

Untersuchung gesunder Pferdeaugen auf eine intraokulare Leptospireninfektion

Stefan Gesell-May¹, Siegfried Brem², Bettina Wollanke³ und Hartmut Gerhards³

¹ Zentrum für Pferdeaugenheilkunde der Pferdeklunik in Parsdorf

² ehem. Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit Oberschleißheim

³ Klinik für Pferde der LMU München

Zusammenfassung: Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, anhand von intraokularen Proben mittels Mikroagglutinationsreaktion (MAR), ELISA, Kultur und PCR ophthalmologisch gesunde Pferdeaugen auf eine asymptomatische Leptospireninfektion zu untersuchen, um weitere Hinweise zur Pathogenese der klassischen Form der ERU, deren Ursache in den meisten Fällen eine intraokulare Leptospireninfektion ist, zu erhalten. Es wurden 168 ophthalmologisch gesunde Augen von 100 Pferden mittels MAR, ELISA und Kultur auf eine intraokulare Leptospireninfektion untersucht. In der PCR wurden 120 Proben von 60 augengesunden Pferden auf Leptospiren-DNA (16S-rRNA) getestet. Als Kontrollgruppe dienten Proben aus 14 Augen mit ERU. 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 ($p < 0,001$). Eine asymptomatische Besiedlung des Glaskörpers scheint, wenn überhaupt, 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. Möglicherweise hätten diese Augen im Verlauf der folgenden Monate und Jahre eine rezidivierende Uveitis entwickelt. Eine kulturelle Anzüchtung von Leptospiren gelang mit Glaskörperproben aus diesen Augen jedoch nicht. Zudem sind falsch positive PCR-Nachweise zu bedenken. Der Zusammenhang zwischen der ERU und einer intraokularen Leptospireninfektion wird damit untermauert. 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.

Schlüsselwörter: Pferd, ERU, Leptospiren, gesunde Augen

Examination of equine healthy eyes for intraocular leptospiral infection

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? 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. 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. 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. In conclusion 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.

Keywords: horse, ERU, leptospira, healthy eyes

Zitation: Gesell-May S., Brem S., Wollanke B., Gerhards H. (2021) Untersuchung gesunder Pferdeaugen auf eine intraokulare Leptospireninfektion. *Pferdeheilkunde* 37, 215–224; DOI 10.21836/PEM20210302

Korrespondenz: Dr. Stefan Gesell-May, Zentrum für Pferdeheilkunde der Pferdeklinik in Parsdorf, Jakob-Hagenbucher-Str. 3, 80993 München; stefan.gesell@pferdeaugenheilkunde.de

Eingereicht: 15. März 2021 | **Angenommen:** 16. April 2021

Einleitung

Immer noch wird kontrovers über die Ursache der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU) diskutiert. Die Ursachen dafür sind vielschichtig. Faktoren für die unterschiedliche Bewertung sind unterschiedliche Untersuchungsmethoden mit der Konzentration auf unterschiedliche Augenabschnitte, unterschiedliche Patientengruppen (z.B. Anteil an Tigerschekken), unterschiedliche Labortests, unterschiedliche Auswertung der Labortests und eine international wenig beachtete, v.a. deutschsprachige, Literatur über Pferdeaugenerkrankungen, die zu einem großen Teil in der Pferdeheilkunde veröffentlicht ist. Diese Veröffentlichungen beruhen vornehmlich auf Gerhards und Wollanke von der LMU München, die über Jahrzehnte sehr intensiv an der ERU geforscht haben. Die Untersuchung gesunder Pferdeaugen soll ein weiteres Puzzlestück dieser umfassenden Forschung von Gerhards und Wollanke sein.

In Deutschland hatte sich beruhend auf Gerhards, Wollanke und Brem, in den 1990er und frühen 2000er Jahren gezeigt, dass die intraokulare Leptospireninfektion bei der klassischen Form der ERU die Hauptursache darstellt. Weitere Untersuchungen bestätigten dies und es zeigte sich, dass die Vitrektomie wirkungsvoll Rezidive verhindert, weil damit die Ursache beseitigt wird. Hierüber liegen Langzeitergebnisse vor. Allerdings wurden ophthalmologisch gesunde Augen nicht in hoher Anzahl auf Hinweise auf eine intraokulare Leptospireninfektion untersucht. So ergab sich die Frage, ob ophthalmologisch gesunde Augen Hinweise auf eine intraokulare Leptospireninfektion zeigen und ob sich damit Rückschlüsse auf die Pathogenese der ERU erzielen lassen.

Literatur

In den späten 80er bzw. frühen 90er Jahren wandten Werry und Gerhards die Vitrektomie beim Pferd an, um eine „Klärung der brechenden Medien“ und eine Beseitigung von Entzündungsprodukten oder -mediatoren aus dem Glaskörperraum“ zu erreichen (Werry und Gerhards 1991). Mittels der bei der Vitrektomie gewonnenen Proben war es möglich, Glaskörperproben in großer Anzahl zu untersuchen. Langzeitergebnisse wurden bereits 1997 veröffentlicht: 42 von 43 Augen mit ERU blieben nach der Vitrektomie rezidivfrei (Winterberg und Gerhards 1997). Hierbei wurde immer noch vermutet, dass mit der Vitrektomie ein immunologisches Gedächtnis entfernt wird. Ein Hinweis darauf, dass schon an Leptospiren gedacht wurde ergibt sich aus dem Zitieren zweier Artikel von Wollanke bei denen es um Borrelien (1995) und um Leptospiren (1996) geht. Das älteste Zitat im Literaturteil stammt allerdings von 1974 und trägt den Titel „Immunogenic Uveitis“, so dass die älteren Artikel über ERU und Leptospiren (z.B. Heusser 1948) noch nicht genannt und das Hauptaugenmerk noch auf immunologische Geschehen als Ursache gelegt wurden. Kurz

