

Prophylaxe der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU): Erste Erfahrungen mit einem Leptospiren-Impfstoff bei Pferden

Bettina Wollanke¹, S. Brem², P. Meyer², T. Forbrig³, P. Grassl⁴, H. Gerhards¹ und H. Kopp²

Pferdeabteilung der Ludwig-Maximilians-Universität München, Lehrstuhl für Innere Medizin und Chirurgie des Pferdes sowie Gerichtliche Tiermedizin, Vorstand: Prof. Dr. H. Gerhards¹, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim (ehemals „Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Südbayern“)², Dr. Felgenträger & Co./IFID, Öko-Chemie und Pharma GmbH, Rodleben³ und Pferdepraxis, 84171 Baierbach⁴

Zusammenfassung

Bei der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU) handelt es sich um eine persistierende intraokulare Leptospireninfektion, die ausschließlich durch Vitrektomie der erkrankten Augen effektiv und dauerhaft beseitigt werden kann. Um Pferde vor der Infektion mit Leptospiren zu schützen, ergibt sich nach Kenntnis der Ätiologie der ERU unweigerlich die Frage nach einer Impfung gegen Leptospirose. Ein für Pferde zugelassener Leptospiren-Impfstoff ist zurzeit in Europa nicht erhältlich. Die einzige Möglichkeit, eine Impfung bei Pferden durchzuführen, besteht in der Herstellung und Applikation von einer bestandsspezifischen Totvakzine, die aus Leptospiren hergestellt wird, die zuvor von einem Tier dieses Bestandes kultiviert werden konnten. In 2 Beständen, in denen gehäuft Pferde an ERU erkrankt waren, wurde eine Impfung mit einer bestandsspezifischen Vakzine durchgeführt. In beiden Beständen dominierte die Serogruppe Grippotyphosa die intraokularen Infektionen der Tiere und für beide Bestände wurde eine Totvakzine aus dieser Serogruppe hergestellt. Insgesamt wurden 76 Equiden bisher mindestens 2 x geimpft. Die humorale Immunantwort auf die Impfung wurde anhand von Serumuntersuchungen geprüft. Hierfür wurden die MAR (Mikroagglutinationsreaktion) und ELISA-Untersuchungen (IgM und IgG gegen die Serovar grippotyphosa) verwendet. Zusätzlich wurde in einem Bestand Serum von 5 nicht geimpften Kontrollpferden untersucht. Bei allen geimpften Pferden und Ponys wurde durch die Impfung ein signifikanter Anstieg der Antikörpertiter gegen die Serovar grippotyphosa hervorgerufen ($p < 0,001$). Dies galt sowohl für Untersuchungen auf agglutinierende Antikörper mittels MAR als auch für Extinktions-Messungen mittels ELISA. Nach wenigen Wochen sanken die Titer in der MAR und die Extinktion bei ELISA-Untersuchung auf IgM wieder ab, die ELISA-Untersuchung auf IgG ergab die am längsten anhaltende humorale Immunantwort. Bei keinem der geimpften Tiere entstand eine lokale oder systemische Unverträglichkeitsreaktion. Seit Beginn der Impfung vor 5 Jahren bzw. vor 6 Monaten ist in beiden Beständen kein Auge an ERU erkrankt. Die humorale Immunantwort und die Verträglichkeit des Impfstoffes lassen hoffen, dass die Impfung eine relativ ungefährliche Möglichkeit darstellt, die Inzidenz der ERU zumindest in Problembeständen zu senken. Erfahrungen mit der Leptospirose-Impfung bei anderen Spezies haben bei vergleichbaren humoralen Reaktionen nach der Vakzinierung die Schutzwirkung einer derartigen Vakzine aufgezeigt. Grundsätzlich werden für andere Spezies Impf-Intervalle von 6 – 12 Monaten empfohlen. In diesem Zeitraum deutet sich auch ein sinnvolles Impf-Intervall für Pferde an. Die Wirksamkeit der Vakzine ist beim Pferd schwierig zu verifizieren, da die akute Leptospirose in der Regel klinisch inapparent verläuft, die Schutzwirkung einer Vakzine Serogruppen-spezifisch ist und die Latenzzeit bis zur Uveitis-Entstehung Jahre betragen kann. Daher sind Langzeitstudien entweder mit geimpften Pferden und nicht geimpften Kontrolltieren oder sogar Tierversuche mit experimenteller Infektion von geimpften und nicht geimpften Kontrolltieren erforderlich, um die Schutzwirkung der Leptospiren-Vakzine zu beweisen. Sollte sich die Vakzine bewähren, besteht möglicherweise die Chance, dass ein Impfstoff in Deutschland regulär zugelassen wird. Bei Pferdebesitzern ist mit großem Interesse an einer Vakzine zu rechnen, die vor der ERU schützen kann. In einem kommerziellen Impfstoff für Pferde in Deutschland sollte neben der Serovar grippotyphosa auch die Serovar bratislava vertreten sein, damit etwa 90 % der intraokularen Infektionen verhindert werden können.

Schlüsselwörter: Pferde, Leptospiren, intraokulare Infektion, ERU, Impfung

Prophylaxis of equine recurrent uveitis (ERU): First results with a leptospiral vaccine in horses

Equine recurrent uveitis (ERU) is a persistent intraocular leptospiral infection which can only be effectively and permanently eliminated by vitrectomy. Knowledge about etiology of ERU leads directly to the demand for vaccination against leptospirosis to protect horses from leptospiral infection. At present, there is no leptospiral vaccine available in Europe. Thus, the only possibility for a leptospiral vaccination in horses is to produce a stable-specific vaccine with killed leptospire which have been cultured from an animal of this stable before. In two stables with a high incidence of ERU vaccination with a stable-specific vaccine has been performed. In both stables serogruppe Grippotyphosa dominated the intraocular infections of the horses and for both stables a vaccine with killed leptospire out of serogroup Grippotyphosa was produced. Seventy-six equids received at least the first vaccination and one booster injection. Humoral immune response to vaccination was observed by examination of serum samples. The serum samples were tested for antibodies by MAT (microagglutination test) and ELISA-tests (IgM and IgG against serovar grippotyphosa). Additionally, serum samples could be taken from 5 not vaccinated control horses in one stable. In all vaccinated ponies and horses a significant increase of antibody titers against serovar grippotyphosa using MAT and a significant increase of the extinction using ELISA for IgM and IgG could be seen ($p < 0,001$). After a few weeks MAT-titers and IgM-extinction decreased, ELISA for IgG showed the longest humoral immune reaction. None of the vaccinated equids developed a local or systemic incompatibility reaction. Since beginning of vaccination 5 years ago in one stable and 6 months ago in the second stable no eye has shown uveitis. The humoral immune response and lack of incompatibility reactions after vaccination give hope that this vaccination is a relative save possibility to decrease the incidence of ERU at least in stables with a high frequency of this disease. Experiences with lepto-

spiral vaccination in other species and comparable humoral immune responses after vaccination showed a protective effect of such a vaccine. Basically, intervals of 6 – 12 months between vaccinations are recommended for other species. This seems to be a practical interval for horses, too. The efficacy of a leptospiral vaccine in horses is difficult to verify as the acute leptospirosis usually is clinically inapparent, the protection of a vaccine is serogroup specific, and latency period until uveitis develops may be years. Thus, long time studies are necessary either with vaccinated horses and not vaccinated control horses or even experimental infection with leptospirae of vaccinated and not vaccinated horses to demonstrate a protective effect of the vaccine. If vaccination proves itself, there might be a chance for the production of a licensed and commercially available vaccine in Germany. It can be assumed, that horse owners would have great interest in a vaccine protecting their horses from developing ERU. Such a commercial vaccine for horses in Germany should contain serovar bratislava besides serovar grippotyphosa to prevent 90 % of the intraocular infections.

