

Aus der Klinik für Pferde
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Klinikvorstand: Prof. Dr. Hartmut Gerhards)

Arbeit angefertigt unter der Leitung von PD Dr. Bettina Wollanke

Immunologische und mikrobiologische Untersuchungen zur intraokular persistierenden Leptospireninfektion bei Pferden mit rezidivierender Uveitis

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

von

Julia Katharina Loibl

aus München

München 2009

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Wollanke

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Wanke

Tag der Promotion: 17. Juli 2009

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	10
1 Einleitung	13
2 Literaturübersicht	15
2.1 ERU	15
2.1.1 Definition, Bedeutung und Vorkommen	15
2.1.2 Ätiologie und Pathogenese	16
2.1.3 Formen, Verlauf und klinische Symptome	19
2.1.4 Therapie, Prognose und Prophylaxe	21
2.1.5 ERU und Glaskörper	23
2.2 Leptospiren und Leptospirosen	25
2.2.1 Taxonomie	25
2.2.2 Biologie und Epidemiologie	25
2.2.3 Leptospireninfektion Mensch	26
2.2.4 Augenbeteiligung bei der Leptospireninfektion des Menschen . . .	27
2.2.5 Leptospireninfektion Pferd	27
2.2.6 Leptospireninfektion und Uveitis beim Pferd	28
2.2.7 Nachweismethoden	28
2.2.8 Immunität und Erregerpersistenz	36
2.3 Immunglobulinklassen	37
2.3.1 Immunglobulin G	37
2.3.2 Immunglobulin M	37
2.3.3 Immunglobulin A	38
2.3.4 Immunglobulin E	39
2.3.5 Immunglobulin D	39
2.4 Auge und Immunreaktion	39
2.4.1 Blut-Augen-Schranke	39
2.4.2 Immunprivileg des Auges	40
2.4.3 Immunologie bei Uveitiden	40

2.4.4	Vorkommen von Immunglobulinen im erkrankten Auge	42
3	Material und Methoden	44
3.1	Pferde	44
3.2	Vorbericht	44
3.2.1	Einteilung der Pferdeaugen mit ERU anhand des Vorberichtes	45
3.3	Augenuntersuchung	45
3.3.1	Einteilung der Pferdeaugen mit ERU anhand der ophthalmologischen Befunde	46
3.4	Probengewinnung und -weiterverarbeitung	47
3.4.1	Serumproben	47
3.4.2	Glaskörperproben	47
3.4.3	Kammerwasserproben	48
3.5	Mikrobiologische Untersuchungen auf Leptospiren	49
3.5.1	Mikroagglutinationsreaktion	50
3.5.2	Enzyme linked immunosorbent assay	50
3.5.3	Polymerasekettenreaktion	52
3.5.4	Kultur	52
3.6	Untersuchung intraokularer Proben mittels ELISA-Technik in den Jahren 2005–2007 (retrospektiv)	53
3.7	Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse	53
4	Ergebnisse	57
4.1	Vorbericht	57
4.2	Augenuntersuchung	57
4.3	Makroskopische Beurteilung der Glaskörperproben	58
4.4	Leptospirennachweise	58
4.4.1	Antikörper gegen Leptospiren in Serumproben von Pferden mit ERU und augengesunden Tieren	58
4.4.2	Antikörper gegen Leptospiren in Glaskörperproben von Pferden mit ERU und augengesunden Tieren	61
4.4.3	PCR-Nachweis von Leptospiren in Glaskörperproben von Pferden mit ERU und augengesunden Tieren	63
4.4.4	Kulturelle Isolierung von Leptospiren aus Glaskörpermaterial von Pferden mit ERU	63
4.4.5	Antikörper gegen Leptospiren im Kammerwasser von Pferden mit ERU und augengesunden Tieren	64

4.4.6	PCR-Nachweis und Kultur von Leptospiren im Kammerwasser von Pferden mit ERU und augengesunden Tieren	65
4.4.7	Leptospirennachweise bei zwei Pferden mit Ciclosporin A-Implantat	65
4.5	Zusammenhänge von ELISA- und PCR-Resultaten mit dem Vorbericht und den Ergebnissen anderer Untersuchungen bei Pferden mit ERU	67
4.5.1	Korrelationen der ELISA-Ergebnisse mit dem Vorbericht	67
4.5.2	Korrelationen der PCR-Ergebnisse mit dem Vorbericht	72
4.5.3	Korrelationen der ELISA-Ergebnisse mit den ophthalmologischen Befunden	73
4.5.4	Korrelationen der PCR-Ergebnisse mit den ophthalmologischen Befunden	78
4.5.5	Korrelationen der ELISA-Ergebnisse mit den makroskopischen Glaskörperveränderungen	79
4.5.6	Korrelationen der PCR-Ergebnisse mit den makroskopischen Glaskörperveränderungen	81
4.5.7	ELISA und MAR	82
4.5.8	ELISA und direkter Leptospirennachweis im Auge	84
4.6	Antikörpernachweis gegen Leptospiren mittels ELISA in Serum und intraokularen Proben von Pferden mit ERU vergleichend	87
4.6.1	Serum und Glaskörper	87
4.6.2	Serum und Kammerwasser	88
4.7	Leptospirennachweise in Kammerwasser und Glaskörpermaterial von Pferden mit ERU vergleichend	89
4.7.1	MAR	89
4.7.2	ELISA	89
4.7.3	PCR	90
4.8	Übereinstimmung von MAR, ELISA, PCR und Kultur hinsichtlich positiver oder negativer Testergebnisse	90
4.8.1	Übereinstimmung von MAR und ELISA in Serum und intraokularen Proben von Pferden mit ERU	90
4.8.2	Übereinstimmung von MAR bzw. ELISA und PCR in intraokularen Proben von Pferden mit ERU	91
4.8.3	Übereinstimmung von MAR, ELISA bzw. PCR und Kultur in Glaskörperproben von Pferden mit ERU	92
4.8.4	Sensitivität und Spezifität des ELISAs gemessen am Goldstandard MAR	93

4.8.5	Positiver und negativer prädiktiver Wert des ELISAs gemessen am Goldstandard MAR	93
4.9	Übereinstimmung der klinischen Diagnose „ERU“ mit den Leptospirennachweisen im Glaskörper	93
4.9.1	Diagnostische Sensitivität und Spezifität	94
4.9.2	Positiver und negativer prädiktiver Wert	95
4.10	Auswertung der ELISA-Ergebnisse von 2005–2007	96
4.11	Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse	96
5	Diskussion	100
5.1	Leptospirennachweise bei Pferden mit ERU und augengesunden Kontrolltieren	101
5.1.1	Antikörper gegen Leptospiren in Serumproben	101
5.1.2	Antikörper gegen Leptospiren in Glaskörperproben	103
5.1.3	PCR-Nachweis und kulturelle Isolierung von Leptospiren aus Glaskörpermaterial	104
5.1.4	Antikörper gegen Leptospiren im Kammerwasser	105
5.1.5	PCR-Nachweis von Leptospiren im Kammerwasser	106
5.1.6	Leptospirennachweise bei zwei Pferden mit Ciclosporin A-Implantat	107
5.1.7	Antikörper gegen die einzelnen Leptospirensereovare und Isolierung von Leptospirensereogruppen	108
5.2	Zusammenhänge von ELISA- und PCR-Resultaten mit dem Vorbericht und den Ergebnissen anderer Untersuchungen	108
5.2.1	Korrelationen der ELISA-Ergebnisse mit dem Vorbericht	108
5.2.2	Korrelationen der PCR-Ergebnisse mit dem Vorbericht	110
5.2.3	Korrelationen der ELISA-Ergebnisse mit den Augenbefunden und makroskopischen Glaskörperveränderungen	111
5.2.4	Korrelationen der PCR-Ergebnisse mit den Augenbefunden und makroskopischen Glaskörperveränderungen	114
5.2.5	Eignung des ELISAs zur Darstellung von Infektionsverläufen	114
5.2.6	Statistische Zusammenhänge von MAR- und ELISA-Ergebnissen	115
5.2.7	Statistische Zusammenhänge zwischen dem direkten intraokularen Leptospirennachweis und ELISA-Ergebnissen	117
5.3	Vergleich der Antikörperkonzentrationen gegen Leptospiren im Serum und intraokular	118
5.4	Vergleichbarkeit der Leptospirennachweise in Kammerwasser und Glaskörper an einem Auge	120

5.5	Übereinstimmung der angewandten Testverfahren untereinander sowie mit der klinischen Diagnose „ERU“	121
5.5.1	Übereinstimmung von MAR, ELISA, PCR und Kultur hinsichtlich positiver oder negativer Testergebnisse	121
5.5.2	Übereinstimmung von Leptospirennachweisen im Glaskörper mit der klinischen Diagnose „ERU“	123
5.6	Beurteilung der ELISA-Ergebnisse bei der Untersuchung von Glaskörpermaterial	124
5.7	Die Rolle des ELISAs, insbesondere von IgA, bei der (intraokularen) Leptospirendiagnostik	125
5.8	Mögliche Vorgehensweise in der Labordiagnostik bei Pferden mit fraglichen Augenbefunden	128
5.8.1	Serumuntersuchung als „Screeningmethode“	128
5.8.2	Kammerwasseruntersuchung	128
6	Zusammenfassung	130
7	Summary	134
	Literaturverzeichnis	137
	Abbildungsverzeichnis	164
	Tabellenverzeichnis	166

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
Brat.	Leptospirenserovar Bratislava
BSA	bovines Serum-Albumin
C	Antikörperkoeffizient bzw. Kontingenzkoeffizient
Can.	Leptospirenserovar Canicola
CD	cluster of differentiation; Unterscheidungsgruppen
chron.	chronisch(e, er, es)
Cop.	Leptospirenserovar Copenhageni
CRALBP	cellular Retinaldehyde-Binding-Protein; zelluläres Retinaldehyd-bindendes Protein
DGHM	Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie
DNA	desoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure
ELA	equines Leukozytenantigen
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay; enzymgekoppelter Immunabsorptionstest
EMJH	Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris
ERU	equine rezidivierende Uveitis
G	Gauche
ggr.	geringgradig
GK	Glaskörper
Gripp.	Leptospirenserovar Grippotyphosa
H₀	Nullhypothese
Hafl.	Haflinger
hgr.	hochgradig
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
Il	Interleukin
IRBP	Interphotorezeptor Retinoid-bindendes Protein
Isl.	Isländer
J.	Jahre
Jav.	Leptospirenserovar Javanica

κ	kappa; Übereinstimmungsmaß
k.A.	keine Angabe
kDa	Kilodalton
KW	Kammerwasser
L.	Leptospira
lg_2	Logarithmus zur Basis 2
LGL	Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
LH	Lahmheit
LipL32	Lipoprotein 32 bei Leptospira
LipL41	Lipoprotein 41 bei Leptospira
LPS	Lipopolysaccharide
Lru	Lipoprotein lipase releasing units; Lipoprotein Lipase freisetzende Einheiten
MAR	Mikroagglutinationsreaktion
MDH	Malat-Dehydrogenase
mgr.	mittelgradig
MHC	major histocompatibility complex; Haupthistokompatibilitätskomplex
MHz	Megahertz
n	Anzahl
Na	Natrium
obB	ohne besonderen Befund
OD	oculus dexter; rechtes Auge
O.I.E.	Office international des épizooties; Internationales Tierseuchenamt
OMP	outer membrane protein; äußeres Membranprotein
OS	oculus sinister; linkes Auge
OU	oculus uterque; beide Augen
p	Wahrscheinlichkeit
PCR	polymerase chain reaction; Polymerasekettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
Pom.	Leptospirenserovar Pomona
ρ	rho; Rangkorrelationskoeffizient
rRNA	ribosomal ribonucleic acid; ribosomale Ribonukleinsäure
s	Standardabweichung
S-Antigen	soluble antigen; lösliches Antigen
Th1	T-Helferzellen Typ 1
TNF$_{\alpha}$	Tumornekrosefaktor α
V.a.	Verdacht auf

Vollbl.	Vollblut
Wbl.	Warmblut
WHO	world health organization; Weltgesundheitsorganisation
\bar{x}	Mittelwert
\tilde{x}	Median
Z	Ganze Zahl

1 Einleitung

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) stellt mit einer Prävalenz von etwa 8% weltweit die häufigste und folgenschwerste Augenerkrankung des Pferdes dar. Sie ist durch das Auftreten akuter, schmerzhafter Entzündungsschübe, die sich mit Ruhephasen unterschiedlicher Dauer abwechseln, gekennzeichnet. Mit großem Erfolg kann die ERU durch chirurgische Entfernung des Glaskörpers (Vitrektomie) therapiert werden. Die Untersuchung des dabei anfallenden Materials leistete einen wertvollen Beitrag zum Verständnis und zur Diagnostik der Erkrankung. Glaskörperproben von Pferden mit ERU wiesen in der Mikroagglutinationsreaktion (MAR) zu 90% Antikörper gegen Leptospiren auf. In 70% der Proben konnte mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) Leptospiren-DNA detektiert werden. Eine kulturelle Isolierung gelang in 50% der Fälle. Die Erkrankung wird als Folge einer intraokular persistierenden Leptospireninfektion angesehen (WOLLANKE, 2002; WOLLANKE et al., 2004b; BRANDES et al., 2007). Dennoch bleiben weiterhin Fragen zur Pathogenese der ERU offen.

Antikörper der verschiedenen Immunglobulinklassen reflektieren die Immunantwort auf eine Infektion und sind somit hilfreiche Marker zur Beurteilung bestehender und/oder abgelaufener Infektionsereignisse (BECKER et al., 2003). Hauptanliegen der vorliegenden Arbeit war es daher, bei der Vitrektomie gewonnenes Glaskörpermaterial von Pferden mit ERU sowie Serum und Kammerwasser der Patienten insbesondere mittels ELISA auf die verschiedenen Klassen (IgM, IgG und IgA) der gegen Leptospiren gerichteten Antikörper zu untersuchen. Die Resultate sollten auf Zusammenhänge mit dem Patientenvorbericht, den ophthalmologischen Befunden und den Ergebnissen weiterer Labortests (MAR, PCR und Kultur) überprüft sowie ein Vergleich der ELISA-Ergebnisse der verschiedenen Proben eines Patienten durchgeführt werden. Dadurch erhoffte man, Erkenntnisse über die Infektionsverläufe und die Kinetik der Antikörperproduktion zu gewinnen.

Bislang liegen nur in geringem Umfang Berichte über die Untersuchung intraokularen Materials auf Leptospirenantikörper bei Pferden mit ERU mittels ELISA vor. Einzelne Voruntersuchungen ließen jedoch erwarten, dass die ELISA-Technik, und insbesondere der Nachweis von IgA gegen Leptospiren, sehr sensitiv für die Diagnose der leptospirenbe-

dingten Uveitis des Pferdes ist. Eine genauere Evaluierung dieser Nachweismethode und der Vergleich der Ergebnisse mit denen anderer Testverfahren war ebenfalls Bestandteil der vorliegenden Arbeit und könnte zur Verbesserung der Diagnostik der ERU im Rahmen von Kammerwasseruntersuchungen beitragen.

2 Literaturübersicht

2.1 ERU

2.1.1 Definition, Bedeutung und Vorkommen

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) ist eine ein- oder beidseitig auftretende, serofibrinöse, in seltenen Fällen serohämorrhagische, Entzündung einzelner oder mehrerer Anteile der Uvea, die in unterschiedlichen Intervallen rezidivieren oder chronisch schleichend ablaufen kann. Sie führt meist durch progrediente Schädigung intraokularer Strukturen zur Atrophie und Erblindung der betroffenen Augen (GERHARDS und WOLLANKE, 2006).

Bereits zu Beginn des letzten Jahrhunderts wurde die Erkrankung als „durch Mikroorganismen bedingte, nicht eitrige Panophthalmitis“ in einem damaligen Lehrbuch der veterinärmedizinischen Ophthalmologie geführt (BAYER, 1906). Sie stellt weltweit die Hauptursache für Seheinschränkung und Erblinden bei Pferden dar (ERRINGTON, 1941; DIMOCK et al., 1948; REBHUN, 1979; SCHWINK, 1992; KALSOW und DWYER, 1997).

In der Literatur erstrecken sich die Angaben zum Vorkommen der ERU von 1% (DWYER et al., 1995) bis 13% (JONES, 1942), während eine Studie in westdeutschen Pferdebeständen eine Prävalenz von etwa 8% ergab (SZEMES und GERHARDS, 2000). Junge adulte Pferde (4 bis 6 Jahre alt) scheinen häufiger betroffen zu sein als die übrigen Altersklassen (JONES, 1942; WOLLANKE, 2002). Andere Autoren konnten eine Altersverteilung zugunsten junger Pferde (1 bis 4 Jahre alt) feststellen (HEUSSER, 1948; KALISCH, 1952; ALEXANDER und KELLER, 1990).

Eine Analyse der Abstammungsverhältnisse von unter ERU leidenden Trabern im Raum Berlin ließ eine erbliche Disposition vermuten (ALEXANDER und KELLER, 1990). Auch CROSS (1966) beobachtete einen Rückgang der ERU in England nach Zuchtausschluss von Hengsten mit Augenveränderungen. Appaloosas scheinen ebenfalls mit höherem Risiko an ERU zu erkranken (ANGELOS et al., 1988; SLATTER, 2001). Ebenso gibt es Hinweise auf eine Rasseprädisposition bei Warmblutpferden (DWYER et al., 1995). DEEG und Mitarbeiter konnten nachweisen, dass deutsche Warmblutpferde mit einem bestimmten

Leukozyten-Antigen Typ (MHC-I Haplotyp ELA-A9) eine erhöhte Empfänglichkeit für die ERU besitzen (DEEG et al., 2004a). DWYER und Mitarbeiter vermuteten darin auch die Ursache für die Prädisposition bestimmter Appaloosazuchtlinien, an rezidivierender Uveitis zu erkranken (DWYER et al., 1995).

Nach Beobachtungen einiger Autoren leiden des Weiteren männliche Tiere häufiger unter ERU als weibliche (KALISCH, 1952; ALEXANDER und KELLER, 1990; WOLLANKE, 2002). Andere Autoren verneinten eine Alters-, Rassen- oder Geschlechterprädisposition (DIMOCK et al., 1948; CROSS, 1966).

Häufig wird über ein vermehrtes Auftreten der Erkrankung in feuchten, sumpfigen Gebieten berichtet (SLATTER, 2001).

2.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie bzw. Pathogenese der ERU stellt ein Enigma dar (BARNETT, 1987; BROOKS, 1998/99). Aktuell werden in erster Linie folgende Ursachen kontrovers diskutiert: die intraokulare Leptospireninfektion und die autoimmunmedierte Erkrankung.

Bereits Mitte des vergangenen Jahrhunderts wurde ein Zusammenhang zwischen der ERU und einer Leptospireninfektion vermutet (GSELL et al., 1946; RIMPAU, 1947; HEUSSER, 1948; HARTWIGK und STOEBBE, 1952; WITMER et al., 1953; WITMER, 1954). Unterstützt wurde die Annahme, dass den Leptospiren eine wichtige Rolle in der Ätiologie der ERU zukommt, durch den Nachweis hoher Antikörpertiter gegen den Erreger sowohl im Serum als auch im Kammerwasser an ERU erkrankter Pferde (GSELL et al., 1946; RIMPAU, 1947; HEUSSER, 1948; YAGER et al., 1950; WOOD und DAVIS, 1950; HARTWIGK und STOEBBE, 1952; HEUSSER, 1952; KALISCH, 1952; KEMENES und TAMAS, 1952; WITMER et al., 1953; WITMER, 1954; SCHEBITZ, 1954; SOVA, 1964a; HATHAWAY et al., 1981; HALLIWELL et al., 1985b; SILLERUD et al., 1987). Andere Autoren forderten eine Erregerisolierung als Beweis für eine intraokulare Infektion (BRYANS, 1955; SCHEBITZ und DEDIÉ, 1955; THIERMANN, 1984; KALSOW und DWYER, 1997).

Anfangs glückte der Lebendnachweis aus Kammerwasser von Pferden mit ERU nur im Einzelfall (HARTWIGK und STOEBBE, 1952; HARTWIGK, 1953), während viele Kultivierungsversuche scheiterten (BOHL und FERGUSON, 1952; HEUSSER, 1952; KEMENES und TAMAS, 1952; BRYANS, 1955; KEMENES et al., 1961; MORTER et al., 1964). In den letzten Jahren gelang jedoch verschiedenen Arbeitsgruppen die Isolierung von Leptospiren aus intraokularen Proben betroffener Pferde (BREM et al., 1998, 1999a; WOLLANKE

et al., 1998, 2000, 2001, 2004b; FABER et al., 2000; WOLLANKE, 2002; HARTSKEERL et al., 2004; BRANDES et al., 2007).

Zusätzliche Beweise für eine Leptospirenätiologie der ERU erbrachten Beobachtungen von natürlichen Ausbrüchen der Krankheit sowie bei experimentellen Infektionen mit Leptospiren (ROBERTS et al., 1952; HEUSSER, 1952; ROBERTS, 1958; BÜRKI et al., 1963; MORTER et al., 1964; WILLIAMS et al., 1971; KALSOW und DWYER, 1998).

Eine intraokulare Leptospirenpersistenz wurde von einigen Autoren diskutiert ¹ (BREM et al., 1999a; WOLLANKE et al., 2000, 2001; WOLLANKE, 2002; WOLLANKE et al., 2004b; HARTSKEERL et al., 2004; BRANDES et al., 2007). Möglicherweise können sich die Erreger im Glaskörper aufhalten und dort inmitten von Entzündungsprodukten durch eigene Schutzmechanismen (Maskierung mit wirtseigenen Proteinen, morphologische Veränderung der äußeren Hülle) oder auch intrazellulär vor dem Immunsystem geschützt überleben (NIEDERMAIER, 2002; GERHARDS und WOLLANKE, 2006; NIEDERMAIER et al., 2006a). Aus einer langsamen Vermehrung der Keime könnte eine zunehmende Schädigung intraokularer Gewebe und die Wahrnehmung der Bakterien durch die körpereigene Abwehr resultieren. Die dadurch induzierte intraokulare Antikörperproduktion würde sich zusammen mit der aktiven Gewebs- und Zellschädigung durch Leptospiren als klinisch sichtbare Uveitis zeigen (BREM et al., 1999a).

Andere Autoren unterstützten die Hypothese, die ERU sei eine Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ auf bakterielles Antigen (WILLIAMS et al., 1971).

Einige Untersuchungen lieferten einen weiteren, möglichen Erklärungsansatz für die teils sehr hohen intraokularen Antikörpertiter gegen Leptospiren bei Pferden mit ERU. Die Autoren konnten eine Antigenverwandtschaft zwischen intraokularen Proteinen von Hornhaut und Linse und Leptospiren feststellen (PARMA et al., 1985, 1986, 1987, 1992; LUCCHESI und PARMA, 1999). VERMA und Mitarbeitern gelang die Identifizierung zweier Lipoproteine, LruA und LruB, als Antigene aus pathogenen Leptospiren, die im Stande waren, eine starke lokale Antikörperproduktion im Auge an ERU erkrankter Pferde zu induzieren. Des Weiteren konnten die Autoren eine Kreuzreaktivität zwischen für die beiden Lipoproteine spezifischen Antiseren und equinem Gewebe von Linse, Ziliarkörper und Retina nachweisen (VERMA et al., 2005). Die beobachteten Phänomene gaben nach Ansicht der Autoren Hinweise auf Autoimmunreaktionen (PARMA et al., 1985, 1992; VERMA et al., 2005). WOLLANKE und Mitarbeiter konnten im Western Blot keine Antigenverwandtschaft zwischen intraokularen Strukturen von Pferden und Leptospiren nachvollziehen (WOLLANKE

¹siehe auch Kapitel 2.2.8 auf Seite 36

et al., 2000).

Möglicherweise spielen geographische Unterschiede bei der Ätiologie und Pathogenese der ERU eine Rolle. Während Studien aus Europa und Teilen der USA einen deutlichen Zusammenhang zwischen einer Leptospireninfektion und der Erkrankung erkennen ließen (DWYER et al., 1995; WOLLANKE et al., 2001; FABER et al., 2000; HARTSKEERL et al., 2004; WOLLANKE et al., 2004b; BRANDES et al., 2007), konnten andere Untersuchungen in den Vereinigten Staaten dies nur unzureichend oder nicht bestätigen (PEARCE et al., 2007; GILGER et al., 2008).

Viele Autoren sahen im rezidivierenden Charakter der Erkrankung, der Natur der lymphoplasmazellulären Entzündung im vorderen Uveabereich und dem Ansprechen auf immunsupprimierende Therapie mittels Kortikoiden den Hinweis auf ein immunmediertes Geschehen bzw. eine immunvermittelte Pathogenese bei der ERU (HINES, 1984; MAIR und CRISPIN, 1989; SPIESS, 1997; ROMEIKE et al., 1998; GILGER et al., 1999).

Histopathologische Untersuchungen an Augen von Pferden mit ERU zeigten, dass ein zellmediertes Entzündungsgeschehen zugrunde liegt, bei dem T-Lymphozyten die dominierende Zellart in den entzündlichen Infiltraten darstellen (DROMMER et al., 1996; ROMEIKE et al., 1998; KALSOW und DWYER, 1998; GILGER et al., 1999; EHRENHOFER, 2001; DEEG et al., 2002a). SAUNDERS und RUBIN (1975) konnten im akuten Stadium der Erkrankung zuerst eine Infiltration der vorderen Uvea mit vorwiegend neutrophilen Granulozyten und anschließend mit Lymphozyten feststellen. Viele dieser Zellen sollen hierbei auch ins Kammerwasser und einige in den Glaskörper übertreten. Die Lymphozyten konnten als CD4+ T-Zellen charakterisiert werden (GILGER et al., 1999; DEEG et al., 2001). Zudem wurden eine erhöhte Transkription von IL-2 und IFN γ sowie eine gleichzeitig erniedrigte Expression von IL-4 in den Augen von an ERU erkrankten Pferden beobachtet, was ein für eine Th1-Antwort typisches Zytokinprofil darstellt (GILGER et al., 1999). Das Vorherrschen von T-Zellen sowie das Zytokinprofil sind charakteristisch für eine Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ (DROMMER et al., 1996; ROMEIKE et al., 1998; GILGER et al., 1999). Ferner war eine erhöhte Expression von MHC-II-Antigenen auf residenten okularen Zellen der Uvea an ERU erkrankter Augen festzustellen, was zeigt, dass eine abnorme Immunregulation bei der Pathogenese der ERU beteiligt ist (KALSOW und DWYER, 1998; ROMEIKE et al., 1998).

In den letzten Jahren konnten des Weiteren verschiedene Autoantigene beim Pferd identifiziert werden (DEEG, 2008a). DEEG und Mitarbeiter untersuchten Glaskörpermaterial von Pferden mit Uveitis auf Autoantikörper gegen die bereits aus Tiermodellen bekannten re-

tinalen Autoantigene Interphotorezeptor Retinoid-bindendes Protein (IRBP) und S-Antigen (CASPI et al., 1988). Die Autoren konnten diese in 72% der Proben unter Uveitis leidender Pferde, nicht jedoch im Glaskörpermaterial augengesunder Kontrollpferde, nachweisen (DEEG et al., 2001). Zudem konnten Recoverin, Malat-Dehydrogenase (MDH) und zelluläres Retinaldehyd-bindendes Protein (CRALBP) als (potentielle) Autoantigene bei Pferden mit ERU identifiziert werden (DEEG et al., 2006a,b). Derselben Arbeitsgruppe gelang es mittels Injektion retinaler Autoantigene (IRBP und CRALBP) ein mit der spontanen ERU sowohl klinisch als auch pathohistologisch vergleichbares Krankheitsbild auszulösen (DEEG et al., 2002b, 2006a). Im Gegensatz zu IRBP scheinen das retinale S-Antigen sowie die Malat-Dehydrogenase beim Pferd ein nur schwaches bzw. kein uveitogenes Potential zu besitzen (HINES et al., 1990; DEEG et al., 2004b, 2008b). Eine Zusammenfassung zur immunvermittelten Pathogenese bei der ERU findet sich bei DEEG (2008a).

WOLLANKE wertete die beschriebenen Autoimmunreaktionen als Epiphänomene der intraokularen Leptospirose (WOLLANKE, 2002).

2.1.3 Formen, Verlauf und klinische Symptome

Die Uveitis des Pferdes lässt sich entsprechend der Beteiligung der verschiedenen Augensegmente in unterschiedliche Formen unterteilen: vordere Uveitis (Iritis), intermediäre oder hintere Uveitis (Zyklitits, Choroiditis) und Panuveitis (SCHWINK, 1992; WOLLANKE et al., 2004b; DWYER und GILGER, 2005).

GILGER und MICHAU unterteilten die ERU in drei klinische Syndrome: die *klassische* ERU, die durch aktive Entzündungsepisoden gefolgt von Phasen minimaler okularer Entzündung charakterisiert ist; eine *schleichende* Form mit anhaltender, geringgradiger Entzündungsreaktion, die oftmals vom Besitzer unerkannt bleibt und häufig bei Appaloosas auftritt; und die *posteriore* ERU, die den hinteren Augenabschnitt betrifft und vermehrt bei Pferden in Europa zu beobachten ist (GILGER und MICHAU, 2004a; GILGER, 2004b).

Die ERU ist durch das Auftreten akuter, wiederkehrender Entzündungsepisoden im Wechsel mit Ruhestadien unterschiedlicher Dauer gekennzeichnet (MORTER et al., 1969). Die Entzündung kann klinisch unbemerkt ablaufen, mit nur sehr geringgradigen Symptomen einhergehen oder zu äußerst heftigen Beschwerden und Störungen des Allgemeinbefindens mit einem Anstieg der Körpertemperatur bis 39,6 °C führen (GERHARDS und WOLLANKE, 2001). Auch können typische Augenveränderungen auftreten, ohne dass zuvor akute Anzeichen einer Entzündung aufgefallen waren (ERRINGTON, 1941; DIMOCK et al., 1948). Augenveränderungen nehmen mit der Zahl der Uveitisanfälle zu (ALEXANDER und KEL-

LER, 1990). Die Erkrankung tritt häufig bilateral auf (COOK et al., 1983).

Die klinischen Symptome der ERU wurden von zahlreichen Autoren in der Literatur beschrieben (BAYER, 1906; ERRINGTON, 1941; JONES, 1942; DIMOCK et al., 1948; CROSS, 1966; WILLIAMS et al., 1971; REBHUN, 1979; COOK et al., 1983; DAVIDSON et al., 1987; SILLERUD et al., 1987; LAVACH, 1990a; SCHWINK, 1992; WILCOCK, 1992; SPIESS, 1997; WAGNER et al., 1997; BARNETT et al., 1998b; BROOKS, 1998/99; SLATTER, 2001; GERHARDS und WOLLANKE, 2001; GILGER und MICHAU, 2004a; GILGER, 2004b; GERHARDS und WOLLANKE, 2006).

In Abhängigkeit vom hauptsächlich betroffenen Uveaabschnitt und je nach Erkrankungsstadium stehen unterschiedliche ophthalmologische Befunde im Vordergrund (GERHARDS und WOLLANKE, 2001). GILGER und MICHAU betonten neben den typischen klinischen Erscheinungen die Wichtigkeit der vorberichtlich wiederkehrenden Schübe einer inneren Augenentzündung, um die ERU von anderen Uveitiden oder anderen rezidivierenden Augenerkrankungen, wie bestimmten Keratitisformen, abgrenzen zu können (GILGER und MICHAU, 2004a; GILGER, 2004b). Die Symptome der akuten Uveitis sowie die Veränderungen im chronischen Stadium der Erkrankung können, wie in Tabelle 2.1 ersichtlich, zusammengefasst werden.

