovar *grippotyphosa* festgestellt werden. Diese Probe wurde deshalb zusätzlich mittels PCR auf Leptospiren-DNA getestet (siehe 4.1.3). Alle Proben aus Augen, die an ERU erkrankt waren, reagierten in der MAR positiv (siehe Tab. 4.2.). Damit besteht ein signifikanter Unterschied zwischen gesunden und an ERU erkrankten Augen ($p < 0,001$).

Tab. 4.2.: Intraokulare Proben aus 168 gesunden und 14 an ERU erkrankten Augen: positive und negative Reaktionen in der MAR.

MAR-KW/GK	Gesunde	ERU
n	168	14
positiv	1 % (1/168)	100 % (14/14)
negativ	99 % (167/168)	0 % (0/14)

ELISA:

Im ELISA auf Antikörper gegen Leptospiren von 168 intraokularen Proben aus gesunden Augen reagierte ein Ansatz positiv, in der Gruppe der an ERU erkrankten Augen zeigten 92 % der Proben eine positive Reaktion (siehe Tab. 4.3.). Im Chi-Quadrat-Test wurde ein signifikanter

Unterschied errechnet ($p < 0,001$). Die positive Probe stammte aus dem gleichen Auge wie die Probe, die in der MAR einen Antikörpertiter von 1:200 aufwies.

Tab. 4.3.: Intraokulare Proben aus 168 gesunden und 14 an ERU erkrankten Augen: positive und negative Reaktionen im ELISA.

ELISA-KW/GK	Gesunde	ERU
n	168	14
positiv	1 % (1/168)	92 % (13/14)
negativ	99 % (167/168)	8 % (1/14)

Die Verteilung der Reaktionen der Proben aus „ERU“-Augen auf Anti-IgM- und Anti-IgG-Antikörper der Serovare *grippotyphosa* und *bratislava* sind in Tab. 4.10. gezeigt, und werden unter 4.2.3 besprochen.

In Tab. 4.5. sind die Mittelwerte der Proben aus gesunden und kranken Augen, die im ELISA negativ bzw. positiv reagierten, aufgeführt. Die errechneten Cut-off-Werte sind ebenfalls aufgelistet. Es besteht ein deutlicher Unterschied zwischen den positiven Proben aus Augen mit ERU und den negativen aus gesunden Augen.

Tab. 4.5.: Mittelwerte der ELISA-Einheiten aus Proben, die im ELISA negativ bzw. positiv reagierten und ELISA-Grenzwerte.

ELISA-Einheiten	IgM-Gripp	IgG-Gripp	IgM-Brat	IgG-Brat
Negativ (Gesunde)	8	2	11	2
Negativ (ERU)	17	8	22	1
Cut-off-Wert	77	15	112	6
Positiv (Gesunde)		69		
Positiv (ERU)	904	1224	350	696

4.1.3 Leptospiren-Erregernachweis

Kultur:

Bei Kulturversuchen aus intraokularen Proben von 168 klinisch gesunden Augen (Kammerwasser aus 168 Augen und Glaskörper aus 138 Augen) war kein Ansatz positiv. Von den 14 Kulturen mit Glaskörper aus Augen, die an ERU erkrankt waren, erbrachten 57 % innerhalb von zwei bis acht Wochen ein positives Ergebnis (siehe Tab. 4.6.). Im Chi-Quadrat-Test bestand ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$). Bei den isolierten Leptospiren handelte es sich um Leptospiren der Serovar *grippotyphosa* ($n = 8$).

Tab. 4.6.: Intraokulare Proben aus 168 gesunden und 14 an ERU erkrankten Augen: positive und negative Kulturergebnisse.

Kultur	Gesunde	ERU
n	168	14
positiv	0 % (0/168)	57 % (8/14)
negativ	100 % (168/168)	43 % (6/14)

PCR:

Von 120 Proben aus Augen von 60 ophthalmologisch gesunden Pferden reagierten 5 % der Ansätze positiv, wobei 2 positive Proben von einem Pferd stammten (8,3 % der augengesunden Pferde zeigten damit Hinweise auf ein intraokulares Vorkommen von Leptospiren-DNA). Bei den 14 Proben aus an ERU erkrankten Augen wiesen 57 % eine positive Reaktion auf (siehe Tab. 4.7.). Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den Gesunden und den an ERU erkrankten Augen ($p < 0,001$). Der zusätzlich durchgeführte Nukleinsäurenachweis-Versuch in Kammerwasser (mit positivem Antikörpernachweis, siehe 4.1.2.) das aus dem gesunden Auge eines Pferdes mit einseitiger ERU stammte, verlief in der PCR negativ (siehe Tab 4.9.).

Tab. 4.7.: Intraokulare Proben aus 120 gesunden (von 60 Pferden) und 14 an ERU erkrankten Augen (von 14 Pferden): positive und negative Reaktionen in der PCR.

PCR	Gesunde	ERU
n	120	14
positiv	5 % (6/120)	57 % (8/14)
negativ	95 % (114/120)	43 % (6/14)

4.2 Zusammenfassung der einzelnen Untersuchungsergebnisse

4.2.1 Vergleich der Ergebnisse zwischen gesunden und an ERU erkrankten Augen

Alle vier angewandten Testmethoden auf Hinweise einer intraokularen Leptospireninfektion, erbrachten im Vergleich zwischen Proben aus gesunden und Proben aus an ERU erkrankten Augen signifikante Unterschiede (siehe Tab. 4.8.).

Tab. 4.8.: Vergleich der Ergebnisse von 168 gesunden und 14 an ERU erkrankten Augen in den einzelnen Testverfahren auf Leptospiren.

Test	Positive “Gesunde“ [%]	Positive “ERU“ [%]	Irrtums- Wahrscheinlichkeit p
MAR	1	100	< 0,001
ELISA	1	93	< 0,001
Kultur	0	57	< 0,001
PCR	5	57	< 0,001

4.2.2 Vergleich der Ergebnisse eines gesunden Auges mit positivem Antikörper-Nachweis

Ein Auge von den 168 gesunden zeigte in der MAR und im ELISA einen positiven Nachweis von Antikörpern gegen die Serovar *grippotyphosa*. Die Kultur und die zusätzlich durchgeführte PCR verliefen negativ (siehe Tab. 4.9.).

Tab. 4.9.: Untersuchungsergebnisse der Kammerwasserprobe aus dem gesunden Auge eines einseitig an ERU erkrankten 4-jährigen dunkelbraunen Araberhengstes. Bei den Ergebnissen der MAR wurden die Antikörpertiter und beim ELISA der Mittelwert der ELISA-Einheiten angegeben.

Test	Probe	Ergebnis
MAR	SERUM	Brat (1:200) Gripp (1:100)
MAR	KW	Gripp (1:200)
ELISA	KW	Gripp IgG (69)
Kultur	KW	negativ
PCR	KW	negativ

4.2.3 Vergleich der Ergebnisse der Augen mit ERU

Bei den aus an ERU erkrankten Augen reagierte die in der MAR bestimmte Serovar in 13 von 14 Proben auch im ELISA positiv. Es traten parallel lebende Leptospiren und Antikörper gegen die jeweilige Serovar auf. Die Pferde 2, 3, 9, 10,12 und 13 reagierten in allen 4 Tests positiv. Bei positiver Kultur stimmte die Serovar mit der „Antikörper“-Serovar überein. Bei zehn Pferden mit ERU stimmten die Ergebnisse in Kultur und PCR überein. Die PCR verlief bei zwei Proben mit positivem Kulturergebnis negativ, umgekehrt war die PCR bei zwei Proben positiv, die in der Kultur keine Reaktionen zeigten (siehe Tab. 4.10.).