Keywords: horses, leptospirae, intraocular infection, ERU, vaccination

Einleitung

In den letzten Jahren konnte eine intraokulare Leptospireninfektion als Ätiologie der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU) nachgewiesen werden (Brem et al. 1999, Faber et al. 2000, Wollanke 2002, Wollanke et al. 2004). Unter konsequenter medikamentöser Behandlung eines akuten Uveitisschubes kann in den meisten Fällen der zurückbleibende Schaden am Pferdeauge zwar begrenzt werden, bei wiederholt auftretenden Entzündungsschüben wird das Auge jedoch nach und nach zunehmend geschädigt und die meisten betroffenen Pferdeaugen erblinden im weiteren Krankheitsverlauf (Hering 1837, Unger 1955, Zwierzchowski 1967, Abrams und Brooks 1990, Lavach 1990, Davidson 1991, Whitley et al. 1993, Kalsow und Dwyer 1997, Spiess 1997, Gerhards und Wollanke 2001). Die Vitrektomie stellt zwar eine effektive und komplikationsarme Therapiemöglichkeit dar (Gerhards et al. 1999), jedoch handelt es sich um eine Operation in Vollnarkose, die mit Kosten und Risiken verbunden ist. Um dem Auftreten der ERU vorzubeugen und damit den Pferden die Operation zu ersparen, ergibt sich nach Identifizierung der intraokular persistierenden Leptospiren als ERU-auslösendes Agens unweigerlich die Frage nach einer prophylaktischen Impfung.

Grundsätzlich sind Impfungen gegen Leptospirose möglich und können vor Infektionen schützen (Bernard 1993, Heath und Johnson 1994). In der Humanmedizin wird eine Impfung gegen Leptospirose bei gefährdeten Personen, insbesondere in den Tropen und Feuchtgebieten (Haake et al. 1999, Martinez Sanchez et al. 2000, Guerreiro et al. 2001, Ignat et al. 2001, Gordon 2002, Yan et al. 2003), empfohlen. Bei Hunden gehört die Leptospirose-Impfung zum Standard (Appel 1999). Für Rinder gibt es in den USA polyvalente Leptospiren-Vakzine, in denen die Serovare pomona, canicola, icterohaemorrhagiae, hardjo und grippotyphosa enthalten sind (Diesch 1980). Sowohl die Wirkung als auch die Verträglichkeit von Rinder-, Schweine- und Hundeimpfstoffen bei Pferden sind jedoch umstritten (Bernard 1993, Williams et al. 1994).

Erfahrungen mit einer Leptospiren-Vakzine bei Pferden sind begrenzt. Zurzeit existiert weltweit kein für Pferde zugelassener Impfstoff. Es werden nur einzelne Vakzinierungen bei Pferden in der Literatur beschrieben (Bramel und Scheidy 1956, Crane 1956, Scheidy 1957). Die Forderung, einen Leptospiren-Impfstoff für Pferde herzustellen, wurde wiederholt geäußert (Diesch 1980, Ellis und O'Brien 1988, Wood 1994). Die Indikation für eine Impfung gegen Leptospirose bei Pferden wurde in erster Linie in Leptospiren-induzierten Aborten gesehen (Heath und Johnson 1994, Williams et al. 1994, Kinde et al. 1996). Da die Pferde-Leptospirose in der Regel inapparent verläuft, werden ihre Folgen nicht mit der Infektion in Zusammenhang gebracht (Hathaway et al. 1981, Ellis et al.

1983, Park et al. 1992). Mit der Erkenntnis, dass die ERU Folge einer in der Regel inapparent abgelaufenen Leptospireninfektion ist, in deren Verlauf die Erreger in das Pferdeauge gelangen, lässt der prophylaktischen Impfung gegen Leptospirose eine neue Bedeutung zukommen. Möglicherweise kann durch konsequente Impfung von Pferden gegen Leptospirose die Inzidenz der ERU gesenkt werden.

Die einzige legale Möglichkeit, Pferde gegen Leptospirose zu impfen, besteht derzeit in der Applikation eines bestandsspezifischen Impfstoffs. Dieser Impfstoff kann nur dann hergestellt und eingesetzt werden, wenn die Bakterien zuvor von einem Tier aus dem Bestand isoliert werden konnten. Um die Verträglichkeit eines solchen Impfstoffes zu testen und um die Antikörperreaktion auf die Impfung zu prüfen, wurde in 2 Pferdebeständen jeweils mit einer bestandsspezifischen Vakzine (jeweils aus einem Leptospiren-Isolat aus der Serogruppe Grippotyphosa) eine Impfung durchgeführt.

Material und Methode - Ausgangssituation

Bestand 1

Im Verlauf von 4 Jahren wurden 5 Augen von 4 Pferden aus diesem Bestand in der Pferdeabteilung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München vitrektomiert. Die Vitrektomie erfolgte unter standardisierten Bedingungen (Gerhards et al. 1999). Bei 2 Pferden wurde eine Probe aus der etwa um den Faktor 15 verdünnten Glaskörper-Spülflüssigkeit zur Untersuchung auf Antikörper gegen Leptospiren an das Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Südbayern in Oberschleißheim versandt. Bei den beiden anderen Pferden (Operation von 3 Augen) wurden zu Beginn der Vitrektomie, vor Öffnung der Infusionsleitung, 2 ml unverdünntes Glaskörpermaterial über einen an das Operationsinstrument angeschlossenen 3-Wege-Hahn steril aus dem Auge entnommen. Unmittelbar nach der Operation wurde 1 ml des Glaskörpermaterials steril in ein Probengefäß mit Kulturmedium injiziert und zur Anzüchtung der Erreger an das Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Oberschleißheim versandt. Die weitere Kultur erfolgte dort wie von Brem und Mitarbeitern beschrieben (1988). Der Rest des unverdünnt entnommenen Glaskörpermaterials wurde mittels Mikroagglutinationsreaktion (MAR) auf Antikörper gegen Leptospiren getestet (Tab. 1). In allen Glaskörperproben dominierten Antikörper gegen die Leptospiren-Serovar Grippotyphosa. Die Antikörpertiter lagen zwischen 1:100 (eine um den Faktor 1:15 verdünnte Glaskörperprobe) und 1:25.600. Aus jedem der 3 Kultur-Ansätze wurden Leptospiren aus der Serogruppe Grippotyphosa isoliert (Tab. 1).