Tab. 2.1: Übersicht über die akuten Symptome sowie die chronischen Augenveränderungen bei der ERU

Symptome der akuten Uveitis	Abwehrtrias (Epiphora, Blepharospasmus und Photophobie)
	Lidschwellung
	gerötete Konjunktiven
	diffuse hauchartige bis rauchige Hornhauttrübung mit Vaskularisation
	erniedrigter Augeninnendruck
	diffuse Trübung oder seröser, gallertiger, fibrinöser oder hämorrhagischer Erguss in der vorderen Augenkammer
	Rubeosis iridis
	Miosis
	diffuse Glaskörpertrübung und schmutzig-grüner Fundusreflex
	seltene Papillenrötung und -ödeme
Veränderungen im Sinne der chronisch-rezidivierenden Uveitis	Atrophia bulbi (im Endstadium Phthisis bulbi)
	Entstehung eines „dritten“ Augenwinkels
	chronische Keratitiden
	Occlusio pupillae, hintere (seltener vordere) Synechien oder Irisresiduen auf der vorderen Linsenkapsel
	Seclusio pupillae mit Iris bombata
	„bläschenförmige“ Katarakt an der Linsenrückfläche
	Präzipitate an der Linsenrückfläche
	Cataracta complicata
	Linsenluxationen oder -subluxationen
	Glaskörperverflüssigung und zunehmende diffuse, gelbliche Glaskörpertrübung
	spinnwebartige, wolkige bis membranartige Glaskörpereinlagerungen
	falten-, blasenartige oder auch vollständige Ablatio retinae
	chorioretinitische Narben

2.1.4 Therapie, Prognose und Prophylaxe

Die Ziele der Therapie bei der ERU bestehen darin, das Sehvermögen zu erhalten, die augenschädigenden Folgen der Entzündungsvorgänge zu reduzieren und die oft erheblichen Schmerzen zu lindern (GERHARDS und WOLLANKE, 2001; GILGER und MICHAU, 2004a; GILGER, 2004b; ROHRBACH et al., 2005). Unbehandelt führt ein Fortschreiten der Erkrankung meist zur Erblindung des betroffenen Auges (COOK et al., 1983; GERHARDS und WOLLANKE, 2006).

Während eines akuten Schubes ergeben sich folgende symptomatische Behandlungsmög-

lichkeiten: Pupillenweitstellung durch Anwendung von Mydriatika und Zykloplegika sowie Entzündungshemmung durch lokale und systemische Applikation von steroidalen und nicht-steroidalen Antiphlogistika (REBHUN, 1979; COOK et al., 1983; BARNETT, 1987; LAVACH, 1990a; SPIESS, 1997; BARNETT et al., 1998b; BROOKS, 1998/99; SLATTER, 2001; GERHARDS und WOLLANKE, 2001; ROHRBACH et al., 2005; GERHARDS und WOLLANKE, 2006). Linderung kann zudem durch die Unterbringung des Pferdes in einem dunklen Stall verschafft werden (JONES, 1942; LAVACH, 1990a; SLATTER, 2001). Der Schutz des betroffenen Auges vor hellem Licht, z.B. durch Aufsetzen einer dunklen Maske, wird ebenfalls als Begleitmaßnahme empfohlen (GERHARDS und WOLLANKE, 2006).

Auch bei optimaler konservativer Therapie ist die Prognose aufgrund des rezidivierenden Charakters der Erkrankung und der fortschreitenden Zerstörung intraokularer Strukturen in vielen Fällen ungünstig (WINTERBERG und GERHARDS, 1997; GILGER, 2004b). Mit großem Erfolg kann die ERU durch operative Entfernung des Glaskörpers und Spülung des Auginnenren (Vitrektomie) therapiert werden. Von den nach dem Eingriff nachverfolgten Pferdeaugen blieben 98% rezidivfrei (WINTERBERG und GERHARDS, 1997; WOLLANKE et al., 2004b). Auch ein dauerhafter Erhalt der Sehfähigkeit ist bei rechtzeitiger Operation möglich (WERRY und GERHARDS, 1992; FRÜHAUF et al., 1998; GERHARDS et al., 1999; GERHARDS und WOLLANKE, 2001, 2006). Indiziert ist eine Vitrektomie nach dem zweiten beobachteten Uveitisschub oder bei unbekannter Anamnese bei Vorliegen eindeutiger ophthalmologischer Anzeichen einer ERU (GERHARDS et al., 1999; GERHARDS und WOLLANKE, 2001). Detaillierte Beschreibungen der Operationstechnik finden sich bei WERRY und GERHARDS (1992), FRÜHAUF et al. (1998), GERHARDS et al. (1999) und GERHARDS und WOLLANKE (2005). Der therapeutische Effekt des Eingriffes besteht aus der Entfernung des pathologisch veränderten Glaskörpers, von aktivierten Entzündungszellen, Entzündungsprodukten oder -mediatoren sowie von Bakterien, die sich im Maschenwerk der Glaskörperfibrillen aufhalten können (GERHARDS et al., 1999). Zusätzlich resultiert aus der Vitrektomie eine Verbesserung der intraokularen Flüssigkeitsdynamik und damit verbunden ein erleichterter Abfluss von Entzündungszellen und -produkten aus dem Glaskörperraum über das Kammerwasser (DIAMOND und KAPLAN, 1978; WERRY und GERHARDS, 1991).

Eine weitere chirurgische Therapieoption stellt die Anwendung eines intravitrealen oder suprachoroidalen Implantates zur verzögerten Freisetzung von Ciclosporin A dar (GILGER et al., 2001; GILGER und MICHAU, 2004a; GILGER, 2004b; GILGER et al., 2006). Der Wirkungszeitraum wurde von den Autoren mit fünf Jahren angegeben. Ciclosporin A

inhibiert die Synthese von Il-2 und supprimiert weitgehend selektiv die Aktivität der T-Helferzellen. Durch die Implantation konnte eine signifikante Reduktion der Dauer und des Schweregrades sowie der Häufigkeit der Uveitisschübe und der Erblindungsrate unter an experimentell induzierter Uveitis bzw. spontaner ERU leidenden Pferden erzielt werden (GILGER et al., 2000, 2001, 2006). Ciclosporin A weist eine nur schwache antiinflammatorische Wirkung auf. Der Effekt auf die Wiederkehr akuter Uveitisschübe ist auf seine immunsuppressiven Eigenschaften zurückzuführen (GILGER und MICHAU, 2004a). Bei einer in-vitro-Studie konnten die Autoren zudem einen wachstumshemmenden Effekt von Ciclosporin A auf Leptospiren feststellen. In höheren Konzentrationen schien Ciclosporin A sogar eine bakterizide Wirkung zu besitzen (GILGER et al., 2006).

Als Prophylaxe empfahl SLATTER, den Kontakt der Pferde zu Rindern und Wildtieren zu vermeiden, die Pferde von Tümpeln und Sumpfgebieten fernzuhalten, das Futter vor Nagern zu schützen und das Auftreten bakterieller und viraler respiratorischer und systemischer Erkrankungen zu vermindern (SLATTER, 2001). WOLLANKE führte Schadnagerbekämpfung und Weidehygiene als Faktoren an, um den Infektionsdruck durch Leptospiren zu reduzieren und die Inzidenz der ERU zu senken (WOLLANKE, 2002).

Zwei Studien widmeten sich der Therapie bzw. Prophylaxe der ERU durch Vakzinierung der Pferde mit einem Leptospirenimpfstoff. ROHRBACH und Mitarbeiter konnten bei bereits vor Einsatz des Impfstoffes an ERU erkrankten Tieren eine signifikante Verlängerung der Zeitspanne bis zum Auftreten des nächsten Schubes im Vergleich zu nicht-vakzinierten Kontrollpferden ausmachen. Die Häufigkeit der Entzündungsphasen wurde jedoch nicht signifikant reduziert, und ein Fortschreiten der Augenveränderungen konnte nicht aufgehalten werden (ROHRBACH et al., 2005). WOLLANKE und Mitarbeiter ließen die Pferde aus zwei Beständen mit vorberichtlich gehäuftem Auftreten der ERU mindestens zweimalig mit einer bestandsspezifischen Totvakzine gegen die Serovar *Grippotyphosa* impfen. Die Beobachtung, dass Neuerkrankungen in diesen Betrieben ausblieben, kann als möglicher Hinweis auf einen durch die Impfung hervorgerufenen Schutz gedeutet werden (WOLLANKE et al., 2004a).

2.1.5 ERU und Glaskörper

Der farblose, optisch klare und gallertige Glaskörper mit einem Volumen von ca. 28 ml besteht aus einem Kollagenfasernetzwerk, in das Glaskörperflüssigkeit sowie Hyalozyten und Hyaluronsäure eingelagert sind. Das Glaskörpergel verflüssigt sich mit zunehmendem Alter (WISSDORF et al., 2002).

Schon in der ersten Hälfte des letzten Jahrhunderts wurden Glaskörperveränderungen als konstantes Merkmal der „Mondblindheit“ bzw. „periodischen Ophthalmie“ beschrieben (BAYER, 1906; JONES, 1942; DIMOCK et al., 1948). WILLIAMS und Mitarbeiter (1971) konnten Glaskörpertrübungen als frühes gemeinsames Merkmal im Verlauf der Erkrankung erblindender Augen ausmachen.

Einige Autoren sahen in einer veränderten Gefäßpermeabilität der Uvea und dem damit verbundenen Übertritt von Zellen und Proteinen in den Glaskörperraum die Ursache für die zu beobachtenden Glaskörperveränderungen (ERRINGTON, 1941; WILLIAMS et al., 1971; BARNETT et al., 1998a; BROOKS, 1998/99). Zur Bildung von Glaskörpertrübungen tragen viele Zelltypen bei: fibröse Astrozyten, Fibrozyten, Myofibroblasten, Makrophagen, verschiedene Entzündungszellen und Hyalozyten (HULTSCH, 1979). Pathohistologisch wies JONES (1942) vor allem Lymphozyten, Fibrin und Serum sowie vereinzelt Monozyten und Plasmazellen im Glaskörper von Pferden mit ERU nach. NIEDERMAIER und Mitarbeiter fanden mononukleäre Entzündungszellen sowie eine Destruktion des Glaskörpergerüsts durch zahlreiche Fibrillenbündel, Zelltrümmer und nekrotische Zellen bei der elektronenmikroskopischen Darstellung des Glaskörpers an rezidivierender Uveitis leidender Pferde (NIEDERMAIER et al., 2006b).

Bei nur langsamer Clearance der Entzündungszellen kann es bei einer chronischen inneren Augenentzündung zur zunehmenden Trübung des Glaskörpers kommen (DIAMOND und KAPLAN, 1978). Mit steigender Anzahl akuter Schübe verdichten sich die Glaskörpereinlagerungen (ERRINGTON, 1941; DIMOCK et al., 1948). Nach einigen iridozyklitischen Episoden können die Entzündungszellen im Glaskörper daher noch monatelang nachweisbar bleiben (WERRY und GERHARDS, 1991). Nach Abklingen eines akuten Schubes befinden sich die Einlagerungen vornehmlich im dorsalen Bereich des Glaskörpers (ERRINGTON, 1941; DIMOCK et al., 1948). WOLLANKE (2002) konnte beginnende Glaskörperveränderungen vor allem dorso-temporal in der Nähe des Ziliarkörpers ausmachen.

Eine Glaskörperverflüssigung (Syneresis) kann ebenfalls durch die ERU hervorgerufen werden (LAVACH, 1990b; SLATTER, 2001). Die physiologische, gelartige Konsistenz des Glaskörpers wird dabei wasserähnlich und ermöglicht es, Glaskörpereinlagerungen leichter durch ein Ophthalmoskop zu erkennen, da sie bei normalen Augenbewegungen umherschwimmen (REBHUN, 1979).

Glaskörpertrübungen und -einlagerungen erschweren die Beurteilung von Fundusveränderungen (HURTIENNE, 1972; COOK et al., 1983; BARNETT et al., 1998a). Bandartige Glaskörpereinlagerungen, die sich an die Müller'schen Zellen der Retina anlagern, können

durch Traktion eine Ablösung der Retina vom retinalen Pigmentepithel bewirken (BISTNER, 1984; LAVACH, 1990b).

Anmerkung: Die Rolle des Glaskörpers bei der Immunologie und Entzündungen des Auges wird in Kapitel 2.4.3 auf Seite 41 behandelt.

2.2 Leptospiren und Leptospirosen

2.2.1 Taxonomie

Die Gattung *Leptospira* gehört der Familie *Leptospiraceae* der Ordnung *Spirochaetales* an. Spirochäten (Schraubenbakterien) haben zwar Zellwände vom gramnegativen Typ, gehören phylogenetisch jedoch einer eigenständigen Gruppe an (SELBITZ, 2001). Diese taxonomische Einteilung findet sich in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Band I (GARRITY und HOLT, 2001). Bis zum Jahr 1989 wurde die Gattung *Leptospira* in zwei Spezies unterteilt: *L. interrogans* repräsentierte die über 200 pathogenen Serovare unterteilt in 23 Serogruppen, während *L. biflexa* die saprophytären Serovare umfasste (SELBITZ, 2001; O'KEEFE, 2002; DUTTA und CHRISTOPHER, 2005). Diese phänotypische Einteilung konnte mittels molekularbiologischer Untersuchungen nicht bestätigt werden und wurde von einer taxonomisch korrekten, genotypischen Klassifizierung abgelöst (SELBITZ, 2001). Derzeit werden acht pathogene Leptospirenarten unterschieden: *L. interrogans*, *L. noguchii*, *L. weilii*, *L. santarosai*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. fainei* und *L. kirschneri* (SELBITZ, 2001). Einige Genomspezies enthalten sowohl Serovare von *L. interrogans* als auch von *L. biflexa* (LEVETT, 2001).

2.2.2 Biologie und Epidemiologie

Leptospiren sind zarte, schraubenförmige Bakterien von rund 0,1 μm Durchmesser und 20–24 μm Länge. Um ihren Protoplasmazyylinder sind zwei Endflagellen gewunden, die eine rotierende Bewegung ermöglichen. Beide Enden der Zelle sind gebogen, wodurch die charakteristische Kleiderbügel- oder Hakenform zustande kommt (SELBITZ, 2001). Sie passen durch herkömmliche Bakterienfilter (TORTEN und MARSHALL, 1994). Die Bakterien sind streng aerob und bevorzugen mikroaerophile Wachstumsbedingungen sowie einen pH-Wert von 7,2 bis 7,4 (TORTEN und MARSHALL, 1994). Eine epidemiologisch wichtige Eigenschaft der Erreger ist die Fähigkeit zur lange anhaltenden Nierenbesiedelung und damit verbundener Ausscheidung über den Harn. In der Außenwelt können Leptospiren überleben, wenn sie auf Feuchtigkeit und Wärme stoßen (SELBITZ, 2001; AHMAD et al., 2005).

Viele Wild- und domestizierte Tiere sind Träger von Leptospiren, wie Mäuse, Ratten, Schweine, Hunde, Rinder, Pferde, andere Säugetiere und einige Vogelarten. Sie zeigen selbst keine klinischen Symptome, scheiden aber Leptospiren über Wochen bis Jahre mit dem Urin aus (BABUDIERI, 1961). Eine besondere Rolle als Reservoirwirte kommt vor allem den Muriden und anderen erdbewohnenden Kleinsäugetern zu (SELBITZ, 2001). So ist die Ratte beispielsweise Erregerreservoir für die Serovar *Icterohaemorrhagiae* und die Feldmaus für *Grippotyphosa*.

Von diesen Reservoiren kommt es direkt oder indirekt (über Vermittlung von Wasser, feuchtem Erdboden, Grünpflanzen etc.) zu einer Übertragung der Leptospiren (WINTZER, 1982; AHMAD et al., 2005). Die Erreger können über kleine Hautwunden oder die intakte Schleimhaut in den Organismus eindringen (HANSON, 1976; THIERMANN, 1984; WINTZER, 1982; QUINN et al., 1994; LEVETT, 2001; RATHINAM, 2005; AHMAD et al., 2005). Deckinfektionen kommen vor (SELBITZ, 2001). Über den Blutweg gelangen die Bakterien in alle Organe (JUNGHERR, 1944). Ihre Beweglichkeit ermöglicht es ihnen, Gewebe zu penetrieren (FARR, 1995).

2.2.3 Leptospireninfektion Mensch

Die Leptospirose ist die weltweit am stärksten verbreitete Zoonose (WHO, 1999) und stellt in einigen Ländern ein bedeutendes Gesundheitsproblem dar (FAINE et al., 1999; LEVETT, 1999). Eine Infektion des Menschen erfolgt entweder durch direkten oder indirekten Kontakt mit dem Urin infizierter Tiere (HAAKE et al., 2000; LEVETT, 2001; AHMAD et al., 2005). Die Inzidenz der Erkrankung ist in warmen Ländern signifikant höher als in solchen mit gemäßigttem Klima, was auf ein längeres Überleben der Leptospiren in der Außenwelt sowie die Tatsache, dass viele tropische Länder zugleich Entwicklungsländer sind, zurückgeführt werden kann (FAINE, 1994; LEVETT, 2001; DUTTA und CHRISTOPHER, 2005).

Das Spektrum an Erkrankungen, das beim Menschen durch Leptospiren hervorgerufen wird, ist außerordentlich breit und reicht von der subklinischen Infektion bis zu multiplen Organmanifestationen mit bis zu 15%iger Mortalität (FARR, 1995; LEVETT, 2001; AHMAD et al., 2005; MULLA et al., 2006; MICHOT et al., 2007). Aufgrund der unspezifischen klinischen Erscheinungen bleibt die Erkrankung häufig undiagnostiziert (MULLA et al., 2006). Das klassische Syndrom der ikterischen Leptospirose mit Nierenversagen wurde erstmals 1886 von WEIL beschrieben und demzufolge nach ihm benannt (Morbus Weil). Schwere Leptospiroseformen werden beim Menschen regelmäßig, aber nicht ausschließlich, durch Serovare der Serogruppe *Icterohaemorrhagiae* verursacht (LEVETT, 2001). Welche Serovare mit einem Krankheitsgeschehen in Verbindung stehen, hängt stark von

der geographischen Lage und den dort heimischen Erregerreservoirien ab (LEVETT, 2001). Der klinische Verlauf der Leptospirose ist zweiphasig: Der *akuten* oder *septischen Phase*, die etwa eine Woche andauert, folgt eine *Immunphase*, die durch Antikörperproduktion und Ausscheidung der Leptospiren mit dem Urin charakterisiert ist (FARR, 1995; KAYSER et al., 2001; DUTTA und CHRISTOPHER, 2005).

2.2.4 Augenbeteiligung bei der Leptospireninfektion des Menschen

Eine Beteiligung der Augen kann sowohl in der bakteriämischen als auch in der Immunphase der Leptospireninfektion beobachtet werden.

In der akuten Phase wurden vor allem eine Hyperämie der Konjunktiven, Chemosis und subkonjunktivale Blutung als Symptome genannt. Als pathognomonische Merkmale einer schweren systemischen Leptospirose wurden eine Gelbfärbung der Skleren sowie eine zirkumkorneale Hyperämie beschrieben (RATHINAM, 2005).

Schon WEIL erwähnte eine Beteiligung der Augen in Form einer einseitigen Iridozyklitis, die vor allem in der zweiten Phase der Erkrankung oder nach klinischer Genesung auftrat (WEIL, 1886; AUSTONI, 1967). Die Uveitis stellt die wichtigste Spätkomplikation einer Leptospireninfektion dar (GSELL, 1952). Der Zeitpunkt ihres Auftretens kann zwischen drei Wochen und einem Jahr nach der ursprünglichen Infektion liegen (TORTEN und MARSHALL, 1994; FARR, 1995). In den meisten Fällen wurde die Uveitis als ein Immunphänomen interpretiert. Es konnten jedoch Leptospiren aus betroffenen Augen isoliert und deren DNA mittels PCR im Kammerwasser nachgewiesen werden (ALEXANDER et al., 1952; MERIEN et al., 1993; CHU et al., 1998; PRIYA et al., 2003). Konkret wurde die Rolle von leptospiralem LPS als auslösender Faktor diskutiert (PRIYA et al., 2008). Die Uveitis kann sich ein- oder beidseitig, als vordere oder Panuveitis manifestieren (RATHINAM et al., 1997). Oftmals bleibt die Diagnose der leptospirenbedingten Uveitis aus, da kein zeitlicher Zusammenhang mehr zum systemischen Geschehen erkennbar ist (VERMA et al., 2008). Das klinische Bild einer akuten, nicht-granulomatösen Panuveitis mit Hypopyon, Vaskulitis, Papillenödem, membranösen Glaskörpereinlagerungen und dem gleichzeitigen Fehlen von Choroiditis und Retinitis ist jedoch von hohem diagnostischen Wert (RATHINAM, 2005).

2.2.5 Leptospireninfektion Pferd

Weltweite serologische Untersuchungen an Pferden fanden heraus, dass eine Exposition der Tiere gegenüber Leptospiren häufig vorkommt, eine Leptospirose sich beim Pferd allerdings nur selten klinisch manifestiert (ELLIS et al., 1983b; MATTHEWS et al., 1987;

BERNARD, 1993). Eine akute Leptospireninfektion und Leptospirämie bleiben häufig unerkannt, da es sich beim Pferd dabei meist um eine milde Form handelt (WITMER et al., 1953; SCHWINK, 1992). Gelegentlich können Inappetenz, Fieber oder Ikterus beobachtet werden (ROBERTS et al., 1952). Von schweren Allgemeinerkrankungen in Einzelfällen sowie Plazentitiden, Aborten und Frühgeburten aufgrund einer Leptospirose berichteten verschiedene Autoren (ROBERTS et al., 1952; JACKSON et al., 1957; SOVA, 1964b; ELLIS et al., 1983a; HODGIN et al., 1989; DONAHUE et al., 1991, 1992; BREM et al., 1992; DIVERS et al., 1992; BERNARD, 1993; POONACHA et al., 1993; WILLIAMS et al., 1994; DONAHUE et al., 1995; KINDE et al., 1996; DONAHUE und WILLIAMS, 2000; SEBASTIAN et al., 2005; VEMULAPALLI et al., 2005; LÉON et al., 2006; SZEREDI und HAAKE, 2006).

Die dominierende Serovar variiert mit der Verbreitung in der jeweiligen Region (HATHAWAY et al., 1981). Beim Pferd sind mit regionalen Unterschieden folgende Serogruppen bzw. Serovare am häufigsten: *Grippotyphosa*, *Icterohaemorrhagiae*, *Australis* (*Bratislava*), *Pomona*, *Tarassovi*, *Hardjo*, *Sejroe* und *Canicola*, jedoch ohne dass einem dieser Typen eine besondere Virulenz für das Pferd zugeschrieben werden kann (WINTZER, 1982). So herrschen in Deutschland bei Pferden die von Feldmäusen übertragenen Infektionen mit *L. interrogans* (jetzt *L. kirschneri*) Serovar *grippotyphosa* vor (RIMPAU, 1947; HEUSSER, 1948; SCHEBITZ und DEDIÉ, 1955). Für ELLIS und Mitarbeiter stellte das Pferd den Hauptwirt für die Serovar *Bratislava* dar (ELLIS et al., 1983a,b). Leptospirentiter können im Blut über mehr als sieben Jahre nach einer Infektion nachgewiesen werden (SWART et al., 1982).

2.2.6 Leptospireninfektion und Uveitis beim Pferd

Eine leptospirenbedingte Uveitis entwickelt sich beim Pferd erst einige Monate oder sogar Jahre nach der Leptospirämie und wurde als Spätfolge mit meist chronisch rezidivierendem Verlauf beschrieben (ROBERTS et al., 1952; WITMER et al., 1953; ROBERTS, 1958; BRYANS, 1955; BÜRKI et al., 1963; SOVA, 1964a; WILLIAMS et al., 1971; HALLIWELL et al., 1985b; ELLIS, 1986; SLATTER, 2001). In Einzelfällen wurde vom Auftreten einer Uveitis in der akuten Phase der Leptospireninfektion berichtet (ROBERTS et al., 1952; BRYANS, 1955; ROBERTS, 1958).

2.2.7 Nachweismethoden

Als Material für die Labordiagnostik eignen sich Blut, Liquor, Urin, andere Körperflüssigkeiten, wie Kammerwasser, sowie post mortem Leber- und Nierengewebe (BABUDIARI,

1961; MOCHMANN, 1963; QUINN et al., 1994). Eine umfassende Auflistung verschiedener Untersuchungs- und Testmethoden findet sich bei RATHINAM und NAMPERUMAL-SAMY (1999), O'KEEFE (2002) sowie AHMAD et al. (2005). Daher wird im folgenden Abschnitt nur auf einige Nachweisverfahren eingegangen.

Direkter Nachweis

Der direkte Erregernachweis aus dem Patientenmaterial kann mikroskopisch, mittels Polymerasekettenreaktion (PCR), kulturell oder im Tierversuch geführt werden. Er ist im positiven Fall beweisend, ein negatives Resultat schließt eine Leptospirose jedoch nicht aus. Es kann dadurch bedingt sein, dass das Material zu einem unpassenden Zeitpunkt zur Untersuchung kam, oder die Leptospiren in zu geringer Menge vorhanden waren. Eine antibiotische Behandlung kann ebenfalls ein negatives Untersuchungsergebnis verursachen (MOCHMANN, 1963).

Mikroskopische Methoden Im Nativpräparat lassen sich die Spirochäten am besten im Dunkelfeldmikroskop bei 200facher Vergrößerung sichtbar machen. Im fixierten Präparat können Leptospiren mit der GIEMSA-Färbung, der Silberimprägnation nach FONTANA oder mit anderen Spezialfärbungen dargestellt werden. In Gewebeschnitten werden sie mit Versilberungsmethoden, z.B. nach LEVADITI, nachgewiesen (MOCHMANN, 1963). Jedoch sollte sich der Untersucher der Tatsache bewusst sein, dass die Menge Leptospiren, die in Körperflüssigkeiten vorhanden ist, für gewöhnlich sehr gering ist und dadurch nur eine geringe Chance besteht, diese mittels Dunkelfeldmikroskopie nachzuweisen (SHOTTS, 1976).

Polymerasekettenreaktion Die Polymerasekettenreaktion ist eine in-vitro-Methode, um spezifische DNA-Sequenzen zu amplifizieren (vermehrten) (WIESNER und RIBBECK, 2000). In der Humanmedizin stellt die PCR eine Verbesserung in der Leptospirendiagnostik (MERIEN et al., 1995) und die effektivste Testmethode für Leptospiren dar (BAL et al., 1994). Sie soll sich sogar zur Methode der Wahl entwickelt haben (VINETZ, 1997). Sie ist sehr sensitiv und spezifisch, schnell durchführbar und kann bei der Untersuchung von Körperflüssigkeiten und Gewebeproben eingesetzt werden (SMITH et al., 1994). Für die PCR werden meist nur sehr geringe Probenmengen benötigt (50-100 μ l). Die real-time PCR ermöglicht sogar eine schnelle und spezifische Quantifizierung des genetischen Materials infektiöser Organismen (BODAGHI und LE HOANG, 2002). Ebenso ist ein Nachweis mittels PCR im Gegensatz zu serologischen Methoden schon am Tag des Auftretens erster klinischer Symptome möglich (BAL et al., 1994; MERIEN et al., 1995). Einen Nachteil der Me-

thode stellt das Fehlen einer Möglichkeit zur Identifizierung der beteiligten Serovar dar (LEVETT, 2001; O'KEEFE, 2002; AHMAD et al., 2005). Dies schränkt die Möglichkeiten zu epidemiologischen Nachforschungen bezüglich der Infektionsquelle ein (VINETZ, 1997). Jedoch konnten inzwischen Primersets entwickelt werden, die spezifisch DNA-Sequenzen pathogener Leptospirenspezies amplifizieren, wie Gene, die für 16S rRNA, 23S rRNA und Hämolyse-assoziiertes Protein 1 kodieren (BRANGER et al., 2005; KIM et al., 2006; LÉON et al., 2006; KOSITANONT et al., 2007). Aufgrund der großen Empfindlichkeit der Methode darf die Probe auf keinen Fall sekundär kontaminiert werden (THURAU, 2003). In Anwesenheit von Hemmstoffen kann eine Untersuchung falsch-negativ ausfallen (BOOM et al., 1990; OIE, 2008). Ebenso muss auf die Wahl adäquater Primer geachtet werden (BODAGHI und LE HOANG, 2002).

Kultureller Nachweis Die definitive Diagnose einer Leptospirose wird über die Kultur gestellt (THIERMANN, 1984). Für eine Leptospirenkultur kommen flüssige (nach KORTHOFF, VERVOORT und STUART) oder halb feste Nährmedien (nach NOGUCHI) zum Einsatz (BABUDIERY, 1961). Pathogene Leptospiren können am besten in Medien kultiviert werden, die 10% Kaninchenserum oder 1% Rinder-Serum-Albumin sowie langkettige Fettsäuren enthalten (TORTEN und MARSHALL, 1994; FARR, 1995). Ebenso eignen sich in den meisten Fällen auch synthetische Medien (TURNER, 1970; TORTEN und MARSHALL, 1994). Zudem ist ein Zusatz der Vitamine B1 und B12 erforderlich (SELBITZ, 2001). 5-Fluorouracil, ein Pyrimidinanalogon, sollte dem Medium beigelegt werden, um ein Überwuchern der Kultur durch andere Keime zu verhindern, da Leptospiren nur sehr langsam wachsen (JOHNSON und ROGERS, 1964; FARR, 1995). Am weitesten verbreitet ist derzeit ein halbfestes Medium nach ELLINGHAUSEN-McCULLOUGH-JOHNSON-HARRIS (EMJH), das kommerziell erhältlich ist und Tween 80 sowie Rinder-Serum-Albumin enthält (LEVETT, 2001). Die Inkubation erfolgt bei einem Temperaturoptimum von 28 – 30 °C im aeroben bzw. mikroaerophilen Milieu (BABUDIERY, 1961; MOCHMANN, 1963; TURNER, 1970; PALMER, 1988; SELBITZ, 2001). Kulturen sollten mindestens wöchentlich auf Leptospirenwachstum kontrolliert werden (SHOTTS, 1976). Sie müssen über mindestens 16, besser jedoch 26, Wochen durchgeführt werden, bevor ein Kulturergebnis als *negativ* beurteilt werden darf (ELLIS, 1986). Leptospiren sind in den seltensten Fällen ab dem siebten Tag nachweisbar, in der Hälfte der Fälle etwa ab dem 14. Tag (GOCHENOUR, 1953). Isolierte Leptospiren werden entweder über serologische Methoden oder molekulare Techniken identifiziert (LEVETT, 2001).

Tierversuch Tierversuche zur Diagnostik einer Leptospirose kamen in der Vergangenheit vor allem bei verunreinigten Proben in Betracht (MOCHMANN, 1963; SHOTTS,

1976; TORTEN und MARSHALL, 1994). Hauptsächlich wurden hierfür Meerschweinchen und Hamster verwendet. Die Inokulation mit dem Untersuchungsmaterial erfolgte subkutan oder intraperitoneal (BABUDIERY, 1961). Heute sollte die Methode auf Proben mit starker bakterieller Kontamination beschränkt werden (SELBITZ, 2001).

Indirekter Nachweis

Die meisten Fälle von Leptospirose werden mittels serologischer Methoden diagnostiziert (WOODWARD et al., 1997). Im Blut sind Antikörper etwa fünf bis sieben Tage nach dem Einsetzen klinischer Symptome nachweisbar (LEVETT, 2001). Wie auch bei anderen Erkrankungen hat der indirekte Erregernachweis gewisse Limitationen. Resultate müssen vorsichtig und unter Einbeziehung klinischer und sonstiger Daten interpretiert werden (BABUDIERY, 1961). Generell sind serologische Methoden von eingeschränktem diagnostischen Wert, solange sie nicht mit einer Erregerisolierung kombiniert werden (THIERMANN, 1984).