Tab. 4.10.: Intraokulare Proben aus Augen von 14 an ERU erkrankten Pferden: Reaktionen in der MAR, im ELISA, in der Kultur und der PCR.

Pferd	MAR	ELISA	IgM	IgG	Kultur	PCR
1.	Gripp 1:400 (Brat negativ)	Gripp Brat	+ -	+ +	Gripp	-
2.	Gripp 1:3200 (Brat negativ)	Gripp Brat	+ -	+ +	Gripp	+
3.	Gripp 1:6400 (Brat negativ)	Gripp Brat	+ -	+ +	Gripp	+
4.	Gripp 1:200 (Brat negativ)	Gripp	-	+	negativ	-
5.	Gripp 1:51200 (Brat negativ)	Gripp Brat	+ -	+ +	negativ	+
6.	Gripp 1:100 (Brat negativ)	negativ	-	-	Gripp	-
7.	Brat 1:200 (Gripp 1: 100)	Brat Gripp	- -	+ (+)	negativ	-
8.	Gripp 1:6400 (Brat 1:200)	Gripp Brat	+ -	+ +	negativ	-
9.	Gripp 1:3200 (Brat negativ)	Gripp Brat	+ +	+ +	Gripp	+
10.	Gripp 1:12800 (Brat 1:3200)	Gripp Brat	+ +	+ +	Gripp	+
11.	Gripp 1:400 (Brat negativ)	Gripp	-	+	negativ	-
12.	Gripp 1:800 (Brat negativ)	Gripp	-	+	Gripp	+
13.	Gripp 1:3200 (Brat negativ)	Gripp Brat	+ -	+ +	Gripp	+
14.	Gripp 1:100 (Brat negativ)	Gripp	-	+	negativ	+

5 Diskussion

Im Vordergrund der Arbeit stand die Untersuchung klinisch gesunder Pferdeaugen auf intraokular vorhandene Leptospiren oder Leptospirenantikörper. Im Folgenden werden die Untersuchungsergebnisse dieser Gruppe (n = 168) der Kontrollgruppe mit 14 an ERU erkrankten Augen gegenübergestellt und diskutiert. Intraokulare Proben aus Augen mit ERU wurden schon in großem Umfang untersucht (WOLLANKE, 2002). Sowohl in der MAR als auch in der Kultur und der PCR waren die Ergebnisse ähnlich zu denen, die in der vorliegenden Arbeit in der Kontrollgruppe auftraten. Daher erscheint trotz der geringen Anzahl von 14 untersuchten Augen mit ERU ein Vergleich zwischen der Gruppe mit „gesunden“ Augen und der Kontrollgruppe berechtigt.

5.1 Antikörpertiter gegen Leptospiren im Serum

Ebenso wie in vorangegangenen Untersuchungen (WOLLANKE 2002), zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Auftreten von Serumantikörpern zwischen Pferden ohne und mit ERU. Die gemessenen Titerhöhen stimmten annähernd überein. Bei 75 % der augengesunden und über 90 % der an ERU erkrankten Pferde ließen sich Antikörper im Serum nachweisen. Es bestätigt sich also, dass sich ein großer Anteil gesunder Pferde mit Leptospiren auseinandersetzt. Die Serovar *icterohaemorrhagiae* trat in der Gruppe der augengesunden Pferde signifikant häufiger auf als bei an ERU erkrankten Pferden. Andererseits zeigen Pferde mit ERU ein signifikant häufigeres Vorkommen der Serovar *grippotyphosa*. Aus an ERU erkrankten Augen wurden in Kulturversuchen sowohl in der vorliegenden Arbeit (n = 14) als auch bei den Untersuchungen von WOLLANKE (2002) (n = 358) zu einem hohen Prozentsatz Leptospiren der Serovar *grippotyphosa*, nie aber die Serovar *icterohaemorrhagiae* isoliert. Es wäre denkbar, dass die Serovar *icterohaemorrhagiae* für das Pferdeauge weniger pathogen ist, als die Serovar *grippotyphosa*. Dies könnte bedeuten, dass innerhalb der Gattung kreuzreagierende Antikörper (FATHALLA u. COGHLAN 1980) der Serovar *icterohaemorrhagiae* im Blut systemische Infektionen mit Leptospiren der Serovar *grippotyphosa* verhindern oder zu einer schnellen Eliminierung der Leptospiren führen. Bei einer Erstinfektion mit der Serovar *icterohaemorrhagiae* wären Augen vor der Serovar *grippotyphosa* geschützt, zumal

Leptospirenantikörper über lange Zeit im Blut nachweisbar sind (ROBERTS, 1958; FAINE, 1994).

5.2 Antikörpertiter in der MAR gegen Leptospiren in intraokularen Proben

Es besteht in der MAR von Kammerwasser ein signifikanter Unterschied im Auftreten von Antikörpern bei gesunden Augen und „ERU“-Augen. Insbesondere auch im Vergleich zu den Untersuchungen von WOLLANKE (2002), bei denen etwa 90 % der 460 Proben aus an ERU erkrankten Augen in der MAR ab einem Titer von 1:100 reagierten. Der ursächliche Zusammenhang zwischen der ERU und einer intraokularen Leptospireninfektion wird mit der vorliegenden Untersuchung nochmals untermauert.

5.3 Antikörpernachweis im ELISA gegen Leptospiren in intraokularen Proben

Auch im ELISA zum Leptospirenantikörper-Nachweis in Kammerwasser besteht ein signifikanter Unterschied zwischen gesunden Augen und „ERU“-Augen. Nur eine Probe aus den 168 gesunden Pferdeaugen zeigte im ELISA eine positive Reaktion, während 93 % der an ERU erkrankten Augen positiv reagierten. Es bestehen deutliche Unterschiede in den Mittelwerten der ELISA-Einheiten von Proben aus Augen mit und Proben aus Augen ohne ERU. Weitere Untersuchungen an Augen mit ERU wären sinnvoll, um Infektionsverläufe darstellen und einen Vergleich mit gesunden Augen treffen zu können.

5.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der indirekten Nachweismethoden MAR und ELISA

167 von 168 Kammerwasserproben zeigten weder in der MAR noch im ELISA Hinweise auf intraokulare Leptospirenantikörper in gesunden Augen. Nur in einem von 168 gesunden Augen ließen sich Leptospirenantikörper nachweisen. Es handelte sich um das gesunde Auge eines 4-jährigen dunkelbraunen Araberhengstes, bei dem im Zuge einer Vitrektomie des an ERU

erkrankten Auges aus diagnostischen Gründen eine Parazentese in Vollnarkose erfolgte. Sowohl die MAR als auch der ELISA verliefen positiv.

Unterschiedliche Ursachen können dafür infrage kommen:

1. eine Antikörperdiffusion über die Blut-Augen-Schranke (HALLIWELL und HINES 1985)
2. eine Verunreinigung des Kammerwassers mit Leptospirenantikörpern aus dem Blut im Zuge der Entnahme
3. eine falsch positive Reaktion oder Kreuzreaktion mit nicht primär gegen Leptospiren gerichtete Antikörper
4. a) eine intraokulare Leptospiren-Infektion ohne klinische Symptome
b) eine intraokulare Leptospiren-Infektion mit einsetzender Antikörperproduktion und Erregereliminierung

Eine **Diffusion** ist sehr unwahrscheinlich, da bei 167 von 168 gesunden Augen keine Antikörper nachweisbar waren, obwohl ein Großteil (75 %) der gesunden Pferde Antikörper gegen Leptospiren im Blut aufwies. Untersuchungen von intraokularen Proben, auch auf gegen andere Bakterien gerichtete Antikörper, die im Blut der Pferde vorhanden waren, ergaben keinen Hinweis auf eine mögliche Antikörperdiffusion durch die Blut-Augen-Schranke (WITMER et al., 1953; WOLLANKE, 1995).