Tab 1 Pferde aus Bestand 1, die von 1995 bis 1999 in der Chirurgischen Tierklinik der Veterinärmedizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München vitrektomiert wurden und die Ergebnisse der Untersuchungen auf eine Leptospiren-Infektion (Antikörpertiter und Kultur). (gripp = Serovar grippotyphosa, cop = Serovar copenhageni)

Horses from stable 1 which underwent vitrectomy in the Department of Equine Surgery of the University of Munich between 1995 and 1999 and the results of tests for intraocular leptospiral infection (antibody titers and culture). (gripp = serovar grippotyphosa, cop = serovar copenhageni)

Pferd	Vitrektomie	Antikörpertiter (gripp) im Glaskörper	Kultur Glaskörper	Antikörpertiter im Serum
1	linkes Auge	1:400 (Probe ca. 1:15 verdünnt)	nicht angesetzt	negativ
2	linkes Auge	1:100 (Probe ca. 1:15 verdünnt)	nicht angesetzt	1 : 800 (gripp)
3	linkes Auge	1:25.000 (Probe unverdünnt)	positiv (gripp)	1:400 (gripp) 1:400 (cop)
4	rechtes Auge	1:12.800 (Probe unverdünnt)	positiv (gripp)	1:800 (gripp) 1:800 (cop)
	linkes Auge	1:12.800 (Probe unverdünnt)	positiv (gripp)	

Bestand 2

Seit 1995 waren wiederholt Islandponys aus diesem Bestand wegen ERU zur Vitrektomie in die Pferdeabteilung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München überwiesen worden. Es wurden zuletzt im Verlauf von 3 Jahren (2001 bis 2003) 6 an ERU erkrankte Augen von 5 Ponys aus diesem Bestand vitrektomiert. Die Vitrektomie erfolgte wiederum unter standardisierten Bedingungen (Gerhards et al. 1999). Aus allen 6 Augen wurden zu Beginn der Vitrektomie, vor Öffnung der Infusionsleitung, 2 ml unverdünntes Glaskörpermaterial über einen an das Operationsinstrument angeschlossenen 3-Wege-Hahn steril aus dem Auge entnommen. Unmittelbar nach der Operation wurde bei 4 Augen von 4 Ponys 1 ml des Glaskörpermaterials steril in ein Probengefäß mit Kulturmedium injiziert und zur Anzucht von Leptospiren an das Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Oberschleißheim versandt. Von 2 Ponys (3 Augen) wurde Glaskörpermaterial zur Untersuchung mittels Leptospiren-PCR an das Vet Med Labor nach Ludwigsburg geschickt. Ein Kulturversuch wurde hier nicht eingeleitet. Alle 6 unverdünnt entnommenen Glaskörperproben wurden außerdem im Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Oberschleißheim mittels MAR auf Antikörper gegen Leptospiren getestet (Tab. 2).

In 5 der 6 Glaskörperproben dominierten auch bei den Pferden aus diesem Bestand Antikörper gegen die Serovar grippotyphosa. Bei einem Pferd wurden im Glaskörper Antikörper gegen die Serovar saxkoebing nachgewiesen. Die Antikörpertiter lagen zwischen 1:100 und 1:12.800. Aus 3 Kultur-Ansätzen konnten Leptospiren aus der Serogruppe Grippotyphosa isoliert werden und in 2 Glaskörperproben ergab die Untersuchung auf Leptospiren-DNA ein positives Ergebnis (Tab. 2).

Material und Methode - Impfung

Bestand 1

Die in der Kultur isolierten Leptospiren aus der Glaskörperprobe des linken Auges von Pferd 4 wurden für die Herstellung einer bestandsspezifischen Totvakzine verwendet. Die Impfstoffherstellung erfolgte im Landesuntersuchungsamt für

Tab 2 Ponys aus Bestand 2, die von 1995 bis 2003 in der Chirurgischen Tierklinik der Veterinärmedizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München vitrektomiert wurden und die Ergebnisse der Untersuchungen auf eine intraokulare Leptospiren-Infektion (Antikörpertiter, Kultur und PCR). (GK = Glaskörper, AK = Antikörpertiter, LS = Leptospiren, n.u. = nicht untersucht, gripp = Serovar grippotyphosa, cop = Serovar copenhageni, brat = Serovar bratislava, sax = Serovar saxkoebing)

Ponies from stable 2 which underwent vitrectomy in the Department of Equine Surgery of the University of Munich between 1995 and 2003 and the results of tests for intraocular leptospiral infection (antibody titers, culture and PCR). (GK = vitreous, AK = antibody titer, LS = leptospire, n.u. = not tested, gripp = serovar grippotyphosa, cop = serovar copenhageni, brat = serovar bratislava, sax = serovar saxkoebing)

Pferd	Vitrektomie	AK im unverdünnten GK	Kultur GK	LS-PCR GK	AK im Serum
1	linkes Auge	1:400 (sax)	n.u.	n.u.	negativ
2	linkes Auge	1:3.200 (gripp)	positiv (gripp)	n.u.	n.u.
3	linkes Auge	1:100 (gripp)	positiv (gripp)	negativ	1:100 gripp 1:100 cop 1:100 brat
4	linkes Auge	1:12.800 (gripp)	positiv (gripp)	n.u.	n.u.
5	rechtes Auge	1:200 (gripp)	n.u.	positiv	n.u.
	linkes Auge	1:100 (gripp)	n.u.	positiv	

das Gesundheitswesen Südbayern in Oberschleißheim. Die Impfung wurde im Sommer 1999 bei 29 Pferden durchgeführt. Die Tiere erhielten 4 Wochen nach der Erstimpfung eine Boosterung mit dem Impfstoff. Bei 27 der Tiere konnten Verlaufskontrollen der Antikörpertiter durchgeführt werden. Blutentnahmen für die Bestimmung der Antikörpertiter erfolgten sowohl zum Zeitpunkt der Erstimpfung als auch zum Zeitpunkt der Auffrischungs-Impfung. Anschließend konnten nach 3 Monaten bei 4 Pferden und nach weiteren 3 Monaten bei 2 der Pferde Kontrolluntersuchungen durchgeführt werden. Die Antikörperbestimmungen erfolgten bei 19 (Zeitpunkt der Erstimpfung) bzw. 17 Seren (Zeitpunkt der Boosterung) sowie bei den späteren Kontrollen mittels MAR für die Leptospiren-Serovare grippotyphosa, bratislava, copenhageni, pomona, hardjo, canicola, saxkoebing, javanica und pyrogenes. Weitere 10 Seren wurden mittels ELISA auf Antikörper (IgM und IgG) gegen die Serovar grippotyphosa getestet.

Mit der bestandsspezifischen Vakzine wurden im Abstand von jeweils einem Jahr noch 2 weitere Impfungen durchgeführt. Seit Herbst 2001 ist keine weitere Impfung in diesem Bestand erfolgt.

Bestand 2

Die in der Kultur isolierten Leptospiren aus der Glaskörperprobe des linken Auges von Pferd 2 wurden für die Herstellung einer bestandsspezifischen Totvakzine verwendet. Die Impfstoffherstellung erfolgte von Dr. Felgenträger & Co./IFID, Öko-Chemie und Pharma GmbH, Rodleben.

Im November 2003 wurden 47 Islandpferde mit der bestandsspezifischen Vakzine geimpft. Gleichzeitig wurde von diesen 47 Ponys und von 5 nicht geimpften Ponys (Kontrollen) Blut abgenommen und sowohl mittels MAR als auch mittels

ELISA auf Antikörper gegen Leptospiren getestet. Die MAR wurde mit den Serovaren grippotyphosa, bratislava, copenhageni, pomona, hardjo, canicola, saxkoebing, javanica und pyrogenes durchgeführt. ELISA-Untersuchungen wurden zum Nachweis von Antikörpern (IgM und IgG) gegen die Serovar grippotyphosa eingeleitet.

Eine Auffrischimpfung erfolgte bei den 47 Ponys 3 Wochen nach der Erstimpfung. Eine erneute Blutabnahme wurde sowohl bei den 47 geimpften als auch bei den 5 nicht geimpften Ponys 2 Wochen nach der Boosterung durchgeführt. Nach weiteren 6 Wochen wurde von 5 der geimpften Ponys wiederum Blut entnommen. Alle Blutproben wurden wie zuvor mit MAR und ELISA auf Antikörper gegen Leptospiren getestet.