Mikroagglutinationsreaktion Die Mikroagglutinationsreaktion (MAR) stellt die effektivste serologische Nachweismethode für Leptospiren dar (FAINE, 1982). Sie gilt seit langem als sehr sensitiv und besitzt auch eine hohe Spezifität (BABUDIERY, 1961; COLE et al., 1973; FAINE, 1982; OIE, 2008). Die MAR wird als Referenztest zur Überprüfung anderer Tests auf Leptospiren herangezogen und als „Goldstandard“ in der Leptospirendiagnostik bezeichnet (ELLIS, 1986; VINETZ, 1997; RATHINAM, 2002; DUTTA und CHRISTOPHER, 2005).

Mit ihr werden agglutinierende Antikörper gegen Leptospiren nachgewiesen, die höchstwahrscheinlich mit dem LPS-Antigen reagieren (GUERREIRO et al., 2001; PRIYA et al., 2003). Hierzu werden die zu untersuchenden Proben mit Suspensionen von Lebendantigen inkubiert und mikroskopisch auf Agglutination überprüft. Dies erfordert das Vorrätighalten von Lebendkulturen aller Serovare, die als Antigen genutzt werden. Daher ist die Untersuchung Speziallabors vorbehalten (GUSSENHOVEN et al., 1997; CUMBERLAND et al., 1999; FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001). Das Probenmaterial wird schrittweise verdünnt. Als Agglutinationstiter wird die Verdünnung angesehen, bei der noch 50% der Leptospiren agglutiniert werden (BABUDIERY, 1961; TURNER, 1968; SHOTTS, 1976; FAINE, 1982). Ein Titer von 1:100 wird bei der Untersuchung von Einzelproben sowie ein vierfacher Titeranstieg bei der Untersuchung gepaarter Serumproben als signifikant erachtet (OIE, 2008).

Serovare besitzen unterschiedliche geographische Verbreitung. Mit dem Wissen um die für eine Infektion in Frage kommenden Serovare sollte eine MAR durchgeführt werden

(SCHWINK, 1992; VINETZ, 1997; OIE, 2008). Eine Einschränkung stellt die Tatsache dar, dass nur agglutinierende Antikörper detektiert werden (ADLER et al., 1980). Die Fähigkeit zur Agglutination wird sowohl IgG- als auch IgM-Antikörpern zugeschrieben (CRAWFORD, 1972; MORRIS und HUSSAINI, 1974; FAINE et al., 1999; WHO, 2003; AHMAD et al., 2005). IgM ist jedoch die wichtigere Antikörperklasse, die mit dieser Methode nachgewiesen wird (MYRON et al., 1971; HEATH und JOHNSON, 1994; PRIYA et al., 2003), da IgM in erster Linie für eine Agglutination verantwortlich ist (HANSON, 1973). Des Weiteren herrscht eine bedeutende Kreuzreaktivität zwischen Serogruppen und Serovaren (FAINE, 1982; SELBITZ, 2001; AHMAD et al., 2005; OIE, 2008). Eine kürzlich abgelaufene Infektion kann nur über einen Titeranstieg diagnostiziert werden (COUSINS et al., 1985).

Enzyme linked immunosorbent assay Der Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) bezeichnet ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert (WIKIPEDIA, 2009). Untersuchungen mittels ELISA-Technik liefern beim Nachweis von Leptospirenantikörpern mit der MAR vergleichbare Ergebnisse, sind jedoch etwas sensitiver (THIERMANN und GARRETT, 1983; WINSLOW et al., 1997; BREM et al., 1999b; CUMBERLAND et al., 1999; DUTTA und CHRISTOPHER, 2005). Die ELISA-Technik weist gegenüber der MAR zusätzliche Vorteile auf. Es wird totes Antigen verwendet, Ergebnisse können objektiv gemessen anstatt subjektiv beurteilt werden, und sie ermöglicht den Nachweis verschiedener Immunglobulinklassen ohne vorherige Fraktionierung des Serums (COUSINS et al., 1985). Mittels ELISA können spezifische Antikörper zudem früher als in der MAR erkannt werden (TORTEN und MARSHALL, 1994; WINSLOW et al., 1997; CUMBERLAND et al., 1999; AHMAD et al., 2005; MULLA et al., 2006). So kann der Nachweis von IgM im Serum, auch bei negativer MAR, Anzeichen für eine frische Infektion sein (BERNARD, 1993; GUSSENHOVEN et al., 1997; AHMAD et al., 2005). Die Unterscheidung von IgM und IgG erlaubt damit auch eine genauere Datierung des Infektionszeitpunktes (BALLARD et al., 1984; BERNARD, 1993; SMITH et al., 1994; KETTNER, 1997; BREM et al., 1999b). Ebenso können Impfantikörper nachgewiesen werden (BREM et al., 1999b). Ein Nachteil der ELISA-Technik gegenüber der MAR ist allerdings der höhere Arbeits- und Zeitaufwand (BREM et al., 1999b). Wie bei der MAR können Kreuzreaktionen insbesondere zwischen den Serovaren einer Serogruppe auftreten, die im Fall von IgG jedoch schwächer als bei IgM ausfallen (HALLIWELL et al., 1985b). Insgesamt fallen sie stärker aus als in der MAR (CHO et al., 1989).

Eine Reihe von Autoren verwendete bisher die ELISA-Technik zum Nachweis von Leptospirenantikörpern bei verschiedenen Tierspezies (ADLER et al., 1981, 1982; THIER-

MANN und GARRETT, 1983; WALTMAN und DAWE, 1983; BALLARD et al., 1984; HARTMAN et al., 1984a; HARTMAN, 1984b; HARTMAN et al., 1984c; COUSINS et al., 1985; FAIRBROTHER, 1985; HALLIWELL et al., 1985b; COUSINS und ROBERTSON, 1986; HARTMAN et al., 1986; CHO et al., 1989; TRUEBA et al., 1990; GODDARD et al., 1991; COUSINS et al., 1991; GODDARD et al., 1991; MENDOZA und PRESCOTT, 1992; STING und DURA, 1994; WOODWARD et al., 1997; SURUJBALLI et al., 1997a,b; BREM et al., 1999a,b; YAN et al., 1999; RIBOTTA et al., 2000; SURUJBALLI und MALLORY, 2001; DEY et al., 2004; SURUJBALLI und MALLORY, 2004; BOMFIM et al., 2005; THEODORIDIS et al., 2005; OKUDA et al., 2005; ODONTSETSEG et al., 2005; RUIZ et al., 2005; MARIYA et al., 2006; DEY et al., 2007; NAITO et al., 2007).

Während in der Vergangenheit bei serologischen Testverfahren keine Unterscheidung pathogener von apathogenen Leptospiren möglich war, da das verwendete Leptospirenantigen durch Präparation der kompletten Bakterienzelle gewonnen wurde, werden seit kurzem auch in der Veterinärmedizin rekombinante Antigene der äußeren Membran ausschließlich pathogener Leptospiren für einen Antikörpernachweis eingesetzt (DEY et al., 2004; BOMFIM et al., 2005; OKUDA et al., 2005; MARIYA et al., 2006; DEY et al., 2007; NAITO et al., 2007). Bisher fanden die Lipoproteine LipL41 (THEODORIDIS et al., 2005) und LipL32 (DEY et al., 2004; BOMFIM et al., 2005; DEY et al., 2007; NAITO et al., 2007) als Testantigene im ELISA Verwendung. Bei einer natürlichen Leptospireninfektion von Säugetieren ist Lipoprotein LipL32 zusammen mit dem Porin OmpL1 stärker immunogen wirksam als LipL41 (HAAKE et al., 2000). Bei LipL32 scheint es sich zudem um ein hochkonserviertes Antigen innerhalb pathogener Leptospirenspezies zu handeln (HAAKE et al., 2000). Bei einer experimentellen Infektion von Hamstern wurde die Expression von LipL41, OmpL1 und LPS *in vivo* beobachtet (BARNETT et al., 1999).

Da mittels ELISA und MAR die jeweils höchsten Antikörperkonzentrationen gegen Leptospiren zu unterschiedlichen Zeitpunkten messbar waren, schlussfolgerten manche Autoren, dass die beiden Testmethoden verschiedene Antigen-Antikörper-Systeme nachweisen würden (ADLER et al., 1980, 1982; BALLARD et al., 1984; LEONARD et al., 1993). Die Ergebnisse bisheriger Studien lassen Zweifel am Verlass auf die MAR als internationale Standardmethode aufkommen (WOODWARD et al., 1997). Die ELISA-Technik vermag inzwischen auch, den Nachweis mittels MAR zu ersetzen (BOMFIM et al., 2005).

Leptospirennachweis bei Pferden mit ERU

Serumuntersuchungen In zahlreichen Studien wurde bei Pferden mit und ohne Uveitis bzw. Augenveränderungen im Serum der Antikörperspiegel gegen Leptospiren hinsichtlich

einer möglichen ätiologischen Rolle des Erregers bestimmt. Hierbei fanden die meisten Autoren bei unter Uveitis leidenden Pferden häufiger Antikörper und/oder deutlich höhere Titer als bei augengesunden Pferden (RIMPAU, 1947; HEUSSER, 1948; YAGER et al., 1950; WOOD und DAVIS, 1950; KALISCH, 1952; KEMENES und TAMAS, 1952; SCHEBITZ, 1954; SOVA, 1964a; HATHAWAY et al., 1981; HALLIWELL et al., 1985b; SILLERUD et al., 1987; ALEXANDER und KELLER, 1990; PARK et al., 1992; DWYER et al., 1995; WOLLANKE et al., 2001). Zum Teil korrelierten positive Serumuntersuchungen mit dem Alter oder dem Schweregrad der Uveitiden (HEUSSER, 1948; KALISCH, 1952; DWYER et al., 1995). So wiesen blinde Pferde höhere Titer auf (DWYER et al., 1995). Andere Autoren konnten diese Ergebnisse nicht bestätigen (WITMER et al., 1953; SCHEBITZ und DEDIÉ, 1955; MATTHEWS et al., 1987; WOLLANKE et al., 1998, 2000; WOLLANKE, 2002; GILGER et al., 2008).

Bei vielen Pferden konnte im Serum ein positiver Antikörpertiter gegen Leptospiren nachgewiesen werden, ohne dass ein Hinweis auf eine Augenerkrankung bestand (HATHAWAY et al., 1981). Aus diesem Grund eignet sich eine Untersuchung des Serums auf Leptospirenantikörper nicht zur Abklärung der Ätiologie der ERU (WOLLANKE, 2002). Im Allgemeinen werden Labortests, die auf einer Serumuntersuchung basieren, als geringwertig für die Ursachenfindung bei einer Uveitis erachtet, insbesondere wenn die Erkrankung nicht mit einer Beteiligung anderer Organe einhergeht (BODAGHI und LE HOANG, 2002).

Kammerwasser- und Glaskörperuntersuchungen Mittels MAR konnten bei mikrobiologischen Untersuchungen von Glaskörpermaterial aus an ERU erkrankten Augen in über 90% der Fälle Antikörper gegen Leptospiren nachgewiesen werden (WOLLANKE, 2002; WOLLANKE et al., 2004b; BRANDES et al., 2007). Die PCR lieferte in 70–100% der Fälle ein positives Ergebnis (FABER et al., 2000; WOLLANKE, 2002; WOLLANKE et al., 2004b; BRANDES et al., 2007). Eine kulturelle Isolierung war aus 53% (WOLLANKE, 2002; WOLLANKE et al., 2004b) bzw. 75% (BRANDES et al., 2007) der Glaskörperproben erfolgreich. Regelmäßig konnten gleichzeitig Antikörper gegen Leptospiren und vermehrungsfähige Erreger in ein und derselben Glaskörperprobe nachgewiesen werden (BREM et al., 1998, 1999a; WOLLANKE et al., 2001; HARTSKEERL et al., 2004). Positive Kulturergebnisse korrelierten sogar signifikant mit höheren Antikörpertitern gegen Leptospiren im Glaskörper (WOLLANKE, 2002; WOLLANKE et al., 2004b). Die kulturelle Isolierung gelang sowohl aus dem Glaskörper von Pferdeaugen, die vorberichtlich erst einen einzigen Schub einer inneren Augenentzündung erlitten hatten, als auch aus dem Glaskörper von Pferdeaugen, die über mehrere Jahre viele Entzündungsepisoden durchgemacht hatten (WOLLANKE et al., 2000; WOLLANKE, 2002; WOLLANKE et al.,

2004b). In der Präsenz vitaler kultivierbarer Leptospiren und dem gleichzeitigen Nachweis von spezifischen Antikörpern in der gleichen Glaskörperprobe sahen BREM und Mitarbeiter den Beweis für eine intraokulare Antikörperbildung (BREM et al., 1999a). In elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Glaskörpermaterial aus Augen von Pferden mit ERU konnten bei bis zu 24% der Tiere intakte Leptospiren dargestellt werden (NIEDERMAIER et al., 2006a; BRANDES et al., 2007). Bisher sind nur vereinzelt Berichte über den Einsatz der ELISA-Technik zum intraokularen Nachweis spezifischer, gegen Leptospiren gerichteter Antikörper bei Pferden mit ERU bekannt. Eine Auflistung der verfügbaren Literaturstellen findet sich in Tabelle 2.2.

Tab. 2.2: Berichte über den Nachweis intraokularer Leptospirenantikörper mittels ELISA-Technik bei Pferden mit ERU in der Literatur

Autoren	verwendete Leptospirenantigene	untersuchte Ig-Klassen
HALLIWELL et al. (1985b)	Pom.	IgM, IgG, IgA
PARMA et al. (1987)	Leptospira	k.A.
BREM et al. (1999a)	Gripp.	k.A.
GESELL (2004)	Gripp., Brat.	IgM, IgG
VERMA et al. (2005)	LruA, LruB	IgG, IgA
ROCZEK (2008)	Gripp., Brat., Cop., Jav., Can., Pom.	IgM, IgG, IgA

Vergleich von Serum und intraokularen Proben Einige Autoren konnten in intraokularen Proben von an ERU erkrankten Pferden höhere Antikörpertiter als im Serum desselben Tieres nachweisen (GSELL et al., 1946; HEUSSER, 1948, 1952; WITMER et al., 1953; WITMER, 1954; KEMENES et al., 1984; HALLIWELL et al., 1985b; DAVIDSON et al., 1987; SCHWINK et al., 1989; BREM et al., 1998; WOLLANKE et al., 1998, 2000, 2004b; FABER et al., 2000; WOLLANKE, 2002). Andere fanden im Kammerwasser keine oder niedrigere Antikörpertiter als im Serum (BRYANS, 1955; SCHEBITZ und DEDIÉ, 1955; HARTWIGK und STOEBBE, 1952). Oftmals wurde der Antikörperspiegel gegen Leptospiren im Serum jedoch sogar um ein Vielfaches durch denjenigen im Glaskörper oder Kammerwasser übertroffen (HALLIWELL et al., 1985b; DAVIDSON et al., 1987; WOLLANKE et al., 1998, 2001; BREM et al., 1999a). Dies kann als konkreter Hinweis dafür gewertet werden, dass die nachgewiesene Leptospirensenrovar ursächlich für die Augenentzündung ist (BISTNER und SHAW, 1980; DAVIDSON et al., 1987; SCHWINK et al., 1989). WOLLANKE und Mitarbeiter sahen darin einen Hinweis auf eine lokale Bildung der Antikörper anstelle einer Passage der Blut-Augen-Schranke (WOLLANKE et al., 2001). Eine lokale Antikörperbildung gegen Leptospiren vermuteten auch andere Autoren (WIT-

MER, 1954; HALLIWELL und HINES, 1985a; WOLLANKE, 2002; WOLLANKE et al., 2004b; VERMA et al., 2005).

WOLLANKE und Mitarbeiter berechneten für 36 Glaskörper- und Serumprobenpaare von an ERU erkrankten Pferdepatienten einen modifizierten Goldmann-Witmer-Koeffizienten² und konnten für 94% der Fälle eine intraokulare Antikörperproduktion gegen Leptospiren nachweisen (WOLLANKE et al., 2004b).

2.2.8 Immunität und Erregerpersistenz

Die Immunität gegen Leptospiren ist überwiegend humoraler Natur und beschränkt sich auf homologe oder eng verwandte Serovare (LEVETT, 2001). Nach einer Leptospireninfektion kommt es zur spezifischen humoralen Immunantwort in Form von Antikörperbildung, wie sie für die meisten Infektionskrankheiten typisch ist: Zuerst treten die Antikörper der Klasse M auf, dann die der Klasse G, die wiederum länger nachweisbar bleiben (ADLER et al., 1982; LEONARD et al., 1993). Andere Autoren konnten ein gleichzeitiges Auftreten von spezifischem IgM und IgG nach frischer Infektion (BALLARD et al., 1984) oder sogar nur von IgG in Abwesenheit von IgM (CHAPMAN et al., 1988, 1991; GUERREIRO et al., 2001; FLANNERY et al., 2001) beobachten. Im Blut lassen sich dabei keine Leptospiren mehr nachweisen.

In bestimmten Geweben jedoch haben die Keime die Möglichkeit, sich der Immunabwehr zu entziehen und zu persistieren. Hierzu zählen die proximalen Nierentubuli, das Gehirn, bei einigen Tierarten der Genitaltrakt und die vordere Augenkammer (THIERMANN, 1984; BERNARD, 1993; FAINE, 1994; HEATH und JOHNSON, 1994; HARKIN et al., 2003). Zum Schutz vor der Immunreaktion des Wirtes können sich Leptospiren im Urin von Ausscheidern mit Polysacchariden und Proteinen des Wirtes maskieren (FAINE, 1994). Einige Autoren sahen einen Zusammenhang zwischen einer möglichen Leptospirenpersistenz im Auge und dem Auftreten der ERU (BREM et al., 1999a; WOLLANKE, 2002; WOLLANKE et al., 2004b; GESELL, 2004; BRANDES et al., 2007). WOLLANKE und Mitarbeiter vermuteten eine Persistenz der Leptospiren im Glaskörper, da oftmals gleichzeitig lebende Bakterien in der Kultur und hohe Antikörpertiter in derselben Probe nachweisbar waren (WOLLANKE et al., 2001; WOLLANKE, 2002). Die Autoren sahen in folgenden Mechanismen einen begünstigenden Effekt auf die Persistenz der Leptospiren im Auge (WOLLANKE, 2002; WOLLANKE et al., 2004b):

1. das Auge als immunologisch privilegierter Ort und damit verbunden lokale Immun-

²Erläuterung siehe Kapitel 2.4.4 Seite 43

suppression

2. molekulare Mimikry (Ähnlichkeiten zwischen Erregerbestandteilen und wirtseigenen Proteinen) und dadurch bedingte unzureichende Erkennung der Keime als körperfremd
3. Maskierung mit körpereigenen Proteinen und zwischenzeitliches Überleben der Bakterien in körpereigenen Zellen (wie von den Tubulusepithelzellen der Niere bekannt)

BRANDES und Mitarbeiter hielten eine Änderung der Oberflächenstruktur der Leptospiren zum Schutz vor einer Immunantwort für eine mögliche Erklärung der Leptospirenpersistenz (BRANDES et al., 2007). Andere Autoren vermuteten aufgrund der Tatsache, dass gegen einige Leptospirenserovare, wie *Copenhageni* oder *Canicola*, zwar Antikörper in intraokularen Proben nachweisbar waren, die Bakterien aber kulturell nicht isolierbar zu sein schienen, dass nur wenige Serovare nach einer Invasion ins Augennere dort zu persistieren vermögen (HARTSKEERL et al., 2004).

2.3 Immunglobulinklassen

Antikörpermoleküle sind Glykoproteine und werden als *Immunglobuline* bezeichnet. Es gibt fünf verschiedene Klassen oder Isotypen von Immunglobulinen, die sich in ihren schweren Ketten unterscheiden (TIZARD, 2004).

2.3.1 Immunglobulin G

Immunglobulin G oder IgG besitzt ein Molekulargewicht von 180 kDa und weist von allen Antikörpermolekülen die höchste Serumkonzentration auf. Es wird von Plasmazellen in der Milz, in Lymphknoten und Knochenmark produziert und sezerniert (TIZARD, 2004). Vermutlich aufgrund seiner geringen Größe diffundiert es leichter als andere Immunglobuline ins Interstitium, was vor allem bei Entzündungen mit daraus resultierender erhöhter Gefäßpermeabilität von Bedeutung ist (RAHI und GARNER, 1976; TIZARD, 2004). IgG stellt die Hauptquelle humoraler Immunität gegen infektiöse Organismen und deren Produkte im extravasalen Gewebe dar (RAHI und GARNER, 1976). Das Immunglobulin besitzt agglutinierende, opsonisierende und komplementaktivierende Eigenschaften (TIZARD, 2004).

2.3.2 Immunglobulin M

IgM stellt ein Pentamer dar und ist mit einem Molekulargewicht von 900 kDa das größte Immunglobulin (RAHI und GARNER, 1976). Es weist bei den meisten Säugetieren die

zweithöchste Serumkonzentration auf (TIZARD, 2004). Es wird ebenfalls von Plasmazellen in Milz, Lymphknoten und Knochenmark produziert (TIZARD, 2004). Aufgrund seiner Größe verlässt IgM normalerweise nicht das Gefäßsystem. Nach Erstkontakt mit einem Antigen stellt es die erste Antikörperklasse dar, die synthetisiert wird (RAHI und GARNER, 1976). Ebenso wird IgM bei erneutem Kontakt mit dem Antigen produziert und dabei aber meist vom dominierenden IgG maskiert (TIZARD, 2004). Auf molarer Basis ist IgM bei weitem effizienter in der Komplementaktivierung, Opsonisierung, Virusneutralisation und Agglutination als IgG (TIZARD, 2004).

2.3.3 Immunglobulin A

Das IgA-Monomer besitzt ein Molekulargewicht von 150 kDa. Im Gegensatz zum Menschen, bei dem im Serum zirkulierendes IgA prinzipiell in monomerischer Form auftritt, stellt Serum-IgA beim Pferd ein Dimer dar (VAERMAN et al., 1971; McGUIRE und CRAWFORD, 1972). IgA-Polymere werden gelegentlich im Serum nachgewiesen (TIZARD, 2004). Dabei wird ein Molekulargewicht von bis zu 700 kDa erreicht (McGUIRE und CRAWFORD, 1972). Bei den meisten Säugetieren besitzt es die dritthöchste Serumkonzentration (TIZARD, 2004). Es ist jedoch das dominierende Immunglobulin in Sekreten, wie Speichel, Milch oder intestinaler Flüssigkeit, und wird von Plasmazellen, die unter Körperoberflächen sitzen, in der Regel als Dimer sezerniert (TIZARD, 2004). IgA stellt das wichtigste Immunglobulin in der Tränenflüssigkeit dar (RAHI und GARNER, 1976). In der Kolostralmilch weist es von allen Immunglobulinen allerdings nicht die höchste Konzentration auf, sondern wird von IgG übertroffen (McGUIRE und CRAWFORD, 1972).

In submukosalem Gewebe lokal gebildetes IgA gelangt zusammen mit einem Protein, der sogenannten *secretory component*, durch die Epithelzellen von Verdauungsapparat, Respirations- und Harntrakt, Haut und Milchdrüse in die Sekrete. Diese sekretorische Komponente schützt IgA möglicherweise vor einer proteolytischen Spaltung (JANEWAY et al., 2002). Die Hauptaufgabe des IgA besteht im Schutz von Schleimhautoberflächen vor einer Infektion. Es scheint keine effektiven bakteriostatischen oder bakteriziden Eigenschaften zu besitzen, sondern schützt Rezeptoren an der Zelloberfläche, die andernfalls für eine Bindung von Bakterien oder Viren frei wären (JAKOBIEC et al., 1984). IgA weist keine komplementaktivierenden oder opsonisierenden Eigenschaften auf. Es kann aber partikuläre Antigene agglutinieren und Viren neutralisieren (TIZARD, 2004).

Das sekretorische und das Serum-IgA-System scheinen voneinander separat zu arbeiten. Mittels radioaktiv markierter Antikörper konnte herausgefunden werden, dass sekretorisches IgA kaum zum Pool zirkulierender Antikörper beiträgt, und Serum-IgA im Gegenzug

nur in Spuren in Sekreten zu finden ist (MESTECKY et al., 1986).

2.3.4 Immunglobulin E

IgE besitzt ein Molekulargewicht von 190 kDa und ist im zirkulierenden Plasma nur in sehr geringer Menge vorhanden. Wie IgA wird es von Plasmazellen, die unter der Körperoberfläche sitzen, gebildet (TIZARD, 2004). Es weist eine besondere Affinität gegenüber basophilen Granulozyten und Mastzellen auf. Bei Antigenkontakt löst es eine Degranulation der Mastzellen aus, was die Freisetzung von Histamin und weiterer vasoaktiver Amine zur Folge hat (RAHI und GARNER, 1976; TIZARD, 2004). IgE vermittelt Überempfindlichkeitsreaktionen vom Typ I (TIZARD, 2004). Ebenso scheint IgE ein Bestandteil der Immunantwort auf parasitäre Infestationen zu sein (RAHI und GARNER, 1976).

2.3.5 Immunglobulin D

Das Molekulargewicht von IgD beträgt 170 kDa. Das Immunglobulin kommt kaum in Körperflüssigkeiten vor und wurde bisher nicht bei allen Säugetieren nachgewiesen. So wurde es auch beim Pferd noch nicht entdeckt (TIZARD, 2004).

2.4 Auge und Immunreaktion

2.4.1 Blut-Augen-Schranke

Der Übertritt von hochmolekularen Stoffen vom Blut ins Auge wird durch die sogenannte *Blut-Retina-* sowie die *Blut-Kammerwasser-Schranke* verhindert (GUM, 1991). Diese okularen Barrieren setzen sich aus den *tight junctions* der folgenden Strukturen zusammen: dem Gefäßendothel der Uvea, dem Ziliarkörperepithel, dem retinalen Pigmentepithel und dem retinalen Gefäßendothel (O'CONNOR, 1983). MATTHEWS und POULTER (1986) vermuteten, dass Plasmaproteine mit niedrigem Molekulargewicht, einschließlich IgG, praktisch durch passive Diffusion oder Ultrafiltration über die Blut-Kammerwasser-Schranke in die vordere Augenkammer gelangen würden. IgM scheint als pentamerer Molekül zumindest in ophthalmologisch gesunden Augen die intraokularen Barrieren nicht passieren zu können (MATTHEWS, 1989; WAGNER et al., 1997; EULE et al., 2000). Zwischen dem Kammerwasser und der Glaskörperflüssigkeit besteht keine bedeutende Barriere, was eine Diffusion löslicher Stoffe zwischen beiden Kompartimenten ermöglicht (GUM, 1991).

2.4.2 Immunprivileg des Auges

Durch die Zugehörigkeit zum zentralen Nervensystem ist das Augengewebe in seiner Regenerationsfähigkeit limitiert. Um die deletären Folgen einer Immunantwort zu vermeiden, entwickelte sich im Auge ein einzigartiger immunoregulatorischer Mechanismus, der sich im *Immunprivileg des Auges* reflektiert (GRISANTI, 1998; CASPI, 1999). Das Immunprivileg ist definiert als das Phänomen, das ein verlängertes Überleben von histoinkompatiblem Gewebe an gewissen Orten des Organismus ermöglicht (GRISANTI, 1998). Es ist ein physiologischer Zustand, der einerseits einen Schutz des Auges gegenüber Pathogenen gewährleistet, andererseits aber vor Entzündungen schützt, die das Augenlicht gefährden (STREILEIN et al., 2002). Intraokular produzierte Antikörper können so eine essentielle immunologische Schutzfunktion ausüben, da zellmedierte Immunität im Auge im Rahmen des Immunprivilegs unterdrückt wird (MEEK et al., 2003). Im Auge zählen die vordere Augenkammer, das Hornhautstroma, die Linse, der Glaskörper und der subretinale Raum zu den immunprivilegierten Strukturen (STREILEIN, 1999). Zu den immunprivilegierten Orten des gesamten Organismus gehören des Weiteren das Cerebrum, die Haarfollikel, einige endokrine Organe (Schilddrüse, Ovarien, Testes, Nebenniere), die Leber, das Knorpelgewebe und die fetoplazentare Einheit (GRISANTI, 1998).

2.4.3 Immunologie bei Uveitiden

Das Auge nimmt unter immunologischen Gesichtspunkten verglichen mit anderen Organen eine Sonderstellung ein. Während große Teile, wie die avaskuläre Hornhaut und der Glaskörper, vom Immunsystem anatomisch weitgehend isoliert sind, stellt die Uvea ein stark vaskularisiertes Gewebe dar und ist somit für immunologische und entzündliche Reaktionen besonders empfänglich (WERRY und GERHARDS, 1992). Durch die Gefäßendothelien können Lymphozyten in die umgebenden Gewebe austreten und an entzündlichen Veränderungen des inneren Auges teilhaben (HINES, 1984; MAIR und CRISPIN, 1989; WERRY und GERHARDS, 1992).

Nach Abklingen eines akuten Uveitisschubes geht die vormals diffuse Infiltration der vorderen Uvea auf eine fokale Akkumulation von Lymphozyten zurück (SAUNDERS und RUBIN, 1975). Ebenso konnte im Rahmen pathohistologischer Untersuchungen an Augen von Pferden mit ERU eine Bildung von Lymphfollikeln ausgemacht werden (JONES, 1942; WILCOCK, 1992; ROMEIKE et al., 1998; GILGER et al., 1999; DEEG et al., 2002a). Die Uvea kann dabei im Auge die Rolle eines regionären Lymphknotens wahrnehmen (PEIFFER, 1980). Im Zentrum der Lymphfollikel sammelten sich B-Lymphozyten an, in der Peripherie waren T-Lymphozyten zu finden (DEEG et al., 2002a). Dies wurde als Hinweis

auf eine lokale Antikörperproduktion bei der ERU gedeutet (ROMEIKE et al., 1998; EULE et al., 2000).

Eine Uveitis wird in jedem Fall durch irgendeine Art von Gewebetrauma hervorgerufen. Dieses kann durch Mikroorganismen oder auch Autoimmunreaktionen als Spätfolge einer mikrobiellen Schädigung verursacht werden. Gewebeschädigung immunologischen Ursprungs kann verschiedene Formen annehmen: zytotoxische Schädigung durch sensitivierte Lymphozyten, Immunkomplex-bedingte Traumata oder Gewebeverletzung durch oxidative Produkte von Entzündungszellen. In einigen Fällen resultiert daraus eine permanente Veränderung der uvealen Gefäßpermeabilität. Uveitisrezidive können durch die Reaktivierung oder Persistenz infektiöser Organismen, durch die Ablagerung von Immunkomplexen oder eine Änderung der Immunregulation durch Schwangerschaft, Altern oder emotionale Faktoren hervorgerufen werden (O'CONNOR, 1983).

Auch WERRY und GERHARDS (1991) vermuteten in der Antigenpersistenz oder der Retinierung immunkompetenter *memory cells* am Ort der primären Entzündung mit späterer Reaktivierung dieser Zellen eine Erklärung für die Rekurrenz der Uveitisschübe bei der ERU. Bei WOLLANKE (2002) findet sich ebenfalls eine Zusammenstellung möglicher Pathomechanismen für das Auftreten von Entzündungsrezidiven im Rahmen der ERU. So könnte ein akuter Schub einerseits durch die intraokulare Vermehrung von Leptospiren und damit verbundener lokaler Gewebeschädigung sowie Aktivierung des Abwehrsystems, andererseits aber auch durch die Bildung lokaler Immunkomplexe hervorgerufen werden.

Des Weiteren können Rezidive durch die Entwicklung einer Autoimmunerkrankung, die bestimmte Anteile des Auges miteinbezieht, verursacht werden (MAIR und CRISPIN, 1989). So ging DEEG bei der Entstehung der ERU von einer autoaggressiven T-Zellreaktion gegen retinale Proteine aus, in deren Folge durch eine Zerstörung intraokularer Strukturen weitere Epitope im Zielgewebe freigelegt würden. Die Uveitisrezidive ließen sich durch eine Immunreaktion gegen diese neuen Epitope erklären (DEEG, 2008a).