Insbesondere bei der limbalen Kammerwassergewinnung über eine Tunnelung der Hornhaut sind **Blutungen** unwahrscheinlich. Durch Verletzungen der Iris können zwar nennenswerte Blutungen entstehen, treten aber bei der Entnahme in Vollnarkose kaum auf.

Von einem Ablesefehler in der MAR ist nicht auszugehen, da ein Titer von 1:200 nicht die niedrigste Verdünnungsstufe darstellt. Wegen des gleichzeitig positiven Antikörper-Nachweises in der MAR und im ELISA ist eine **falsch positive Reaktion** auf Grund eines Fehlers in der Durchführung oder eine Verwechslung unwahrscheinlich, zumal im ELISA zwei Ansätze je Probe untersucht werden.

Sowohl die MAR, als auch der ELISA gelten als spezifische Untersuchungsmethoden auf Leptospirenantikörper (BREM et al., 1999 b; LEPTOSPIROSIS REFERENCE LABORATORY, 2004). Mögliche **Kreuzreaktionen** mit Borrelienantikörpern sind unwahrscheinlich, da diese weder in gesunden noch in erkrankten Augen, trotz positiver Antikörpertiter im Blut, nachgewiesen wurden (WOLLANKE, 1995). Reaktionen mit körpereigenen Strukturen, wie z. B. der Hornhaut, kommen im Antikörpernachweis nicht infrage, da es sich um körpereigene Antigene handelt, bei denen Ähnlichkeiten zu Leptospiren bestehen (LUCCHESI u. PARMA 1999). Antikörper, die gegen diese Hornhautstrukturen gerichtet sind, reagieren nicht mit vollständig intakten Leptospiren, da die zur Hornhaut ähnlichen Epitope der Leptospiren intrazellulär gelegen sind (PARMA et al., 1997).

Eine mögliche **intraokulare Infektion** mit Leptospiren ohne Auftreten klinischer Symptome wird weiter unten im Text diskutiert (siehe 5.7 und 5.8).

Die Ergebnisse des ELISA werden durch die Gold-Standard-Methode MAR bestätigt. Alle Proben, die in der MAR negativ reagierten, waren im ELISA ebenfalls negativ. Bei der bei beiden Verfahren positiv getesteten Probe herrschte Übereinstimmung in der Serovar (siehe Tab. 4.9.). Die Stärke der Reaktion befand sich jeweils nahe der unteren Nachweisgrenze. Der niedrige Antikörpertiter in der MAR (1:200, siehe Tab. 4.9.) und die im Vergleich zu den an ERU erkrankten Augen deutlich schwächere Extinktion im ELISA (69, siehe Tab. 4.5.) könnten für eine länger zurückliegende Infektion bzw. für eine Erregerelimination nach intraokularer Infektion sprechen (siehe 5.7 und 5.8).

5.5 Kultur

Aus 168 gesunden Augen wurden über 4500 Kulturansätze mit unterschiedlichen Verdünnungen und Hemmstoff-Zusätzen angefertigt und jeweils über sechs Monate auf ein Leptospirenwachstum untersucht. In keinem Ansatz waren Leptospiren nachweisbar, während die Kulturen mit Proben aus an ERU erkrankten Augen innerhalb von zwei bis acht Wochen zu 57 % ein positives Ergebnis zeigten. Dies beweist den ursächlichen Zusammenhang zwischen einer intraokularen Leptospireninfektion und der ERU, zumal die Untersuchungsergebnisse mit

denen von WOLLANKE (2002) fast exakt übereinstimmen und zusammen mit der vorliegenden Studie sowohl gesunde als auch an ERU erkrankte Augen in hoher Anzahl in der Kultur untersucht wurden. Für die Diagnostik bietet sich diese Untersuchungsmethode wegen der niedrigen Sensitivität, des langsamen Wachstums der Leptospiren (FAINE, 1982; BREM et al., 1988) und des großen Zeitaufwandes nicht an.

5.6 PCR

Von 60 augengesunden Pferden wiesen 5 (8,3 %) Hinweise für intraokular vorhandene Leptospiren-Nukleinsäuren auf, was in etwa der Häufigkeit des Auftretens der ERU entspricht. Dies könnte ein Hinweis auf intraokular vorhandene Leptospiren bei noch nicht erfolgter Antikörperproduktion sein oder Hinweise auf abgestorbenes Erregermaterial darstellen (siehe 5.8). Leider wurden diese Proben von frisch euthanasierten Pferden entnommen, so dass eine weitere Beobachtung im Hinblick auf eventuell einsetzende Augenentzündungen, sofern es sich um lebende Leptospiren gehandelt haben sollte, nicht möglich war (die Kulturansätze der Proben waren negativ, siehe Tab. 4.6.). Auf dem Gebiet der Leptospiren-PCR ist noch intensive Forschung vonnöten (BOLIN, 2003), bis diese Untersuchungsmethode sichere und spezifische Ergebnisse mit geringem, für klinische Labors vertretbarem Aufwand erbringt. Dennoch bestehen auch in der PCR signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe der gesunden Augen (5 % positiv) und der Gruppe mit „ERU“-Augen (57 % positiv).

5.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

5.7.1 Vergleich der Ergebnisse zwischen gesunden und an ERU erkrankten Augen

Zusammenfassend muss bemerkt werden, dass bei allen vier Untersuchungsmethoden auf intraokular vorhandene Leptospiren (MAR, ELISA, Kultur und PCR) signifikante Unterschiede zwischen gesunden Augen und an ERU erkrankten Augen bestehen (Tab. 4.8.). Augen mit „ERU“ weisen zu einem hohen Prozentsatz Leptospiren oder Antikörper gegen Leptospiren auf (WOLLANKE, 2002). Gesunde Augen dagegen reagieren nur vereinzelt oder gar nicht in den angegebenen Tests. Die Richtigkeit der Ergebnisse des ELISA wurden mit der MAR bestätigt.

5.7.2 Vergleich der Ergebnisse eines gesunden Auges mit positivem Antikörper-Nachweis

Die Ergebnisse der Probe aus dem gesunden Auge mit positivem indirekten Nachweis (MAR und ELISA) bei gleichzeitig negativem Ausgang in den direkten Verfahren (Kultur und PCR) sprechen aus labordiagnostischer Sicht für eine vor längerer Zeit abgelaufene intraokulare Leptospireninfektion mit Erregerelimination. Anamnestisch und klinisch ließen sich keine krankhaften Veränderungen feststellen. Dies wäre durch eine Resorption der Entzündungsprodukte nach einer vom Besitzer unbemerkt abgelaufenen Entzündungsreaktion mit anschließender Erregerelimination zu erklären. Die Besitzerin konnte etwa ein Jahr nach der Entlassung des Patienten berichten, dass in der Zwischenzeit keinerlei Anzeichen einer Entzündung aufgetreten waren.