ELISA-Ergebnisse

Alle Serumproben wurden für die ELISA-Untersuchung 1 : 50 verdünnt. Die Ergebnisse des ELISA wurden bei Untersuchung der Proben von Bestand 1 vom Labor in Extinktionen (optischer Dichte = OD) angegeben, die für die Auswertung übernommen wurden. Bei der Untersuchung der Proben von Bestand 2 wurden die ELISA-Ergebnisse vom Labor mit „-“ (negativ), „+/-“ (grenzwertig), „(+“ (schwach positiv), „+“ (positiv) und „++“ (stark positiv) befundet. Für die statistische Auswertung wurden diesen Ergebnissen Zahlen zugeordnet (Tab. 3).

Vakzine-Herstellung und -Applikation

Die Reinkultur des Grippotyphosa-Isolats wurde mehrmals mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und auf ein Drittel der Ausgangsmenge eingengt. Die Vakzine wurde auf einen 0,3 %igen Formol- und einen 7,5 %igen Alu-Gel-S-Gehalt (Fa. Serva) eingestellt. Der Gesamtkeimgehalt betrug mindestens 6×10^8 Keime / ml. Die Impfdosis des auf Sterilität geprüften Impfstoffes betrug 2 ml.

Für die Zubereitung der Vakzine für Bestand 2 wurden die angezüchteten Leptospiren mit Formol inaktiviert. Der Impfstoff enthielt ein Adjuvans (4 mg / ml Aluminiumhydroxid) sowie 2 % Phenol zur Konservierung und wurde nach Ph. EUR. auf Sterilität geprüft. Der Gesamtkeimgehalt betrug $7,5 \times 10^8$ Keime/ml. Die Pferde erhielten jeweils 3 ml der Vakzine subkutan.

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm SPSS 11,5 für Windows. Neben der Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen wurden der Wilcoxon-Test für den Vergleich der Höhe der Antikörpertiter vor und nach den Impfungen sowie der Mann-Whitney-Test für den Vergleich der Antikörper-Reaktion von geimpften und ungeimpften Pferden verwendet.

Ergebnisse

Bestand 1

Zum Zeitpunkt der ersten Impfung wies die überwiegende Zahl der Pferdeseren keine Antikörper gegen Leptospiren auf. In 3 der 19 mit MAR untersuchten Seren war ein Antikörpertiter gegen die Serovar grippotyphosa von 1:100 oder höher feststellbar. Der mittlere reziproke Antikörpertiter gegen die Serovar grippotyphosa betrug $\bar{x} = 88$ ($s = 199$) für die mit MAR untersuchten Seren. Die im ELISA gemessene optische Dichte betrug im Mittel $\bar{x} = 257$ ($s = 354$) für IgG und $\bar{x} = 260$ ($s = 144$) für IgM (Abb. 1).

Zum Zeitpunkt der Boosterung 4 Wochen nach der Erstimpfung betrug der mittlere reziproke Antikörpertiter gegen die Serovar grippotyphosa $\bar{x} = 1086$ ($s = 1273$) in der MAR. Die optische Dichte der ELISA-Untersuchungen betrug im Mittel $\bar{x} = 1088$ ($s = 387$) für IgG und $\bar{x} = 553$ ($s = 244$) für auf IgM. Der mittlere reziproke Antikörpertiter war bei allen Tests signifikant angestiegen ($p = 0,004$, $p < 0,001$ und $p = 0,001$) (Abb. 1).

Die weiteren Kontrolluntersuchungen mittels MAR konnten nur bei 4 (nach 3 Monaten) bzw. 2 (nach 6 Monaten) Pferden

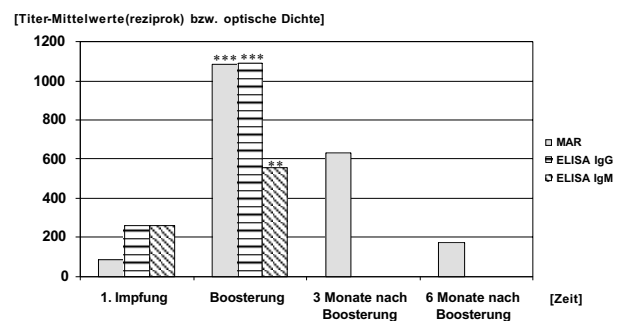


Abb 1 Verlauf der Antikörpertiter (MAR) sowie der IgM- und IgG-Extinktionen (ELISA) nach Impfung mit einer Totvakzine aus einem Isolat der Serogruppe Grippotyphosa in Bestand 1. Der Antikörpertiter-Anstieg vom Zeitpunkt der Erstimpfung zum Zeitpunkt der Boosterung ist für alle Tests signifikant (** entspricht $p \leq 0,01$, *** entspricht $p \leq 0,001$).

*Course of levels antibody of antibody titers (MAT) and course of IgM- and IgG-extinctions (ELISA) after vaccination with a killed leptospira vaccine made from a culture of serogroup Grippotyphosa from stable 1. The increase of the antibody levels from the time of first vaccination to the time of booster vaccination was significant for all tests (** means $p \leq 0,01$, *** means $p \leq 0,001$).*

durchgeführt werden. Drei Monate nach der Boosterung war der reziproke Mittelwert der Antikörpertiter auf $\bar{x} = 630$ ($s = 735$) zurückgegangen. Nach 6 Monaten betrug der reziproke Mittelwert der Antikörpertiter gegen die Serovar grippotyphosa noch $\bar{x} = 170$ ($s = 212$), d.h., es waren wieder annähernd die Antikörpertiter vom Zeitpunkt der Erstimpfung erreicht (Abb. 1).

Zu keinem Zeitpunkt wurde bei einem der Tiere eine lokale oder systemische (Unverträglichkeits-) Reaktion festgestellt. Seit der Impfung sind im Verlauf von mittlerweile über 4,5 Jahren keine weiteren Pferde für die Besitzer erkennbar an ERU erkrankt.

Bestand 2

Zum Zeitpunkt der Erstimpfung hatten 11 der 47 geimpften

Ponys und eins der 5 nicht geimpften Ponys einen Antikörpertiter gegen die Serovar grippotyphosa von 1:100 oder 1:200. Auffallend war, dass bei 34 der 47 geimpften Ponys und bei allen 5 nicht geimpften Ponys auch Antikörpertiter gegen die Serovar bratislava zwischen 1:100 und 1:400 bestimmt wurden. Der reziproke Mittelwert der Antikörpertiter betrug für die Serovar grippotyphosa $\bar{x} = 33,51$ ($s = 58,11$) und für die Serovar bratislava $\bar{x} = 113,83$ ($s = 97,08$). Bei den 5 nicht geimpften Ponys lag der reziproke Mittelwert der Antikörpertiter gegen die Serovar grippotyphosa bei $\bar{x} = 40$ ($s = 41,83$) und gegen die Serovar bratislava bei $\bar{x} = 180$ ($s = 44,72$) (Abb. 2 und Tab. 4).

Bei den Untersuchungen mit ELISA auf Antikörper gegen die Serovar grippotyphosa wurden bei den meisten der Tiere (38/52) Reaktionen für IgM, jedoch nur bei wenigen Tieren (11/52) Reaktionen für IgG nachgewiesen. Der Mittelwert der ELISA-Extinktionen betrug bei den 47 geimpften Ponys zum Zeitpunkt der Erstimpfung (nach Umrechnung anhand Tab. 3) $\bar{x} = 1,7$ ($s = 1,21$) für IgM und $\bar{x} = 0,57$ ($s = 1,12$) für IgG. Bei den nicht geimpften Ponys waren die Ergebnisse ähnlich. Der Mittelwert lag bei $\bar{x} = 2$ für IgM und $\bar{x} = 0$ für IgG (Abb. 3 und Tab. 4).