Die Rolle des Glaskörpers

Die Rolle des Glaskörpers bei der Immunologie und Entzündungen des Auges ist nachwievor ungeklärt (HULTSCH, 1979). Dank ihrer Makrophagen-ähnlichen Eigenschaften könnte Hyalozyten eine bedeutende Rolle bei der Förderung persistierender oder rezidivierender Uveitiden durch Verstärkung der antigenen Wirkung von Antigenen, bei der Speicherung von Antigenen und der Rekrutierung von Lymphozyten nach Beeinträchtigung der Blut-Glaskörper-Schranke zukommen (HULTSCH, 1979). Einige weitere Autoren vermu-

teten ebenfalls einen Depoteffekt oder die Persistenz von Antigenen im Glaskörperraum sowie die Speicherung von zellulären und organischen Entzündungsmediatoren (RAHI und GARNER, 1976; WERRY und HONEGGER, 1987; DIAMOND und KAPLAN, 1978; ULBIG und KAMPIK, 1989). Eine Verstärkung und Verlängerung der Immunantwort auf ein Fremdprotein im Auge kann durch diese Speicherung und langsame Freisetzung von Antigenen bewirkt werden (HALL und O'CONNOR, 1970).

Dadurch lässt sich der positive Effekt der Vitrektomie auf den Fortgang des Entzündungsgeschehens bei Pferden mit ERU erklären: Bei diesem Eingriff wird der uveitisch veränderte Glaskörper entfernt und durch balancierte Elektrolytlösung und später endogen produziertes Kammerwasser ersetzt, was den intravitrealen Stoffwechsel fördert und den schnelleren Abtransport von Antigenen und Entzündungsresten gewährleistet (WINTERBERG und GERHARDS, 1997).

2.4.4 Vorkommen von Immunglobulinen im erkrankten Auge

FIELDER und RAHI (1979) diskutierten mögliche Einflussfaktoren auf die Immunglobulinlevel im Menschaugen. Zu diesen zählten sie das Molekulargewicht und hydrodynamische Volumen des Immunglobulins, die Integrität der Blut-Kammerwasser-Schranke, lokale Synthese und aktiver Transport der Immunglobuline im Auge. HARTMANN und Mitarbeiter betonten an dieser Stelle die Bedeutung des Molekülradius anstelle des Molekulargewichtes als beeinflussende Größe (HARTMANN et al., 1983).

HALLIWELL und HINES konnten in erkrankten und dabei insbesondere in uveitisch veränderten Pferdeaugen verglichen mit den Konzentrationen in gesunden Augen einen erhöhten Gehalt an Albumin und Immunglobulinen feststellen. Die ebenfalls beobachtete Erhöhung des Kammerwasser-Serum-Verhältnisses für die genannten Proteine sowie eine Verringerung des IgG-Albumin-Verhältnisses werteten die Autoren eher als einen Hinweis auf den Zusammenbruch der Blut-Kammerwasser-Schranke als Folge der Entzündung als auf eine intraokulare Synthese von Antikörpern (HALLIWELL und HINES, 1985a).

WOLLANKE (2002) hingegen konnte insbesondere bei erst geringgradig geschädigten Augen von Pferden mit ERU eine deutliche Erhöhung der Globulinfraction (und somit des IgG-Albumin-Verhältnisses) im Glaskörper feststellen, während der Albuminanteil am Gesamteiweißgehalt trotz des im Vergleich zu den Immunglobulinen geringeren Molekulargewichtes erst bei höhergradigen uveitischen Veränderungen anstieg.

Intraokulare AK-Produktion

Bei der lokalen Immunantwort erfolgt die Antikörperproduktion im Auge, d.h. es handelt sich nicht nur um eine reine Diffusion von Serumantikörpern bei geschädigter Blut-Kammerwasser- und Blut-Retina-Schranke (GRUS, 2007).

Die Humanmediziner HARTMANN und Mitarbeiter werteten den Nachweis hoher intraokularer Antikörpertiter als sichersten Hinweis auf die Ursache der Augenerkrankung, da bei einem hohen Antikörperspiegel im Serum das Auge nicht betroffen sein muss, bei einem niedrigen oder negativen Seramtiter dennoch hohe intraokulare Titer vorliegen können. Bei einem standardisierten IgG-Gehalt im Serum und in Kammerwasser- bzw. Glaskörperproben gilt ein im Serum niedrigerer Antikörpertiter als in den intraokularen Proben als Beweis für eine lokale Antikörperbildung und somit als Beweis für die Ursache der Augenerkrankung (HARTMANN et al., 1991). Weitere Autoren sahen im Nachweis einer intraokularen Antikörperproduktion gegen einen bestimmten Erreger den Beweis für eine intraokulare Infektion (REMKY, 1961; WITMER, 1978; HARTMANN et al., 1991; BAARSMA et al., 1991; REMKY, 1998).

Folgende „Formel“ dient der Bestimmung der Herkunft von Antikörpern in intraokularen Flüssigkeiten: Als „Antikörper-Aktivität“ bezeichnete WITMER (1978) die Antikörperkonzentration im Verhältnis zum Gammaglobulin- oder Gesamtproteingehalt. Das Verhältnis aus der Antikörper-Aktivität im Kammerwasser zu der im Serum wurde als „Verhältnis der Antikörper-Aktivität“ definiert. Dieser Wert bleibt im Falle eines bloßen Durchtrittes der Immunglobuline durch die Blut-Augen-Schranke <1 , ein größerer Wert hingegen impliziert eine lokale Antikörperbildung. Nach Meinung einiger Autoren zeugt ein Antikörperkoeffizient >1 theoretisch von einer lokalen Produktion spezifischer Antikörper, ein Koeffizient >3 (GOLDMANN und WITMER, 1954; KIJLSTRA et al., 1990) bzw. >8 (LIGHTMAN und TOWLER, 1998; WOLLANKE, 2002) wurde als signifikant erachtet. Mit dem Zusammenbruch der Blut-Augen-Schranke während intraokularer Entzündungen können Antikörper passiv ins Auge diffundieren, was den intraokularen Gesamt-IgG-Gehalt erhöht und den Koeffizienten erniedrigt. Außerdem kann eine ähnliche Wirkung durch eine polyklonale Aktivierung verschiedener Antikörper erreicht werden (THURAU, 2003).

3 Material und Methoden

3.1 Pferde

Im Untersuchungszeitraum von Februar bis September 2008 wurden 72 Pferde als Patienten in die Studie einbezogen. Das Patientengut umfasst Tiere, die der Klinik für Pferde der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München mit dem Verdacht auf ERU zur Vitrektomie oder auch zur speziellen Augenuntersuchung vorgestellt wurden und bei denen anhand der klinischen Befunde die Diagnose „ERU“ mit Indikation zur Vitrektomie bestätigt werden konnte. Des Weiteren schließt es Patienten ein, bei denen nach einer positiven Kammerwasseruntersuchung auf Leptospiren-DNA und/oder -antikörper eine anschließende Vitrektomie durchgeführt wurde.

Als Kontrollpferde dienten 22 augengesunde Tiere (Tabelle 3.10 auf Seite 56), die aufgrund anderer schwerwiegender Erkrankungen in der Klinik euthanasiert werden mussten.

Das Alter der Augenpatienten betrug zwischen 2 und 15 Jahren und im Durchschnitt 7,8 Jahre ($7,78 \pm 3,54$ Jahre). Die Kontrollpferde waren 2 bis 32 Jahre und im Durchschnitt 13,0 Jahre alt ($12,95 \pm 6,79$ Jahre). Es waren 23 Stuten (Kontrollgruppe: 9), 43 Wallache (Kontrollgruppe: 11) und 6 Hengste (Kontrollgruppe: 2) verschiedener Farben, Rassen und Zuchtgebiete vertreten. Die Tiere stammten zum größten Teil aus Deutschland, einige kamen aus Österreich, der Schweiz oder Tschechien.

3.2 Vorbericht

Soweit nachvollziehbar wurde bei der Anamneseerhebung insbesondere die Gesamtdauer der Erkrankung, die Anzahl der aufgetretenen Uveitisschübe, die Lokalisation und der Schweregrad der Entzündungen sowie der Zeitpunkt des letzten Schubes festgehalten. War bereits im Vorfeld eine diagnostische Kammerwasserentnahme (Parazentese) durch den betreuenden Haustierarzt durchgeführt worden, wurden die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen auf Leptospiren und spezifische Antikörper ebenfalls notiert. Bei der Kontrollgruppe erfolgte soweit möglich anamnestisch der Ausschluss einer vorhergehenden Au-

generkrankung oder -reizung.

3.2.1 Einteilung der Pferdeaugen mit ERU anhand des Vorberichtes

Für einen Teil der statistischen Auswertung wurden die Augen der vorberichtlich unter ERU leidenden Pferde entsprechend der Anamnese (soweit bekannt) in die unter Tabelle 3.1 aufgelisteten Gruppen eingeteilt. Dabei wurden für jedes betroffene Pferdeauge die Gesamtdauer der Erkrankung, die Anzahl der beobachteten Uveitisschübe und der Zeitpunkt des letzten Schubes berücksichtigt.

Tab. 3.1: Schema zur Einteilung der Pferdeaugen mit ERU anhand des Vorberichtes für die statistische Auswertung unter Berücksichtigung der Gesamtdauer der Erkrankung, der Anzahl an beobachteten Uveitisschüben und des Zeitpunktes des letzten aufgetretenen Schubes

Gesamtdauer der Erkrankung	bis einschließlich 6 Monate
	über 6 Monate
Anzahl der Uveitisschübe	bis einschließlich 2 Schübe
	mehr als 2 Schübe
Zeitpunkt des letzten Schubes	vor maximal 0,5 Monaten
	vor mehr als 0,5 Monaten

3.3 Augenuntersuchung

Bereits beim Hereinführen des Pferdes in den ihm fremden Untersuchungsraum wurde das Verhalten und die Kopf-Hals-Haltung des Patienten beobachtet, um einen eventuellen Hinweis auf eine erhebliche Sehstörung zu erhalten. Zur Überprüfung der Sehfähigkeit kamen die in der Veterinärphthalmologie gebräuchlichen Tests, wie Auslösung des Drohreflexes, Lidschlussreaktion auf plötzlichen Lichteinfall und Auslösung des (konsensuellen) Pupillarreflexes zum Einsatz. Nach Adspektion der Augenumgebung, der Augenlider, des Augapfels, der Konjunktiven und Sklera erfolgte nach Abdunkelung der Umgebung eine Untersuchung der Hornhaut, vorderen Augenkammer, Iris und Linsenvorderfläche mit einer fokalen Lichtquelle. Hilfreich war hierbei in Zweifelsfällen die Zuhilfenahme von Spaltlicht und Kopfband-Lupe. Nach erforderlichenfalls Weitstellung der Pupille mit Tropicamid (Mydriaticum Stulln ®) wurden die Linsenrückfläche auch unter Zuhilfenahme der Spaltlampe, der Glaskörperraum und der Augenhintergrund mit einem direkten Ophthalmoskop inspiziert. Anschließend erfolgte in den Fällen, in denen eine vollständige Beurteilung des hinteren Augenabschnittes aufgrund von Transparenzverlusten der Medien (Hornhaut,

Kammerwasser, Linse oder Glaskörper) oder vollständiger Engstellung der Pupille nicht mehr ophthalmoskopisch möglich war, eine transpalpebrale ultrasonographische Untersuchung des Auges mit einem 7,5 MHz-Linearschallkopf. Abschließend wurde bei einigen Patienten der Augeninnendruck mittels elektronischem, lageunabhängigen Applanations-tonometer (Tono-Pen ® XL) nach Betäubung der Hornhaut mit dem Lokalanästhetikum Tetracain (Ophthocain®-N) gemessen. Die Augenuntersuchung zielte insbesondere auf die für die ERU typischen Veränderungen am Auge ab, wie sie in Tabelle 2.1 auf Seite 21 aufgelistet wurden.

In der Kontrollgruppe erfolgte eine sorgfältige Augenuntersuchung wenn möglich am lebenden Pferd, sonst unmittelbar nach Euthanasie der Tiere. Veränderungen am Auge, die als Symptome der ERU bekannt sind, führten zum Ausschluss der betroffenen Pferde.

3.3.1 Einteilung der Pferdeaugen mit ERU anhand der ophthalmologischen Befunde

Die Augen der unter ERU leidenden Pferde wurden für die statistische Auswertung hinsichtlich der Eindeutigkeit der ophthalmologischen Befunde im Sinne der ERU, der betroffenen Augen, des Schweregrades sowie der Lokalisation der Augenveränderungen in die unter Tabelle 3.2 gelisteten Gruppen unterteilt.

Tab. 3.2: Schema zur Einteilung der Pferdeaugen mit ERU anhand der ophthalmologischen Befunde für die statistische Auswertung unter Berücksichtigung der Eindeutigkeit des klinischen Bildes im Sinne der ERU, der betroffenen Augen, des Grades der Augenveränderungen sowie der Form der Uveitis

Eindeutigkeit des klinischen Bildes	eindeutig ERU
	nicht eindeutig ERU (aber positiver mikrobiologischer Untersuchungsbefund des KWs)
Betroffene Augen	beidseits (OU)
	einseitig links (OS)
	einseitig rechts (OD)
Grad der Augenveränderungen	keine Veränderungen
	geringgradig (Grad 1)
	mittelgradig (Grad 2)
	hochgradig (Grad 3)
Form der Uveitis	keine Angabe
	überwiegend vordere Uveitis
	überwiegend intermediäre/ hintere Uveitis
	Panuveitis

3.4 Probengewinnung und -weiterverarbeitung

3.4.1 Serumproben

Die Gewinnung der Serumproben von 44 augenkranken Pferden erfolgte bei der zur Narkoseeinleitung erforderlichen Implantierung eines Venenverweilkatheters (Vygonüle S ®) in die Vena jugularis externa mit Blutabflussüberprüfung vor Beginn der Vitrektomie. Dabei wurde das abtropfende Blut in einem Kunststoffröhrchen ohne Gerinnungshemmer (Fa. SARSTEDT) aufgefangen. Bei den als Kontrollgruppe dienenden augengesunden Pferden wurde unmittelbar nach der Euthanasie mit Pentobarbital-Na (Eutha ® 77) Blut aus der Vena jugularis externa genommen.

Nach Gerinnung und Zentrifugation der etwa 10 ml Vollblut wurde das Serum abpipettiert und in ein weiteres Kunststoffröhrchen für den Versand ans Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) in Oberschleißheim abgefüllt.

3.4.2 Glaskörperproben

80 Glaskörperproben von Pferden mit ERU wurden im Rahmen der durchgeführten Vitrektomien gewonnen. Über einen an das Operationsinstrument angeschlossenen 3-Wegehahn konnten zu Beginn der Operation vor Öffnung der Infusionsleitung unproblematisch 3–5 ml unverdünnter Glaskörper mit einer 5 ml-Spritze steril zu diagnostischen Zwecken entnommen werden. Bei euthanasierten Pferden erfolgte die Gewinnung des meist zähen Glaskörpermaterials unmittelbar post mortem mit einem großlumigen Venenverweilkatheter (Vygonüle S ®, 12G). Dieser wurde an der wenig durchbluteten Stelle des Zuganges für die Pars-plana-Vitrektomie etwa 14 mm dorsal des Limbus ins Augeninnere eingebracht und das Glaskörpermaterial durch Absaugen mit einer 5 ml-Spritze entnommen.

Das gewonnene Material der Patienten wurde unmittelbar nach Abschluss der Vitrektomie zunächst makroskopisch beurteilt und der Grad der diffusen Glaskörpertrübung sowie der entzündlichen Einlagerungen notiert (Tabelle 3.3).

Tab. 3.3: Schema zur Einteilung der Pferdeaugen mit ERU anhand der makroskopischen Glaskörperveränderungen für die statistische Auswertung unter Berücksichtigung des Grades der diffusen Glaskörpertrübung sowie des Grades der (entzündlichen) Glaskörpereinlagerungen

Grad der diffusen GK-Trübung	keine Trübung
	geringgradig (Grad 1)
	mittelgradig (Grad 2)
	hochgradig (Grad 3)
Grad der GK-Einlagerungen	keine Einlagerungen
	geringgradig (Grad 1)
	mittelgradig (Grad 2)
	hochgradig (Grad 3)

Anschließend wurde ein Teil des unverdünnt gewonnenen Glaskörpermaterials unter ebenfalls sterilen Bedingungen in zwei Ansätzen von 0,5 ml und 1 ml auf Transportmedien (8 ml) für eine anschließende Kultivierung am LGL verimpft. Beim Grundnährboden der Transportmedien handelte es sich um ein EMJH-Medium mit bovinem Serum-Albumin (BSA) Tween80/40 „Enrichment“ sowie 100 µg/ml 5-Fluorouracil. Das übrige Probenmaterial wurde für die immunologischen Tests in sterile Plastikgefäße umgefüllt bzw. für die PCR in der zur Entnahme verwendeten sterilen Spritze belassen und ebenso steril verschlossen. Der Versand ins Untersuchungslabor des LGL erfolgte am Tag der Probennahme.

3.4.3 Kammerwasserproben

Im Rahmen der Studie wurden 73 Kammerwasserproben untersucht (siehe Tabelle 3.4). 42 Proben gehörten zu den augengesunden Pferden der Kontrollgruppe. 16 Mal wurde Kammerwasser auf Besitzerwunsch aus dem gesunden Auge von ERU-Patienten während der zur Vitrektomie am erkrankten Auge erforderlichen Allgemeinnarkose entnommen. Zwei Proben wurden im Rahmen einer vor Durchführung der Vitrektomie unerlässlichen Syn-echiolyse gewonnen, da zur besseren Stabilisierung der vorderen Augenkammer Kammerwasser durch Hyaluronsäure ersetzt werden musste. Elf weitere Pferde erhielten aufgrund fehlender eindeutiger Augenbefunde eine diagnostische Parazentese, um über eine Indikation zur Vitrektomie zu entscheiden ¹.

¹Zu beachten gilt hier allerdings, dass nur solche Pferde mit fraglicher ERU an der Studie teilnahmen, die aufgrund positiver mikrobiologischer Untersuchungsbefunde des Kammerwassers im Anschluss einer Vitrektomie unterzogen wurden. Weit mehr Pferde erhielten im Untersuchungszeitraum eine diagnostische Parazentese, wurden aber aufgrund eines negativen Untersuchungsergebnisses auf Leptospirenbeteiligung nicht berücksichtigt.

Tab. 3.4: Übersicht über die Gruppen der Pferde, bei denen Kammerwasserproben auf Leptospirenantikörper sowie Leptospiren-DNA untersucht wurden ($n_{\text{Gesamt}}=71$)

Gruppe der Pferde	$n_{\text{KW-Proben}}$
augengesunde Kontrolltiere mit Parazentese post mortem	42
Parazentese am anderen, gesunden Auge von Pferden mit einseitiger ERU	16
KW-Entnahme während der Synechiolyse bei Pferden mit klinisch eindeutiger ERU	2
Parazentese bei Pferden mit fraglichen ophthalmologischen Befunden und mindestens einem positiven Testergebnis auf Leptospirenbeteiligung	11

Bei den Patienten wurden während einer Kurznarkose jeweils 0,5–1 ml Kammerwasser mit einer 2 ml-Spritze abgesaugt. Von den ophthalmologisch gesunden Kontrolltieren wurde Kammerwasser durch Punktion der vorderen Augenkammer mittels limbalen Parazentese und Tunnelstich durch die Hornhaut mit einer 27G dicken Kanüle unmittelbar nach der Euthanasie gewonnen.

Für die Antikörpernachweise wurde ein Teil der Probenflüssigkeit abermals in sterile Kunststoffgefäße umgefüllt und ans LGL verschickt. Das Material für die PCR verblieb in den Spritzen, wurde steril verschlossen und an das VetMedLabor in Ludwigsburg versandt. Bei einem Pferd wurde eine Kultur eingeleitet, wie bereits für die Glaskörperproben beschrieben.

3.5 Mikrobiologische Untersuchungen auf Leptospiren

Die Seren, Glaskörper- und Kammerwasserproben wurden mittels MAR und ELISA auf Leptospirenantikörper und in der Kultur und PCR (nur intraokulares Probenmaterial) direkt auf Leptospiren untersucht. Die serologischen Testverfahren, einen Großteil der PCR-Untersuchungen sowie die kulturellen Isolierungen führte das Leptospirenlabor des Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Oberschleißheim durch (SAL-akkreditiertes Prüflaboratorium, Reg.-Nr.: SAL-BY-L20-04-03). Eine detaillierte Beschreibung der dort etablierten Untersuchungstechniken findet sich bei BREM et al. (1988a), BREM und SCHREYER (1988b), KETTNER (1997), GESELL (2004) und ROCZEK (2008). Einige der PCR-Untersuchungen (Kammerwasser) erfolgten im VetMedLabor in Ludwigsburg.

3.5.1 Mikroagglutinationsreaktion

Gewonnenes Serum sowie Glaskörper- und Kammerwasserproben wurden am Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit mittels MAR auf Leptospirenantikörper untersucht. Die Untersuchung erfolgte nach den Richtlinien des O.I.E. (Office international des épizooties) und der DGHM (Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie) (OIE, 2008; DGHM, 1984). Folgende Leptospirenservare fanden als Lebendantigene Verwendung: *Bratislava*, *Canicola*, *Copenhageni*, *Grippotyphosa*, *Hardjo*, *Icterohaemorrhagiae*, *Javanica*, *Pomona*, *Pyrogenes*, *Saxkoebing*, *Sejroe* und *Tarassovi*. Titer ab 1:100 wurden als spezifisch gewertet. Es wurde die höchste gemessene Titerstufe in die Ergebnisse einbezogen. Waren bei einer Probe Antikörper gegen mehrere Serovare mit gleicher Titerhöhe nachweisbar, so gingen diese bei der Bewertung der Häufigkeit des Auftretens eines Serovars zu gleichen Teilen mit ein.

Umrechnung der Antikörpertiter in ganze Zahlen Um eine statistische Auswertung der Ergebnisse zu vereinfachen, wurden die Antikörpertiter wie in Tabelle 3.5 aufgelistet logarithmisch in ganze Zahlen umgewandelt.

Die Formel $GanzeZahlZ = \log_2(1/(AK - Titer * 100))$ lag hierbei zugrunde.

Tab. 3.5: Antikörpertiter (AK-Titer) in der MAR und nach logarithmischer Umrechnung entsprechende ganze Zahlen für die statistische Auswertung

AK-Titer	ganze Zahl
<1:100	-1
1:100	0
1:200	1
1:400	2
1:800	3
1:1600	4
1:3200	5
usw.	usw.

3.5.2 Enzyme linked immunosorbent assay

Der Antikörpernachweis in Serum und intraokularen Proben erfolgte nach dem von KETTNER (1997) entwickelten Verfahren mit Leptospiren-Vollantigenen. Die verwendete indirekte ELISA-Technik ermöglicht eine sowohl qualitative als auch quantitative Aufzeichnung der

Immunantwort, da die einzelnen Immunglobulinklassen IgM, IgG und IgA getrennt nachgewiesen werden und verschiedene Werte annehmen können. So kann eine Probe in Abhängigkeit von ihrer mittels Photometer (Wellenlänge 405 nm) ermittelten optischen Dichte im ELISA negativ (-), grenzwertig (0), schwach positiv (+), positiv (++) oder stark positiv (+++) reagieren (Tabelle 3.6). Für die statistische Auswertung wurde ein grenzwertiges Ergebnis als negativ bewertet.

Tab. 3.6: Mögliche ELISA-Resultate entsprechend der Werte der photometrisch ermittelten optischen Dichte („-“=negativ, „0“=grenzwertig, „+“=schwach positiv, „++“=positiv, „+++“=stark positiv)

Wertbereich optische Dichte	ELISA-Resultat
<250	-
250–300	0
301–500	+
501–1000	++
>1000	+++

Die Wahl der Serovare bei der Untersuchung der Proben mittels ELISA-Technik orientierte sich an den positiven Resultaten aus der MAR sowie an der geographischen Herkunft des Tieres. Es kamen eine bis vier unterschiedliche Serovare je Probe zum Einsatz. Konnten in der zuvor durchgeführten MAR keine Leptospirenantikörper nachgewiesen werden, erfolgte die ELISA-Untersuchung mit einem *Grippotyphosa*- und einem *Bratislava*-Antigen. Zur Anwendung kamen die Serovare *Bratislava*, *Canicola*, *Copenhageni*, *Grippotyphosa*, *Icterohaemorrhagiae* und *Pomona*. Für eine Vereinfachung der statistischen Auswertung der Quantität der humoralen Immunantwort sowie eine Vergleichbarkeit der Resultate unterschiedlicher Patienten wurde auf eine Unterteilung der ELISA-Ergebnisse in die einzelnen Serovare verzichtet. Anstattdessen ging für jedes Immunglobulin lediglich die höchste gemessene Extinktion in die Auswertung ein.

Codierung der ELISA-Ergebnisse für die statistische Auswertung Um die qualitative Beurteilung der mittels ELISA gemessenen Immunantwort der Pferde auf die Leptospireninfektion mittels statistischer Methoden zu vereinfachen, wurde für die $2^3 = 8$ denkbaren Kombinationen aus positiven und negativen Untersuchungsergebnissen der drei Immunglobulinklassen folgende Codierung in Form ganzer Zahlen verwendet (siehe Tabelle 3.7):

Tab. 3.7: Codierung der Kombinationsmöglichkeiten für positive und negative Ergebnisse der einzelnen Immunglobulinklassen (IgM, IgG, IgA) im ELISA auf Leptospiren-antikörper („-“=negativ, „+“=positiv)

Code	ELISA-Resultat
0	IgM- IgG- IgA-
1	IgM+ IgG- IgA-
2	IgM- IgG+ IgA-
3	IgM- IgG- IgA+
4	IgM+ IgG+ IgA-
5	IgM+ IgG- IgA+
6	IgM- IgG+ IgA+
7	IgM+ IgG+ IgA+

3.5.3 Polymerasekettenreaktion

29 Kammerwasserproben von ERU-Patienten wurden am VetMedLabor in Ludwigsburg mittels PCR auf Leptospiren-DNA untersucht. Die Untersuchungstechnik wurde anhand der Veröffentlichungen von MERIEN und Mitarbeitern entwickelt und basiert auf der Erkennung einer 16S-rDNA Gensequenz von *Leptospira interrogans* (MERIEN et al., 1992, 1995). Eine Unterscheidung der Leptospirensereovare ist nicht möglich. Am LGL wurden 79 Glaskörperproben² von Patienten sowie die 42 Proben aus der Kontrollgruppe und 44 Kammerwasserproben mittels quantitativer „real-time“ PCR untersucht. Zielsequenz stellte das LipL32 Gen pathogener Leptospiren dar. Die Methode wurde von ROCZEK (2008) etabliert. Positiv- und Negativkontrollen wurden mituntersucht.

3.5.4 Kultur

Die steril verimpften Glaskörperproben (und eine Kammerwasserprobe) erreichten das Labor bei Raumtemperatur und wurden am Tag ihrer Ankunft subkultiviert. Aliquots (0,5 ml) der Proben in ihren Transportmedien wurden in ein Rinderalbumin-Tween-Medium ohne Hemmstoffzusatz oder unter Zusatz von 100 µg/ml 5-Fluorouracil oder 10 µg/ml 5-Fluorouracil und 10 µg/ml Vancomycin verimpft. Die Kultivierung erfolgte bei 29 °C. Die Ansätze wurden anfänglich alle zwei, später im Abstand von vier Wochen, über einen Zeitraum von sechs Monaten unter dem Dunkelfeldmikroskop auf Leptospirenwachstum untersucht. Bei positivem Kulturergebnis erfolgte eine Typisierung der Isolate mit spezifischen Antiseren. Als Antikörper standen folgende Serogruppen zur Verfügung: *Australis*, *Gripotyphosa*, *Hardjo*, *Javanica*, *Pomona* und *Sejroe*. Eine Isolierung der Leptospiren wurde

²bei einem Pferd war nicht ausreichend Material zur Durchführung vorhanden

ausschließlich aus intraokularem Material von ERU-Patienten versucht, da frühere Untersuchungen gezeigt hatten, dass der Erreger aus Proben gesunder Pferdeaugen nicht angezüchtet werden kann (WOLLANKE, 2002; GESELL, 2004).

3.6 Untersuchung intraokularer Proben mittels ELISA-Technik in den Jahren 2005–2007 (retrospektiv)

Von Januar 2005 bis Dezember 2007 fiel bei 258 intraokularen Proben von Pferden mit Augenveränderungen, die bei diagnostischen und therapeutischen operativen Eingriffen (Vitrektomie, Parazentese, Synechiolyse, Bulbusexstirpation) gewonnen und anschließend mikrobiologisch untersucht wurden, das MAR-Resultat negativ aus. Daraufhin wurde das Kammerwasser oder Glaskörpermaterial im Anschluss einer Untersuchung mittels ELISA-Technik auf leptospirenspezifische IgM-, IgG- und IgA-Antikörper der Serovare *Grippotyphosa* und *Bratislava* unterzogen. Diese Untersuchungen wurden ebenfalls am LGL durchgeführt. Bei dem untersuchten Material handelte es sich um 109 Glaskörper- und 149 Kammerwasserproben.

3.7 Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS für Windows Version 16.0. OpenOfficeCalc wurde zur graphischen Darstellung der Ergebnisse in Diagrammen verwendet. Tabellen wurden mittels TeX/LaTeX erstellt.

Der Artikel „Methoden der Diagnoseevaluierung“ von RICHTER und LANGE diente als Grundlage für die Berechnung von Sensitivität und Spezifität sowie der prädiktiven Werte (RICHTER und LANGE, 1997).

Um Abhängigkeiten und statistische Zusammenhänge zwischen den Variablen von Vorbericht, Klinik und Laborergebnissen zu erkennen, erfolgte eine Berechnung des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman (ρ) bei ordinalskalierten Merkmalen. Bei nominalskalierten bzw. dichotomen Variablen wurden der Chi-Quadrat-Koeffizient nach Pearson und der Kontingenzkoeffizient C berechnet. Bei einer Vierfeldertafel oder einer Kreuztabelle, in der über 20% der Zellen eine erwartete Häufigkeit <5 aufwies, wurde der exakte Test nach Fisher angewandt. Als Nullhypothese H_0 wurde die Unabhängigkeit zweier getesteter Variablen definiert. Für ρ bzw. C wurden die in Tabelle 3.8 definierten Wertbereiche für die Interpretation der Stärke einer Korrelation zugrunde gelegt.

Tab. 3.8: Festlegung der Wertbereiche für ρ (Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman) bzw. C (Kontingenzkoeffizient) zur Interpretation der Stärke einer Korrelation

Wertbereich für ρ bzw. C	Korrelation
$0,2 < \rho$ bzw. $C \leq 0,4$	schwache Korrelation
$0,4 < \rho$ bzw. $C \leq 0,6$	moderate Korrelation
$0,6 < \rho$ bzw. $C \leq 0,8$	starke Korrelation
$0,8 < \rho$ bzw. $C \leq 1,0$	sehr starke Korrelation

Eine Überprüfung auf Übereinstimmung der verschiedenen Labortests (MAR, ELISA, PCR, Kultur) hinsichtlich positiver oder negativer Ergebnisse erfolgte mittels Cohens Kappa. LANDIS und Mitarbeiter schlugen dabei folgende Bewertung vor: $\kappa < 0$: „schlechte Übereinstimmung“; $\kappa 0-0,20$: „schwache Übereinstimmung“; $\kappa 0,21-0,40$: „ausreichende Übereinstimmung“; $\kappa 0,41-0,60$: „moderate Übereinstimmung“; $\kappa 0,61-0,80$: „weitgehende Übereinstimmung“; $\kappa 0,81-1,00$: „(fast) vollständige Übereinstimmung“ (LANDIS und KOCH, 1977).