darauf konnten Leptospiren aus ERU-Augen isoliert werden (Brem et al. 1998 und 1999a). Schon zwei Jahre später erfolgte dann eine erste Abgrenzung der leptospirenbedingten Uveitis zu anderen Uveitiden (Gerhards und Wollanke 2001) und es wurden Ergebnisse über Antikörpertiter von 242 Pferden (270 Augen) und Kulturen von 252 Augen mit ERU von Wollanke et al. (2001) zusammengefasst. Ein hoher Anteil der Augen wies in der Mikroagglutinationsreaktion (MAR) positive Antikörpertiter (ab 1:400) auf und 52% der Augen waren in der Kultur positiv. Hier wurde auch erwähnt, dass eine Spülung des Glaskörpers mit 250 ml BSS (balanced salt solution), das 20 mg Gentamicin enthält, in fast allen Fällen zur Rezidivfreiheit führt. Dies wurde bei Wollanke et al. (2004a) an einer hohen Patientenanzahl bestätigt. 53% von 358 Glaskörperproben aus ERU-Augen zeigten einen positiven Nachweis von Leptospiren in der Kultur, 76% von 418 Proben aus an ERU erkrankten Augen wiesen einen höheren Antikörpertiter als im Serum auf und bei 35 von 36 Pferden war der GWC (Goldmann-Witmer-Koeffizient) positiv (>3). Über 97% der Augen wiesen nach Vitrektomie kein Rezidiv einer Uveitis auf. Dies wurde mit der Entfernung des auslösenden Agens begründet. Zu der Zeit wiesen auch Faber et al. (2000) Leptospiren in ERU-Augen mittels Kultur und PCR nach. Über erste Erfahrungen mit einem bestandsspezifischen Leptospiren-Impfstoff berichteten Wollanke et al. (2004b). Hier wird erwähnt, dass in einem geimpften Bestand im Zeitraum von über 5 Jahren keine ERU auftrat, während zuvor gehäuft ERU-Fälle vorhanden waren. Im Jahr 2007 konnten Brandes et al. Leptospiren in 4 Augen mittels Elektronenmikroskopie darstellen. Hierbei wird ein proteinöses Material erwähnt, das die Leptospiren ummantelt und bei einer phagozytierten Leptospire vermindert war. Weiter zeigten Czupalla und Gerhards (2013) an über 1280 Narkosen bei Pferden, bei denen ein Eingriff am Auge nötig war, dass das Narkoserisiko bei Augenoperationen im Vergleich zu anderen Operationen nicht erhöht ist. Popp et al. (2013) verabreichten Pferden systemisch Enrofloxacin. Da trotz intraokularer Konzentration über der MIC (mittlere alveolare Hemmkonzentration) bei 30% der untersuchten Pferde Leptospiren aus dem Glaskörper anzüchtbar waren, vermuten die Autoren unter anderem, dass Leptospiren im Glaskörper nicht ausreichend mit Enrofloxacin in Kontakt kommen. Baumgart und Gerhards (2014) beschrieben, dass die Tigerschekken-Uveitis und seltene Einzelfälle sowohl klinisch als auch im Hinblick auf Leptospirennachweise anders verlaufen: Es besteht in diesen Fällen meist eine chronische hintere Uveitis, die kaum mit äußerlich sichtbaren Symptomen einhergeht und bei denen die Tests auf Leptospiren meist negativ verlaufen. Als Überträger von *Leptospira grippotyphosa* kommen im deutschen Raum vor allem Wühlmäuse in Frage (Cibulski und Wollanke 2016). Hier sind auch Brandmäuse als Überträger von vorwiegend *L. pomona* und Ratten als Überträger von vorwiegend *L. icterohaemorrhagiae* erwähnt. Interessant ist die Vermutung, dass viele Ratten einen hohen Infektionsdruck bewirken und eine Erklärung für die vielen Augenerkrankungen der Gruben-

pferde in Bergwerken sein könnten. Zur Testung auf Leptospiren beschreiben *Loibl et al. (2018)* den sehr sensitiven IgA-ELISA. Sie schlagen vor, intraokulare Proben zunächst auf IgA zu prüfen und bei negativem Ergebnis die Probe mittels MAR, IgM- und IgG-ELISA und PCR zu testen. *Waldner et al. (2018)* untersuchten Pferde mit Augenerkrankungen auf SAA (Serum Amyloid A) und zeigten, dass intraokular eine Korrelation zur Höhe des Antikörpertiters besteht, dies auch längere Zeit nach dem akuten Entzündungsschub. *Schinagl (2017)* kann Langzeitergebnisse von einem Verfolgungszeitraum von 6 Monaten bis 18 Jahren (Durchschnitt 10 Jahre) präsentieren. Von 654 Augen, die positiv auf eine intraokulare Leptospireninfektion waren, zeigten 96% kein Rezidiv nach der Vitrektomie, wobei die antiinflammatorische Behandlung nach Vitrektomie 10 Tage beträgt. Dies bestätigt die Untersuchung von *Winterberg und Gerhards (1997)*, die etwa 20 Jahre zuvor an einer kleineren Probenanzahl und kürzeren Kontrollzeiten ähnliche Ergebnisse hatte.