Zwei Wochen nach der Boosterung (d.h. 5 Wochen nach der Erstimpfung) war bei allen geimpften Tieren ein hoch signifikanter Anstieg der Antikörpertiter gegen die Serovar grippotyphosa sowohl in der MAR als auch in den ELISA-Untersu-

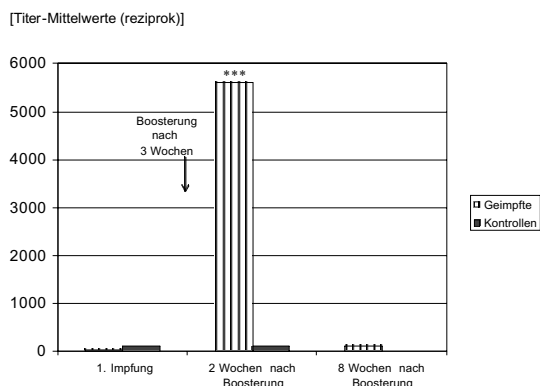


Abb 2 Verlauf der Antikörpertiter gegen die Serovar grippotyphosa in der MAR nach Impfung mit einer bestandsspezifischen Vakzine aus einem Isolat der Serogruppe Grippotyphosa in Bestand 2. (Geimpfte = 47 (bzw. 8 Wochen nach Boosterung 5) Ponys, die die Vakzine erhalten haben; Kontrollen = 5 nicht geimpfte Ponys, *** entspricht $p \leq 0,001$).

*Course of levels of antibody titers against serovar grippotyphosa using MAT after vaccination with a stable specific vaccine from a culture of serogroup Grippotyphosa from stable 2. (Geimpfte = 47 (8 weeks after boosting 5) vaccinated ponies; Kontrollen = 5 ponies which were not vaccinated, *** means $p \leq 0,001$).*

chungen auf IgG und IgM feststellbar (p jeweils $< 0,001$) (Abb. 2 und 3 sowie Tab. 4). Die Antikörpertiter gegen die Serovar bratislava waren geringfügig aber nicht signifikant angestiegen. Der reziproke Mittelwert der Antikörpertiter gegen die Serovar grippotyphosa betrug in der MAR $\bar{x} = 6451,06$ ($s = 6233,5$), der reziproke Mittelwert der Antikörpertiter gegen die Serovar bratislava betrug $\bar{x} = 185,64$ ($s = 265,69$). Bei den nicht geimpften Ponys waren für beide Serovare keine Veränderungen im Vergleich zur vorhergegan-

Tab 3 Zuordnung der ELISA-Ergebnisse zu Zahlen für die statistische Auswertung.

Testergebnis im ELISA	-	+/-	(+)	+	++
zugeordnete Zahlen	0	1	2	3	4

Transformation of ELISA results into numbers for statistical analysis.

Tab 4 Ergebnisse der MAR- und ELISA-Untersuchungen in Bestand 2 zum Zeitpunkt der Erstimpfung sowie 2 und 8 Wochen nach der Boosterung. Von den geimpften Ponys wurden bei der Erstimpfung und 2 Wochen nach Boosterung jeweils 47 Seren und 8 Wochen nach Boosterung 5 Seren untersucht. Bei den nicht geimpften Ponys wurden jeweils 5 Blutproben untersucht. Für die in der MAR gemessenen Antikörpertiter wurden die reziproken Werte eingesetzt und die ELISA-Ergebnisse wurden nach Tab. 3 berechnet. (gripp = Serovar grippotyphosa, brat = Serovar bratislava, \bar{x} = Mittelwert, s = Standardabweichung, n.u. = nicht untersucht)

Results of MAT and ELISA tests in stable 2 at the time of the first vaccination, 2 weeks and 8 weeks after booster injection. From the vaccinated ponies 47 serum samples were taken at the time of first vaccination and two weeks after booster vaccination and 5 serum samples from these ponies were taken 8 weeks after booster vaccination. From 5 ponies which have not been vaccinated serum samples were taken at the time of the first vaccination and 2 weeks after the booster vaccination. MAT titers are reciprocal and ELISA results were calculated after table 3. (gripp = serovar grippotyphosa, brat = serovar bratislava, \bar{x} = mean, s = standard deviation, n.u. = not tested)

		Bei 1. Impfung		2 Wochen nach Boosterung		8 Wochen nach Boosterung	
		\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
MAR (gripp)	geimpfte	33,51	58,113	6451,06	6233,496	105	62,249
	ungeimpfte	40	41,833	50	50	n.u.	n.u.
MAR (brat)	geimpfte	113,83	97,078	185	165,689	145	79,844
	ungeimpfte	180	44,721	90	22,361	n.u.	n.u.
ELISA-IgM (gripp)	geimpfte	1,7	1,214	4	0	3,4	0,548
	ungeimpfte	2	1,414	3,6	0,548	n.u.	n.u.
ELISA-IgG (gripp)	geimpfte	0,57	1,118	4	0	4	0
	ungeimpfte	0	0	0,8	1,095	n.u.	n.u.

nen Untersuchung erkennbar (Abb. 2 und Tab. 4). Im ELISA wurden jedoch ein geringgradiger IgG-Anstieg sowie ein deutlicherer IgM-Anstieg gemessen (Abb. 3 und Tab. 4).

Bei 5 der geimpften Ponys wurde 8 Wochen nach der Boosterung erneut Blut untersucht. Die in der MAR feststellbaren Antikörpertiter gegen Serovar grippotyphosa waren zu diesem Zeitpunkt wieder abgesunken ($\bar{x} = 105$, $s = 62,25$), die im ELISA feststellbaren Reaktionen waren noch positiv (IgM) bzw. stark positiv (IgG) (Tab. 4). Zu keinem Zeitpunkt wurde bei einem der Ponys eine lokale oder systemische (Unverträglichkeits-) Reaktion festgestellt. Ebenso trat bei keinem der Ponys eine Uveitis auf.

Diskussion

Verträglichkeit des Impfstoffes

Bei keinem der 76 zum Teil wiederholt geimpften Ponys und Pferde ist eine lokale oder systemische Unverträglichkeitsreaktion beobachtet worden. Die jeweils bestandsspezifisch zubereiteten Vakzinen stellten somit gut verträgliche Impfstoffe dar, die ohne größere Bedenken verwendet werden kön-

nen.

Es ist bekannt, dass nicht nur nach Stresssituationen, sondern

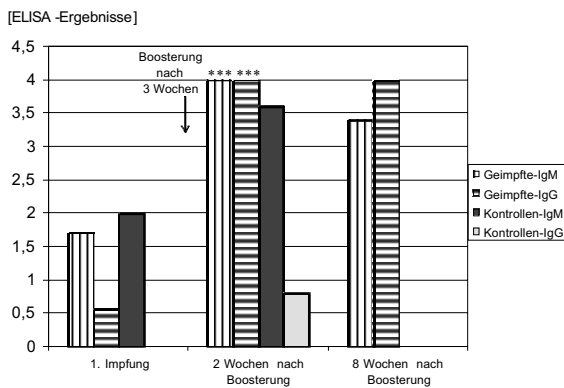


Abb 3 Verlauf der Antikörpertiter gegen die Serovar grippotyphosa im ELISA (IgM und IgG) nach Impfung mit einer bestands-spezifischen Vakzine aus einem Isolat der Serogruppe Grippotyphosa in Bestand 2. (Geimpfte-IgM = ELISA für IgM bei geimpften Ponys, Geimpfte-IgG = ELISA für IgG bei geimpften Ponys, Kontrollen-IgM = ELISA für IgM bei nicht geimpften Ponys, Kontrollen-IgG = ELISA für IgG bei nicht geimpften Ponys, *** entspricht $p \leq 0,001$).