Als Signifikanztests für einen Vergleich der Laborergebnisse von Patienten und Kontrollieren fanden der Mann-Whitney-Test bei ordinalskalierten Variablen und bei nominalskalierten sowie dichotomen Variablen die Chi-Quadrat-Tests Verwendung. Vorab wurde die Nullhypothese H_0 „Die beiden Gruppen unterscheiden sich nicht hinsichtlich ihrer Laborergebnisse.“ formuliert. Analog wurden die Gruppen, in die die Patienten für eine Vereinfachung der Beurteilung ihres Vorberichtes eingeteilt worden waren, auf jeweils signifikante Unterschiede untersucht. Als Nullhypothese H_0 lag folgende Aussage zugrunde: „Die jeweiligen Gruppen unterscheiden sich nicht hinsichtlich der Laborergebnisse.“ Folgende Signifikanzniveaus wurden für zweiseitige Testverfahren festgelegt (Tabelle 3.9). Es wurde stets die exakte Signifikanz für die Bewertung herangezogen.

Tab. 3.9: Festlegung der Signifikanzniveaus für zweiseitige statistische Tests (p =Wahrscheinlichkeit)

Wertbereich für p	Signifikanz
$p > 0,05$	nicht signifikant
$p < 0,05$	signifikant
$p < 0,01$	hochsignifikant
$p < 0,001$	höchstsignifikant

Ein Teil der statistischen Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Sta-

tistik der LMU München (Leitung: Prof. Helmut Küchenhoff, Durchführung: Monia Mahling, studentische Hilfskraft).

Tab. 3.10: Übersicht über die augengesunden Pferde der Kontrollgruppe, die aufgrund schwerwiegender Erkrankungen euthanasiert werden mussten (n=22)

Nr.	Alter	Rasse/ Pferdety	Geschlecht	Grund der Euthanasie
1	18 J.	Wbl.	Stute	V.a. mediastinales Lymphom
2	16 J.	Lusitano	Wallach	malignes Lymphom
3	10 J.	Friese	Hengst	Rektumruptur, chron. Magendilatation
4	21 J.	Wbl.	Wallach	hgr. LH, Osteomyelitis Hufbein
5	5 J.	Pony	Stute	Sklerodermie ventrales Abdomen, hgr. Schmerzen
6	8 J.	Wbl.	Wallach	hgr. LH 3 Gliedmaßen
7	15 J.	Vollbl.	Wallach	chron. Niereninsuffizienz
8	15 J.	Wbl.	Wallach	hgr. LH 2 Gliedmaßen
9	12 J.	Wbl.	Wallach	kopfgroßer Harnblasenstein, inoperabel
10	4 J.	Traber	Hengst	Nierenkolik, akute Niereninsuffizienz
11	22 J.	Wbl.	Stute	zentralnervöse Störungen
12	11 J.	Wbl.	Wallach	spinale Ataxie
13	13 J.	Haf.	Stute	V.a. Tetanus
14	12 J.	Traber	Stute	V.a. Borna
15	7 J.	Vollbl.	Stute	Aggression, Wesensveränderungen
16	12 J.	Wbl.	Wallach	Kardiomegalie, Herzinsuffizienz
17	2 J.	Traber	Stute	V.a. Borna
18	5 J.	Wbl.	Wallach	V.a. Borna
19	15 J.	Wbl.	Wallach	retrobulbärer Tumor
20	14 J.	Wbl.	Wallach	V.a. malignes Lymphom
21	32 J.	Isl.	Stute	chron. Niereninsuffizienz
22	16 J.	Wbl.	Stute	V.a. Tumor der Nasenmuscheln

4 Ergebnisse

4.1 Vorbericht

Die 80 erfassten Augen von 72 Patienten mit ERU waren zum Zeitpunkt der Einlieferung in die Klinik für Pferde im Mittel - soweit bekannt - seit 15 Monaten ($\bar{x}=15,16$; $s=23,02$; $\tilde{x}=6$) erkrankt. Die kürzeste Krankheitsdauer betrug zwei Wochen. Ein Pferd litt bereits seit zehn Jahren unter Uveitisschüben.

Die Anzahl der beobachteten akuten Schübe lag zwischen einem und 40 und im Durchschnitt bei 3,5 ($\bar{x}=3,5147$; $s=5,2105$; $\tilde{x}=2$).

40% der Pferdeaugen wurden direkt im Anschluss an einen abgelaufenen Uveitisschub einer Untersuchung unterzogen und innerhalb von weniger als zwei Wochen nach Abklingen der akuten klinischen Symptome operiert. Der längste zeitliche Abstand der Operation zu einer akuten Episode betrug 12 Monate und betraf lediglich einen Patienten.

4.2 Augenuntersuchung

Von den 80 wegen Uveitis untersuchten Pferdeaugen sprachen bei 66 (82,5%) die ophthalmologischen Veränderungen zum Zeitpunkt der Untersuchung eindeutig für das Vorliegen einer ERU. Bei 14 Augen (17,5%) waren die Befunde zweifelhaft, ein Befall des Auges mit Leptospiren wurde aber in einer Kammerwasseruntersuchung bestätigt.

In 29 Fällen (40%) war das rechte, bei 25 Pferden (35%) das linke und 18 Mal (25%) waren beide Augen betroffen. Es wurden jedoch nicht zwangsläufig beide Augen einer Operation unterzogen.

Unter den Augen mit ERU waren 12,5% (10/80) von einer vorwiegend vorderen, 32,5% (33/80) von einer überwiegend intermediären oder hinteren und 47,5% (38/80) von einer Panuveitis betroffen. Bei 7,5% (6/80) konnte aufgrund fehlender typischer Augenveränderungen keine Einteilung vorgenommen werden.

Der Grad der Uveitis wurde bei 44 Augen (55%) als geringgradig, bei 20 Augen (25%) als mittelgradig und in 12 Fällen (15%) als hochgradig beurteilt. Vier Augen (5%) waren klinisch ohne besonderen Befund. Von diesen vier ophthalmoskopisch unauffälligen Augen gehörten drei zu Pferden, bei denen lediglich auf Besitzerwunsch eine Parazentese mit anschließend positiver mikrobiologischer Untersuchung des Kammerwassers durchgeführt wurde und die aufgrunddessen auch eine Glaskörperoperation erhielten. Ein Auge wurde im Anschluss an einen einzigen abgelaufenen Uveitisschub, der konsequent medikamentös therapiert worden war, vitrektomiert und wies daher noch keinerlei bleibende Veränderungen auf.

4.3 Makroskopische Beurteilung der Glaskörperproben

Die diffuse Trübung des zu Beginn der Vitrektomie gewonnenen, unverdünnten Glaskörpermaterials wurde bei 17 (21%) der insgesamt 80 Proben als geringgradig, bei 20 Proben (25%) als mittelgradig und bei neun Proben (11%) als hochgradig eingestuft. 34 Proben (43%) waren makroskopisch klar. In 24 Fällen (30%) waren die darin befindlichen (entzündlichen) Einlagerungen geringgradig, in 21 Fällen (26%) mittelgradig und in 16 Fällen (20%) hochgradig. 19 Proben (24%) wiesen keinerlei Einlagerungen auf.

4.4 Leptospirennachweise

4.4.1 Antikörper gegen Leptospiren in Serumproben von Pferden mit ERU und augengesunden Tieren

Antikörpertiter in Serumproben

Ohne Berücksichtigung der Titerhöhe reagierten die Serumproben augengesunder Tiere (12/22, 55%) in der MAR annähernd ebenso häufig positiv wie die an ERU erkrankter Pferde (30/44, 68%) (Abbildung 4.1). Die Anwendung der Chi-Quadrat-Tests lieferte auch keinen signifikanten Unterschied. Ebenso bestand beim Vergleich der Höhe der Antikörpertiter gegen Leptospiren kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen, obgleich die Seren kranker Pferde beim Vergleich der mittleren Ränge im Mann-Whitney-Test geringfügig höhere Titer aufwiesen. Sowohl unter den an ERU erkrankten als auch den augengesunden Pferden reagierten die meisten Seren bis zu einer Verdünnung von 1:200. Der höchste Titer lag bei 1:800 und konnte bei sieben Seren erkrankter Tiere festgestellt werden.

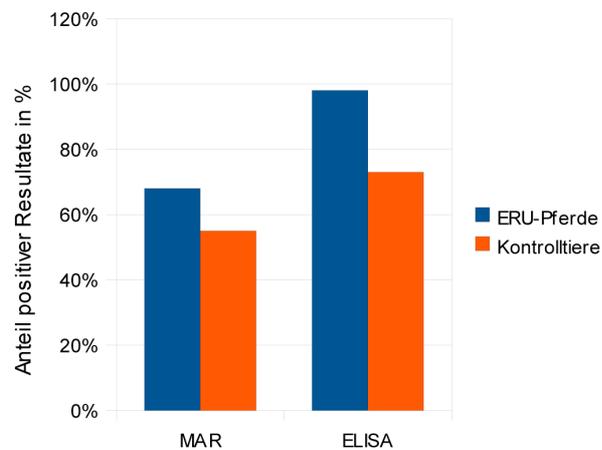


Abb. 4.1: Nachweis von Leptospirenantikörpern in Serumproben von Pferden mit ERU (n=44) und augengesunden Kontrolltieren (n=22) mittels MAR und ELISA

Antikörper gegen die einzelnen Leptospirenserovare in Serumproben

Von insgesamt 66 untersuchten Serumproben waren bei den 42 positiven Ansätzen 22 Mal Antikörper gegen die Serovar *Grippityphosa* mit dem höchsten Titer nachweisbar. Auffallend war, dass es sich dabei 21 Mal um Seren an ERU erkrankter Pferde handelte. Auch reagierte *Grippityphosa* am häufigsten mit dem gemessenen Höchstititer von 1:800 (6/7). Bei den augengesunden Tieren war die Serovar *Canicola* am häufigsten (5/22) in der höchsten Verdünnung detektierbar.

Antikörpernachweis in Serumproben mittels ELISA-Technik

73% der Serumproben augengesunder und 98% der Seren ERU-kranker Pferde lieferten im ELISA positive Ergebnisse. Diese Differenz war hochsignifikant (Exakter Test nach Fisher, $p=0,004$) (Abbildung 4.1). Von den auf Antikörper gegen die Serovar *Grippityphosa* untersuchten Ansätzen aller Pferde reagierten 83% (44/53) positiv. Bei der Serovar *Bratislava* waren dies 78% (39/50). 49 Seren wurden sowohl auf die Serovar *Grippityphosa* als auch auf *Bratislava* getestet, wovon 67% (33/49) nachweisbare Antikörper beider Serovare enthielten.

Nachweis der verschiedenen Immunglobulinklassen in Serumproben

Von den Serumproben ERU-kranker Pferde war bei 82% der Nachweis von spezifischem IgM, bei 89% der Nachweis von IgG und bei 61% der von IgA mittels ELISA erfolgreich. Die Ansätze der Kontrollgruppe lieferten folgende Prozentzahlen: IgM: 73% positiv, IgG:

18% positiv und IgA: 36% positiv (Tabelle 4.1). Der beobachtete Unterschied war jedoch nur für den Nachweis von IgG signifikant (Exakter Test nach Fisher, $p < 0,001$).

Tab. 4.1: Nachweis von Leptospirenantikörpern der verschiedenen Klassen (IgM, IgG und IgA) in Serumproben von Pferden mit ERU (n=44) und augengesunden Kontrolltieren (n=22) mittels ELISA: Anteil positiver Resultate in %

Labortest	ERU-Pferde	Kontrolltiere
IgM-ELISA	82%	73%
IgG-ELISA	89%	18%
IgA-ELISA	61%	36%

Bei Betrachtung der acht möglichen Kombinationen positiver und negativer Ergebnisse für den Nachweis der einzelnen Immunglobulinklassen gegen Leptospiren¹ fiel auf, dass 55% der Seren von Pferden mit ERU spezifische Antikörper aller drei Klassen aufwiesen, von den Kontrolltieren hingegen kein einziges. Die Anwendung des Exakten Tests nach Fisher bestätigte den höchstsignifikanten Unterschied der beiden Gruppen bezüglich ihres ELISA-Profiles im Serum ($p < 0,001$). Abbildung 4.2 veranschaulicht die qualitativen Unterschiede im Nachweis von Leptospirenantikörpern im Serum von Pferden mit und ohne ERU mittels ELISA-Technik.

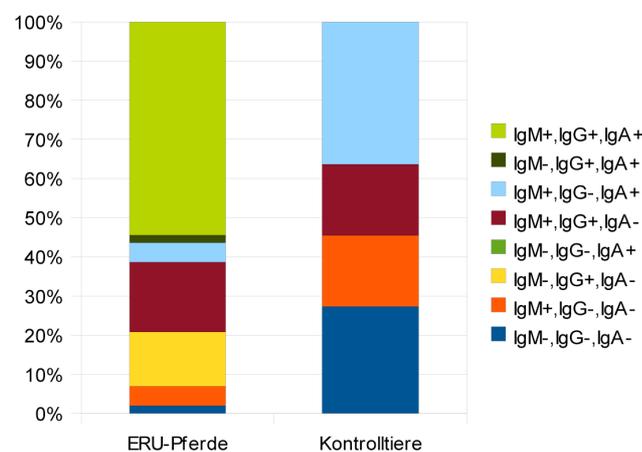


Abb. 4.2: ELISA-Profil: Qualitative Unterschiede im Nachweis von Leptospirenantikörpern der verschiedenen Klassen (IgM, IgG, IgA) im Serum von Pferden mit ERU (n=44) und augengesunden Kontrolltieren (n=22) mittels ELISA („-“=negativ, „+“=positiv)

¹Anwendung des ELISA-Codes Tabelle 3.7 Seite 52

Bei der quantitativen Beurteilung der mittels ELISA gemessenen Antikörperproduktion war für IgG ein höchstsignifikanter Unterschied ($p < 0,001$) zwischen den Patienten und Kontrolltieren erkennbar. Unter den ERU-Pferden war die durch IgG vermittelte Immunantwort deutlich stärker als unter den gesunden Tieren (Vergleich der mittleren Ränge im Mann-Whitney-Test). Auch für IgM und IgA wurden bei den erkrankten Tieren höhere mittlere Ränge berechnet. Deren Werte waren jedoch nicht signifikant größer als die der Kontrollgruppe.

4.4.2 Antikörper gegen Leptospiren in Glaskörperproben von Pferden mit ERU und augengesunden Tieren

Antikörpertiter in Glaskörperproben

In der MAR reagierten 78% (62/80) der Glaskörperproben ERU-kranker und 10% (4/42) der augengesunder Pferde positiv, was einen höchstsignifikanten Unterschied darstellte (Exakter Test nach Fisher, $p < 0,001$) (Abbildung 4.3). Bei den unter ERU leidenden Tieren wurde am häufigsten ein Titer von 1:800 erreicht. Der Median lag bei 1:400, und der höchste Titer war 1:102400. Die vier positiven Ansätze der Kontrolltiere wiesen alle einen Antikörpertiter von 1:100 auf und gehörten zu drei unterschiedlichen Pferden. Für die Glaskörperproben der Patienten wurde auch in der Titerhöhe ein höchstsignifikanter Unterschied zur Gruppe augengesunder Tiere festgestellt (Mann-Whitney-Test, $p < 0,001$).

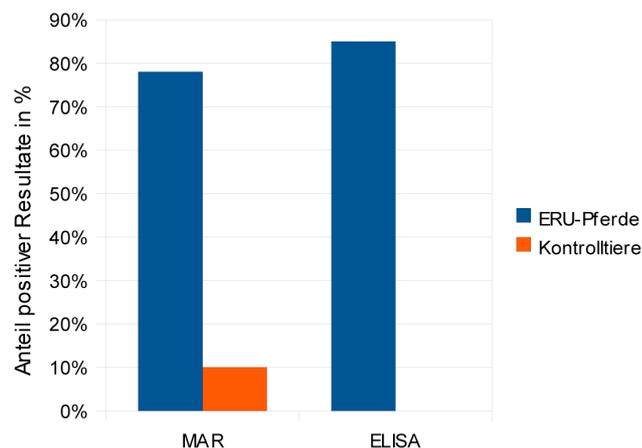


Abb. 4.3: Nachweis von Leptospirenantikörpern in Glaskörperproben von Pferden mit ERU (n=80) und augengesunden Kontrolltieren (n=42) mittels MAR und ELISA

Antikörper gegen die einzelnen Leptospirenservare in Glaskörperproben

Wie bereits bei den Serumproben waren mit 80% (50/71) unter den ERU-Patienten auch im Glaskörper am häufigsten Antikörper gegen die Serovar *Grippotyphosa* nachweisbar. Am zweithäufigsten reagierten die Proben gegen *Leptospira interrogans* Serovar *bratislava* (8/71). Bei den Kontrollpferden waren in drei Ansätzen Antikörper gegen *Grippotyphosa* und ein Mal gegen *Canicola* detektierbar.

Antikörpernachweis in Glaskörperproben mittels ELISA-Technik

In 85% (68/80) der Glaskörperproben ERU-kranker und in keiner Glaskörperprobe augengesunder Pferde konnten Leptospirenantikörper mittels ELISA-Technik nachgewiesen werden (Abbildung 4.3). Der Unterschied war höchstsignifikant (Exakter Test nach Fisher, $p < 0,001$). 82% (61/74) der auf *Leptospira kirschneri* Serovar *grippotyphosa* untersuchten Ansätze unter den ERU-Patienten reagierten positiv, bei der Serovar *Bratislava* waren dies 69% (37/54). 49 Glaskörperproben wurden sowohl auf die Serovar *Grippotyphosa* als auch auf *Bratislava* getestet, wovon 65% (32/49) nachweisbare Antikörper beider Serovare enthielten.

Nachweis der verschiedenen Immunglobulinklassen im Glaskörper von ERU-kranken Pferden

Die Untersuchung auf Leptospirenantikörper der Immunglobulinklasse M war bei 34% (27/80) der Glaskörperproben von ERU-Pferden positiv. Bei IgG waren es 74% (59/80) und bei IgA 84% (67/80). Immunglobuline des Isotyps A waren mit 11% am häufigsten die alleinig nachweisbare Immunglobulinklasse (9/80). IgG war bei einem Ansatz alleinig nachweisbar. 39% der Proben (31/80) enthielten detektierbare Immunglobuline der Klassen G und A und 34% (27/80) aller drei Typen. Abbildung 4.4 zeigt die Unterschiede der mittels ELISA-Technik untersuchten Glaskörperproben von Pferden mit ERU hinsichtlich der Qualität der lokalen humoralen Immunantwort gegen Leptospiren².

²Anwendung des ELISA-Codes Tabelle 3.7 Seite 52

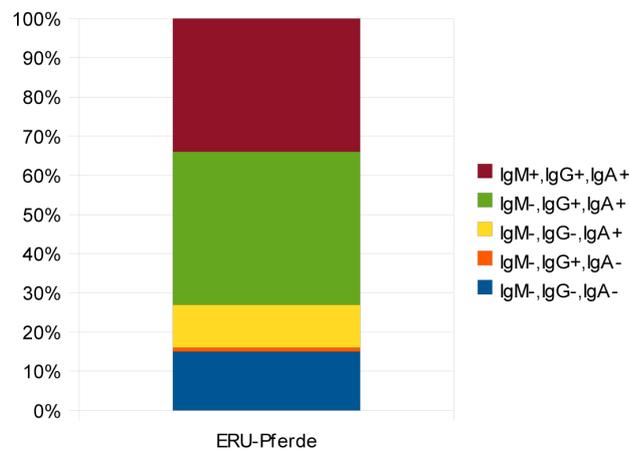


Abb. 4.4: ELISA-Profil: Kombinationen positiver und negativer Testergebnisse für den Nachweis von IgM, IgG und IgA gegen Leptospiren im Glaskörper von Pferden mit ERU mittels ELISA (n=80) („-“=negativ, „+“=positiv)

4.4.3 PCR-Nachweis von Leptospiren in Glaskörperproben von Pferden mit ERU und augengesunden Tieren

In 61% (48/79) der Glaskörperproben ERU-kranker Pferde und in keinem Ansatz der Kontrollgruppe wurde Leptospiren-DNA mittels PCR detektiert (Abbildung 4.5). Die Anwendung des Exakten Tests nach Fisher bestätigte den höchstsignifikanten Unterschied ($p < 0,001$).

4.4.4 Kulturelle Isolierung von Leptospiren aus Glaskörpermaterial von Pferden mit ERU

Die Isolierung lebender Leptospiren aus dem Glaskörpermaterial unter ERU leidender Tiere gelang in 22,5% der Fälle (7/31). Die angezüchteten Leptospiren konnten der Serogruppe *Grippotyphosa* zugeordnet werden.

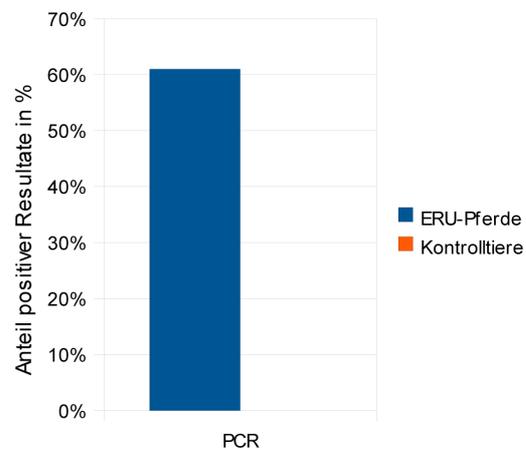


Abb. 4.5: Nachweis von Leptospiren-DNA in Glaskörperproben von Pferden mit ERU (n=79) und augengesunden Kontrolltieren (n=42) mittels PCR

4.4.5 Antikörper gegen Leptospiren im Kammerwasser von Pferden mit ERU und augengesunden Tieren

Bei keinem Pferd aus der Kontrollgruppe waren im Kammerwasser Antikörper gegen Leptospiren mittels MAR oder ELISA detektierbar. Von den 16 klinisch unauffälligen Augen der Pferde, die am anderen Auge wegen ERU eine Glaskörperoperation und auf Besitzerwunsch am gesunden Auge eine Parazentese erhalten hatten, reagierten drei (19%) sowohl in der MAR als auch im ELISA positiv. Dabei wurden nur Antikörper gegen die Serovar *Grippotyphosa* nachgewiesen. Die in der MAR ermittelten Titer lagen bei 1:100, 1:200 und 1:400. Im ELISA waren keine Antikörper der Klasse IgM, zwei Mal IgG- und drei Mal - und somit in allen Ansätzen - IgA-Antikörper nachweisbar. Zwei Proben enthielten sowohl IgG- als auch IgA-Antikörper gegen Leptospiren. Die drei betroffenen Pferde wurden einige Tage darauf auch an diesem Auge vitrektomiert, da die Besitzer ihren Tieren einen ansonsten möglicherweise erforderlichen zweiten Kliniktransport und -aufenthalt ersparen wollten. Von den beiden Patienten mit klinisch eindeutiger ERU waren nur bei einem in der MAR ein Titer von 1:200 gegen *Bratislava* und im ELISA Antikörper der Klassen G und A nachweisbar. Die Probe des anderen Pferdes enthielt keine detektierbaren Leptospirenantikörper. 64% (7/11) der Kammerwasserproben aus Pferdeaugen mit fraglichen klinischen Befunden im Sinne der ERU - aber später in mindestens einem Testergebnis bestätigtem Leptospirenbefall - wiesen in der MAR Leptospirenantikörper auf. Im ELISA waren es sogar 89% (8/9). In der MAR wurden Titer bis 1:1600 erreicht. Die höchsten Antikörpertiter waren ausschließlich gegen *L. kirschneri* Serovar *grippotyphosa* gerichtet. Der ELISA lieferte für die einzelnen Immunglobulinklassen folgende Prozentsätze positiver Ergebnisse:

IgM 22% (2/9), IgG 56% (5/9) und IgA 89% (8/9). IgA war somit in allen im ELISA als positiv beurteilten Proben nachweisbar.

Beim Vergleich ERU-kranker und augengesunder Pferde bezüglich der MAR- und ELISA-Resultate waren ebenfalls höchstsignifikante Unterschiede sichtbar (Exakter Test nach Fisher, $p < 0,001$).

(Anmerkung: In den folgenden Kapiteln über Zusammenhänge von ELISA-Ergebnissen mit den Resultaten anderer Untersuchungen wurden die Kammerwasserbefunde nicht mehr nach Gruppen getrennt behandelt. Aus der Gruppe der Patienten mit einseitiger ERU, die am anderen, gesunden Auge einer Parazentese unterzogen worden waren, fanden nur die Ergebnisse der drei Pferde mit positivem Laborbefund des Kammerwassers Verwendung.)

4.4.6 PCR-Nachweis und Kultur von Leptospiren im Kammerwasser von Pferden mit ERU und augengesunden Tieren

In keiner Kammerwasserprobe aus der Kontrollgruppe konnte Leptospiren-DNA mittels PCR nachgewiesen werden. Ein Ansatz aus der Gruppe der Pferde, die an einem Auge unter ERU litten und am anderen punktiert worden waren, reagierte in der PCR positiv. Er gehörte zu einem der drei Pferde, deren Kammerwasserproben auch Antikörper gegen Leptospiren enthielten. Bei nur einem der beiden Pferde mit klinisch eindeutiger ERU wurden die direkten Nachweismethoden für Leptospiren angewandt. Dabei lieferte sowohl die PCR als auch die Kultur ein positives Ergebnis (Serogruppe *Pomona*). Von den elf Patienten mit fraglicher ERU wurde bei neun eine PCR-Untersuchung des Kammerwassers eingeleitet. Davon reagierten fünf Ansätze (45%) positiv.

Der Unterschied zwischen augengesunden und ERU-kranken Pferden hinsichtlich des direkten Leptospirennachweises mittels PCR errechnete sich als höchstsignifikant (Exakter Test nach Fisher, $p < 0,001$).

(Anmerkung: siehe 4.4.5)

4.4.7 Leptospirennachweise bei zwei Pferden mit Ciclosporin A-Implantat

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei Pferde mit der Verdachtsdiagnose „ERU“ zur Vitrektomie vorgestellt, denen im Vorfeld bereits von einem anderen Tierarzt ein subsklerales Implantat zur verzögerten Freisetzung von Ciclosporin A eingesetzt worden war. Bei den Patienten handelte es sich um einen 10jährigen braunen Warmblutwallach aus Österreich („Cadillac“) sowie einen 12jährigen braunen Traberwallach aus Bayern („Velvet“).

„Cadillac“ litt vorberichtlich seit neun Monaten unter rezidivierenden Uveitisschüben (ca.

vier bis fünf insgesamt) am linken Auge. Der letzte war etwa drei Wochen vor Vorstellung und damit trotz des neun Monate zuvor eingesetzten Implantates aufgetreten. Die Besitzer berichteten darüber hinaus, dass mit Ausnahme der ersten Episode einer inneren Augenentzündung alle weiteren Uveitisschübe nach Einsatz des Ciclosporin A-Implantates zu beobachten gewesen waren. Der Wallach zeigte auch bei der Eingangsuntersuchung Anzeichen einer akuten Uveitisphase mit Lidkneifen, geringgradig geröteten Konjunktiven, Trübung und Vaskularisation der Hornhaut sowie einer mittelgradigen diffusen Glaskörpertrübung. Insgesamt war das Pferd an einer hochgradigen Panuveitis mit beginnender Bulbusatrophie, Abflachung der vorderen Augenkammer, zirkulärer hinterer Synechie, beginnender Katarakt, mittelgradigen Glaskörpereinlagerungen und mehreren faltenförmigen Ablösungen der Netzhaut erkrankt.

„Velvet“ war zum Zeitpunkt der Untersuchung seit einem Jahr am rechten Auge erkrankt und hatte in dieser Zeit drei Schübe einer inneren Augenentzündung erlitten. Das Ciclosporin A-Implantat war etwa drei Monate vor Vorstellung in der Klinik eingesetzt worden. Auch er hatte erst kürzlich einen akuten Uveitisschub erlitten, in der vorderen Augenkammer schwamm noch eine kleine Fibrinflocke. Zudem wünschten die Besitzer eine Entfernung des Ciclosporinimplantates, da der Wallach mit regelmäßigen Reizzuständen auf den Fremdkörper reagiert hatte.

Bei „Velvet“ wurde zunächst während der zur Entfernung des Implantates notwendigen Vollnarkose Kammerwasser aus dem betroffenen rechten Auge entnommen und mikrobiologisch auf Leptospiren sowie spezifische Antikörper untersucht, da das Auge außer der kleinen Fibrinflocke in der vorderen Augenkammer keinerlei Anzeichen für eine ERU aufwies. „Cadillac“ wurde dagegen sogleich einer Vitrektomie unterzogen.

Bei „Cadillac“ wurde im gewonnenen Glaskörpermaterial mittels MAR ein Titer von 1:1600 gegen die Leptospirenserovar *Grippotyphosa* nachgewiesen. Der ELISA ergab für IgM ein schwach, für IgG und IgA ein stark positives Ergebnis. Ebenso war der direkte Erregernachweis mittels PCR und Kultur (Serogruppe *Grippotyphosa*) erfolgreich.

„Velvets“ Kammerwasser enthielt keine in der MAR nachweisbaren Antikörper gegen Leptospiren. Der ELISA lieferte für alle drei Immunglobulinklassen ein schwach positives Ergebnis, und mittels PCR konnte Leptospiren-DNA detektiert werden. Aufgrund der positiven Kammerwasserbefunde wurde der Wallach sechs Wochen später ebenfalls vitrektomiert. Dabei lieferte die MAR im Glaskörpermaterial wiederum ein negatives Ergebnis. Im ELISA war die gemessene Extinktion für IgA grenzwertig (für IgM und IgG negativ), und auch PCR und Kultur verliefen negativ.

4.5 Zusammenhänge von ELISA- und PCR-Resultaten mit dem Vorbericht und den Ergebnissen anderer Untersuchungen bei Pferden mit ERU

4.5.1 Korrelationen der ELISA-Ergebnisse mit dem Vorbericht

Serumuntersuchung mittels ELISA

Qualitative Betrachtung Im Serum konnten bei Pferden mit ERU Leptospirenantikörper weitgehend unabhängig von der Gesamtdauer der Erkrankung, der Anzahl der Uveitischübe und dem Zeitpunkt des letzten akuten Entzündungsschubes mittels ELISA-Technik nachgewiesen werden.

Eine Aufteilung der Patienten in Gruppen entsprechend ihrer Anamnese³ ließ jedoch für die erst maximal ein halbes Jahr erkrankten Pferde und diejenigen mit maximal zwei Uveitisattacken sowie die Tiere mit einem erst kürzlich abgelaufenen ERU-Schub geringfügig mehr positive ELISA-Ergebnisse erkennen. Die Beobachtungen waren allerdings nicht signifikant (Exakter Test nach Fisher, Kontingenzkoeffizient). Ebenfalls keine signifikanten Unterschiede lieferte die Kategorisierung der Patienten anhand ihres Vorberichtes bei einer Betrachtung der Kombinationen positiver und negativer Untersuchungsergebnisse für die einzelnen Immunglobulinklassen⁴ im Exakten Test nach Fisher.

Quantitative Betrachtung Bei der quantitativen Betrachtung des Nachweises der verschiedenen Immunglobulinklassen gegen Leptospiren im Serum der ERU-Patienten in Relation zum Vorbericht war lediglich für den Gehalt an IgM eine schwache negative Korrelation mit der Gesamtdauer der Erkrankung erkennbar ($\rho = -0,306$), die jedoch nicht signifikant war ($p = 0,083$). Ein noch schwächerer Zusammenhang bestand zwischen der Konzentration an IgG bzw. IgA und der Gesamtdauer der Erkrankung ($\rho = -0,208$ bzw. $-0,209$). Dies bedeutet, dass bei Pferden, die schon länger unter ERU litten, ein geringerer Gehalt an spezifischen Antikörpern detektierbar war. Keinerlei statistische Zusammenhänge waren zwischen dem quantitativen Nachweis der verschiedenen Immunglobulinklassen im Serum und dem Zeitpunkt des letzten Schubes sowie der Anzahl der Schübe einer inneren Augenentzündung erkennbar (Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman).