Bei *Gilger (2008)*, *Gerding und Gilger (2016)*, *Malalana (2017)*, *Fischer (2019)* und *Voelter (2020)* unterscheiden sich die Ergebnisse der Untersuchungen auf Leptospiren von z.B. *Wollanke (2004)*. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass der *Goldmann-Witmer-Koeffizient* bei den erstgenannten Arbeiten ohne Referenzwert aus dem Serum (z.B. Geamteiweiß oder Gesamt-IgG) berechnet wurde, die Kriterien für die Diagnose „ERU“ verschieden sind und eine andere Zusammensetzung der Patienten besteht, so dass die Ergebnisse schwer vergleichbar sind. Hier spielt z.B. der Unterschied in der Population zwischen Deutschland und USA im Hinblick auf den Anteil der Tigerschecken eine große Rolle. Bei der Untersuchung von *Gerding und Gilger (2016)* stellten z.B. Appaloosas die größte Gruppe (54/224 Pferden), bei 24/224 Warmblutpferden, während bei *Wollanke (2002)* weniger als 5% Tigerschecken in der Untersuchung enthalten waren.

Parallel zu den Untersuchungen über Leptospiren forschte *Deeg (2001)* im Institut für Tierphysiologie der LMU München an von *Gerhards* mittels Vitrektomie gewonnenem Glaskörpermaterial von ERU-Augen und postulierte ein Autoimmungeschehen als Ursache für die ERU. Das führte dazu, dass an Methoden geforscht wurde, die das Immunsystem unterdrücken sollen. Aktuell werden vor allem folgende Behandlungen dazu vorgeschlagen: Cyclosporinimplantate von *Gilger (2010)*, intravitreale Gentamicininjektionen (*Fischer, 2019*), wobei bei Gentamicin ein immunmodulatorischer Effekt vermutet wird oder von *Brooks* die dauerhafte konservative Therapie mit entzündungshemmenden (z.B. Prednisolon) Mitteln (mündliche Aussage IEOC Congress 2018). Weiter zeigte sich, dass eine Autoimmunerkrankung bzw. Uveitiden ohne intraokulare Leptospireninfektion, wie es für die Tigerschecken-Uveitis wahrscheinlich ist, nicht mit der Vitrektomie geheilt werden können (*Baumgart und Gerhards 2014*, *Tömördy et al. 2010*). Auch die intravitreale Gentamicin-Injektion zeigt hier schlechte Ergebnisse (*Fischer 2019*). Die Tigerschecken-Uveitis und seltene Einzelfälle verlaufen sowohl klinisch als auch im Hinblick auf Leptospirennachweise anders: Es besteht in diesen Fällen meist eine chronische hintere Uveitis, die kaum mit äußerlich sichtbaren Symptomen einhergeht und bei denen die Tests auf Leptospiren meist negativ verlaufen (*Wiehen 2012*, *Baumgart und Gerhards 2014*).

Eigene Untersuchungen – Material und Methoden

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, bei denen jeweils das gesunde Partnerauge beprobt wurde

Zur Kontrolle der Testdurchführung konnte Glaskörpermaterial von 14 an ERU erkrankten Augen auf Leptospiren untersucht werden. 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{x} = 9,9 Jahre; s = 6,5) und die an ERU erkrankten (13 Stuten, 19 Wallache, 1 Hengst) zwischen 3 und 16 Jahren (\bar{x} = 8,0 Jahre; s = 3,9). Die Pferde kamen überwiegend aus der Bundesrepublik Deutschland, aber auch aus Österreich, der Schweiz, Holland, Tschechien und England.

Anamnese und Einteilung der Pferdeaugen in „augengesund“ und „ERU“

Bei den „gesunden“ Pferdeaugen ergaben sich ophthalmologisch (anamnestisch und ophthalmoskopisch) keine Hinweise auf eine Augenerkrankung.

Pferde mit „ERU“ hatten vorberichtlich mindestens zwei schmerzhaft Entzündungsschübe aufgewiesen, die mit Lidkneifen, Lidschwellung und vermehrtem Tränenfluss einhergegangen waren. Zudem zeigten sie ophthalmoskopisch mindestens eines der folgenden Symptome: Fibrin in der vorderen Augenkammer, hintere Synechie, Irisreste auf der Linsenvorderfläche, Miosis, diffuse schmutzig-grün-gelbliche Trübung des Glaskörpers, entzündliche Einlagerungen im Glaskörper.

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 Lupe (2,3 × – 10 ×) und einer fokalen Lichtquelle untersucht. Die Untersuchung von Linsenrückfläche, Glaskörperraum und Augenhintergrund erfolgte mit einem direkten Ophthalmoskop.

Kammerwasser- und Glaskörperproben

Glaskörper- (GK) und Kammerwasser- (KW)-Proben wurden aus „gesunden“ Augen unmittelbar nach der Euthanasie mit Pentobarbital-Na (Eutha® 77 100 ml/Pferd, Essex) oder Schlachtung, die nicht wegen Augenerkrankungen erforderlich war, entnommen. Kammerwasserproben wurden mittels limbalen Parazentese der vorderen Augenkammer über eine

Kanüle (27 G 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 Augennere eingebracht wurde, abgesaugt werden. Eine gewissenhafte Desinfektion der Einstichstelle war am toten Pferd möglich.

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 Dreivegehahn unproblematisch 3 ml unverdünnter und steriler GK-Flüssigkeit zu diagnostischen Zwecken entnommen werden.

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. MAR, ELISA und kulturelle Untersuchungen wurden unter Anleitung und Hilfe des Leiters des Leptospirenlabors Dr. Brem und Mitarbeitende im Landesamt für das Gesundheitswesen und Lebensmittelsicherheit Südbayern durchgeführt (Gesell 2004). 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 auf Leptospiren 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 der Berichte von Merien et al. (1992, 1995).