*Course of levels of antibody titers against serovar grippotyphosa using ELISA (IgM and IgG) after vaccination with a stable specific vaccine from a culture of serogroup Grippotyphosa from stable 2. (Geimpfte-IgM = ELISA for IgM in vaccinated ponies, Geimpfte-IgG = ELISA for IgG in vaccinated ponies, Kontrollen-IgM = ELISA for IgM in not vaccinated ponies, Kontrollen-IgG = ELISA for IgG in not vaccinated Ponys, *** means $p \leq 0,001$).*

auch nach Impfungen (insbesondere EHV- und Influenza-Impfungen) bei an ERU erkrankten Pferden Uveitisschübe auftreten können. Möglicherweise wird das Immunsystem durch eine Impfung derart beeinflusst, dass die effektiven immun-supprimierenden intraokularen Mechanismen (Nussenblatt und Gery 1996, Zierhut et al. 1999) außer Kraft gesetzt werden und es zu einem Uveitisschub kommt. Insbesondere bei Injektion einer Leptospiren-haltigen Vakzine ist vorstellbar, dass bei Pferden, die diese Erreger bereits im Auge beherbergen, eine Uveitis ausgelöst wird. Bisher hat sich diese Befürchtung jedoch bei keinem Pferd verwirklicht. Da 9,5 % der Pferde, bei denen Leptospiren aus dem Glaskörper angezchtet werden konnten, keine mit der MAR nachweisbaren Antikörper mehr im Serum aufwiesen (Wollanke 2002), ist eine vor der Impfung durchgeführte Serumuntersuchung nur begrenzt aussagekräftig. Es kann daher auch mit vorhergehenden Serumuntersuchungen nicht sicher verhindert werden, dass Equiden, die Leptospiren im Auge beherbergen, geimpft werden.

Antikörper-Produktion (MAR/ELISA), Verlaufskontrollen und Impfintervalle

Sowohl mit MAR- als auch ELISA-Untersuchungen konnte ein höchst signifikanter Anstieg der Antikörper gegen die Serovar grippotyphosa bei den geimpften Equiden gemessen werden. Der Anstieg der Antikörpertiter war in Bestand 2 deutlicher zu sehen, da die Serumuntersuchungen 2 Wochen nach der Boosterung und nicht wie in Bestand 1 zum Zeitpunkt der Boosterung erfolgt sind. In Bestand 1 ist davon auszugehen, dass die Antikörpertiter 2 Wochen nach der Boosterung äh-

lich angestiegen sind wie in Bestand 2.

Die humorale Reaktion auf die Impfung wird als zufrieden stellend eingeschätzt und lässt hoffen, dass mit einer Leptospiren-Impfung auch beim Pferd ein Schutz vor einer Leptospiren-Infektion erzielt werden kann. Das Sistieren der Uveitiden in Bestand 1 seit der Impfung könnte ein erster Hinweis auf einen durch die Impfung hervorgerufenen Schutz sein. Wie lange dieser Schutz anhalten kann ist schwer abzuschätzen. Bei Mensch, Hund und Rind wird ein 6-12-monatiges Impfintervall empfohlen (Diesch 1980, Heath und Johnson 1994, Appel 1999, Plank und Dean 2000, Branger et al. 2001, Klaasen et al. 2003).

Die Kontrollen der Verläufe der Antikörpertiter gegen Leptospiren erfolgen üblicherweise mittels MAR und in jüngerer Zeit, entsprechend Untersuchungen bei anderen Infektionskrankheiten auch mittels ELISA (Goddard et al. 1991, Brem et al. 1999, Sepulveda-Amor et al. 2002, Klaasen et al. 2003, Yan et al. 2003, Symeonidis et al. 2003, Van Oirschot 2003, Li et al. 2004). Da die Schutzwirkung der Impfung vor einer Leptospiren-Infektion nicht nur auf agglutinierende und nicht agglutinierende Antikörper, sondern auch auf eine zelluläre Immunität zurückgeführt wird (Naimann et al. 2001), sind MAR- und ELISA-Untersuchungen möglicherweise nur begrenzt aussagekräftig für das Fortbestehen einer Schutzwirkung durch die Impfung. So sind bei Rindern in einer Untersuchung 4 Monate nach der Impfung keine agglutinierenden Antikörper mehr im Serum nachgewiesen worden, der Schutz vor einer Leptospiren-Infektion habe jedoch 11 Monate angehalten und wurde vor allem auf IgG zurückgeführt (Tripathy et al. 1975). Diese Immunglobuline können zwar nicht mit der MAR, jedoch mittels ELISA nachgewiesen werden. So sind die mit MAR nachweisbaren agglutinierenden Antikörper gegen die Serovar grippotyphosa in Bestand 2 innerhalb kurzer Zeit nach der Impfung wieder erheblich abgefallen, im ELISA ist jedoch noch eine hohe Extinktion bei Untersuchung auf IgG erkennbar (Abb. 3). Eine zusätzliche zelluläre, TH1-vermittelte Immunität (Naimann et al. 2001) könnte eine noch längere Schutzwirkung nach Impfung erklären, auch wenn sowohl MAR als auch ELISA keine Antikörper mehr nachweisen können.

Serogruppen und Serovare

Da bei Pferden Serovare aus verschiedenen Serogruppen krankheitsverursachend sein können, ist es schwierig, einen wirksamen Impfstoff herzustellen. Es müsste vermutlich ein polyvalenter Impfstoff angefertigt werden (Ellis und O'Brien 1988). In Abhängigkeit von der Region, in der die Pferde gehalten werden, müssten die jeweils am häufigsten vorkommenden Serovare enthalten sein. Für Pferde in Deutschland wäre ein Impfstoff, der die Serogruppe Grippotyphosa abdeckt, am wichtigsten, da diese Serogruppe für 77 % der Uveitiden verantwortlich ist (Wollanke 2002). Seltener ist die Leptospiren-Serogruppe Australis als Auslöser der ERU nachzuweisen, aber es können 13 % der Uveitiden auch auf diese Serogruppe zurückgeführt werden. Weitere Serogruppen, die bei Pferden mit Uveitis aus dem Auge isoliert werden konnten, sind Sejroe (5 %), Pomona (3 %) und Javanica (2 %) (Wollanke 2002). Ein Kombinationsimpfstoff für die Leptospiren-

ren-Serogruppen Grippotyphosa und Bratislava könnte demnach 90 % der Erkrankungen an ERU verhindern, wenn für einen kontinuierlichen Impfschutz der Pferde gesorgt wird.

Ein Impfstoff mit einer Leptospiren-(Tot-)Vakzine und dadurch hervorgerufene schützende Antikörper sind Serovar- (*Diesch* 2001, *Ellis* und *O'Brien* 1988, *Naimann* et al. 2001, *Klaassen* et al. 2003) bzw. zumindest Serogruppen-spezifisch (*Faine* et al. 2000, *Plank* und *Dean* 2000, *Branger* et al. 2001, *Yan* et al. 2003). Selbst wenn nach Impfung mit einer Serovar agglutinierende Antikörper gegen andere Leptospiren („Kreuz-“ oder „Mitreaktionen“) feststellbar sind, bedeutet dies keinen Schutz vor einer Infektion mit dieser anderen Leptospirenart. Die beim Hund bedeutsame Serovar *canicola*, gegen die ein Impfstoff für Hunde seit Jahren zugelassen ist, ist bei Pferden unwirksam, da die Serovar *canicola* so gut wie nie nachgewiesen werden kann.