5.7.3 Vergleich der Ergebnisse der Augen mit ERU

Der Vergleich der MAR mit dem ELISA bestätigt die Richtigkeit der im ELISA festgestellten Ergebnisse, so dass bei Untersuchungen einer größeren Anzahl von „ERU“-Augen mit dem ELISA Erkenntnisse über die Infektionsverläufe zu erwarten sind. Die Übereinstimmung der nachgewiesenen Serovare in MAR, ELISA und Kultur unterstreicht die Ergebnisse von WOLLANKE (2002), bei deren Untersuchungen die Spezifität der Antikörper in 96 % (179/187) der angezüchteten Serogruppe entsprach. In fünf Fällen stimmten die Ergebnisse der positiven Kulturen mit der PCR überein. Es traten sowohl negative Kulturen bei positiver PCR (Pferd 5. und 14.) als auch positive Kulturen bei negativer PCR auf (Pferd 1. und 6.). Es sind weitere Untersuchungen von Augen mit und ohne ERU in der PCR nötig, um die Untersuchungsergebnisse richtig deuten und damit klinisch nutzbar machen zu können.

5.8 Schlussfolgerung

Mit der vorliegenden Arbeit sind jetzt auch gesunde Augen in großer Anzahl (168 Augen von 100 Pferden) auf intraokulare Leptospireninfektionen untersucht worden. Der ursächliche Zusammenhang zwischen der ERU und einer intraokularen Leptospireninfektion wird weiter untermauert.

Allerdings bleibt weiterhin ungeklärt, welche Umstände dazu führen, dass die Erreger in das Augennere gelangen können. Ebenfalls sind die Vorgänge im Auge, die zu rezidivierenden Entzündungen führen, und inwieweit Autoimmunreaktionen hierbei eine Rolle spielen, noch nicht eindeutig verstanden. Auch der genaue Ort, wo sich die Leptospiren im Auge befinden, ist unklar. Obwohl in der Literatur Hinweise für schützende Umhüllungen erwähnt werden (FAINE, 1994; NIEDERMAIER, 2002), ist die Frage, wie es möglich ist, dass Leptospiren und spezifisch gegen diese Erreger gerichtete Antikörper gleichzeitig im Auge auftreten, nicht geklärt. WOLLANKE (2002) hat sich intensiv dieser Thematik gewidmet und Antwortmöglichkeiten, insbesondere zur Pathogenese und zu möglichen Orten der Leptospiren-Persistenz, nachdem der erste Entzündungsschub stattgefunden hat, aufgezeigt.

Ob es möglich ist, dass Leptospiren zunächst in das Auge gelangen und dort über längere Zeit persistieren können, ohne eine Abwehr- oder Entzündungsreaktion auszulösen, konnte mit dieser Arbeit nicht sicher geklärt werden, es ergaben sich jedoch Hinweise auf eine Leptospireninfektion bei gesunden Augen.

Hinweise, die für eine mögliche asymptomatische intraokulare Leptospireninfektion sprechen, sind:

- 1) Das positive PCR-Ergebnis in 5 % der untersuchten gesunden Augen bzw. 8 % der untersuchten gesunden Pferde bei gleichzeitig negativen Ergebnissen der Antikörper-Nachweisversuche.
- 2) Die Übereinstimmung der Häufigkeit der positiven PCR bei Proben aus gesunden Augen mit der in der Literatur angegebenen Prävalenz der ERU (CROSS, 1966; GELATT, 1972; BISTNER u. SHAW, 1980; LAVACH, 1990; SPIESS, 1997; SZEMES u. GERHARDS, 2000).

- 3) Die lange Zeit (Monate bis Jahre) zwischen systemischer Infektion und dem Auftreten von klinischen Anzeichen am Auge (ROBERTS, 1958; WILLIAMS, 1971), zumal lebende Leptospiren nur für kurze Zeit (etwa 9 Tage) im Blut nachweisbar sind (WILLIAMS, 1971).
- 4) Die Eigenschaft des Auges, schädigende Entzündungsreaktionen zu unterdrücken (ALLEN et al., 1996; NUSSENBLATT u. GERY, 1996).
- 5) Die Abgrenzung des Glaskörpers vom humoralen (Immun-) System beim „gesunden“ Auge (NUSSENBLATT u. GERY, 1996).
- 6) Die geringe direkte gewebeschädigende Wirkung der Leptospiren (FAINE et al., 2000).
- 7) Die Möglichkeit, dass Leptospiren aktiv in Zellen eindringen können (THOMAS und HIGBIE, 1990) und intrazellulär nachgewiesen wurden (BARNETT et al., 1999). Im Auge kämen Hyalozyten oder Fibrozyten in Betracht, Leptospiren zu beherbergen (WOLLANKE, 2002).
- 8) Die Hinweise darauf, dass Leptospiren im Urin **wirtseigene** Proteine und Polysaccharide, die eine Agglutination durch Antikörper verhindert, aufweisen (FAINE, 1994).

Dagegen spricht, dass sich aus keinem der in der Kultur untersuchten gesunden Augen Leptospiren anzüchten ließen, auch nicht aus denen mit positivem Nukleinsäure-Nachweis. Allerdings könnte der Lebendnachweis von Leptospiren durch eine geringe Anzahl bzw. ein intrazelluläres Vorkommen dieser Erreger in gesunden Augen erschwert sein.

Mit dieser Untersuchung hat sich gezeigt, dass ophthalmologisch gesunde Augen auf Leptospirenantikörper-Nachweisversuche in der MAR zu 99 % negativ reagierten, während sich in 100 % der Augen mit ERU intraokulare Antikörper gegen Leptospiren nachweisen ließen. Aus diesem Grunde ist die MAR abgesehen davon, dass mit lebenden Leptospiren gearbeitet werden muss, als relativ einfache, schnelle und preisgünstige Methode gut geeignet für die ERU-Diagnostik und Indikationsstellung zur Vitrektomie in unklaren Fällen.

Die Indikation zu einer diagnostischen Parazentese muss wegen Narkoserisiken, Infektions- und Verletzungsgefahren äußerst kritisch gestellt werden. Vorsorgeuntersuchungen von vorberichtlich und ophthalmoskopisch gesunden Pferdeaugen erscheinen nicht ratsam, da die Wahrscheinlichkeit, Leptospiren oder Leptospirenantikörper nachzuweisen, laut dieser Untersuchung sehr gering ist.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) ist eine akut auftretende, chronisch rezidivierende serohaemorrhagische Entzündung der Uvea, die durch Entfernung des Glaskörpers und Spülung des Auginneren (Vitrektomie) mit großem Erfolg therapiert werden kann. Durch die Einführung dieser Operationstechnik und der Parazentese bei Pferdeaugen wurde intraokulares Material in großem Umfang der labordiagnostischen Untersuchung zu Forschungs- und Diagnosezwecken zugänglich. Es hat sich gezeigt, dass Pferdeaugen mit rezidivierender Uveitis in allen Krankheitsstadien zu einem hohen Anteil (> 50 %) Leptospiren und gleichzeitig spezifische Antikörper gegen diesen Keim aufweisen. Obwohl Leptospiren nach experimenteller Infektion nur bis zum neunten Tag im Blut nachweisbar sind, treten Augenveränderungen oft erst Monate bis Jahre nach (spontaner und experimenteller) systemischer Infektion auf. Es stellte sich die Frage, ob lebende Leptospiren die Möglichkeit besitzen, im Stadium der Leptospirämie aktiv in gesunde Augen einzudringen und dort, ohne sofort eine Abwehrreaktion zu provozieren, intraokular persistieren können.

Ziel

Ein Lebend- oder DNA-Nachweis im vorberichtlich und ophthalmoskopisch gesunden Auge bei gleichzeitig negativem Antikörpernachweis könnte die lange Zeit zwischen dem Ende der Leptospirämie und dem Beginn der Uveitis erklären. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es daher, zu klären, ob in ophthalmologisch gesunden Pferdeaugen Hinweise auf intraokulare Leptospireninfektionen vorhanden sind.