Zusammensetzung der intraokularen Proben und Untersuchung mittels MAR, ELISA und Kultur

- Proben aus 168 gesunden Augen von 100 Pferden
- KW (MAR und ELISA) und KW und GK (Kultur) 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

MAR

Bei der MAR werden Kultur-Leptospiren (WHO-Standardstämme) mit den Proben zusammengebracht. Enthält die Probe Antikörper gegen Leptospiren, erfolgt eine Agglutination der Leptospiren. Über eine Verdünnungsreihe wird der Antikörpertiter bestimmt, der ab einem Titer von 1:100 als

„positiv“ bewertet wurde. 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 einer Serovar zu gleichen Anteilen in die Untersuchung mit ein.

Es wurde auf folgende Serovare getestet:

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

ELISA

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 ELISAs 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. Negativ-Kontrollen 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.

Leptospirenkultur

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

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. MAR, ELISA und Kultur wurden wie bei Gesell (2004) beschrieben durchgeführt.

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.

PCR – Untersuchung auf Leptospiren-DNA

Kammerwasser aus 120 gesunden Augen von 60 euthanasierten Pferden (Alter: 1–29 Jahre, Ø = 10,5 Jahre, s = 6,2) und aus an klassischer 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. Zusätzlich wurde eine Kammerwasserprobe aus dem gesunden Auge eines einseitig an ERU erkrankten Pferdes mit Hilfe dieser PCR auf Leptospiren getestet, da dieses Kammerwasser in der MAR und im ELISA positiv reagierte (diese Probe wurde nicht in die Gruppe der 120 Proben aus gesunden Augen von 60 Pferden aufgenommen).

Statistische Auswertung

Die beiden Gruppen „Augengesunde“ 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 „Augengesunde“ 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 Konsequenzen für Patienten mit ERU entstehen können.

Ergebnisse

MAR

Bei Antikörpernachweis-Versuchen mit Kammerwasser aus 168 klinisch gesunden Augen von 100 Pferden war lediglich 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. Alle Proben aus Augen, die an ERU erkrankt waren, reagierten in der MAR positiv. Damit besteht ein signifikanter Unterschied zwischen gesunden und an ERU erkrankten Augen ($p < 0,001$)

ELISA

Im ELISA auf Antikörper gegen Leptospiren reagierte eine der 168 Proben aus gesunden Augen positiv, in der Gruppe der an ERU erkrankten Augen zeigten 92% der Proben eine positive Reaktion. 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.

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. 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).

In 6 (5%) der 120 Proben aus Augen von 60 ophthalmologisch gesunden Pferden verlief die PCR 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 PCR auf. Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den gesunden und den an ERU erkrankten Augen ($p < 0,001$). Die Kammerwasserprobe, die aus dem gesunden Partnerauge eines einseitig an ERU erkrankten Pferdes stammte und in der Antikörper gegen Leptospiren nachweisbar gewesen waren, reagierte in der PCR negativ. (Tab. 1)

Diskussion

Im Vordergrund der Arbeit stand die Untersuchung klinisch gesunder Pferdeaugen auf intraokular vorhandene Leptospiren oder Leptospirenantikörper. Intraokulare Proben aus

Tab. 1 Vergleich gesunder Augen mit an ERU erkrankten Augen im Hinblick auf Antikörpertests (MAR und ELISA) und direkte Nachweise (PCR und Kultur). Zudem Vergleich mit Literaturangaben. | Comparison of healthy eyes with eyes affected by ERU with regard to antibody tests (MAR and ELISA) and direct detection (PCR and culture). In addition, comparison with references.

Test	Positive Gesunde	Positive ERU	Literatur: Positive ERU
MAR	1/168 (0,6%)	14/14 (100%)	382/426 (90%) (Wollanke 2004)
ELISA	1/168 (0,6%)	13/14 (93%)	67/80 (84%) (Loibl 2018)
Kultur	0/168 (0,0%)	8/14 (57%)	189/358 (53%) (Wollanke 2004)
PCR	6/120 (5,0%)	8/14 (57%)	39/55 (71%) (Wollanke 2004)

an ERU erkrankten Augen waren schon in großem Umfang untersucht worden (siehe Tabelle). In MAR, ELISA, PCR und Kultur waren die Ergebnisse mit Proben aus an ERU erkrankten Augen ähnlich zu denen, die in der vorliegenden Arbeit in der Kontrollgruppe auftraten. Daher ist trotz der geringen Anzahl von nur 14 untersuchten Augen mit ERU gegenüber 168 bzw. 120 gesunden Augen ein Vergleich zwischen der Gruppe „augengesunde“ und der Kontrollgruppe „ERU“ berechtigt.

Serumuntersuchungen zeigten, dass im Patientengut der LMU München ein Großteil der Pferde positive Serum-Antikörpertiter aufwies und kein signifikanter Unterschied zwischen Pferden, die keine ERU hatten und Pferden, die an ERU erkrankt waren, bestanden (Wollanke et al. 2002, Gesell 2004). Zudem wies Wollanke (2002) nach, dass bei vielen Pferden mit ERU negative Serum-MAR-Ergebnisse und gleichzeitig ein positiver MAR-Titer in intraokularen Proben bestehen. Daraus folgerte sie, dass Serumuntersuchungen bei der ERU kaum Bedeutung für die Bestimmung der Ätiologie einer Uveitis haben. Sind im Serum keine Antikörpertiter gegen Leptospiren nachweisbar, heißt das also nicht, dass die MAR mit intraokularen Proben negativ sein muss.