In der vorliegenden Untersuchung war bei Bestand 2 auffallend, dass fast alle Tiere Antikörper gegen die Serovar bratislava aufwiesen, relativ wenige jedoch Antikörper gegen die Serovar grippotyphosa. Andererseits wurden bei den intraokularen Proben kulturell ausschließlich Leptospiren der Serogruppe Grippotyphosa nachgewiesen. Antikörper wurden in 5 der 6 vitrektomierten Augen gegen Serovar grippotyphosa und in einem Auge gegen Serovar saxkoebing festgestellt. Antikörper gegen Serovar bratislava (Serogruppe Australis) waren in keiner Glaskörperprobe nachweisbar.

Bei Serumuntersuchungen von Pferden aus Deutschland sind generell fast ebenso häufig Antikörper gegen Serovar bratislava nachweisbar wie gegen Serovar grippotyphosa (*Wollanke* 2002). Im Auge dominieren jedoch die Nachweise aus der Serogruppe Grippotyphosa. Überproportional im Auge vertreten ist, in Relation zur Häufigkeit von Serum-Antikörpern, weiterhin die Serogruppe Sejroe. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass manche Leptospiren-Serovare oder -Gruppen leichter zu einer Uveitis führen können, als andere. Es sind zwar Serovare aus verschiedenen Serogruppen im Auge nachweisbar, aber mit Abstand am häufigsten Serovare aus der Serogruppe Grippotyphosa (*Wollanke* 2002).

Eine neue Anregung, möglicherweise Serogruppen-übergreifende Impfstoffe herstellen zu können, lieferte eine Arbeitsgruppe, die feststellte, dass das Adenovirus-medierte Hap 1 (Haemolyse-assoziiertes Protein 1) eine Leptospiren-Serogruppen übergreifende Schutzwirkung hat (*Branger* et al. 2001). Sollte sich die protektive Wirkung weiter untermauern lassen, könnte eine Impfung gegen Leptospirose somit erheblich vereinfacht werden.

Schutzwirkung der Impfung

Im Gegensatz zu anderen Infektionen ist es bei der Leptospirose schwierig, den Impferfolg zu erfassen, da die Leptospiren lange unbemerkt im Auge überleben können und die ERU erst Jahre nach der Infektion auftreten kann. Um zu prüfen, ob und wie lange die durch die Impfung induzierte Antikörperbildung und ggf. vorhandene zelluläre Immunität effektiv

vor Leptospiren-Infektionen schützt, sind weitere Untersuchungen erforderlich. Eine Möglichkeit, die Wirksamkeit zu prüfen, wäre ein Tierversuch. Es müssten sowohl geimpften als auch nicht geimpften Tieren pathogene Leptospiren der betreffenden Serovar injiziert werden. Der erforderliche Beobachtungszeitraum, in dem sich nach Leptospiren-Injektion eine Uveitis zeigt, beträgt nach experimentellen Untersuchungen (*Williams* et al. 1971) bis über 2 Jahre. Eine andere Möglichkeit besteht darin, die nicht geimpften Tiere aus einem Bestand mit gehäuft auftretender ERU als „Kontrollgruppe“ im Vergleich zu den geimpften Equiden zu beobachten.

Um ein Pferd oder Pony effektiv vor einer Leptospiren-Infektion zu schützen ist neben der Auswahl der Serovare auch ein kontinuierlicher Impfschutz von Bedeutung. Hierfür wäre entsprechend der Hinweise für die Impfung von Rindern (*Diesch* 1980, *Heath* und *Johnson* 1994) eine Impfung bzw. Boostierung von Stuten während der Hochträchtigkeit ratsam, damit das Kolostrum möglichst gut mit Antikörpern versorgt ist. Nach Rückgang des maternalen Schutzes müsste dann mit der Impfung der Fohlen begonnen werden. Sollte der Impfschutz nachlassen, ist es den Leptospiren möglich, in das Auge zu gelangen. Wenn nach einer gewissen Zeit erneut und regelmäßig geimpft wird, könnte es trotz Impfung zur ERU kommen, da die Bakterien zuvor in das Auge gelangen konnten. Diese Situation würde verständlicherweise als „Impfdurchbruch“ fehl interpretiert werden.

Fazit

Sowohl die mit den Impfungen erzielbare humorale Immunantwort als auch die gute Verträglichkeit des Impfstoffes sind sehr zufrieden stellend. Im Hinblick auf Untersuchungen an anderen Spezies (Hund, Rind, Mensch) ist zu vermuten, dass mit der Impfung ein Schutz vor Neu-Infektionen mit Serovaren aus der Serogruppe Grippotyphosa möglich ist. Wie zuverlässig mit der Impfung einem Auftreten der ERU vorzubeugen ist, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Nicht zuletzt schwierig ist die Abschätzung, ob sich bei einem potentiellen Impf-Kandidaten schon Leptospiren im Auge befinden (unzuverlässige Ergebnisse von Blutuntersuchungen und jahrelange Leptospiren-Persistenz im Auge vor dem Auftreten der ERU). Sollte sich der Impfschutz als zuverlässig erweisen, ist von einer guten Akzeptanz von Besitzerseite auszugehen, da die Impfstoff-Herstellung nicht übermäßig teuer ist, der Impfstoff bisher problemlos vertragen wurde und die Angst vor Erblindung der Pferde und Ponys begründeter Weise groß ist. Die Zulassung eines Leptospiren-Impfstoffes für Equiden könnte unter diesen Voraussetzungen somit ein gutes Stück näher gerückt sein.

Literatur

- Abrams K. L.* und *D. E. Brooks* (1990): Equine recurrent uveitis: current concepts in diagnosis and treatment. *Equine Pract.* 12, 27-35
Appel M. J. (1999): Forty years of canine vaccination. *Adv. Vet. Med.* 41, 309-324
Ben-Wen L., A. Rush, S. Zhang, K. C. Curtis und *G. J. Weil* (2004):