Patienten und Methoden

Intraokulares Probenmaterial aus 168 ophthalmologisch gesunden Augen von 100 Pferden konnte mittels MAR, indirektem ELISA und Kultur auf eine intraokulare Leptospireninfektion untersucht werden. In der PCR wurden 120 Proben von 60 augengesunden Pferden auf Leptospiren-DNA getestet. Als Kontrollgruppe dienten Proben aus 14 Augen mit ERU. Zusätzlich wurde die MAR zum Antikörpernachweis bei 71 Serumproben von Pferden ohne ERU und 25 Seren von Pferden mit ERU durchgeführt.

Ergebnisse

Von 168 Proben aus gesunden Augen zeigte ein Auge (0,6 %) positive Antikörpernachweise in der MAR und im ELISA, wobei kulturelle Versuche in keiner (0,0 %) der 168 Proben positiv verliefen. Mittels PCR ließ sich in 6 von 120 gesunden Augen (5,0 %) bei gleichzeitig negativem Antikörpertest Leptospiren-DNA nachweisen. Die Kontrollgruppe wies in 14 von 14 Fällen (100 %) in der MAR und in 13 von 14 Fällen (93 %) im ELISA positive Antikörpernachweise auf. Sowohl Kultur als auch PCR verliefen 8-mal positiv (57 %). Der Vergleich der gesunden mit den an ERU erkrankten Augen zeigte im Chi-Quadrat-Test in allen vier angewandten Methoden signifikante Unterschiede ($p < 0,001$). Bei Serumuntersuchungen in der MAR war mit 75 % positiven Proben (53/71) bei Pferden ohne und 92 % (23/25) bei Pferden mit ERU kein signifikanter Unterschied festzustellen ($p = 0,066$).

Schlußfolgerungen

- 1) Eine asymptomatische Besiedlung des Glaskörpers scheint, wenn überhaupt möglich, auf Einzelfälle beschränkt zu sein. Die DNA-Nachweise in ophthalmologisch gesunden Augen bei gleichzeitig negativem Antikörpernachweis könnten Hinweise auf eine vom körpereigenen Abwehrsystem nicht erkannte intraokulare Leptospireninfektion darstellen. Lebende Leptospiren ließen sich allerdings nicht anzüchten.
- 2) Der Zusammenhang zwischen der ERU und einer intraokularen Leptospireninfektion wird nochmals untermauert.
- 3) Im Hinblick auf die Tatsache, dass bei 168 ophthalmologisch gesunden Augen sich nur in einem Auge Antikörper nachweisen ließen, sollte die Indikationsstellung für die diagnostische Kammerwasserpunktion bei „gesunden“ Augen auf Ausnahmefälle beschränkt bleiben.

7 SUMMARY

Does a subclinical intraocular leptospiral infection exist in the horse?

Stefan Gesell

Introduction

Equine recurrent uveitis presents as an acute manifestation of a chronic recurrent serohemorrhagic inflammation of the uvea. This disease can be treated with great success using the pars plana vitrectomy technique. Introduction of this surgical technique as well as routine diagnostic aqueocentesis performed on equine eyes has provided substantial intraocular material for diagnostic evaluation and scientific research. In equine eyes with recurrent uveitis it was possible to concomitantly isolate leptospire as well as leptospira specific antibodies regardless of the stage of disease. In comparison, leptospire can only be detected in the blood of experimentally infected horses for up to nine days. Clinical signs of recurrent uveitis often first appear months, or even years, after spontaneous or experimental systemic infection has occurred. Is it possible for leptospire to actively invade the eye during the stage of bacteremia and persist without initiating an immediate local immune response?

Objective

Isolation of leptospire or their DNA from anamnestic and ophthalmoscopic inapparent eyes revealing no antibody titers possibly explains the long period of incubation in this disease. The objective of this study was to provide evidence of leptospiral presence in ophthalmologic healthy equine eyes.

Materials and methods

Intraocular material from 168 ophthalmologic healthy eyes from 100 horses were subjected to MAT, indirect ELISA and culture testing for the presence of intraocular infection with leptospire. PCR was implemented to screen 120 specimens from 60 horses determined to be free from ocular disease for the presence of leptospiral DNA. Intraocular samples from 14 eyes obtained from horses diagnosed with ERU served as the control group. Additionally, the serum

from 71 horses without ERU, and the serum from 25 horses with ERU were tested for the presence of leptospiral antibodies using the MAT.

Results

From the 168 specimens taken from the healthy eyes, only one eye (0.6 %) revealed a positive antibody titer in the MAT and ELISA, whereas, none of the cultures were positive (0.0 %). The PCR was positive for leptospiral DNA in 6/120 eyes (5.0 %) with concomitantly negative antibody test results. In the control group 14/14 cases in the MAT (100 %) and 13/14 cases (93.0 %) in the ELISA revealed antibodies. Culture and PCR were positive simultaneously in 8 samples (57.0 %). Comparison of the healthy eyes and eyes with ERU in the chi-square-test revealed a significant difference ($p < 0,001$) independent of the method used (MAT, ELISA, culture, PCR). No significant difference ($p = 0,066$) could be detected between the 53/71 (75.0 %) horses without signs of ERU and the 23/25 (92.0 %) horses with signs of ERU in the serological MAT.

Conclusions

- 1) A subclinical leptospiral infection of the vitreous body, if at all possible, is restricted to isolated cases. The appearance of DNA in ophthalmologic healthy eyes with simultaneously negative antibody results could possibly be interpreted as an intraocular leptospiral infection that has evaded recognition from the host's immune system. Nevertheless, it was not possible to culture living leptospire.
- 2) Further evidence of the relationship between ERU and intraocular leptospiral infection was presented.
- 3) Because antibodies were only detected in the aqueous humor of 1/168 ophthalmologically asymptomatic eyes included in this study, diagnostic aqueocentesis should only be carried out on such eyes in exceptional situations.

8 Literaturverzeichnis

ALEXANDER, C. S. u. H. KELLER (1990): Ätiologie und Vorkommen der periodischen Augenentzündung des Pferdes im Raum Berlin. *Tierärztl. Prax.* 18, 623–627.

ALLEN, J. B., M. C. MCGAHAN, O. YASUSHI, D. C. SELLON, B. D. CLARK u. L. N. FLEISHER (1996): Intravitreal transforming growth factor- β 2 decreases cellular infiltration in endotoxin-induced ocular inflammation in rabbits. *Curr. Eye Res.* 15, 95–103.

ATTENBURROW, D. P., J. J. DONNELLY u. E. J. L. SOULSBY (1983): Periodic ophthalmia (recurrent uveitis) of horses: An evaluation of the aetiological role of microfilariae of *Onchocerca cervicalis* and the clinical management of the condition. *Equine Vet. J. Suppl.* 2, 48–56.

BARKAY, S. u. H. GARZOZI (1990): Leptospirosis. In: D. H. GOLD u. T. A. WEINGEIST (Hrsg.): *The eye in systemic disease*. J. B. Lippincott, Philadelphia, Grand Rapids, S. 226–228.

BARNETT, K. C., S. M. CRISPIN, J. D. LAVACH u. A. G. MATTHEWS (Hrsg.) (1995): Uveitis. In: *Color atlas and text of equine ophthalmology*. Mosby-Wolfe, London, Baltimore, S. 166–170.