Die Gruppierung der Patienten anhand ihres Vorberichtes zeigte allerdings beim Vergleich der mittleren Ränge im Mann-Whitney-Test, dass Seren von Pferden mit maximal einem

³siehe Schema in Tabelle 3.1 auf Seite 45

⁴Anwendung des ELISA-Codes Tabelle 3.7 Seite 52

halben Jahr Erkrankungsdauer und nur ein bis zwei ERU-Schüben sowie einer Entzündungsphase zeitnah zur Klinikeinweisung höhere Gehalte an Immunglobulinen aller drei Klassen (außer IgG bei Betrachtung der Erkrankungsdauer) gegen Leptospiren aufwiesen als die der übrigen Tiere. Die Unterschiede waren jedoch abermals nicht signifikant.

Glaskörperuntersuchung mittels ELISA

Qualitative Betrachtung Gegen Leptospiren gerichtete Antikörper im Glaskörper konnten sowohl bei Patienten, die vorberichtlich erst seit kurzer Zeit erkrankt waren und nur einen oder zwei Schübe erlitten hatten, als auch bei Pferden, die seit mehreren Jahren unter ERU litten und bei denen mehrere Schübe aufgetreten waren, mittels ELISA-Technik nachgewiesen werden.

Keine signifikanten Unterschiede ließ die Kategorisierung der Patienten anhand des Vorberichtes für eine Betrachtung positiver oder negativer Ergebnisse im ELISA erkennen, obwohl die Glaskörperproben der bis zu sechs Monate erkrankten Pferde mit 87% häufiger positiv reagierten als die der länger betroffenen Tiere (79%) (Exakter Test nach Fisher) (Abbildung 4.6).

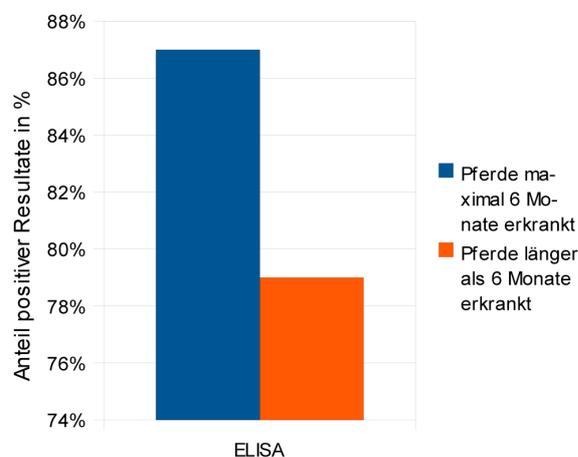


Abb. 4.6: Prozentualer Anteil positiver ELISA-Ergebnisse beim Nachweis von Leptospirenantikörpern in Glaskörperproben von Pferden mit ERU in Abhängigkeit von der Gesamtdauer der Erkrankung ($n_{\text{Gesamt}}=59$)

Auch für den Zeitpunkt des letzten Uveitisschubes war erkennbar, dass bei Glaskörperproben aus erst kürzlich akut erkrankten Augen häufiger Antikörper gegen Leptospiren nachweisbar waren (94%) als bei solchen aus Augen, die schon länger keinen Schub mehr erlitten hatten (78%) (Abbildung 4.7).

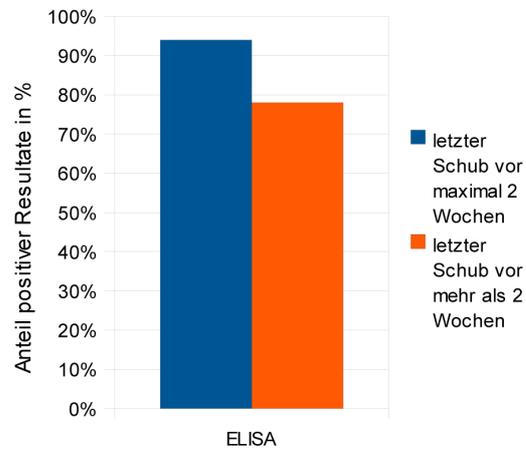


Abb. 4.7: Prozentualer Anteil positiver ELISA-Ergebnisse beim Nachweis von Leptospirenantikörpern in Glaskörperproben von Pferden mit ERU in Abhängigkeit vom Zeitpunkt des letzten Schubes ($n_{\text{Gesamt}}=55$)

Am geringsten war der Unterschied für die Anzahl an Uveitisschüben. Jedoch war auch hier die ELISA-Untersuchung bei Augen mit nur einer oder zwei akuten Entzündungsepisoden geringfügig häufiger positiv (52%) als bei solchen mit häufigeren Uveitisanfällen (48%) (Abbildung 4.8).

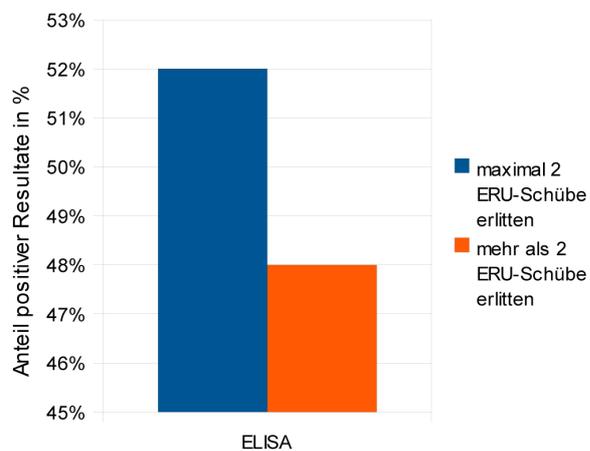


Abb. 4.8: Prozentualer Anteil positiver ELISA-Ergebnisse beim Nachweis von Leptospirenantikörpern in Glaskörperproben von Pferden mit ERU in Abhängigkeit von der Anzahl erlittener Schübe ($n_{\text{Gesamt}}=68$)

Die rein qualitative Betrachtung der humoralen Immunantwort in Form verschiedener nachweisbarer Immunglobulinklassen ließ für den IgA-ELISA erkennen, dass bei Glaskörper-

proben aus Augen, deren letzter Schub maximal einen halben Monat zurücklag, häufiger (94%) IgA-Antikörper gegen Leptospiren nachweisbar waren als bei solchen aus Augen, die sich bereits länger in einer Ruhephase befanden (74%) (Abbildung 4.9). Der Zusammenhang war bei Berechnung des Kontingenzkoeffizienten signifikant ($C=0,267$; $p=0,040$).

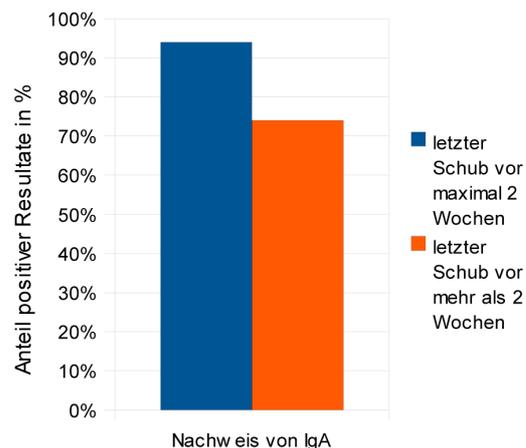


Abb. 4.9: Prozentualer Anteil positiver Ergebnisse für den Nachweis von IgA gegen Leptospiren mittels ELISA-Technik in Glaskörperproben von Pferden mit ERU in Abhängigkeit vom Zeitpunkt des letzten Schubes ($n_{\text{Gesamt}}=55$)

Für IgM und IgG sowie für IgA und die anderen beiden Anamnesepunkte differierten die errechneten Prozentsätze jedoch weniger. Ebenso lieferte die Betrachtung des ELISA-Profiles im Glaskörper keine signifikanten statistischen Beziehungen zu den Variablen des Vorberichtes.

Quantitative Betrachtung Kein signifikanter statistischer Zusammenhang konnte bei der Berechnung des Spearman'schen Rangkorrelationskoeffizienten zwischen der Gesamtdauer der Erkrankung bzw. der Anzahl an beobachteten Entzündungsschüben im Auge und dem quantitativen Nachweis der verschiedenen Immunglobulinisotypen gegen Leptospiren im Glaskörper mittels ELISA-Technik ausgemacht werden. Jedoch bestand eine signifikante negative Korrelation zwischen dem Zeitpunkt des letzten Schubes und dem Gehalt an spezifischem IgG im Glaskörper ($\rho=-0,284$; $p=0,036$). Dies bedeutet, dass mit zunehmendem Abstand der Vitrektomie mit Probennahme zum Auftreten der letzten Uveitisattacke die IgG-Konzentration gegen Leptospiren im Glaskörper abnahm.

Bei der Einteilung der Patienten hinsichtlich der Gesamtdauer ihrer Erkrankung war der mittlere Rang des IgM-Gehaltes im Glaskörper für die länger erkrankten Tiere höher und

implizierte damit einen höheren Antikörpergehalt gegen Leptospiren im Vergleich zu den erst kurze Zeit betroffenen Pferden. Die errechneten Werte für IgG und IgA waren dagegen niedriger als bei den kürzer erkrankten Pferden. Die Unterschiede waren auch in keinem der Fälle signifikant (Mann-Whitney-Test). Bei Betrachtung der Anzahl der Schübe einer inneren Augenentzündung wiesen die Glaskörperproben aus Augen, die erst bis zu zwei akute Phasen durchgemacht hatten, geringfügig höhere Gehalte an IgG und IgA gegen Leptospiren auf, diejenigen aus Augen mit mehr als zwei Uveitisschüben hingegen eine geringfügig höhere Konzentration an spezifischem IgM (Vergleich der mittleren Ränge). Die Unterschiede waren abermals nicht signifikant (Mann-Whitney-Test). Die Anwendung des Mann-Whitney-Tests bei der Beurteilung der Differenzen zwischen den Patienten, deren letzter Uveitisschub erst maximal einen halben Monat zurücklag, und denen, die sich schon länger in einer Ruhephase befanden, ließ für alle drei Immunglobulinklassen unmittelbar nach einer akuten Episode eine höhere Konzentration erkennen. Der Unterschied war allerdings lediglich für IgG signifikant ($p=0,038$) und bestätigte das Ergebnis des Rangkorrelationstests.

Kammerwasseruntersuchung mittels ELISA

Qualitative Betrachtung Auch im Kammerwasser ⁵ waren Leptospirenantikörper sowohl bei länger erkrankten Tieren oder mehreren aufgetretenen Uveitisschüben als auch bei erst seit kurzem unter ERU leidenden Pferden mit nur wenigen Entzündungsphasen mittels ELISA nachweisbar.

Eine Betrachtung der rein qualitativen Nachweise der einzelnen Immunglobulinklassen auch bei Anwendung des ELISA-Codes in Abhängigkeit von der Gruppierung der Patienten entsprechend des Vorberichtes erbrachte keine signifikanten Unterschiede (Exakter Test nach Fisher).

Quantitative Betrachtung Die Anzahl an beobachteten Uveitisschüben korrelierte moderat (IgM: $\rho=-0,442$) bzw. sehr stark (IgG: $\rho=-0,949$; IgA: $\rho=-0,925$) negativ mit dem Gehalt an Leptospirenantikörpern der verschiedenen Klassen im Kammerwasser, d.h. eine höhere Anzahl an Entzündungsattacken ging häufig mit einem erniedrigten Gehalt an Immunglobulinen einher. Für IgM erwies sich die Korrelation als nicht signifikant ($p=0,201$), für IgG und IgA dagegen als höchstsignifikant ($p<0,001$). Ein ähnliches Bild lieferte die Berechnung des Rangkorrelationskoeffizienten für die Gesamtdauer der Erkrankung und

⁵Hinweis: Hier gilt es zu beachten, dass lediglich Patienten, deren Proben mindestens ein positives Ergebnis in einem der drei standardmäßig durchgeführten Nachweismethoden auf Leptospiren (MAR, ELISA oder PCR) verzeichneten, Eingang in diese Untersuchung fanden.

die einzelnen Immunglobulinklassen: Eine schwache negative, aber nicht signifikante Korrelation ergab sich für IgM gegen Leptospiren ($\rho=-0,350$; $p=0,321$), sehr starke negative, hochsignifikante Korrelationen hingegen für spezifisches IgG ($\rho=-0,870$; $p=0,001$) und IgA ($\rho=-0,864$; $p=0,001$). Eine zunehmende Krankheitsdauer war somit ebenfalls mit sinkenden Gehalten an Immunglobulinen gegen Leptospiren im Kammerwasser verbunden. Bei Betrachtung des Zeitpunktes des letzten aufgetretenen Schubes einer inneren Augenentzündung war ein schwacher bis moderater statistischer Zusammenhang mit der Stärke der humoralen Immunantwort gegen Leptospiren erkennbar (IgM: $\rho=0,363$; $p=0,548$; IgG: $\rho=-0,287$; $p=0,640$; IgA: $\rho=-0,444$; $p=0,454$), der jedoch in keinem der Fälle signifikant war.

Eine Einteilung der Augen anhand des Patientenvorberichtes in die Gruppen „bis zu 6 Monate“ und „über 6 Monate“ erkrankt sowie „bis zu 2 Uveitisschübe“ und „mehr als 2 Uveitisschübe“ erlitten bestätigte den sinkenden Gehalt an Leptospirenantikörpern mit steigender Krankheitsdauer bzw. höherer Anzahl an durchlittenen akuten Entzündungsphasen für alle drei Immunglobulinklassen. Die Unterschiede waren jedoch wiederum nur für spezifisches IgG und IgA bei Betrachtung der Schubanzahl signifikant (Mann-Whitney-Test, jeweils $p=0,008$). Die Berechnung der mittleren Ränge nach Einteilung der Augen in die vom Zeitpunkt des letzten beobachteten Entzündungsschubes abhängigen Kategorien lieferte einen geringfügig höheren Wert für den IgA-Gehalt gegen Leptospiren bei den Tieren, die erst kürzlich einen akuten Schub erlitten hatten, der Wert für den IgM-Gehalt war niedriger und für die Konzentration an IgG gleich dem der Gruppe mit bereits länger andauernder Ruhephase. Allerdings war keiner der Unterschiede signifikant (Mann-Whitney-Test).

4.5.2 Korrelationen der PCR-Ergebnisse mit dem Vorbericht

Glaskörperuntersuchung mittels PCR

Wie die Untersuchung auf Leptospirenantikörper mittels ELISA-Technik lieferte der direkte Erregernachweis mittels PCR für kürzer erkrankte Patienten und solche mit nur einem oder zwei aufgetretenen Schüben sowie bei einer erst kürzlich aufgetretenen Entzündungsepisode häufiger positive Resultate (71%, 64% bzw. 72%) bei der Glaskörperuntersuchung als für diejenigen, die schon länger unter ERU litten, mehr als zwei Attacken durchgemacht hatten oder deren letzter ERU-Schub mehr als zwei Wochen zurücklag (59%, 58% bzw. 64%). Die Unterschiede waren jedoch ebenfalls nicht signifikant (Exakter Test nach Fisher).

Kammerwasseruntersuchung mittels PCR

Zwischen der Gesamtdauer der Erkrankung sowie dem Zeitpunkt des letzten Schubes einer inneren Augenentzündung und den Untersuchungsergebnissen der PCR im Kammerwasser

⁶ konnten keine wesentlichen statistischen Zusammenhänge ausgemacht werden (Exakter Test nach Fisher). Jedoch lieferte die Betrachtung der PCR-Ergebnisse einen signifikanten Unterschied zwischen Pferden mit maximal zwei und denen mit mehr als zwei Schüben einer inneren Augenentzündung (Exakter Test nach Fisher, $p=0,033$). Der Nachweis von Leptospiren-DNA im Kammerwasser gelang ausschließlich in den Fällen mit mehr als zwei akuten Schüben (Abbildung 4.10). Dieser Zusammenhang erwies sich als stark ($C=0,626$; $p=0,011$).

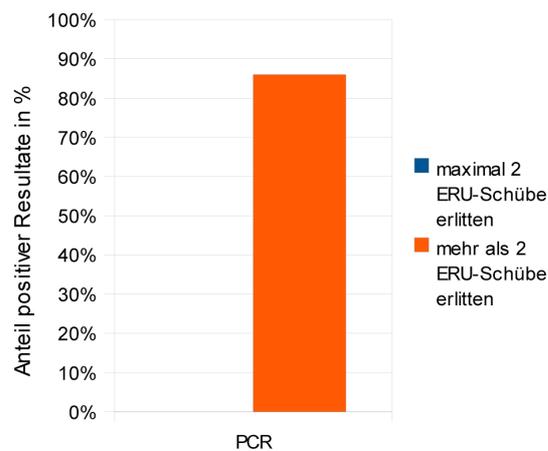


Abb. 4.10: Prozentualer Anteil positiver Ergebnisse für den Nachweis von Leptospiren-DNA mittels PCR in Kammerwasserproben von Pferden mit ERU in Abhängigkeit von der Anzahl erlittener Schübe ($n_{\text{Gesamt}}=10$)

4.5.3 Korrelationen der ELISA-Ergebnisse mit den ophthalmologischen Befunden

Serumuntersuchung mittels ELISA

Qualitative Betrachtung Ein eindeutiges klinisches Bild korrelierte hochsignifikant mit einem positiven IgG-Resultat gegen Leptospiren im Serum ($C=0,392$; $p=0,003$). So lieferten 95% der Seren von Pferden mit für die ERU typischen ophthalmologischen Befunden ein positives Ergebnis. Von den Tieren, deren Augenbefunde nicht sicher für das Vorliegen einer ERU sprachen, waren dies nur 60%. Für die ELISA-Untersuchung ohne Immunglobulindifferenzierung sowie den Nachweis von spezifischem IgM und IgA konnten keine vergleichbaren Beobachtungen gemacht werden. Ebenso konnte keine signifikante statistische

⁶Hinweis: Hier gilt es zu beachten, dass lediglich Patienten, deren Proben mindestens ein positives Ergebnis in einem der drei standardmäßig durchgeführten Nachweismethoden auf Leptospiren (MAR, ELISA oder PCR) verzeichneten, Eingang in diese Untersuchung fanden.

Beziehung zwischen dem Grad oder der Form der ERU und dem Nachweis der Leptospirenantikörper im Serum mittels ELISA ausgemacht werden.

Bei Überprüfung statistischer Zusammenhänge für die acht Kombinationsmöglichkeiten negativer und positiver Ergebnisse beim Nachweis der einzelnen Immunglobulinklassen gegen Leptospiren war auffällig, dass in 58% der Seren von Pferden mit eindeutiger ERU Antikörper aller drei Klassen enthalten waren, bei den Pferden mit unklaren Augenbefunden im Sinne der ERU waren es nur 33% (Abbildung 4.11). Diese Beziehung war bei Berechnung des Kontingenzkoeffizienten signifikant ($C=0,488$; $p=0,020$).

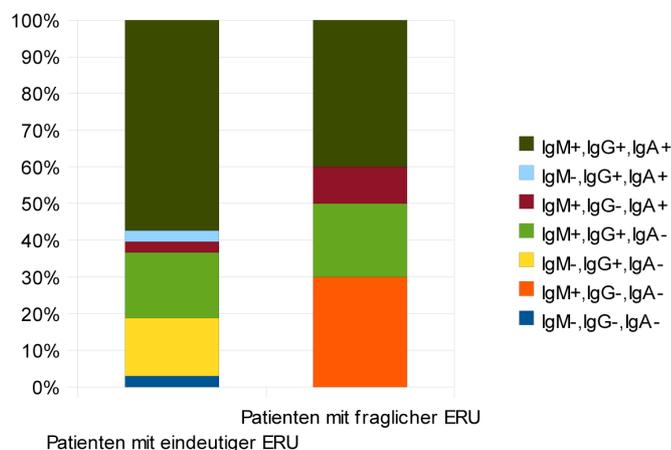


Abb. 4.11: ELISA-Profil: Qualitative Unterschiede in der systemischen humoralen Immunantwort gegen Leptospiren von Pferden mit klinisch eindeutiger ERU ($n=38$) und solchen mit fraglichen ophthalmologischen Befunden im Sinne der ERU ($n=6$) („-“=negativ, „+“=positiv)

Keinerlei signifikante statistische Beziehungen waren zwischen dem ELISA-Profil im Serum und dem Grad der uveitischen Veränderungen oder der Form der ERU erkennbar.

Quantitative Betrachtung Bei Anwendung des exakten Tests nach Fisher sowie Berechnung des Kontingenzkoeffizienten konnte ein moderater statistischer Zusammenhang zwischen der Eindeutigkeit der ophthalmologischen Veränderungen im Sinne einer ERU und dem IgM- ($C=0,433$; $p=0,026$) sowie IgG-Gehalt ($C=0,451$; $p=0,015$) im Serum erkannt werden. So wurden bei Vorliegen eindeutiger Befunde höhere Antikörperkonzentrationen gegen Leptospiren festgestellt. Zwischen dem quantitativen Nachweis der unterschiedlichen Immunglobuline im Serum und dem Grad oder der Lokalisation der uveitischen Veränderungen im Auge bestand keine signifikante statistische Beziehung.

Glaskörperuntersuchung mittels ELISA

Qualitative Betrachtung Ein eindeutiger ophthalmologischer Befund im Sinne der ERU korrelierte signifikant mit dem Nachweis von IgM- ($C=0,251$; $p=0,020$) und IgG-Antikörpern ($C=0,308$; $p=0,004$) gegen Leptospiren bei der ELISA-Untersuchung des Glaskörpermaterials. Für die ELISA-Resultate ohne Differenzierung der Immunglobulin-klassen sowie für den Nachweis von spezifischem IgA waren die statistischen Zusammenhänge mit dem klinischen Bild nicht signifikant.

Des Weiteren errechnete sich eine signifikante statistische Beziehung zwischen dem ELISA-Profil im Glaskörper und der Eindeutigkeit des klinischen Bildes ($C=0,431$; $p=0,001$). Konkret waren bei Betrachtung der beiden „Code“-Zahlen, die am häufigsten in jeder Gruppe als Ergebnis ermittelt wurden, in 65% der Proben aus Augen mit unklaren ophthalmologischen Befunden im Sinne der ERU entweder nur Antikörper vom Isotyp A (36%) oder sowohl IgG- als auch IgA-Antikörper (29%) gegen Leptospiren nachweisbar. Im Glaskörpermaterial aus Augen mit eindeutiger ERU waren in 80% der Fälle entweder spezifisches IgG und IgA (41%) oder alle drei Immunglobulinklassen (39%) detektierbar. Dagegen waren bei Tieren mit fraglicher ERU nur in etwa 7% der Fälle alle drei Immunglobuline und bei denen mit typischen Augenveränderungen nur bei etwa 6% ausschließlich IgA-Antikörper gegen Leptospiren nachweisbar. Die Unterschiede im ELISA-Profil der beiden Gruppen verdeutlicht Abbildung 4.12.

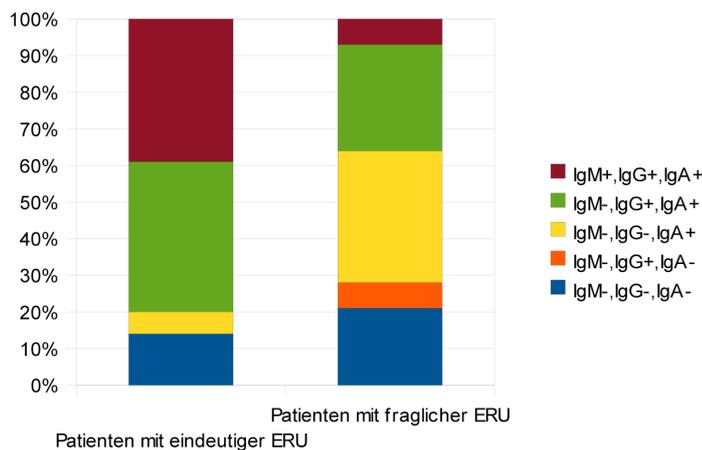


Abb. 4.12: ELISA-Profil des Glaskörpermaterials: Qualitative Unterschiede in der lokalen humoralen Immunantwort gegen Leptospiren von Pferden mit klinisch eindeutiger ERU ($n=66$) und solchen mit fraglichen ophthalmologischen Befunden im Sinne der ERU ($n=14$) („-“=negativ, „+“=positiv)

Ein höherer Grad an ophthalmologischen Veränderungen bei Pferden mit ERU ging signifikant mit einem höheren Prozentsatz positiver Ergebnisse im ELISA einher (Abbildung 4.13). So lieferten die Glaskörperproben von Pferden mit hochgradiger ERU in 100% der Fälle ein positives ELISA-Ergebnis, bei Pferden mit mittelgradigen Befunden waren dies 95% und bei denjenigen mit nur geringgradigen ophthalmologischen Veränderungen 75% der Proben ($C=0,299$; $p=0,049$). Auch für den IgG- und IgA-ELISA ergaben sich ähnliche Prozentsätze. So enthielten alle Glaskörperproben aus Augen mit hochgradiger ERU Leptospirenantikörper vom Isotyp G und A. Bei den mittelgradigen Veränderungen reagierten 95% der Proben (IgG und IgA) positiv. Bei geringgradig veränderten Augen waren dies 61% (IgG) bzw. 73% (IgA). Der statistische Zusammenhang erwies sich jeweils als signifikant (IgG: $C=0,422$; $p=0,001$; IgA: $C=0,316$; $p=0,031$). Beim IgM-ELISA waren 59% der Proben aus hochgradig, 55% der Proben aus mittelgradig und 21% der Proben aus geringgradig erkrankten Augen positiv ($C=0,371$; $p=0,005$).

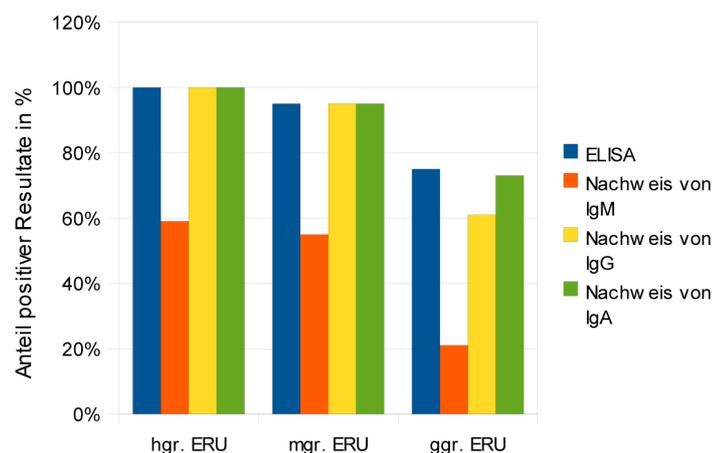


Abb. 4.13: Anteil positiver ELISA-Ergebnisse beim Nachweis von Leptospirenantikörpern im Glaskörper von Pferden mit ERU in Abhängigkeit vom Grad der uveitischen Veränderungen (n=76)

Diese Zusammenhänge konnten bei Berechnung des Kontingenzkoeffizienten für das ELISA-Profil und den Grad der Uveitis nachvollzogen werden. Eine geringgradige Uveitis oder fehlende klinische Veränderungen gingen häufig mit einem negativen Ergebnis oder dem Nachweis nur einer Immunglobulinklasse einher, während beim Vorliegen einer hochgradigen Uveitis mindestens zwei Immunglobulinklassen gegen Leptospiren detektierbar waren ($C=0,549$; $p=0,001$).

Bei Betrachtung der Form der ERU galt für alle Nachweise von Leptospirenantikörpern

mittels ELISA-Technik, dass der höchste Prozentsatz positiver Ergebnisse mit einer Lokalisation der Erkrankung im hinteren Augenabschnitt assoziiert war. Die zweitmeisten positiven Resultate erzielten Augen mit einer Panuveitis. Für den Nachweis von IgG- und IgA-Antikörpern gegen Leptospiren waren die statistischen Zusammenhänge signifikant (IgG: $C=0,343$; $p=0,014$; IgA: $C=0,347$; $p=0,012$). Eine Aufstellung der Prozentsätze positiver Resultate für die einzelnen Labortests in Abhängigkeit von der Lokalisation der uveitischen Veränderungen findet sich in Tabelle 4.2.

Tab. 4.2: Prozentualer Anteil positiver Resultate beim Nachweis von Leptospirenantikörpern (ELISA) sowie von Leptospiren-DNA (PCR) im Glaskörper von Pferden mit ERU in Abhängigkeit von der Form der Uveitis (n=74)

Labortest	vordere Uveitis	hintere Uveitis	Panuveitis
ELISA	60%	92%	84%
IgM-ELISA	10%	42%	37%
IgG-ELISA	40%	89%	76%
IgA-ELISA	50%	92%	84%
PCR	0%	92%	62%

Auch die Betrachtung des ELISA-Profiles bestätigte die Korrelation zwischen einer hinteren oder Panuveitis und dem Nachweis mehrerer Immunglobulinklassen gegen Leptospiren in der zugehörigen Glaskörperprobe ($C=0,506$; $p=0,006$).

Quantitative Betrachtung Ein eindeutiger ophthalmologischer Befund ging signifikant mit einer Erhöhung der Gehalte an IgM ($C=0,328$; $p=0,047$), IgG ($C=0,482$; $p<0,001$) und IgA ($C=0,460$; $p=0,001$) gegen Leptospiren im Glaskörper einher. Zwischen dem Grad der ophthalmologischen Veränderungen und dem quantitativen Antikörpernachweis im ELISA war ebenfalls eine signifikante positive Korrelation erkennbar. Der Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient betrug für den Grad der ERU und IgM 0,453 ($p<0,001$), für IgG 0,485 ($p<0,001$) und für IgA 0,358 ($p=0,001$), d.h. ein zunehmender Grad uveitischer Veränderungen ging mit einem intraokularen Anstieg der Konzentrationen der einzelnen Immunglobulinklassen gegen Leptospiren im ELISA einher. Bei Betrachtung der Form der ERU und des quantitativen Immunglobulinnachweises war ein signifikanter Zusammenhang nur zwischen einem erhöhten IgG-Gehalt gegen Leptospiren und einer Lokalisation der Erkrankung im hinteren Augenabschnitt oder einer Manifestation als Panuveitis erkennbar ($C=0,487$; $p=0,003$). Eine ähnliche Verteilung wies die Kreuztabelle für IgA und die Form der Uveitis auf. Die Berechnung der Chi-Quadrat-Tests sowie des Kontingenzkoeffizienten erbrachten jedoch keine signifikante statistische Beziehung.

Kammerwasseruntersuchung mittels ELISA

Qualitative Betrachtung Es waren keinerlei signifikante statistische Zusammenhänge zwischen dem Grad oder der Form der ERU und dem Nachweis von Leptospirenantikörpern im Kammerwasser⁷ der Patienten erkennbar (Chi-Quadrat-Tests, Kontingenzkoeffizient).

Quantitative Betrachtung Ebenso war keine signifikante statistische Beziehung zwischen dem Grad sowie der Form der ERU und dem Gehalt der einzelnen Immunglobuline gegen Leptospiren im Kammerwasser zu erkennen (Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizient bzw. Chi-Quadrat-Tests, Kontingenzkoeffizient).