Der Eiweißgehalt in intraokularen Proben aus gesunden Augen liegt bei etwa 1 g/l (Wollanke 1996, Wollanke 2002). Wenn man den GWC zur Bestimmung einer lokalen Antikörperproduktion als Methode der Wahl ansieht (Goldmann und Witmer 1954), sind bei negativen Leptospiren-Tests mit intraokularen Proben auch im Vergleich mit Serumuntersuchungen aussagekräftige Ergebnisse ausgeschlossen. Der GWC untersucht, ob Antikörper durch Diffusion über die Blut Augen-Schranke in das Auge gelangt sind, oder ob es sich um eine infektionsbegleitende intraokulare Antikörperproduktion handelt. Wenn keine Antikörper im Auge nachweisbar sind, erübrigt sich folglich die Berechnung des GWC.

Auch bei an ERU erkrankten Augen ist der Gesamteiweißwert in intraokularen Proben um ein Vielfaches niedriger als im Serum (Wollanke 1995 und 2002, Binder 2017, Gesell-May 2020). Zudem erwähnt Binder (2017), dass sich der Gesamteiweißwert bei vielen Proben unter 5 g/l befand, so dass keine Elektrophorese durchgeführt werden konnte. Der Mittelwert aller Proben aus ERU-Augen lag bei 4,42 g/l. Bei Untersuchungen von Altmann (2007) wurde bei gesunden Augen ein Gesamteiweißwert von 0,15 g/l und bei ERU-Augen 3,67 g/l festgestellt. Bei einem nachweisbaren Antikörpertiter in intraokularen Proben ist ein GWC unter 3 also sehr unwahrscheinlich (Gesell-May 2020). Bei intraokularen Proben aus „gesunden“ Augen, in denen keine agglutinierenden Antikörper nachweisbar sind und die einen ca. 50-fach niedrigeren Gesamteiweißwert als im Serum aufweisen, ist die Berechnung des GWC nach den Vorschlägen von Goldmann und Witmer (1954) sinnlos. So kann also davon ausgegangen werden, dass bei diesem hohen Anteil (fast 100 %) negativer MAR-Ergebnisse bei gesunden Augen und auch bei den ERU-Augen vergleichende Serumuntersuchungen für diese Arbeit keinen Mehrwert an Aussage erbracht hätten.

Bei der MAR mit Kammerwasser besteht ein signifikanter Unterschied im Auftreten von Antikörpern bei „gesunden“ und „ERU“-Augen. Beim Vergleich mit 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 und die mit denselben Methoden im selben Labor untersucht worden waren, wird der Unterschied zu den Befunden der Proben aus „gesunden“ Augen besonders deutlich. Der ursächliche Zusammenhang zwischen der ERU und einer intraokularen Leptospireninfektion wird mit der vorliegenden Untersuchung darum untermauert.

Sowohl die MAR, als auch der ELISA gelten als spezifische Untersuchungsmethoden auf Leptospirenantikörper (Brem et al. 1999 b, Loibl et al. 2018). 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 bei einem Antikörpernachweis nicht infrage, da es sich um körpereigene Antigene handelt, bei denen Ähnlichkeiten zu Leptospiren bestehen (Lucchesi und Parma 1999). Antikörper, die gegen diese Hornhautstrukturen gerichtet sind, reagieren nicht mit in der MAR verwendeten Kulturleptospiren, da die zur Hornhaut ähnlichen Epitope der Leptospiren intrazellulär gelegen sind (Parma et al. 1997).

Aus 168 gesunden Augen wurden über 4500 Kulturansätze mit unterschiedlichen Verdünnungen und Hemmstoff-Zusätzen angefertigt (siehe Eigene Untersuchungen bei Gesell 2004) 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 Proben aus „gesunden“ als auch an ERU erkrankten Augen in hoher Anzahl in der Kultur untersucht wurden. Für die klinische Diagnostik bietet sich diese Untersuchungsmethode wegen der vergleichsweise niedrigen Sensitivität, des langsamen Wachstums der Leptospiren (Brem et al. 1988) und des großen Zeitaufwandes nicht an.

Fünf Pferde von 60 augengesunden Pferden (8,3 %) wiesen 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. Leider wurden diese Proben von frisch euthanasierten Pferden entnommen, so dass eine weitere Beobachtung im Hinblick auf später auftretende Augenentzündungen, sofern es sich um lebende Leptospiren gehandelt haben sollte, nicht möglich war. Zudem waren die Kulturansätze der Proben negativ und falsch positive Ergebnisse sind gerade in Leptospiren-DNA-reicher Umgebung, wie es wegen der hohen Anzahl an Vitrektomien der Fall gewesen sein könnte, möglich. Allerdings wurden die Proben steril entnommen und direkt in saubere Röhrchen umgefüllt. Auch in der PCR bestanden signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe der „gesunden“ Augen (5 % positiv) und der Gruppe der „ERU“-Augen (57 % positiv).

Zusammenfassend muss bemerkt werden, dass bei allen vier auf eine intraokulare Leptospireninfektion hinweisenden

Untersuchungsmethoden (MAR, ELISA, Kultur und PCR) signifikante Unterschiede zwischen Augen „gesunder“ Pferde und an Augen an klassischer ERU erkrankter Pferde bestanden. Die Richtigkeit der Ergebnisse des ELISAs wurde mit der MAR bestätigt und *Loibl et al. (2018)* wiesen eine sehr hohe Sensitivität des ELISA nach.

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 abgelaufene intraokulare Leptospireninfektion mit Erregerelimination. Anamnestic 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.