BARNETT, J. K., D. BARNETT, C. A. BOLIN, T. A. SUMMERS, E. A. WAGAR, N. F. CHEVILLE, R. A. HAARTSKEERL u. D. A. HAAKE (1999): Expression and distribution of leptospiral outer membrane components during renal infection of hamsters. *Infect. Immun.* 67, 853–861.

BERNARD W. V. (1993): Leptospirosis. *Vet. Clin. North Am., Equine Pract.* 9, 435–444.

BERNHARDT-GUDWALLEN, L. (1900): Ueber die periodische Augenentzündung der Pferde. *Tierärztl. Wschr.* 26, 301–304.

- BISTNER, S. u. D. SHAW (1980): Uveitis in the horse: Part II – diagnosis and therapy. *Minnesota Vet.* 20, 36–42.
- BOHL, E. H. u. L. C. FERGUSON (1952): Leptospirosis in domestic animals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 121, 421–428.
- BOLIN, C. A. (2003): Letters to the Editor: Finds fault with implications of PCR assay conclusions. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 223, 178–179
- BREM, S., H. GERHARDS, B. WOLLANKE, P. MEYER u. H. KOPP (1998): Intraokularer Leptospirennachweis bei 4 Pferden mit rezidivierender Uveitis (ERU). *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 111, 415–417.
- BREM, S., H. GERHARDS, B. WOLLANKE, P. MEYER u. H. KOPP (1999a): 35 Leptospirenisolationen aus Glaskörpern von 32 Pferden mit rezidivierender Uveitis (ERU). *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 112, 390–393.
- BREM, S., H. KOPP, P. MEYER u. P. HOLLMANN (1988): Erste Isolation von *Leptospira* Serovar hardjo in der Bundesrepublik Deutschland. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 101, 419–421.
- BREM, S., C. STAAK, A. SCHÖNBERG, H. KOPP u. P. MEYER (1999b): Beitrag zur Leptospirenserologie des Hundes. Vergleich von MAR- und ELISA-Ergebnissen. *Tierärztl. Umsch.* 54, 83–87.
- BRUNS, G. (1967): Vergleichende pathologische Anatomie der Leptospirosen. In: J. KATHE u. H. MOCHMANN (Hrsg.): *Leptospiren und Leptospirosen. Teil I.* Gustav Fischer Verlag, Jena, S. 154–230.
- BRYANS, J. T. (1955): Studies on equine leptospirosis. *Cornell Vet.* 45, 16–50.

- BURGESS, E., C., D. GILLETTE u. J. P. PICKETT (1986): Arthritis and panuveitis as manifestations of *Borrelia burgdorferi* infection in a Wisconsin pony. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 189, 1340–1342.
- COOK, C. S., R. L. PFEIFFER u. D. E. HARLING (1983): Equine recurrent uveitis. In: K. C. BARNETT, P. D. ROSSDALE u. J. F. WADE (Hrsg.): *Equine ophthalmology*. *Equine Vet. J.*, Suppl. 2, 57–60.
- COUSINS, S. W., W. B. TRATTLER u. W. STREILEIN (1991): Immune privilege and suppression of immunogenic inflammation in the anterior chamber of the eye. *Curr. Eye Res.* 10, 287–297.
- CROSS, R. S. N. (1966): Equine periodic ophthalmia. *Vet. Rec.* 78, 8–13.
- DAVIDSON, M. G. (1991): Equine ophthalmology. In: K. GELATT (Hrsg.): *Veterinary Ophthalmology*, 2. Aufl., Lea & Febiger, Philadelphia, London, S. 576–610.
- DEEG, C. A., B. KASPERS, H. GERHARDS, S. R. THURAU, B. WOLLANKE u. G. WILDNER (2001): Immune responses to retinal autoantigens and peptides in equine recurrent uveitis. *Invest. Ophthalmol.* 42, 393–398.
- DEEG, C. A., E. MARTI, C. GAILLARD u. B. KASPERS (2004): Equine recurrent uveitis is strongly associated with the MHC class I haplotype ELA-A9. *Equine Vet. J.* 36, 73–75.
- DGHM, Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (1984): Diagnostik bei Leptospiren. *Zbl. Bakt. Hyg. A* 258, 480–491.
- DIXON, P. u. R. COPPACK (2002): Equine recurrent uveitis. *Vet. Rec.* 27, 2002.
- DWYER, A. E., R. S. CROCKETT u. C. M. KALSOW (1995): Association of leptospiral seroreactivity and breed with uveitis and blindness in horses: 372 cases (1986-1993). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 207, 1327–1331.

- ELLIS, W. A., G. M. ROBERTSON, L. HUSTA u. M. KIRBY (1983): Detection of leptospire in tissue using an immunoperoxidase staining procedure. *Austr. Vet. J.* 60, 364–367.
- ERRINGTON, B. J. (1941): Ophthalmology in equidae. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 108, 115–123.
- EULE, J. C., B. WAGNER, W. LEIBOLD u. E. DEEGEN (1999): Vorkommen verschiedener Immunglobulinisotypen bei Pferden mit equiner rezidivierender Uveitis (ERU). *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 113, 253–257.
- FABER, N. A., M. CRAWFORD, R. B. LEFEBVRE, N. C. BUYUKMIHCI, J. E. MADIGAN u. N. H. WILLITS (2000): Detection of *Leptospira* spp. in the aqueous humor of horses with naturally acquired recurrent uveitis. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2731–2733.
- FAINE, S. (1982): Guidelines for the control of leptospirosis. WHO Offset Publication No. 67. World health organization, Geneva.
- FAINE, S. (1994): *Leptospira and leptospirosis*. CRC Press, Boca Raton.
- FAINE, S., B. ADLER, C. BOLIN und P. PEROLAT (2000): *Leptospira and Leptospirosis* 2. Aufl., MediSci, Melbourne.
- FATHALLA, N. C. u. J. D. COGHLAN (1980): Detection of leptospiral antibodies in animal sera by means of fractionated antigenic extracts. *J. Med. Microbiol.* 11, 513–526.
- FRÜHAUF, B., B. OHNESORGE, E. DEEGEN u. M. BOEVÉ (1998): Surgical management of equine recurrent uveitis with single port pars plana vitrectomy. *Vet. Ophthalmol.* 1, 137–151.
- GARRITY, G. M., D. R. BOONE u. R. W. CASTENHOLZ (2001): *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2. Aufl. Bd. I. Springer Verlag, New York, Berlin, Heidelberg.
- GELATT, K.N. (1972): The eye. In: E. J. CATCOTT u. J. F. SMITHCORS (Hrsg.): *Equine medicine & surgery*. 2. Aufl., American Veterinary Publications, S. 399–432.

- GERHARDS, H. u. B. WOLLANKE (1996): Vitrektomie bei rezidivierender Uveitis des Pferdes. *Veterinärspiegel*, 222–228.
- GERHARDS, H u. B. WOLLANKE (2001): Uveitis bei Pferden – Diagnose und Therapie. *Pferdeheilk.* 17, 319–329.
- GERHARDS, H., B. WOLLANKE u. S. BREM (1999): Vitrectomy as a diagnostic and therapeutic approach for equine recurrent uveitis (ERU). *Proceedings 45th Ann. Conv. AAEP*, Albuquerque, S. 89–93.
- GERHARDS, H., B. WOLLANKE, A. WINTERBERG u. H. WERRY (1998): Technique for and results with surgical treatment of equine recurrent uveitis (ERU). *Proc. 29th Annu. Meet. Am. Coll. Vet. Ophthalmol.*, Seattle, S. 30.
- GILGER, B. C. (2003): How to diagnose and treat glaucoma in the horse. *AAEP Proc.* 49, 306–311.
- GILGER, B. C., D. A. WILKIE, M. G. DAVIDSON u. J. B. ALLEN (2001): Use of an intravitreal sustained-released cyclosporine delivery device for treatment of equine recurrent uveitis. *Am. J. Vet. Res.* 62, 1892–1896.
- GSELL, O., K. REHSTEINER u. F. VERREY (1946): Iridocyclitis als Spätfolge von Leptospirosis Pomona (Schweinehüterkrankheit). *Ophthalmologica* 112, 320–334.
- HAHN, K. (1991): Leptospiren. In: H. HAHN, D. FALKE u. P. KLEIN (Hrsg.): *Medizinische Mikrobiologie*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, S. 476–497.
- HALLIWELL, R. E. W. u. M. T. HINES (1985): Studies on equine recurrent uveitis. I: Levels of immunoglobulin and albumin in the aqueous humor of horses with and without intraocular disease. *Curr. Eye Res.* 4, 1023–1031.