4.5.4 Korrelationen der PCR-Ergebnisse mit den ophthalmologischen Befunden

Glaskörperuntersuchung mittels PCR

Für die Anwendung der PCR war eine signifikante statistische Beziehung zwischen einem erfolgreichen Leptospirennachweis im Glaskörpermaterial und dem typischen klinischen Bild der ERU erkennbar ($C=0,454$; $p<0,001$). So glückte der DNA-Nachweis in 72% der Fälle mit eindeutigen ophthalmologischen Anzeichen, aber nur in 7% der Glaskörperproben aus Pferdeaugen mit fehlenden eindeutigen Befunden im Sinne der ERU. Der Nachweis von Leptospiren-DNA gelang des Weiteren mit 85% am häufigsten in mittelgradig veränderten Augen. Unter den Augen mit hochgradigen Befunden reagierten 75% der Ansätze positiv und bei solchen mit nur geringgradigen Veränderungen 51%. Die Berechnung des Kontingenzkoeffizienten erbrachte eine schwache, signifikante Korrelation zwischen einem positiven PCR-Resultat im Glaskörper und dem Grad der Uveitis ($C=0,386$; $p=0,003$). Die meisten positiven PCR-Resultate lieferten Glaskörperproben aus Pferdeaugen mit hinterer oder intermediärer Uveitis (92% positiv), gefolgt von Panuveitis (62%). In Augen mit vorderer Uveitis glückte der DNA-Nachweis in keinem einzigen Fall (Tabelle 4.2). Dieser Zusammenhang erwies sich abermals als signifikant ($C=0,532$; $p<0,001$).

Kammerwasseruntersuchung mittels PCR

Es waren keinerlei signifikante statistische Beziehungen zwischen dem Grad oder der Form der ERU und dem Nachweis von Leptospiren-DNA im Kammerwasser⁸ der Patienten erkennbar (Chi-Quadrat-Tests, Kontingenzkoeffizient).

⁷Hinweis: Hier gilt es zu beachten, dass lediglich Patienten, deren Proben mindestens ein positives Ergebnis in einem der drei standardmäßig durchgeführten Nachweismethoden auf Leptospiren (MAR, ELISA oder PCR) verzeichneten, Eingang in diese Untersuchung fanden.

⁸Hinweis: s.o.

4.5.5 Korrelationen der ELISA-Ergebnisse mit den makroskopischen Glaskörperveränderungen

Serumuntersuchung mittels ELISA

Qualitative Betrachtung Zwischen dem Nachweis von Leptospirenantikörpern im Serum der ERU-Patienten mittels ELISA-Technik und dem Grad der makroskopischen Veränderungen des bei der Vitrektomie gewonnenen Glaskörpermaterials gab es keine signifikanten statistischen Beziehungen (Chi-Quadrat-Tests, Kontingenzkoeffizient).

Quantitative Betrachtung Eine Überprüfung der statistischen Zusammenhänge zwischen dem quantitativen Nachweis von IgM, IgG oder IgA gegen Leptospiren im Serum und dem Grad der Glaskörperveränderungen ergab ebenfalls keine bedeutenden Korrelationen der Variablen (Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizient).

Glaskörperuntersuchung mittels ELISA

Qualitative Betrachtung Höchstsignifikante statistische Zusammenhänge konnten zwischen dem Grad der Glaskörperveränderungen und dem ELISA-Profil des Glaskörpers ausgemacht werden (Glaskörpertrübung: $C=0,554$; $p<0,001$; Glaskörpereinlagerungen: $C=0,551$; $p<0,001$). Intensivere Glaskörpertrübungen korrelierten bei Betrachtung aller Nachweise von Leptospirenantikörpern mittels ELISA-Technik mit einem höheren Prozentsatz positiver Resultate (IgM: $C=0,387$; $p=0,003$; IgG: $C=0,506$; $p<0,001$; IgA: $C=0,366$; $p=0,006$; ELISA: $C=0,345$; $p=0,013$). Analog war eine höhere Prozentzahl positiver ELISA-Ergebnisse gemeinsam mit einem höheren Grad an Glaskörpereinlagerungen zu beobachten (IgM: $C=0,418$; $p=0,001$; IgG: $C=0,449$; $p<0,001$; IgA: $C=0,402$; $p=0,001$; ELISA: $C=0,409$; $p=0,001$). Eine Zusammenstellung der Prozentsätze positiver Testergebnisse in Abhängigkeit von den makroskopischen Glaskörperveränderungen enthalten die Tabellen 4.3 und 4.4.

Tab. 4.3: Prozentualer Anteil positiver Resultate beim Nachweis von Leptospirenantikörpern (ELISA) sowie von Leptospiren-DNA (PCR) in Glaskörperproben von Pferden mit ERU in Abhängigkeit vom Grad der makroskopischen Glaskörpertrübung (n=46)

Labortest	ggr. Trübung	mgr. Trübung	hgr. Trübung
ELISA	88%	100%	100%
IgM-ELISA	29%	55%	67%
IgG-ELISA	88%	100%	100%
IgA-ELISA	88%	100%	100%
PCR	88%	95%	78%

Tab. 4.4: Prozentualer Anteil positiver Resultate beim Nachweis von Leptospirenantikörpern (ELISA) sowie von Leptospiren-DNA (PCR) in Glaskörperproben von Pferden mit ERU in Abhängigkeit vom Grad der makroskopischen Glaskörpereinlagerungen (n=61 bzw. 60)

Labortest	ggr. Einlagerungen	mgr. Einlagerungen	hgr. Einlagerungen
ELISA	63%	100%	100%
IgM-ELISA	17%	52%	63%
IgG-ELISA	50%	95%	100%
IgA-ELISA	63%	100%	100%
PCR	39%	100%	81%

Quantitative Betrachtung Sowohl zwischen dem Merkmal „diffuse Glaskörpertrübung“ als auch dem Merkmal „Glaskörpereinlagerungen“ und den Variablen IgM-, IgG- und IgA-Gehalt gegen Leptospiren im Glaskörper ergaben sich signifikante positive Korrelationen. Für die diffuse Glaskörpertrübung wurden folgende Werte des Rangkorrelationskoeffizienten berechnet: für IgM: $\rho=0,510$; $p<0,001$; für IgG: $\rho=0,632$; $p<0,001$; für IgA: $\rho=0,459$; $p<0,001$. Für die entzündlichen Glaskörpereinlagerungen waren die Werte folgende: für IgM: $\rho=0,452$; $p<0,001$; für IgG: $\rho=0,482$; $p<0,001$; für IgA: $\rho=0,394$; $p<0,001$. Demzufolge bestand ein signifikanter statistischer Zusammenhang zwischen einer stärkeren Glaskörperveränderung und einer höheren Antikörperkonzentration gegen Leptospiren im Glaskörper.

Kammerwasseruntersuchung mittels ELISA

Qualitative Betrachtung Es waren keine signifikanten statistischen Beziehungen zwischen der Qualität der humoralen Immunantwort auf Leptospiren im Kammerwasser⁹ und den makroskopischen Glaskörperveränderungen der ERU-Pferde erkennbar (Chi-Quadrat-Tests, Kontingenzkoeffizient).

Quantitative Betrachtung Die statistische Analyse mittels Spearman'schem Rangkorrelationskoeffizienten lieferte keinerlei bedeutende Zusammenhänge zwischen den makroskopischen Glaskörperveränderungen und dem Gehalt der verschiedenen Antikörperklassen gegen Leptospiren im Kammerwasser.

4.5.6 Korrelationen der PCR-Ergebnisse mit den makroskopischen Glaskörperveränderungen

Glaskörperuntersuchung mittels PCR

Beim Nachweis von Leptospiren-DNA im Glaskörper von Pferden mit ERU mittels PCR wurden die meisten positiven Ergebnisse im Zusammenhang mit mittelgradigen makroskopischen Veränderungen des zugehörigen Probenmaterials verzeichnet (Glaskörpertrübung: $C=0,570$; $p<0,001$; Glaskörpereinlagerungen: $C=0,527$; $p<0,001$). Eine Übersicht über die Prozentsätze positiver PCR-Resultate in Abhängigkeit von den makroskopischen Glaskörperveränderungen enthalten die Tabellen 4.3 und 4.4.

Kammerwasseruntersuchung mittels PCR

Die Anwendung der Chi-Quadrat-Tests sowie die Berechnung des Kontingenzkoeffizienten erbrachten keine Hinweise auf einen statistischen Zusammenhang zwischen dem Nachweis von Leptospiren-DNA im Kammerwasser¹⁰ ERU-kranker Pferde und den makroskopischen Glaskörperveränderungen.

⁹Hinweis: Hier gilt es zu beachten, dass lediglich Patienten, deren Proben mindestens ein positives Ergebnis in einem der drei standardmäßig durchgeführten Nachweismethoden auf Leptospiren (MAR, ELISA oder PCR) verzeichneten, Eingang in diese Untersuchung fanden.

¹⁰Hinweis: s.o.

4.5.7 ELISA und MAR

Zusammenhänge von MAR- und ELISA-Ergebnissen im Serum von Pferden mit ERU

Qualitative Betrachtung Von den 44 Seren an ERU erkrankter Pferde lieferten 30 (68%) sowohl bei einer Untersuchung in der MAR als auch mittels ELISA auf Leptospirenantikörper ein positives Resultat. Ein Ansatz (2%) reagierte in beiden Nachweisverfahren negativ. Es konnten mittels ELISA-Technik bei 30% (13/44) der in der MAR als negativ beurteilten Serumproben Antikörper gegen Leptospiren nachgewiesen werden. Hierbei waren in 62% der Ansätze (8/13) spezifische IgM-, in 77% (10/13) IgG- und in 38% (5/13) IgA-Antikörper enthalten ¹¹.

Quantitative Betrachtung Die Berechnung des Spearman'schen Rangkorrelationskoeffizienten für den Leptospirentiter im Serum von Pferden mit ERU und den quantitativen Nachweis von IgM, IgG und IgA ergab jeweils eine signifikante positive Korrelation (IgM: $\rho=0,546$; $p<0,001$; IgG: $\rho=0,563$; $p<0,001$; IgA: $\rho=0,461$; $p=0,002$), d.h. eine Erhöhung des mittels MAR ermittelten Titters war mit einer Erhöhung der Gehalte aller drei Immunglobulinklassen gegen Leptospiren assoziiert. Am schwächsten erwies sich die Korrelation für die Konzentration an spezifischem IgA.

Zusammenhänge von MAR- und ELISA-Ergebnissen im Glaskörper von Pferden mit ERU

Qualitative Betrachtung Von insgesamt 80 untersuchten Glaskörperproben von Pferden mit ERU wiesen 61 (76%) sowohl in der MAR als auch bei Anwendung der ELISA-Technik Leptospirenantikörper auf. 11 (14%) Ansätze reagierten bei beiden Methoden negativ. Ein Mal (1%) waren spezifische Antikörper nur mittels MAR nachweisbar und in sieben Ansätzen (9%) nur mittels ELISA (Abbildung 4.14). Von den sieben nur im ELISA positiv reagierenden Glaskörperproben enthielt keine IgM-Antikörper. Vier Mal waren IgG- (57%) und sechs Mal (86%) IgA-Antikörper gegen Leptospiren nachweisbar. IgA war in drei Fällen die alleinig nachweisbare Immunglobulinklasse und IgG in einem Fall ¹².

¹¹Anmerkung: In Kapitel 4.8 auf Seite 90 wird ebenfalls auf die Übereinstimmung der MAR- und ELISA-Ergebnisse im Serum eingegangen (Berechnung von Cohens Kappa).

¹²Anmerkung: In Kapitel 4.8 auf Seite 90 wird ebenfalls auf die Übereinstimmung der MAR- und ELISA-Ergebnisse im Glaskörper eingegangen (Berechnung von Cohens Kappa).

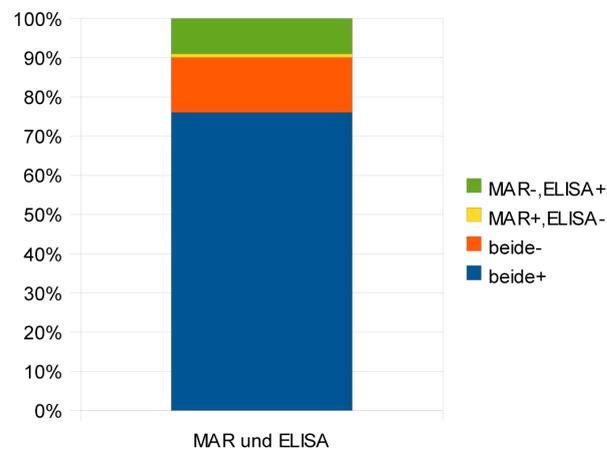


Abb. 4.14: Vorhandene bzw. fehlende Übereinstimmung von MAR- und ELISA-Resultaten beim Nachweis von Leptospirenantikörpern in Glaskörperproben von Pferden mit ERU (n=80) („-“=negativ, „+“=positiv) (hierzu siehe auch Tabelle 4.8 auf Seite 91)

Quantitative Betrachtung Ein höherer Antikörpertiter gegen Leptospiren in der MAR im Glaskörper der Patienten wurde gemeinsam mit höheren Gehalten an IgM-, IgG- und IgA-Antikörpern gegen Leptospiren im ELISA beobachtet. Der höchste Korrelationskoeffizient wurde für IgG ($\rho=0,718$) ermittelt, gefolgt von IgA ($\rho=0,710$) und IgM ($\rho=0,605$). Die Korrelationen waren jeweils höchstsignifikant ($p<0,001$).

Zusammenhänge von MAR- und ELISA-Ergebnissen im Kammerwasser von Pferden mit ERU

Qualitative Betrachtung Im Rahmen der Studie gelangten 16 Kammerwasserproben von Pferden mit ERU zur Untersuchung, wobei bei zweien keine ELISA-Ergebnisse vorlagen. Acht Mal waren mittels beider Testverfahren Leptospirenantikörper nachweisbar (57%, 8/14). Eine Probe reagierte in beiden Methoden negativ (7%, 1/14). Vier Mal verlief lediglich die ELISA-Untersuchung positiv (29%, 4/14). Ein weiterer Ansatz lieferte nur in der MAR ein positives Resultat (7%, 1/14) (Abbildung 4.15). Von den vier Kammerwasserproben, die ausschließlich im ELISA positiv reagierten, enthielt nur eine Antikörper aller drei Immunglobulinklassen (25%), eine weitere sowohl IgG als auch IgA (25%) und zwei Ansätze nur IgA-Antikörper (50%). IgA gegen Leptospiren war somit in allen in der MAR negativ reagierenden Proben nachweisbar ¹³.

¹³Anmerkung: In Kapitel 4.8 auf Seite 90 wird ebenfalls auf die Übereinstimmung der MAR- und ELISA-Ergebnisse im Kammerwasser eingegangen (Berechnung von Cohens Kappa).

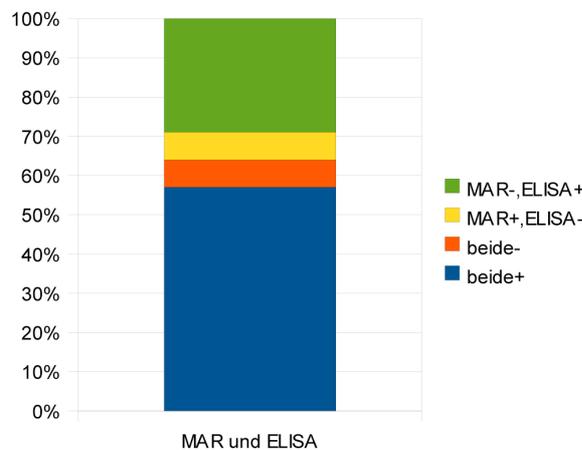


Abb. 4.15: Vorhandene bzw. fehlende Übereinstimmung von MAR- und ELISA-Resultaten beim Nachweis von Leptospirenantikörpern in Kammerwasserproben von Pferden mit ERU (n=14) („-“=negativ, „+“=positiv) (hierzu siehe auch Tabelle 4.8 auf Seite 91)

Quantitative Betrachtung Signifikante positive Korrelationen ergab die Berechnung des Spearman'schen Rangkorrelationskoeffizienten zwischen dem mittels MAR ermittelten Antikörpertiter gegen Leptospiren im Kammerwasser und dem Gehalt an IgG ($\rho=0,604$; $p=0,022$) und IgA ($\rho=0,683$; $p=0,007$) in derselben Probe, d.h. ein höherer Titer ging auch mit höheren Konzentrationen der beiden Immunglobulinklassen einher. Für spezifisches IgM war hingegen kein signifikanter statistischer Zusammenhang zu beobachten.

4.5.8 ELISA und direkter Leptospirennachweis im Auge

Serumuntersuchung

Qualitative Betrachtung Die Anwendung der Chi-Quadrat-Tests und Berechnung des Kontingenzkoeffizienten ließen keine signifikanten statistischen Zusammenhänge zwischen dem direkten Leptospirennachweis im Auge der ERU-Patienten mittels PCR oder Kultur und den qualitativen ELISA-Ergebnissen im Serum erkennen.

Quantitative Betrachtung Zwischen dem Testergebnis der PCR im Glaskörper und den quantitativen Nachweisen der Leptospirenantikörper im Serum von Pferden mit ERU mittels ELISA waren keine signifikanten Korrelationen erkennbar. Ein anderes Bild lieferte die Betrachtung der Kulturergebnisse. Einen signifikanten statistischen Zusammenhang ergab die Berechnung des Spearman'schen Rangkorrelationskoeffizienten für den Gehalt an spezifischem IgM ($\rho=-0,403$; $p=0,030$) sowie IgA ($\rho=-0,424$; $p=0,022$) und den direkten Erre-

gernachweis. So ging eine erfolgreiche Isolierung von Leptospiren aus Glaskörpermaterial moderat mit einer erniedrigten Konzentration der beiden Immunglobuline gegen Leptospiren im Serum einher.

Glaskörperuntersuchung

Qualitative Betrachtung Höchstsignifikante positive Korrelationen lieferte die Anwendung der Chi-Quadrat-Tests sowie die Berechnung des Kontingenzkoeffizienten für die qualitativen ELISA-Ergebnisse im Glaskörper und die PCR-Untersuchung auf Leptospiren in derselben Probe ($p < 0,001$). Der Kontingenzkoeffizient nahm dabei folgende Werte an: für die PCR und ELISA allgemein: $C = 0,414$, für IgM: $C = 0,383$, für IgG: $C = 0,534$ und für IgA: $C = 0,434$. Ebenso signifikante Zusammenhänge waren für das ELISA-Profil im Glaskörper und das Testergebnis der PCR zu verzeichnen ($C = 0,558$; $p < 0,001$). Ein negatives PCR-Resultat war in 36% der Fälle mit einem fehlenden Antikörpernachweis verbunden, wohingegen ein erfolgreicher Erregernachweis zu 96% mit einem Nachweis von mindestens zwei verschiedenen Immunglobulinen einherging (IgG und IgA: 46%; IgM, IgG und IgA: 50%) (Abbildung 4.16).

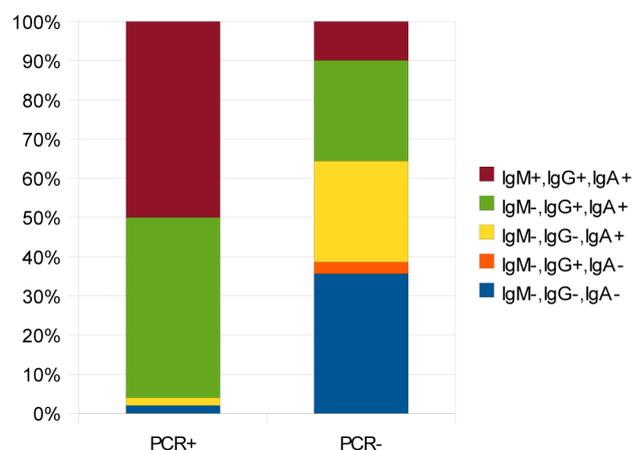


Abb. 4.16: Statistische Zusammenhänge zwischen dem Nachweis von Leptospiren-DNA im Glaskörpermaterial von Pferden mit ERU und dem Nachweis der verschiedenen Immunglobulinklassen gegen Leptospiren in derselben Probe ($n = 79$) („-“=negativ, „+“=positiv)

Für die Kulturergebnisse und Immunglobulinnachweise gegen Leptospiren im Glaskörper konnten allerdings keine signifikanten statistischen Beziehungen ermittelt werden (Chi-Quadrat-Tests, Kontingenzkoeffizient).

Quantitative Betrachtung Ebenfalls höchstsignifikant waren die statistischen Beziehungen zwischen positiven PCR-Ergebnissen und einem Anstieg der Immunglobulinkonzentrationen gegen Leptospiren im Glaskörper von Pferden mit ERU ($p < 0,001$). Den höchsten Wert für den Rangkorrelationskoeffizienten lieferte IgG ($\rho = 0,681$), gefolgt von IgA ($\rho = 0,650$) und IgM ($\rho = 0,433$). Ebenfalls signifikante Korrelationen waren zwischen dem Gehalt an spezifischem IgG ($\rho = 0,370$; $p = 0,040$) sowie IgA ($\rho = 0,390$; $p = 0,030$) im Glaskörper und einer erfolgreichen kulturellen Isolierung von Leptospiren erkennbar. Ein direkter Leptospirennachweis in Glaskörpermaterial war somit mit erhöhten Gehalten an spezifischen Immunglobulinen in derselben Probe assoziiert.

Kammerwasseruntersuchung

Qualitative Betrachtung Kaum ein Zusammenhang war zwischen der PCR sowie der kulturellen Untersuchung des Glaskörpermaterials von Pferden mit ERU auf Leptospiren und dem Nachweis von Leptospirenantikörpern im Kammerwasser desselben Auges gegeben (Chi-Quadrat-Tests, Kontingenzkoeffizient). Für einen Nachweis von LeptospirendNA im Kammerwasser war lediglich ein signifikanter Zusammenhang mit dem Ergebnis des IgG-ELISAs derselben Probe erkennbar ($C = 0,651$; $p = 0,002$). Ein positives PCR-Resultat ging in 86% der Fälle mit einem negativen ELISA-Ergebnis für IgG einher. Umgekehrt war die PCR bei gleichzeitig nachweisbaren IgG-Antikörpern gegen Leptospiren stets negativ (100%). Diese Beobachtung spiegelte sich auch im Zusammenhang zwischen dem ELISA-Profil des Kammerwassers und dem PCR-Ergebnis derselben Probe wieder ($C = 0,677$; $p = 0,012$) (Abbildung 4.17).

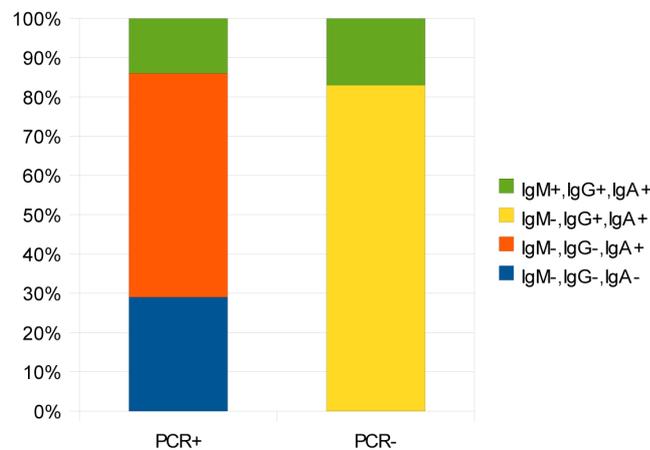


Abb. 4.17: Statistische Zusammenhänge zwischen dem Nachweis von Leptospiren-DNA im Kammerwasser von Pferden mit ERU und dem Nachweis der verschiedenen Immunglobulinklassen gegen Leptospiren in derselben Probe (n=13) („-“=negativ, „+“=positiv)

Quantitative Betrachtung Die Berechnung des Spearman'schen Rangkorrelationskoeffizienten ließ für den Extinktionswert von IgG ($\rho=0,478$) und IgA ($\rho=0,388$) im Kammerwasser zwar einen moderaten Zusammenhang zum direkten Erregernachweis im Glaskörper erkennen, der jedoch nicht signifikant war. Signifikante starke negative Korrelationen konnten allerdings für den PCR-Nachweis von Leptospiren im Kammerwasser und die Konzentrationen an spezifischem IgG ($\rho=-0,884$; $p<0,001$) sowie IgA ($\rho=-0,694$; $p=0,009$) beobachtet werden. Ein Leptospirennachweis mittels PCR war somit mit erniedrigten Gehalten an spezifischen Antikörpern beider Klassen im Kammerwasser assoziiert.

4.6 Antikörpernachweis gegen Leptospiren mittels ELISA in Serum und intraokularen Proben von Pferden mit ERU vergleichend

4.6.1 Serum und Glaskörper

48 Mal lagen sowohl für das Serum eines ERU-Patienten als auch das Glaskörpermaterial Extinktionswerte aus der ELISA-Untersuchung für einen Vergleich der Höhe der Antikörperkonzentrationen gegen Leptospiren vor. Für die Zusammenfassung in Tabelle 4.5 wurde für jedes Probenpaar die Differenz aus dem ELISA-Wert des Glaskörpers und dem des Serums gebildet. Für 62% (IgM), 31% (IgG) bzw. 17% (IgA) der Probenpaare war der Wert

im Serum größer und somit der Gehalt an spezifischen Antikörpern höher. In 27% (IgM), 40% (IgG) bzw. 23% (IgA) der Fälle unterschieden sich die Werte nicht. Für 11% (IgM), 29% (IgG) bzw. 60% (IgA) der Probenpaare war der Wert im Glaskörper größer, was einer höheren intraokularen Antikörperkonzentration gegen Leptospiren verglichen mit dem Begleitserum entsprach.

Tab. 4.5: Vergleich der Höhe der Antikörperkonzentrationen gegen Leptospiren für die einzelnen Immunglobulinklassen in Serum und Glaskörper von Pferden mit ERU ($n_{\text{Probenpaare}}=48$)

	IgM n	IgG n	IgA n
höhere Konzentration im Serum	30	15	8
Konzentrationen gleich	13	19	11
höhere Konzentration im GK	5	14	29

4.6.2 Serum und Kammerwasser

Ein Vergleich der ELISA-Werte für die Antikörperkonzentrationen gegen Leptospiren in Serum und Kammerwasser konnte für zehn Probenpaare vorgenommen werden. Bei 70% (IgM), 40% (IgG) bzw. 20% (IgA) der Paare war die Konzentration an Immunglobulinen im Serum höher. Bei 30% (IgM), 40% (IgG) bzw. 50% (IgA) wiesen die beiden Proben die gleiche Extinktion im ELISA auf, und bei 0% (IgM), 20% (IgG) bzw. 30% (IgA) der Fälle war der Wert im Kammerwasser höher. Eine Zusammenfassung der analog zum Glaskörper ausgewerteten Werte findet sich in Tabelle 4.6.

Tab. 4.6: Vergleich der Höhe der Antikörperkonzentrationen gegen Leptospiren für die einzelnen Immunglobulinklassen in Serum und Kammerwasser von Pferden mit ERU ($n_{\text{Probenpaare}}=10$)

	IgM n	IgG n	IgA n
höhere Konzentration im Serum	7	4	2
Konzentrationen gleich	3	4	5
höhere Konzentration im KW	0	2	3

4.7 Leptospirennachweise in Kammerwasser und Glaskörpermaterial von Pferden mit ERU vergleichend

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten von 11, 14 bzw. 12 Augen mit ERU sowohl das Kammerwasser als auch Glaskörpermaterial in der PCR auf Leptospiren-DNA und mittels MAR und ELISA auf spezifische Antikörper untersucht werden. Eine Übersicht über vorhandene und fehlende Übereinstimmungen der Testergebnisse aus den beiden okularen Kompartimenten stellt Tabelle 4.7 dar.

Tab. 4.7: Qualitative Übereinstimmung in Kammerwasser und Glaskörpermaterial desselben Auges von Pferden mit ERU bei Betrachtung der Resultate von MAR, ELISA und PCR beim Nachweis von Leptospirenantikörpern und Leptospiren-DNA

Labortest	n _{gesamt}	n _{KW+,GK+}	n _{KW-,GK-}	n _{KW+,GK-}	n _{KW-,GK+}
MAR	14	8	4	2	0
ELISA	12	8	2	2	0
PCR	11	0	4	6	1

4.7.1 MAR

MAR-Resultate der Kammerwasser- und Glaskörperuntersuchung auf Leptospirenantikörper lagen von 14 Pferdeaugen mit ERU vor. Acht Mal waren dabei in beiden Proben spezifische Antikörper nachweisbar (57%), vier Mal in keiner von beiden (29%). Zwei Mal konnten nur im Kammerwasser Antikörper detektiert werden (14%) (Tabelle 4.7). Somit stimmten die qualitativen Aussagen der MAR-Ergebnisse aus den beiden okularen Kompartimenten in 86% der Fälle überein. Dieselbe Titerstufe war dabei bei acht Probenpaaren nachweisbar (57%). Drei Mal lag eine Titerstufe dazwischen (21%), und in drei Fällen differierten die Ergebnisse stärker (21%).

4.7.2 ELISA

ELISA-Ergebnisse konnten nur für 12 Probenpaare ausgewertet werden, da bei zwei Kammerwasserproben vom Haustierarzt lediglich die MAR-Resultate vorlagen. Acht dieser Paare enthielten in beiden Proben mittels ELISA nachweisbare Leptospirenantikörper (67%). Zwei stimmten in ihrem negativen Ergebnis überein (17%). Zwei Mal konnten nur im Kammerwasser Antikörper detektiert werden (17%) (Tabelle 4.7). Dieselbe Kombination negativer und positiver Resultate für die einzelnen Immunglobulinklassen lieferten neun Probenpaare (75%). Drei unterschieden sich in ihrem ELISA-Profil (25%). Der quantitative

Nachweis von IgM ergab für neun Augen denselben Wert im Kammerwasser und Glaskörper (75%). Ein Mal lag eine (8%) und zwei Mal mehr als eine Wertstufe dazwischen (17%). Beim IgG-ELISA wurde 10 Mal eine vergleichbare Extinktion gemessen (84%). Je ein Mal lagen eine bzw. mehr Wertstufen dazwischen (8%). Der quantitative Nachweis von IgA ergab sieben Mal denselben Wert (58%). Vier Mal differierten die Werte in Kammerwasser und Glaskörper um eine (33%) und ein Mal um mehr als eine Stufe (8%).

4.7.3 PCR

PCR-Ergebnisse beider Proben lagen für elf Augen vor. Kammerwasser- und Glaskörperproben stimmten vier Mal in einem negativen Ergebnis überein (36%). Sechs Mal war Leptospiren-DNA nur im Kammerwasser nachweisbar (55%) sowie einmal nur im Glaskörper (9%) (Tabelle 4.7).

4.8 Übereinstimmung von MAR, ELISA, PCR und Kultur hinsichtlich positiver oder negativer Testergebnisse

4.8.1 Übereinstimmung von MAR und ELISA in Serum und intraokularen Proben von Pferden mit ERU

Die Überprüfung einer Übereinstimmung der MAR- und ELISA-Resultate (auch unter Differenzierung der einzelnen Immunglobulinklassen) im Serum von Pferden mit ERU mittels Cohens Kappa lieferte für die MAR und den Nachweis von IgM gegen Leptospiren mittels ELISA den höchsten Wert ($\kappa=0,409$; $p=0,004$), gefolgt von der MAR und dem Nachweis von spezifischem IgA ($\kappa=0,356$; $p=0,017$) sowie der MAR und dem Nachweis von spezifischem IgG ($\kappa=0,305$; $p=0,014$). Keine signifikante Übereinstimmung war bei der Betrachtung von MAR und ELISA ohne Immunglobulinunterscheidung erkennbar.

Die Berechnung von Kappa für das Kammerwasser ließ ebenfalls keine wesentliche Übereinstimmung für die MAR und die verschiedenen ELISA-Ergebnisse beobachten.

Hochsignifikante Übereinstimmungen dagegen erbrachte die Anwendung des statistischen Verfahrens bei den Glaskörperproben von Pferden mit ERU. Hierbei war Cohens Kappa für die MAR und den Nachweis von IgA gegen Leptospiren am höchsten ($\kappa=0,722$; $p<0,001$), was einer beträchtlichen Übereinstimmung entsprach. Ähnlich war der Wert für MAR und ELISA allgemein betrachtet ($\kappa=0,675$; $p<0,001$) sowie für die MAR und den Nachweis von IgG ($\kappa=0,628$; $p<0,001$). Eine ausreichende Übereinstimmung konnte für die MAR und den Nachweis von IgM ausgemacht werden ($\kappa=0,258$; $p=0,001$). Trotz der hohen Übereinstimmung

stimmung von MAR und IgA-ELISA im Glaskörper war bei drei der sieben nur im ELISA positiv reagierenden Ansätzen nur der Nachweis von spezifischem IgA erfolgreich (43%). Im Kammerwasser waren bei zwei von vier Proben, die in der MAR negativ, im ELISA hingegen positiv reagierten, nur IgA-Antikörper gegen Leptospiren detektierbar (50%).