Bei Proben aus den ERU-Augen stimmten in fünf positiven Fällen die Ergebnisse der Kultur (erfolgreiche Anzucht von Leptospiren) mit der PCR überein. Es traten jedoch bei anderen Proben aus an ERU erkrankten Augen sowohl negative Kulturergebnisse bei positiver PCR in denselben Proben ($n = 2$) als auch positive Kulturergebnisse bei gleichzeitig negativer PCR auf ($n = 2$). Weitere Untersuchungen von Proben aus Augen mit und ohne ERU in der PCR wären sinnvoll, um die Untersuchungsergebnisse richtig zu deuten und damit klinisch nutzbar machen zu können.

Mit der vorliegenden Arbeit sind 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 Augeninnere 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.

In einer Literaturstudie wurde als mögliche Ursache für die rezidivierenden Uveitisschübe und die inkonsistenten labordiagnostischen Ergebnisse die In vivo-Bildung von Leptospiren-Biofilm dargestellt (*Geißler 2021*). In einer weiteren Arbeit konnte anhand histologischer Untersuchungen von Glaskörperproben aus an ERU erkrankten Pferdeaugen eine Biofilm-Bildung dargestellt werden (*Ackermann 2021*). 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 selten vorkommende Leptospiren-

infektion in gesunden Augen. Der Prozentsatz positiv getesteter intraokularer Proben aus „gesunden“ Augen entspricht in etwa der Inzidenz der ERU in manchen Studien (z. B. *Szemes und Gerhards 2000*). Das bedeutet, dass diese „gesunden“ Augen noch eine ERU hätten entwickeln können und dann lediglich vor dem Auftreten klinischer Symptome getestet worden waren.

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

1. Das positive PCR-Ergebnis in 5% der untersuchten Proben aus gesunden Augen bzw. 8% der untersuchten intraokularen Proben von gesunden Pferden 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 (*Kulbrock et al. 2013, Szemes und Gerhards 2000*).
3. Die lange Zeit (Monate bis Jahre) zwischen systemischer Infektion und dem Auftreten von klinischen Anzeichen am Auge (*Roberts 1958, Williams et al. 1971*), zumal lebende Leptospiren nur für kurze Zeit (etwa 9 Tage) im Blut nachweisbar sind (*Williams et al. 1971*).
4. Die Eigenschaft des Auges, schädigende Entzündungsreaktionen zu unterdrücken (*Allen et al. 1996, Nussenblatt und Gery 1996, Grisanti 1998*).
5. Die Abgrenzung des Glaskörpers vom humoralen (Immun-) System beim „gesunden“ Auge (*Nussenblatt und 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 Ergebnisse von *Brandes et al. (2007)*, bei der in Glaskörperproben aus an klassischer ERU erkrankten Pferdeaugen Leptospiren mit einer Schicht („Biofilm“) umgeben waren, die den Kulturleptospiren fehlte. Dies bei Pferdeaugen, die zwei oder mehr Entzündungsschübe durchgemacht hatten.

Dagegen spricht, dass sich aus keiner der in der Kultur untersuchten Proben aus „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 Proben aus ophthalmologisch gesunden Augen auf Leptospirenantikörper-Nachweisversuche mittels MAR und ELISA zu 99% negativ reagierten, während sich in 93% (ELISA) und 100% (MAR) der Proben aus an klassischer ERU erkrankten Augen intraokulare Antikörper gegen Leptospiren nachweisen ließen. Aus diesem Grund sind MAR und ELISA, abgesehen davon, dass mit lebenden Leptospiren gearbeitet werden muss, als relativ einfache, schnelle und preisgünstige Methode gut geeignet für die ERU-Diagnostik mittels Kammerwasser und die Prüfung der Indikation für eine Vitrektomie in unklaren Fällen. Die In-

dikation zu einer diagnostischen Parazentese muss wegen Narkoserisiken, Infektions- und Verletzungsgefahren äußerst sorgfältig 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.

Danksagung

Den Technischen Assistentinnen *Maria Hauser*, *Illona Peter* sowie Frau *Agapi Papalazaru*, *Klara Varady* und *Hermine Harzer* vom Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Oberschleißheim (LGL) sei sehr herzlich für die freundliche Unterstützung im Labor gedankt, den Herren *Dr. Kopp* und *Dr. Meyer* (ebenfalls ehem. LGL) für die hilfsbereite Beantwortung wissenschaftlicher Fragen.

Literatur

Ackermann K. (2021) Darstellung von Leptospiren und deren Biofilmbildung in Glaskörperproben aus an equiner rezidivierender Uveitis (ERU) erkrankten Augen. Diss. Med. Vet. München, in Vorbereitung

Allen J. B., Mcgahan M. C., Yasushi O., Sellon D. C., Clark B. D., Fleisher L. N. (1996) Intravitreal transforming growth factor- β 2 decreases cellular infiltration in endotoxin-induced ocular inflammation in rabbits. *Curr. Eye Res.* 15, 95–103; DOI 10.3109/02713689609017616

Altmann F. (2007) Differenzielle Expression von Proteinen im Glaskörper gesunder und an ERU erkrankter Pferde. Vetmed. Diss. Ludwig-Maximilians-Universität München.

Barnett J. K., Barnett D., Bolin C. A., Summers T. A., Wagar E. A., Chevillat N. F., Haartskeerl R. A., Haake D. A. (1999) Expression and distribution of leptospiral outer membrane components during renal infection of hamsters. *Infect. Immun.* 67, 853–861; DOI 10.1128/IAI.67.2.853-861.1999

Baumgart A., Gerhards H. (2014) Besonderheiten der Tigerschecken-Uveitis und möglicher Cyclosporin-A-Einsatz in deren Therapie in Deutschland. *Pferdeheilkunde* 6, 626–632; DOI 10.21836/PEM20140601; DOI 10.21836/PEM20140601

Binder K. (2013) Klinischer Vergleich der Wirksamkeit von Firocoxib und Phenylbutazon bei equinen Augenpatienten. Diss. Med. Vet. München

Brandes K., Wollanke B., Niedermaier G., Brem S., Gerhards H. (2007) Recurrent uveitis in horses: Vitreal examinations with ultrastructural detection of leptospines. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 54, 270–275; DOI 10.1111/j.1439-0442.2007.00921.