HARKIN, K. R., Y. M. ROSHTO, J. T. SULLIVAN, T. J. PURVIS u. M. M. CHENGAPPA (2003): Comparison of polymerase chain reaction assay, bacteriologic culture, and serologic testing in assessment of prevalence of urinary shedding of leptospire in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 222, 1230–1233.

HASSENKAMP, F. (1974): Glaskörperveränderungen bei Sportpferden. Tiermedizinische Dissertation, Tierärztl. Hochsch. Hannover.

HEUSSER, H. (1948): Die periodische Augenentzündung, eine Leptospirose? *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 90, 287–312.

HEUSSER, H. (1952): Zur Ätiologie der periodischen Augenentzündung. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 94, 296–306.

HINES, M. T. (1984): Immunologically mediated ocular disease in the horse. *Vet. Clin. North Am. Large Anim. Pract.* 6, 264–271.

HORSCH, F. u. H. NATTERMANN (1999): Leptospirose. in: O. DIETZ u. B. HUSKAMP (Hrsg.): *Handbuch Pferdepraxis*. 2. Aufl. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, S. 652–654.

JOHNSON, R. C. u. S. FAINE (1984): Family II. Leptospiraceae. in: N. R. KRIEG u. J. G. HOLT (Hrsg.): *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Bd. I. William & Wilkins, Baltimore, London. S. 62–66.

KEMENES, F. u. L. TAMAS (1952): Ist die fibrinöse Iridozyklitis der Pferde eine Leptospirose? *Acta Veterinaria* 2, 327–336. (Ref. als: KEMENES, F. u. L. TAMAS (1954): Ist die fibrinöse Iridozyklitis der Pferde eine Leptospirose? *Monatsh. Vet. Med.* 9, 357–358)

KEMENES, P., J. SURJAN u. L. VIZY (1961): *Leptospira* as the cause of periodic ophthalmia in horses. *Vet. Bull.* 31, 12.

KETTNER, H. (1997): Untersuchungen zur klinischen Epizootiologie und Diagnostik der Leptospireninfektion beim Pferd. Tiermedizinische Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.

LAVACH, J. D. (Hrsg.) (1990): Periodic ophthalmia. In: Large animal ophthalmology. C. W. Mosby Company, St. Louis, Baltimore, S. 162–171.

LEPTOSPIROSIS REFERENCE LABORATORY (2003): Biomedical Research. Internet-Seite: http://www.kit.nl/biomedical_research/html/leptospirosis_reference.asp .

LEVETT, P. N. (2001): Leptospirosis. Clin. Microbiol. Rev. 14, 296–326.

LUCCHESI, M.A. u. A. E. PARMA (1999): A DNA fragment of *Leptospira interrogans* encodes a protein which shares epitopes with equine cornea. Vet. Immunol. Immunopathol. 71, 173–179.

LUCCHESI, M.A., A. E. PARMA u. G. H. ARROYO (2002): Serovar distribution of a DNA sequence involved in the antigenic relationship between *Leptospira* and equine cornea. BMC Microbiol. 2, 3. Internet-Seite: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=11869455> .

MAIR, T. S. u. S. M. CRISPIN (1989): Immunological mechanisms in uveitis. Equine Vet. J. 21, 391–393.

MCGRAWTH, H., B. ADLER, T. VINH u. S. FAINE (1984): Phagocytosis of virulent and avirulent leptospire by guinea-pig and human polymorphonuclear leukocytes in vitro. Pathology 16, 243–249.

MERIEN, F., G. BARANTON u. P. PEROLAT (1995): Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. J. Infect. Dis. 172, 281–285.

MERIEN, F., P. AMOURIAUX, P. PEROLAT, G. BARANTON u. I. SAINT GIRONS (1992): Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2219–2224.

MERIEN, F., G. BARANTON u. P. PEROLAT (1997): Invasion of vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. *Infect. Immunol.* 65, 729–738.

MILLER, T. R. u. WHITLEY, R. D. (1987): Uveitis in horses. *Mod. Vet. Pract.* 68, 351–357.

MILLER, N. G., u. R. B. WILSON (1962): In vivo and in vitro observation of *Leptospira pomona* by electron microscopy. *J. Bact.* 84, 569–576.

MORTER, R. L., R. C. HERSCHLER, J. F. FESSLER u. A. LAVIGNETTE (1964): Experimental equine leptospirosis (*Leptospira pomona*). *Proc. Annu. Meet. U. S. Livestock Sanitary Assoc.* 68, 147–152.

NCBI-TAXONOMIEBROWSER (2004):

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=171>

(Anmerkung: Die NCBI-Datenbank ist keine autorisierte Quelle für die Nomenklatur oder Klassifikation)

NIEDERMAIER, G. (2002): Elektronenmikroskopische Untersuchung des Glaskörpers des Pferdes mit equiner rezidivierender Uveitis. Tiermedizinische Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.

NUSSENBLATT, R. B. u. I. GERY (1996): Experimental autoimmune uveitis and its relationship to clinical ocular inflammatory disease. *J. Autoimmunity* 9, 575–585.

OIE (2000): Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. 4. Aufl., Office International des Epizzooties, Paris: Leptospirosis, Chapter 2.2.4.,

http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/a_00041.htm

- PARMA, A. E., C. G. SANTISTEBAN, C. G. VILLALBA u. R. A. BOWDEN (1985): Experimental demonstration of an antigenic relationship between leptospira and equine cornea. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 10, 215–224.
- PARMA, A. E., A. S. FÉRNANDEZ, C. G. SANTISTEBAN, R. A. BOWDEN u. S. I. CERONE (1987): Tears and aqueous humor from horses inoculated with *Leptospira* contain antibodies which bind to cornea. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 14, 181–185.
- PARMA, A. E., M. E. SANZ, P. M. LUCCHESI, J. MAZONELLI u. M. A. PETRUCCELLI (1997): Detection of an antigenic protein of *Leptospira interrogans* which shares epitopes with the equine cornea and lens. *Vet. J.* 153, 75–79.
- QUINN, P. J., M. E. CARTER, B. K. MARKEY u. G. R. CARTER (1994): *Clinical veterinary microbiology*. Mosby Verlag, Edinburgh, London, New York, S. 292–299.
- REBHUN, W. C. (1979): Diagnosis and treatment of equine uveitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 175, 803–808.
- RIIS, R. C. (1981): Special ophthalmology. In: K. GELATT (Hrsg.): *Veterinary Ophthalmology*, Lea & Febiger, Philadelphia, S. 590–596.
- ROBERTS, S. J. (1958): Sequelae of leptospirosis in horses on a small farm. *J. Am. Med. Vet. Assoc.* 133, 189–194.
- ROLLE, M. u. A. MAYR (1993): Spezielle Bakteriologie und Mykologie. in: A. MAYR (Hrsg.): *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. 6. Aufl. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, S. 542–548.
- SELBITZ, H. J. (2001): Bakterielle Krankheiten der Tiere. In: A. MAYR (Hrsg.): *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. 7. Aufl. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, S. 417–418 u. 423–427.