- Antibody responses to *Brugia malayi* antigens induced by DANN vaccination. <http://www.filariajournal.com/content/3/1/1>
- Bernard W. V. (1993): Leptospirosis. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 9, 435-444
- Bramel R. G. und S. F. Scheidy (1956): The effect of revaccination of horses and cattle with *Leptospira pomona* bacterin. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 128, 399-400
- Brem S., H. Kopp, P. Meyer und P. Hollmann (1988): Erste Isolation von *Leptospira* Serovar hardjo in der Bundesrepublik Deutschland. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 101, 419-421
- Brem S., H. Gerhards, B. Wollanke, P. Meyer und H. Kopp (1999): 35 Leptospirenisolierungen aus Glaskörpern von 32 Pferden mit rezidivierender Uveitis (ERU). *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 112, 390-393
- Branger C., C. Sornier, B. Chatrenet, B. Klonjowski, N. Nuvoen-Clouet, A. Aubert, G. André-Fontaine und M. Eloit (2001): Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination. *Infect. Immun.* 69, 6831-6838
- Crane C. S. (1956): A report on Leptospirosis in a herd of Shetland ponies. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 129, 260-262
- Davidson M. G. (1991): Equine ophthalmology. In: K. GELATT (Hrsg.): *Veterinary Ophthalmology*, 2. Aufl., Lea & Febiger, Philadelphia, London, S. 576-610
- Diesch S. L. (1980): Vaccination and titer evaluation. *Mod. Vet. Pract.* 61, 905-908
- Ellis W. A. und J. J. O'Brien (1988): Leptospirosis in horses. *Proc. 5th Int. Conf. Equine Infect. Dis.*, Lexington, Kentucky, S. 168-171
- Ellis W. A., J. J. O'Brien, J. A. Cassells und J. Montgomery (1983): Leptospirosis in horses in northern Ireland: serological and microbiological findings. *Equine Vet. J.* 15, 317-320
- Faber N. A., M. Crawford, R. B. Lefebvre, N. C. Buyukmihci, J. E. Madigan und 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., B. Adler, C. Bolin und P. Perolat (2000): *Leptospira* and Leptospirosis. 2. Aufl., MediSci, Melbourne
- Gerhards H., B. Wollanke und S. Brem (1999): Vitrectomy as a diagnostic and therapeutic approach for equine recurrent uveitis (ERU). *Proceedings 45th Ann. Conv. AAEP* (2000), Albuquerque, S. 89-93
- Gerhards H. und B. Wollanke (2001): Uveitis bei Pferden - Diagnose und Therapie. *Pferdeheilkunde* 17, 319-329
- Goddard R. D., P. R. Luff und D. H. Thornton (1991): The serological response of calves to *Leptospira interrogans* serovar hardjo vaccines and infection measured by the microscopic agglutination test and anti-IgM and anti-IgG enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet. Microbiol.* 26, 191-201
- Gordon P. J. (2002): Control of leptospirosis by vaccination. *Vet. Rec.* 150, 420
- Guerreiro H., J. Croda, B. Flannery, M. Mazel, J. Matsunaga, M. Galvao Reis, P. N. Levett, A. I. Ko und D. A. Haake (2001): Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. *Infect. Immun.* 69, 4958-4968
- Haake D. A., M. K. Mazel, A. M. Mc Coy, F. Milward, G. Chao, J. Matsunaga und E. A. Wagar (1999): Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. *Infect. Immun.* 67, 6572-6582
- Hanson L. E. und D. N. Tripathy (1983): Leptospirosis vaccination. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 183, 927, 948
- Hathaway S. C., T. W. A. Little, S. M. Finch und A. E. Stevens (1981): Leptospirosis in horses in England: A serological study. *Vet. Rec.* 108, 396-398
- Heath E. S. und R. Johnson (1994): Leptospirosis. *J. Vet. Med. Assoc.* 205, 1518-1523
- Hering E. (Hrsg.) (1837): Spezifische Augenentzündung oder Mondblindheit. In: *Das Pferd, seine Zucht, Behandlung, Structur, Mängel und Krankheiten*. Verlag der Metzler'schen Buchhandlung, Stuttgart, S. 128-131
- Ignat F., M. Preda und I. Perovic (2001): Less frequent etiology in uveitis. *Oftalmologia* 51, 72-76
- Kalsow C. M. und A. E. Dwyer (1997): Role of leptospiral infection in equine recurrent uveitis. *USAHA Proceedings*, <http://www.usaha.org/speeches/leperu97.html>
- Kinde H., S. K. Hietala, C. A. Bolin und J. T. Dowe (1996): Leptospirosis in horses following a flooding incident. *Equine Vet. J.* 28, 327-330
- Klaassen H. L., M. J. Molkenboer, M. P. Vrijenhoek und M. J. Kaashoek (2003): Duration of immunity in dogs vaccinated against leptospirosis with a bivalent inactivated vaccine. *Vet. Microbiol.* 95, 121-132
- Lavach J. D. (Hrsg.) (1990): *Periodic ophthalmia*. In: *Large animal ophthalmology*. C. W. Mosby Company, St. Louis, Baltimore, S. 162-171
- Li B.-W., A. Rush, S. Zhang, K. C. Curtis und G. J. Weil (2004): Antibody responses to *Brugia malayi* antigens induced by DNA vaccination. *Filaria J.*
- Martinez Sanchez R., A. Perez Sierra, M. Baro Suarez, A. M. Alvarez, J. Menendez Hernandez, M. Diaz Gonzalez, R. Cruz De La Paz, G. De Los Reyes, B. Montoya Batisda, G. Sierra Gonzalez, M. Armesto Del Rio, A. Saltaren Cobas und O. Sabourmin Ramos (2000): Evaluation of the effectiveness of a new vaccine against human leptospirosis in groups at risk. *Rev. Salud Panam. Publica* 8, 385-392
- Naimann B. M., D. Alt, C. A. Bolin, R. Zuermer und C. L. Baldwin (2001): Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and (* T Lymphocytes. *Infect. Immun.* 69, 7550-7558
- Nussenblatt R. B. und I. Gery (1996): Experimental autoimmune uveitis and its relationship to clinical ocular inflammatory disease. *J. Autoimmunity* 9, 575-585
- Van Oirschot J. T. (2003): Vaccinology of classical swine fever: from lab to field. *Vet. Microbiol.* 96, 367-384
- Park Y. G., J. C. Gordon, S. Bech-Nielsen und R. D. S. Slemons (1992): Factors of seropositivity to leptospirosis in horses. *Preventive Vet. Med.* 13, 121-127
- Plank R. und D. Dean (2000): Overview of the epidemiology, microbiology and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. *Microbes and Infection* 2, 1265-1276
- Scheidy S. F. (1957): Leptospirosis vaccination studies in cattle, swine, sheep and horses. *J. Am. Med. Vet. Assoc.* 131, 366-368
- Sepulveda-Amor J., J. L. Valdespino-Gomez, L. Garcia-Garcia, R. Islas-Romero, G. Echaniz-Aviles und J. F. De Castro (2002): A randomized trial demonstrating successful boosting response following simultaneous aerosols of measles and rubella (MR) vaccines in school age children. *Vaccine* 20, 2790-2795
- Spiess B. M. (1997): Zur equinen rezidivierenden Uveitis (ERU). *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 139, 126-133
- Symeonidis N., C. Symeonidis, E. Souliou, E. Houiaz, E. Diza, A. Symeonidis und A. Antoniadis (2003): Serological survey of immunity to tetanus in adult population of Northern Halkidiki, Greece. *Eur. J. Epidemiol.* 18, 1147-1152
- Tripathy D. N., A. R. Smith und L. E. Hanson (1975): Immunoglobulins in cattle vaccinated with leptospiral bacterins. *Am. J. Vet. Res.* 36, 1735-1736
- Unger H. (1955): Anaphylaxie, Allergie und Herdinfekt in ihren Beziehungen zur periodischen Augenentzündung der Pferde. *Vet. Med. Diss. Zürich*
- Whitley R. D., T. R. Miller und J. H. Wilson (1993): Therapeutic considerations for equine recurrent uveitis. *Equine Pract.* 15, 16-23
- Williams R. D., R. L. Morter, M. J. Freeman und A. M. Lavignette (1971): Experimental chronic uveitis. Ophthalmic signs following equine leptospirosis. *Invest. Ophthalmol.* 10, 948-954
- Williams D. M., B. J. Smith, J. M. Donahue und K. B. Poonacha (1994): Serological and microbiological findings on 3 farms with equine leptospiral abortions. *Equine Vet. J.* 26, 105-108
- Wollanke B. (2002): Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) als intraokulare Leptospirose. *Habilitationsschrift, Vet. Med. Fak., München*
- Wollanke B., H. Gerhards, S. Brem, P. Meyer und H. Kopp (2004): Ätiologie der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU): Autoimmunkrankheit oder intraokulare Leptospireninfektion? *Pferdeheilkunde* 20, 327- 340, 489