Brem S., Kopp H., Meyer P., Hollmann P. (1988) Erste Isolation von *Leptospira* Serovar hardjo in der Bundesrepublik Deutschland. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 101, 419–421; PMID 3219120

Brem S., Gerhards H., Wollanke B., Meyer P., Kopp H. (1998): Intraokularer Leptospirennachweis bei 4 Pferden mit rezidivierender Uveitis (ERU). *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 111, 415–417; PMID 9880935

Brem S., Gerhards H., Wollanke B., Meyer P., Kopp H. (1999a) 35 Leptospirenisolierungen aus Glaskörpern von 32 Pferden mit rezidivierender Uveitis (ERU). *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 112, 390–393; PMID 10598357

Brem S., Staak C., Schönberg A., Kopp H., Meyer P. (1999b) Beitrag zur Leptospirenserologie des Hundes. Vergleich von MAR- und ELISA-Ergebnissen. *Tierärztl. Umsch.* 54, 83–87

Cibulski S., Wollanke B. (2016) Testing wild small mammals and water samples for pathogen leptospines using real-time PCR. *Pferdeheilkunde* 32, 634–640; DOI 10.21836/PEM20160608

Czupalla I., Gerhards H. (2013) Narkoserisiko bei Pferden – Eine retrospektive Studie anhand von 1.989 Narkosen. *Pferdeheilkunde* 6, 729–738; DOI 10.21836/PEM20130607

DGHM, Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (1984) Diagnostik bei Leptospiren. *Zbl. Bakt. Hyg. A* 258, 480–491; PMID 11157872

Deeg C. A., Kaspers B., Gerhards H., Thurau S. R., Wollanke B., Wildner G. (2001) Immune responses to retinal autoantigens and peptides in equine recurrent uveitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 393–398; PMID 11157872

Faber N. A., Crawford M., Lefebvre R. B., Buyukmihci N. C., Madigan J. E., Willits U. N. H. (2000) Detection of *Leptospira* spp. in the aqueous humor of horses with naturally acquired recurrent uveitis. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2731–2733; DOI 10.1128/JCM.38.7.2731-2733.2000

Faine S. (1994) *Leptospira and leptospirosis*. CRC Press, Boca Raton

Fischer, B. M., McMullen, R. J., Reese, S., Brehm W. (2019) Intravitreal injection of low-dose gentamicin for the treatment of recurrent or persistent uveitis in horses: Preliminary results. *BMC Vet. Res.* 15, 29 <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1722-7>

Geißler P. (2021) Biofilm-Bildung als Pathogenitätsmechanismus bei persistierenden Infektionen und ihre mögliche Rolle bei der Equinen Rezidivierenden Uveitis - eine Literaturstudie. Diss. Med. Vet. München

Gesell S. (2004) Gibt es eine asymptomatische intraokulare Leptospireninfektion beim Pferd? Diss. Med. Vet. München

Gesell-May S. (2020) Die equine rezidivierende Uveitis (ERU): Diskussion von Untersuchungs- und Therapieergebnissen, insbesondere in Bezug auf die Vitrektomie und den Einsatz von Cyclosporin und Gentamicin. *Prakt. Tierarzt* 101, 560–566; DOI 10.2376/0032-681X-2014

Gerding J. C., Gilger B. C. (2016) Prognosis and impact of equine recurrent uveitis. *Equine Vet. J.* 48, 290–298

Gerhards H., Wollanke B. (2001) Uveitis bei Pferden – Diagnose und Therapie. *Pferdeheilkunde* 4, 319–329; DOI 10.21836/PEM20010402

Gilger B. C., Salmon J. H., Yi N. Y., Barden C. A., Chandler H. L., Wendt J. A., Colitz C. M. (2008) Role of bacteria in the pathogenesis of recurrent uveitis in horses from the southeastern United States. *Am. J. Vet. Res.* 69, 1329–1335; DOI 10.2460/ajvr.69.10.1329

Gilger B. C. (2010) Long-term outcome after implantation of a suprachoroidal cyclosporine drug delivery device in horses with recurrent uveitis. *Vet. Ophthalmol.* 13, 294–300; DOI 10.1111/j.1463-5224.2010.00807.x

Goldmann, H., Witmer R. (1954) Antikörper im Kammerwasser. *Ophthalmologica* 127, 323–330; DOI 10.1159/000301976

Grisanti S. (1998) Das Immunprivileg des Auges. *Ophthalmologe* 95, 124–135; DOI 10.1007/s003470050250

Heusser H. (1948) Die periodische Augenentzündung, eine Leptospirose? *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 6, 287–312; DOI 10.5169/seals-590026

Kettner H. (1997) Untersuchungen zur klinischen Epizootiologie und Diagnostik der Leptospireninfektion beim Pferd. Diss. Med. Vet. München

Kulbrock M., von Borstel M., Rohn K., Distl O., Ohnesorge B. (2013) Studie zur Häufigkeit und Schweregrad der Equinen Rezidivierenden Uveitis bei Warmblütern. *Pferdeheilkunde* 1, 27–36; DOI 10.21836/PEM20130105