- SPIESS, B. M. (1997): Zur equinen rezidivierenden Uveitis (ERU). Schweiz. Arch. Tierheilk. 139, 126–133.
- STADES, F. C., W. NEUMANN, M.H. BOEVÉ u. M. WYMAN (1996): Praktische Augenheilkunde für den Tierarzt. Schlütersche, Hannover, S. 174.
- STUBBS, E. L. u. W. G. LOVE (1941): Studies on sensitization: its possible relationship to periodic ophthalmia. North Am. Vet. 22, 539–542.
- SZEMES, P. A. u. H. GERHARDS (2000): Untersuchungen zur Prävalenz der equinen rezidivierenden Uveitis im Großraum Köln-Bonn. Prakt. Tierarzt 81, 408–420.
- THOMAS, D. D. u. L. M. HIGBIE (1990): In vitro association of leptospire with host cells. Infect. Immun. 58, 581–585.
- TIJSSEN, P. (1985): Practice and theory of enzyme immunoassays. In: Burdon, R. H., P. H. van Knippenberg (Hrsg.): Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford.
- TOMASEK, V. (1954): Etiology and treatment of equine periodic ophthalmia. Vet. Glasnik 8, 243 (Ref. in: Vet. Bull. 25, 248–249).
- WADA, S., M. YOSHINARI, Y. KATAYAMA, T. ANZAI, R. WADA u. M. AKUZAWA (2003): Nonulcerative keratouveitis as a manifestation of leptospiral infection in a horse. Vet. Ophthalmol. 6, 191–195.
- WILLIAMS, R. D. (1968): The presence and duration of persistence of *Leptospira pomona* in equine ocular tissues following experimentally induced systemic infection. M. S. Thesis, Purdue University, Lafayette, Ind. (zit. nach WILLIAMS et al., 1971).

WILLIAMS, R. D., R. L. MORTER, M. J. FREEMAN u. A. M. LAVIGNETTE (1971): Experimental chronic uveitis. Ophthalmic signs following equine leptospirosis. *Invest. Ophthalmol.* 10, 948–954.

WILLIAMS, C. S., I. H. SIDDIQUE u. W. J. SAPP (1981): Studies on the kidneys of pregnant hamsters infected with *Leptospira canicola*. *Br. J. Exp. Path.* 62, 165–170.

WINTERBERG, A. (1997): Langzeitergebnisse der Pars-plana-Vitrektomie bei equiner rezidivierender Uveitis. Tiermedizinische Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.

WINTERBERG, A. u. H. GERHARDS (1997): Langzeitergebnisse der Pars-plana-Vitrektomie bei equiner rezidivierender Uveitis. *Pferdeheilk.* 13, 377–383.

WITMER, R., J. LÖHRER u. E. WIESMANN (1953): Zur Ätiologie, Diagnose und Therapie der periodischen Augenentzündung (p. A.) des Pferdes. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 95, 419–439.

WOLLANKE, B. (1995): Untersuchungen zur Ätiologie der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU). Tiermedizinische Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.

WOLLANKE, B. (2002): Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) als intraokulare Leptospirose. Tiermedizinische Habilitation, Ludwig-Maximilians-Universität München.

WOLLANKE, B., H. GERHARDS, S. BREM, R. GOTHE, E. WOLF, S. HERZOG, H. KOPP u. P. MEYER (1998): Studies on vitreous and serum samples from horses with equine recurrent uveitis (ERU): The role of *Leptospira*, *Borrelia burgdorferi*, Borna disease virus and *Toxoplasma* in the etiology of ERU. *Proc. 29th Annu. Meet. Am. Coll. Vet. Ophthalmol.*, Seattle, S. 31.

WOLLANKE, B., H. GERHARDS, S. BREM, E. WOLF, H. KOPP u. P. MEYER (2000): Zur Leptospirenätiologie der equinen rezidivierenden Uveitis. *Tierärztl. Prax.* 28, 153–158.

WOLLANKE, B., B. ROHRBACH u. H. GERHARDS (2001): Serum and vitreous humor antibodies to *Leptospira interrogans* from horses with recurrent uveitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 219, 795–800.

WOODS, A. C. u. A. M. CHESNEY (1930): The transmission of periodic ophthalmia of horses by means of a filterable agent. *J. Exp. Med.* 52, 637–657.

WOODS, A. C. u. A. M. CHESNEY (1931): The transmission of periodic ophthalmia of horses by means of a filterable agent. *Vet. Med.* 26, 496–498.

ZWIERZCHOWSKI, J. (1967): Klinik und Therapie der Leptospirose der Haus- und Nutztiere. In: J. KATHE u. H. MOCHMANN (Hrsg.): *Leptospiren und Leptospirose*. Teil I. Gustav Fischer Verlag, Jena, S. 79–137.

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Lehrer Professor Dr. H. Gerhards für die Überlassung des Themas und die große Unterstützung während meiner Ausbildung.

Herrn Dr. Brem bin ich sehr zum Dank verpflichtet, da er mir als Leiter des Leptospirenlabors des Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit freundliche Unterstützung zur Durchführung der Laborarbeit gewährte. Die vielen Diskussionen die ich mit ihm führen durfte waren sehr aufschlussreich. Den Herren Dr. Kopp und Dr. Maier danke ich ebenfalls für das freundliche Beantworten meiner Fragen.

Den Technischen Assistentinnen Maria Hauser, Agapi Michailidou, Klara Varady, Illona Peter und Hermine Harzer danke ich herzlich für die freundliche Unterstützung im Labor.

Frau Dr. Bettina Wollanke danke ich für die immerwährende Hilfe bei fachlichen Fragen und Herrn Professor Dr. Osterkorn für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Frau Dr. Gabi Niedermaier, Steffi Aspmaier, Richard McMullen und Ullrichs Mohn danke ich für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Meiner Frau und Freundin Uta möchte ich besonderen Dank für die liebevolle Unterstützung und Geduld, die sie während der Phasen der Laborarbeit aufbrachte, aussprechen.

Meinen Eltern und meiner Familie insgesamt kann ich gar nicht genug danken für das Ermöglichen eines sorgenfreien Lebensweges bis hierher und den dauerhaften Rückhalt in allen Lebenslagen.

10 LEBENS LAUF

Name	Stefan Gesell
Geburtsdatum	30. Sept. 1975
Geburtsort	Tettnang
Staatsangehörigkeit	deutsch
Eltern	Paul Gesell, Staatsanwalt Monika Gesell, geb. Greißing, Hausfrau
Familienstand	verheiratet
Ehefrau	Uta Gesell, geb. Schulze, Studentin der Zahnmedizin
Schulbildung	1982–1986: Grundschule Langentrog 1986–1995: Gymnasium Tettnang
Abitur	Juli 1995
Hochschulausbildung	Nov. 1995 bis Jan. 2001: Studium der Tiermedizin an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Approbation	Feb. 2001
Dissertation	Jan. 2001 bis Juli 2004: Doktorarbeit an der Chirurgischen Tierklinik der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, Vorstand Prof. Dr. H. Gerhards
Tierärztliche Tätigkeit	seit Sept. 2001 wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Chirurgischen Tierklinik der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians- Universität München, Vorstand Prof. Dr. H. Gerhards