Loibl J., Gerhards H., Brem S., Wollanke B. (2018) Verbesserung der Labordiagnostik der Leptospirenuveitis bei Pferden mittels Anwendung eines indirekten ELISAs zum Nachweis von Antikörpern gegen *Leptospira* spp. in intraokularen Proben. *Pferdeheilkunde* 3, 267–277; DOI 10.21836/PEM20180308

Lucchesi M. A., Parma A. E. (1999): A DNA fragment of *Leptospira interrogans* encodes a protein which shares epitopes with equine cornea. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 71, 173–179; DOI 10.1016/s0165-2427(99)00084-7

Malalana F., Blundell R. J., Pinchbeck G. L., Mcgowan C. M. (2017) The role of *Leptospira* spp. in horses affected with recurrent uveitis in the UK. *Equine Vet. J.* 49, 706–709; DOI 10.1111/evj.12683

- Merien, F., Baranton G., Perolat P. (1997) Invasion of vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. *Infect. Immunol.* 65, 729–738; DOI 10.1128/IAI.65.2.729-738.1997
- Nussenblatt R. B. (1996) Experimental autoimmune uveitis and its relationship to clinical ocular inflammatory disease. *J. Autoimmunity* 9, 575–585; DOI 10.1006/jaut.1996.0077
- OIE (2000) Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. 4. Aufl., Office International des Epizooties, Paris: Leptospirosis, Chapter 2.2.4.
- Parma A. E., Sanz M. E., Lucchesi P. M., Mazonelli J., Petruccioli M. A. (1997) Detection of an antigenic protein of *Leptospira interrogans* which shares epitopes with the equine cornea and lens. *Vet. J.* 153, 75–79; DOI 10.1016/s1090-0233(97)80011-1
- Popp M., Gerhards H., Wollanke B. (2013) Enrofloxacin concentrations in the vitreous of horses with equine recurrent uveitis (ERU) after repeated intravenous administration. *Pferdeheilkunde* 5, 574–580; DOI 10.21836/PEM20130501
- Roberts S. J. (1958) Sequelae of leptospirosis in horses on a small farm. *J. Am. Med. Vet. Assoc.* 133, 189–194; PMID 13575275
- Schinagl C. (2017) Pars-Plana-Vitrektomie bei Equiner Rezidivierender Uveitis – Langzeitergebnisse zu Rezidivfreiheit, Sehfähigkeit und Bulbuserhalt bei 654 Augen von 549 Pferden. Diss. Med. Vet. München
- Szemes P. A., Gerhards H. (2000) Untersuchungen zur Prävalenz der equinen rezidivierenden Uveitis im Großraum Köln-Bonn. *Prakt. Tierarzt* 81, 408–420
- Thomas D. D., Higbie L. M. (1990) In vitro association of leptospirae with host cells. *Infect. Immun.* 58, 581–585; DOI 10.1128/IAI.58.3.581-585.1990
- Tömördy E. (2009) Verlaufsstudie nach Vitrektomie bei equiner rezidivierender Uveitis. Diss. Med. Vet. Zürich
- Voelter K., Vial Z., Pot S. A., Spiess, B. M. (2020) Leptospiral antibody prevalence and surgical treatment outcome in horses with Equine Recurrent Uveitis (ERU) in Switzerland. *Vet. Ophthalmol.* 23, 1–11; DOI 10.1111/vop.12767
- Waldner J., Gerhards H., Wollanke B. (2018): Untersuchungen über das Auftreten von Serum-Amyloid A im Auge des Pferdes. *Pferdeheilkunde* 5, 461–467; DOI 10.21836/PEM20180508
- Werry H., Gerhards H. (1991) Möglichkeit der und Indikation zur chirurgischen Behandlung der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU). *Pferdeheilkunde* 6, 321–331; DOI 10.21836/PEM19910602
- Wiehen L. E. (2012) Retrospektive Analyse zum Vorkommen der Equinen rezidivierenden Uveitis – unter Berücksichtigung der Leptospireninfektion – an der LMU München von 01/2005 bis 06/2010. Diss. Med. Vet. München
- Williams R. D., Morter R. L., Freeman M. J., Lavignette A. M. (1971) Experimental chronic uveitis. Ophthalmic signs following equine leptospirosis. *Invest. Ophthalmol.* 10, 948–954; PMID 5128770
- Winterberg A., Gerhards H. (1997) Langzeitergebnisse der Pars-plana-Vitrektomie bei equiner rezidivierender Uveitis. *Pferdeheilkunde* 13, 377–383; DOI 10.21836/PEM19970409
- Wollanke B. (1995) Untersuchungen zur Ätiologie der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU). Diss. Med. Vet. München
- Wollanke B. (1996) Was bedeuten intraokulare Antikörper-titer gegen Leptospiren bei Pferden mit Uveitis. DVG Fachgruppe Pferdekrankheiten, Arbeitstagung Wiesbaden, 317–333
- Wollanke B., Rohrbach B. W., Gerhards H. (2001) Serum and vitreous humor antibodies to *Leptospira interrogans* from horses with recurrent uveitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 219, 795–800; DOI 10.2460/javma.2001.219.795
- Wollanke B. (2002) Die equine rezidivierende Uveitis als intraokulare Leptospirose. Habil. Vet. Med. München
- Wollanke B. (2004a) Ätiologie der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU) Autoimmunkrankheit oder intraokulare Leptospireninfektion? *Pferdeheilkunde* 20, 327–340; DOI 10.21836/PEM20040403
- Wollanke B., Brem S., Meyer P., Forbig T., Grassl P., Gerhards H., Kopp H. (2004b) Prophylaxe der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU): Erste Erfahrungen mit einem Leptospiren-Impfstoff bei Pferden. *Pferdeheilkunde* 5, 447–454; DOI 10.21836/PEM20040506