Tabelle 4.8 stellt die Übereinstimmung zwischen MAR und ELISA (auch unter Differenzierung der einzelnen Immunglobulinklassen) bei der mikrobiologischen Untersuchung von Serum und intraokularen Proben von Pferden mit ERU dar.

Tab. 4.8: Übereinstimmung von MAR und ELISA (einschließlich Differenzierung der einzelnen Immunglobulinklassen) hinsichtlich positiver oder negativer Testergebnisse beim Nachweis von Leptospirenantikörpern in Serum und intraokularen Proben von Pferden mit ERU

Material	n	Labortests ¹	n _{beide+}	n _{beide-}	n _{MAR+ELISA-}	n _{MAR-ELISA+}
Serum	44	ELISA	30	1	0	13
		IgM	28	6	2	8
		IgG	29	4	1	10
		IgA	22	9	8	5
KW	14	ELISA	8	1	1	4
		IgM	1	4	8	1
		IgG	6	3	3	2
		IgA	8	1	1	4
GK	80	ELISA	61	11	1	7
		IgM	27	18	35	0
		IgG	55	14	7	4
		IgA	61	12	1	6

¹) jeweils in Kombination mit MAR

4.8.2 Übereinstimmung von MAR bzw. ELISA und PCR in intraokularen Proben von Pferden mit ERU

Eine schlechte, nicht signifikante Übereinstimmung war beim Kammerwasser für die Ergebnisse von MAR bzw. ELISA und PCR zu erkennen. Höchstsignifikant (jeweils $p < 0,001$) hingegen waren die Ergebnisse für die Untersuchung des Glaskörpermaterials. Die Übereinstimmung zwischen MAR und PCR war moderat ($\kappa = 0,513$), die zwischen ELISA und PCR gering ($\kappa = 0,375$). Insgesamt waren in den intraokularen Proben häufiger Leptospirenantikörper als deren DNA nachweisbar.

Tabelle 4.9 veranschaulicht die Übereinstimmung zwischen MAR bzw. ELISA und PCR bei der mikrobiologischen Untersuchung intraokularer Proben von Pferden mit ERU auf

Leptospiren und spezifische Antikörper.

Tab. 4.9: Übereinstimmung von MAR bzw. ELISA und PCR hinsichtlich positiver oder negativer Testergebnisse beim Nachweis einer intraokularen Leptospireninfektion bei Pferden mit ERU

Material	n	Labortests ¹	n _{beide+}	n _{beide-}	n _{nurPCR+}	n _{nurPCR-}
KW	13	MAR	3	1	4	5
		ELISA	5	0	2	6
GK	79	MAR	46	16	2	15
		ELISA	47	11	1	20

¹) jeweils in Kombination mit PCR

4.8.3 Übereinstimmung von MAR, ELISA bzw. PCR und Kultur in Glaskörperproben von Pferden mit ERU

Die Übereinstimmung zwischen dem MAR- und Kulturergebnis in den Glaskörperproben von Pferden mit ERU war ausreichend ($\kappa=0,244$; $p=0,038$), zwischen dem Resultat der ELISA-Untersuchung und dem der Kultur schwach und nicht signifikant ($\kappa=0,157$; $p=0,104$). Die Berechnung von Cohens Kappa für die beiden direkten Nachweisverfahren PCR und Kultur lieferte eine moderate Übereinstimmung ($\kappa=0,475$; $p=0,002$). Eine Untersuchung der Glaskörperproben mittels MAR, ELISA oder PCR fiel im Falle einer erfolgreichen Erregerisolierung in der Kultur nie negativ aus.

Tabelle 4.10 veranschaulicht die Übereinstimmung zwischen MAR, ELISA bzw. PCR und Kultur bei der mikrobiologischen Untersuchung von Glaskörperproben von Pferden mit ERU auf Leptospiren und spezifische Antikörper.

Tab. 4.10: Übereinstimmung von MAR, ELISA bzw. PCR und Kultur hinsichtlich positiver oder negativer Testergebnisse beim Nachweis einer intraokularen Leptospireninfektion bei Pferden mit ERU

Material	n	Labortests ¹	n _{beide+}	n _{beide-}	n _{nurKultur+}	n _{nurKultur-}
GK	31	MAR	7	10	0	14
		ELISA	7	7	0	17
		PCR	7	16	0	8

¹) jeweils in Kombination mit Kultur

4.8.4 Sensitivität und Spezifität des ELISAs gemessen am Goldstandard MAR

Die Bestimmung von Sensitivität und Spezifität der ELISA-Technik bei der Untersuchung der Glaskörperproben von Pferden mit ERU ¹⁴ mit der oftmals in der Literatur als Goldstandard bezeichneten MAR als Referenzpunkt ergab für die diagnostische Sensitivität 98% und für die Spezifität 61%.

4.8.5 Positiver und negativer prädiktiver Wert des ELISAs gemessen am Goldstandard MAR

Analog zu Sensitivität und Spezifität wurden positiver und negativer prädiktiver Wert berechnet. Der positive prädiktive Wert ergab 90% und der negative 92%.

4.9 Übereinstimmung der klinischen Diagnose „ERU“ mit den Leptospirennachweisen im Glaskörper

66 Augen waren präoperativ anhand typischer ophthalmologischer Veränderungen als eindeutig unter ERU leidend eingestuft worden. Ergebnisse einer Überprüfung der Übereinstimmung mikrobiologischer Untersuchungen des bei der Vitrektomie gewonnenen Glaskörpermaterials auf Leptospirenbeteiligung mit der davor gestellten klinischen Diagnose werden in den Tabellen 4.11 und 4.12 zusammengefasst.

Tab. 4.11: Prozentualer Anteil positiver Ergebnisse beim Nachweis von Leptospirenantikörpern sowie von Leptospiren-DNA im Glaskörpermaterial von Pferden mit ERU in Abhängigkeit von der Eindeutigkeit des klinischen Bildes (n=80 bzw. 79) („KW+“=positiver mikrobiologischer Untersuchungsbefund des KWs)

Eindeutigkeit des klinischen Bildes	MAR	ELISA	PCR
klinisch ERU	82%	86%	72%
klinisch nicht eindeutig ERU, aber KW+	57%	79%	7%

¹⁴in diesem Fall einschließlich derer mit bereits vorab mittels Kammerwasseruntersuchung bestätigtem Leptospirenbefall

Tab. 4.12: Prozentualer Anteil positiver Ergebnisse beim Nachweis von IgM, IgG und IgA gegen Leptospiren im Glaskörpermaterial von Pferden mit ERU in Abhängigkeit von der Eindeutigkeit des klinischen Bildes (n=80) („KW+“=positiver mikrobiologischer Untersuchungsbefund des KWs)

Eindeutigkeit des klinischen Bildes	IgM-ELISA	IgG-ELISA	IgA-ELISA
klinisch ERU	39%	80%	86%
klinisch nicht eindeutig ERU, aber KW+	7%	43%	71%

So resultierten 86% der klinisch eindeutigen Fälle in einem positiven Antikörpernachweis gegen Leptospiren mittels ELISA. Bei Anwendung der MAR reagierten 82% der Ansätze von eindeutig unter ERU leidenden Augen positiv. In 72% der Proben konnte Leptospiren-DNA nachgewiesen werden. Bei Betrachtung des Nachweises der einzelnen Immunglobulinklassen war auffällig, dass in allen 57 im ELISA positiv reagierenden Ansätzen IgA-Antikörper gegen Leptospiren enthalten waren, in 53 zusätzlich IgG-Antikörper und in 26 Proben auch solche der Klasse M. Prozentual gesehen reagierten 86% der Proben von Pferden mit klinisch eindeutiger ERU im IgA-ELISA positiv, 80% im IgG-ELISA und 39% im IgM-ELISA.

4.9.1 Diagnostische Sensitivität und Spezifität

In die Berechnung der diagnostischen Sensitivität und Spezifität der einzelnen Testverfahren wurden lediglich die Patienten einbezogen, bei denen eine Leptospirenbeteiligung am Krankheitsbild nicht schon zuvor mittels Kammerwasseruntersuchung bestätigt worden war. Somit erfolgte die Berechnung für die 66 (MAR und ELISA) bzw. 65 (PCR) Proben der Pferde mit klinisch eindeutiger ERU sowie die 42 Proben der augengesunden Kontrolltiere. Für die MAR errechnete sich dabei eine Sensitivität von 82% bei einer Spezifität von 91%, für den ELISA eine Sensitivität von 86% und eine Spezifität von 100% und für die PCR eine Sensitivität von 72% bei einer Spezifität von ebenfalls 100%. Die Betrachtung der einzelnen Immunglobulinklassen im ELISA ergab für IgM eine Sensitivität von 39%, für IgG eine Sensitivität von 80% und für IgA eine Sensitivität von 86%. Die Spezifität betrug jeweils 100% (Tabelle 4.13).

Tab. 4.13: Diagnostische Sensitivität und Spezifität von MAR, ELISA (einschließlich Differenzierung von IgM, IgG und IgA) und PCR beim Nachweis von Leptospirenantikörpern sowie von Leptospiren-DNA im Glaskörper von Pferden mit eindeutiger ERU und augengesunden Kontrolltieren gemessen am klinischen Bild ($n_{\text{ERU-Pferde}}=66$ bzw. 65, $n_{\text{Kontrolltiere}}=42$)

Labortest	Sensitivität	Spezifität
MAR	82%	91%
ELISA	86%	100%
PCR	72%	100%
IgM-ELISA	39%	100%
IgG-ELISA	80%	100%
IgA-ELISA	86%	100%

4.9.2 Positiver und negativer prädiktiver Wert

Die Berechnung der prädiktiven Werte für dieselbe Auswahl an Tieren ergab für die MAR einen positiven prädiktiven Wert von 93% und einen negativen von 76% und für die Anwendung der ELISA-Technik einen positiven prädiktiven Wert von 100% und einen negativen prädiktiven Wert von 82%. Der positive prädiktive Wert für die PCR wurde mit 100% berechnet und der negative prädiktive Wert mit 70%. Beim Nachweis der einzelnen Immunglobulinklassen mittels ELISA war für IgM der positive prädiktive Wert 100% und der negative 51%, für IgG 100% und 79% sowie für IgA 100% und 82% (Tabelle 4.14).

Tab. 4.14: Positiver und negativer prädiktiver Wert von MAR, ELISA (einschließlich Differenzierung von IgM, IgG und IgA) und PCR beim Nachweis von Leptospirenantikörpern sowie von Leptospiren-DNA im Glaskörper von Pferden mit eindeutiger ERU und augengesunden Kontrolltieren gemessen am klinischen Bild ($n_{\text{ERU-Pferde}}=66$ bzw. 65, $n_{\text{Kontrolltiere}}=42$)

Labortest	positiver prädiktiver Wert	negativer prädiktiver Wert
MAR	93%	76%
ELISA	100%	82%
PCR	100%	70%
IgM-ELISA	100%	51%
IgG-ELISA	100%	79%
IgA-ELISA	100%	82%

4.10 Auswertung der ELISA-Ergebnisse von 2005–2007

Von insgesamt 258 intraokularen Proben, in denen mittels MAR keine spezifischen Antikörper gegen Leptospiren nachweisbar waren, lieferten 95 (37%) bei Anwendung der ELISA-Technik im Anschluss ein positives Ergebnis und 163 (63%) blieben negativ. 22 Kammerwasserproben wurden von ophthalmoskopisch unauffälligen Augen auf Besitzerwunsch mittels Parazentese gewonnen und anschließend mikrobiologisch untersucht. Von diesen Proben lieferte nur eine im ELISA ein positives Resultat. Unter den positiven ELISA-Resultaten waren 51 Glaskörper- und 44 Kammerwasserproben.

Von den 95 Proben, in denen mittels ELISA-Technik Antikörper gegen Leptospiren nachweisbar waren, reagierten bis auf eine Kammerwasserprobe (nur IgG-Antikörper) alle Ansätze in der Untersuchung auf spezifisches IgA positiv. Davon waren in 60 (63%) Proben ausschließlich IgA-Antikörper gegen Leptospiren nachweisbar. 33 (35%) Ansätze enthielten sowohl spezifische IgG- als auch IgA-Antikörper und einer sogar Antikörper aller drei untersuchten Immunglobulinklassen (Glaskörperprobe). Betrachtet man ausschließlich die Untersuchung der 149 Kammerwasserproben, lieferten 105 Ansätze ein negatives Ergebnis (70%). Unter den 30% positiven Ansätzen waren 30 Mal (68%) nur IgA-Antikörper, 13 Mal (30%) IgG- und IgA-Antikörper und 1 Mal (2%) nur IgG-Antikörper gegen Leptospiren mittels ELISA detektierbar.

4.11 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

1. Bei der Untersuchung der Seren von Pferden mit ERU sowie augengesunden Kontrolltieren auf Leptospirenantikörper waren zwischen den beiden Gruppen für die Anwendung der ELISA-Technik im Gegensatz zur MAR signifikante Unterschiede vor allem hinsichtlich der Qualität der humoralen Immunantwort erkennbar.
2. Die Untersuchung intraokularer Proben von ERU-Pferden sowie augengesunden Kontrolltieren auf Leptospiren und deren Antikörper lieferte jeweils signifikante Unterschiede. Bei Anwendung des ELISAs und der PCR reagierten alle Ansätze der Kontrollgruppe negativ. In den Proben der Patienten waren mittels ELISA am häufigsten Immunglobuline der Klasse A gegen Leptospiren nachweisbar.
3. Beide Patienten, die vor Vorstellung in der Klinik ein Ciclosporin A-Implantat erhalten hatten, zeigten bei der Eingangsuntersuchung Anzeichen einer akuten Uveitisepisode. In der Glaskörperprobe eines der beiden Pferde konnten ein hoher Gehalt an spezifischen Antikörpern mittels MAR und ELISA sowie Leptospiren und deren

DNA mittels Kultur und PCR nachgewiesen werden.

4. Während zwischen den ELISA-Ergebnissen des Serums von ERU-Pferden und dem Patientenvorbericht keine signifikanten statistischen Zusammenhänge feststellbar waren, war IgA gegen Leptospiren im Glaskörper signifikant häufiger nachweisbar und der Gehalt an spezifischem IgG signifikant höher, wenn der letzte Schub einer inneren Augenentzündung erst maximal einen halben Monat zurücklag. Im Kammerwasser waren signifikante statistische Beziehungen zwischen einer höheren Konzentration an IgG und IgA gegen Leptospiren und einer geringen Schubanzahl sowie einer kurzen Krankheitsdauer erkennbar.
5. Die Ergebnisse der PCR-Untersuchung des Glaskörpermaterials von ERU-Pferden standen in keinem signifikanten statistischen Zusammenhang zum Patientenvorbericht. Jedoch korrelierte eine Anzahl von mehr als zwei aufgetretenen Uveitisepisoden signifikant mit dem Nachweis von Leptospiren-DNA im Kammerwasser.
6. Im Serum korrelierte ein eindeutiges klinisches Bild im Sinne der ERU mit einem positiven IgG-Resultat gegen Leptospiren sowie erhöhten Gehalten an IgM und IgG. Bei der Glaskörperuntersuchung war eine signifikante Korrelation zwischen typischen Anzeichen einer ERU und dem Nachweis von IgM und IgG sowie dem Antikörpergehalt gegen Leptospiren zu beobachten. Des Weiteren war ein höherer Grad an ophthalmologischen Veränderungen sowie eine Manifestation der ERU als hintere oder Panuveitis signifikant mit einem höheren Prozentsatz positiver ELISA-Ergebnisse (insbesondere für IgG und IgA) und darüber hinaus mit einer höheren Immunglobulinkonzentration im Glaskörper assoziiert. Für die ELISA-Resultate des Kammerwassers hingegen waren keine signifikanten Korrelationen mit den Augenbefunden erkennbar.
7. Während für die Kammerwasseruntersuchung mittels PCR keine signifikanten Korrelationen mit dem klinischen Bild erkennbar waren, korrelierte der Nachweis von Leptospiren-DNA im Glaskörpermaterial der ERU-Pferde signifikant mit eindeutigen ophthalmologischen Befunden im Sinne der ERU, mittelgradigen Augenveränderungen sowie einer Manifestation der Erkrankung als hintere Uveitis.
8. Während die Untersuchung der Seren und Kammerwasserproben von Pferden mit ERU mittels ELISA-Technik keine signifikanten statistischen Zusammenhänge mit den makroskopischen Veränderungen des Glaskörpers zeigten, waren die Korrelationen für die Ergebnisse der Glaskörperuntersuchung signifikant positiv.

9. Der direkte Leptospirennachweis mittels PCR gelang am häufigsten in Pferdeaugen mit mittelgradigen Glaskörperveränderungen. Für die Untersuchung der Kammerwasserproben hingegen konnten keine signifikanten statistischen Zusammenhänge beobachtet werden.
10. Im Serum der ERU-Pferde stimmten MAR und ELISA in 70% der Ansätze in einem positiven oder negativen Ergebnis überein. Im Glaskörper waren dies 90% und im Kammerwasser 64%. Waren Leptospirenantikörper nur in einem der beiden indirekten Testverfahren nachweisbar, so war dies in den meisten Fällen die Untersuchung mittels ELISA. Im Serum waren in diesen Fällen am häufigsten IgG- und in den intraokularen Proben IgA-Antikörper detektierbar. Bei der quantitativen Betrachtung war im Serum die Korrelation zwischen dem MAR-Titer und dem Gehalt an IgM, im Glaskörper zwischen dem MAR-Titer und dem IgG-Gehalt und im Kammerwasser zwischen dem MAR-Titer und der Konzentration an IgA gegen Leptospiren am stärksten.
11. Der direkte Leptospirennachweis in Glaskörpermaterial von Pferden mit ERU mittels Kultur war signifikant mit einer erniedrigten Konzentration an spezifischem IgM und IgA im Serum der Patienten assoziiert. Ein positives PCR-Resultat im Glaskörper korrelierte signifikant mit dem Nachweis sowie dem Gehalt aller drei Immunglobulin-klassen gegen Leptospiren in derselben Probe. Ebenso signifikant war der Zusammenhang zwischen einer Erregerisolierung und einer höheren Antikörperkonzentration im Glaskörper. Im Kammerwasser war der direkte Leptospirennachweis mit erniedrigten Gehalten an spezifischem IgG und IgA oder gar einem negativen Resultat des IgG-ELISAs assoziiert.
12. Beim Vergleich der Antikörpergehalte gegen Leptospiren in Serum und intraokularen Proben der ERU-Patienten war bei bis zu 60% der Probenpaare (IgA im Glaskörper) die Konzentration im Auge höher als im Serum.
13. Mittels MAR wurde in 86% der Glaskörper- und Kammerwasserprobenpaare das gleiche positive oder negative Ergebnis ermittelt, mittels ELISA waren es 84% und mittels PCR 36%. Mehr positive Resultate lieferte jeweils die Untersuchung des Kammerwassers.
14. Im Serum der ERU-Pferde war die höchste Übereinstimmung zwischen dem MAR-Ergebnis und dem Nachweis von IgM gegen Leptospiren und im Glaskörpermaterial zwischen dem MAR-Ergebnis und dem Nachweis von IgA zu erkennen. Für die Untersuchung des Kammerwassers ließen sich keine bedeutenden Übereinstimmungen

der beiden indirekten Nachweisverfahren sowie MAR bzw. ELISA und PCR beobachten. Im Glaskörper war die Übereinstimmung der Antikörpernachweise mit der PCR oder Kultur gering bis moderat. Die beiden direkten Erregernachweise stimmten bei der Untersuchung von Glaskörpermaterial moderat überein. Insgesamt waren in den intraokularen Proben häufiger Leptospirenantikörper als deren DNA oder vitale Bakterien nachweisbar.

15. Gemessen am Goldstandard MAR errechnete sich für den ELISA eine diagnostische Sensitivität von 98%, eine Spezifität von 61%, ein positiver prädiktiver Wert von 90% und ein negativer prädiktiver Wert von 92% für die Untersuchung der Glaskörperproben von Pferden mit ERU.
16. Die höchste Übereinstimmung mit dem eindeutigen klinischen Bild der ERU wies die Anwendung der ELISA-Technik auf (Nachweis von IgA). Ebenso wurden für das Testverfahren verglichen mit MAR und PCR die höchste Sensitivität (86%) und Spezifität (100%) sowie die höchsten prädiktiven Werte für eine Untersuchung der Glaskörperproben von Pferden mit eindeutiger ERU und augengesunden Kontrolltieren berechnet.
17. 37% der intraokularen Proben aus den Jahren 2005–2007, in denen mittels MAR keine Antikörper gegen Leptospiren nachweisbar waren, reagierten im daraufhin durchgeführten ELISA positiv. Bis auf einen dieser Ansätze enthielten alle spezifisches IgA. In 63% der Fälle gelang ausschließlich der Nachweis von IgA.

5 Diskussion

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand der Versuch, die systemische und lokale humorale Immunantwort von an ERU erkrankten Pferden auf die Leptospirenpersistenz im Auge zu charakterisieren, um weitere Hinweise auf die bisher unzureichend geklärte Pathogenese der Erkrankung zu erhalten. Da Antikörper der verschiedenen Immunglobulinklassen sich als wertvoll und geeignet zur Beurteilung bestehender und/oder abgelaufener Infektionsereignisse erwiesen hatten (BECKER et al., 2003) und zudem von den unterschiedlichen Komponenten des Immunsystems die am leichtesten zugängliche Information über die Reaktion des Wirtes darstellen (KAEBERLE, 1973), erhoffte man, durch Untersuchungen von Seren und intraokularen Proben der betroffenen Pferde mittels ELISA Erkenntnisse über die Kinetik der Antikörperproduktion zu gewinnen.

Obwohl bereits einige Autoren die lokale Immunantwort von ERU-Pferden auf Leptospiren mittels MAR untersucht sowie andere sich einer Analyse der systemischen Antikörperproduktion betroffener Tiere gewidmet hatten, liegen bisher kaum Daten zum Nachweis intraokularer Antikörper gegen Leptospiren mittels ELISA-Technik bei Pferden mit ERU vor¹. Darüber hinaus ließen einzelne Voruntersuchungen der Klinik für Pferde der LMU erwarten, dass die ELISA-Technik und insbesondere der Nachweis von IgA gegen Leptospiren sehr sensitiv für die Diagnose der leptospirenbedingten Uveitis bei Pferden ist.

Daher war Hauptaspekt der Studie, klinische Parameter zu erfassen und Leptospirennachweise in Serum, Glaskörpermaterial und Kammerwasser von Pferden mit ERU sowie von augengesunden Tieren durchzuführen. Eine Analyse und Evaluierung der Testmethoden konzentrierte sich auf den Nachweis der einzelnen Immunglobulinklassen (IgM, IgG und IgA) gegen Leptospiren mittels ELISA. Eine Optimierung der Vorgehensweise bei der Durchführung diagnostischer Kammerwasseruntersuchungen bei Pferden mit unklaren ophthalmologischen Befunden im Sinne der ERU zu erarbeiten, war ebenfalls Bestandteil der Aufgabenstellung.

Anmerkung: Bisher wurde in der Klinik für Pferde der LMU München bei einer Untersuchung von Kammerwasserproben aus klinisch nicht eindeutig unter ERU leidenden Augen

¹siehe Tabelle 2.2 auf Seite 35

zur Abklärung der Ätiologie der beobachteten Augenveränderungen wie folgt verfahren:

- Untersuchung der Kammerwasserprobe mittels PCR auf Leptospiren-DNA (Erkennung einer 16S-rDNA Gensequenz von *Leptospira interrogans* bzw. des LipL32 Gens pathogener Leptospiren²) sowie zeitgleich
- Untersuchung mittels MAR auf Leptospirenantikörper der Serovare Bratislava, Canicola, Copenhageni, Grippotyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Pomona, Pyrogenes, Saxkoebing, Sejroe und Tarassovi³
- Bei negativem Testergebnis der MAR: Durchführung eines ELISAs auf Leptospirenantikörper der Klassen M, G und A der Serovare Bratislava und Grippotyphosa⁴

5.1 Leptospirennachweise bei Pferden mit ERU und augengesunden Kontrolltieren

5.1.1 Antikörper gegen Leptospiren in Serumproben

Die Anwendung der MAR zur Untersuchung von Serumproben ERU-kranker und augengesunder Pferde auf Leptospirenantikörper lieferte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen, wenn auch die Seren der Augenpatienten geringfügig häufiger sowie höhere Antikörpertiter gegen Leptospiren enthielten. Das Untersuchungsergebnis stimmt mit den Beobachtungen anderer Autoren überein, die ebenfalls keine signifikanten Unterschiede ausmachen konnten (WOLLANKE et al., 1998; WOLLANKE, 2002; GESELL, 2004; WOLLANKE et al., 2004b). Zudem zeigt es, dass sich viele (auch augengesunde) Pferde mit Leptospiren auseinandersetzen (HATHAWAY et al., 1981).

Jedoch lagen bisher keine Publikationen zu vergleichenden Serumuntersuchungen von Pferden mit ERU und augengesunden Tieren mittels ELISA auf IgM, IgG und IgA gegen Leptospiren vor. Der Vergleich der Prozentsätze positiver Resultate im ELISA erbrachte einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen, da die Proben kranker Tiere mit 98% weitaus häufiger detektierbare Leptospirenantikörper enthielten als die der gesunden Pferde (73%). Höchstsignifikant war die Differenz auch bei Betrachtung des ELISA-Profiles im Serum. So waren alle drei Immunglobulinklassen zugleich nur bei Pferden mit ERU nachweisbar. Damit erscheint die ELISA-Technik zur Unterscheidung augengesunder von

²siehe Kapitel 3.5.3 auf Seite 52

³siehe Kapitel 3.5.1 auf Seite 50

⁴siehe auch Kapitel 3.5.2 auf Seite 50

an ERU erkrankten Pferden hinsichtlich einer systemischen Antikörperproduktion gegen Leptospiren zumindest geeigneter als die MAR.

Interessant ist auch, dass unter den Uveitispatienten weitaus häufiger und höhere Gehalte an IgG gegen Leptospiren im Serum nachgewiesen werden konnten als in der Kontrollgruppe, deren Seren ja ebenfalls Antikörper gegen Leptospiren enthielten und somit auch von einer zurückliegenden Infektion mit dem Erreger zeugten. Möglicherweise ist daher die spezifische systemische Immunantwort gegenüber Leptospiren mit der Pathogenese der ERU assoziiert.

Am häufigsten waren bei Betrachtung beider Gruppen IgM-Antikörper gegen Leptospiren im Serum nachweisbar. Von einer Persistenz von IgM-Antikörpern nach einer Leptospireninfektion beim Menschen wurde von einigen Autoren berichtet, ohne dass sich jedoch eine Ursache für das Phänomen finden ließ (CHERNUKHA et al., 1976; ADLER und FAINE, 1978; MILNER et al., 1985; TERPSTRA et al., 1985; LUPIDI et al., 1991; SILVA et al., 1995; WINSLOW et al., 1997). Da sich das klinische Bild der ERU häufig ebenfalls erst 12 bis 24 Monate nach einer Leptospirämie zeigt (ROBERTS, 1958; SLATTER, 2001), ist auch bei den betroffenen Tieren von einer zeitlich weit zurückliegenden Leptospireninfektion auszugehen. Somit erscheint eine Persistenz von Immunglobulinen der Klasse M beim Pferd ebenfalls denkbar, zumal Leptospirentiter im Blut über mehr als sieben Jahre nach einer Infektion nachgewiesen werden können (SWART et al., 1982).

Eignung der Serumuntersuchung mittels ELISA als „Screening“

Anders als die MAR, die sich sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch in früheren Studien als kaum bedeutend für eine Klärung der Ätiologie bei Pferden mit Uveitis im Rahmen von Serumuntersuchungen auf Leptospirenantikörper erwies (WOLLANKE et al., 2001; WOLLANKE, 2002), erscheint die Eignung der ELISA-Technik für eine Absicherung klinischer Verdachtsdiagnosen zumindest diskussionswürdig. Insbesondere könnte der Nachweis von Immunglobulinen der Klasse G oder das Vorkommen von Antikörpern aller drei Isotypen im Serum auf eine Leptospirenbedingtheit der Augenveränderungen hinweisen. Allerdings liegen derzeit nur die Resultate von 44 Seren ERU-kranker sowie 22 Seren augengesunder Pferde vor. Eine Studie in größerem Umfang ließe möglicherweise zuverlässigere Aussagen zu. In Frage kommen könnte die Serumuntersuchung auf Leptospirenantikörper mittels ELISA für Pferde, deren Besitzer einen Transport ihres Tieres sowie einen Klinikaufenthalt und den chirurgischen Eingriff in Vollnarkose bei der für eine Kammerwasseruntersuchung notwendigen Parazentese vorerst vermeiden wollen.

5.1.2 Antikörper gegen Leptospiren in Glaskörperproben

Wie bereits in der Literatur beschrieben (WOLLANKE, 2002; GESELL, 2004; WOLLANKE et al., 2004b) waren bei Betrachtung des Antikörpernachweises mittels MAR im Glaskörpermaterial höchstsignifikante Unterschiede zwischen unter ERU leidenden (78% positive Ergebnisse) und gesunden Pferden (10% positive Ergebnisse) erkennbar. Der Prozentsatz positiver Resultate unter den augengesunden Pferden war jedoch geringfügig höher als in anderen Untersuchungen (0% (WOLLANKE et al., 1998), 0,6% (GESELL, 2004), 5% (WOLLANKE et al., 2001) bzw. 6% (WOLLANKE, 2002)). WOLLANKE und Mitarbeiter hielten es für denkbar, dass sich auch bei diesen Tieren eines Tages eine leptospirenbedingte Uveitis entwickeln hätte können (WOLLANKE et al., 2001). Eine Nachverfolgung der betroffenen Augen war aufgrund der Euthanasie der Pferde vor der Probennahme jedoch nicht möglich.

Bei der Untersuchung des Glaskörpermaterials mittels ELISA-Technik war die Differenz zwischen den beiden Gruppen ebenfalls höchstsignifikant. So reagierten die Proben aus Pferdeaugen mit ERU in 85% der Fälle positiv. Auffällig war jedoch, dass im Gegensatz zur MAR keine Probe aus einem klinisch unauffälligen Auge mittels ELISA nachweisbare Antikörper gegen Leptospiren enthielt. GESELL (2004) hingegen konnte in seiner Arbeit bei einem augengesunden Pferd sowohl in der MAR als auch mittels ELISA Antikörper gegen den Erreger nachweisen. Bei der ELISA-Untersuchung war in der vorliegenden Arbeit spezifisches IgA mit 84% die am häufigsten nachweisbare Immunglobulinklasse und in 11% der Fälle alleinig detektierbar. Dies lässt die Vermutung zu, dass der Nachweis von IgA tatsächlich, wie Voruntersuchungen der Klinik für Pferde bereits annehmen ließen, besonders sensitiv für eine intraokulare Leptospireninfektion ist.

(Im Verlauf der Diskussion wird noch näher auf die Rolle von IgA⁵ sowie die Evaluierung einzelner Labortests⁶ bei der intraokularen Leptospirendiagnostik eingegangen.)

14% der Glaskörperproben von ERU-Pferden enthielten weder mittels MAR noch mittels ELISA nachweisbare Leptospirenantikörper. Das Ergebnis stimmt mit den Untersuchungen anderer Autoren überein, die ebenfalls nicht in allen Ansätzen von unter Uveitis leidenden Pferden Antikörper gegen Leptospiren detektieren konnten (WOLLANKE et al., 1998, 2001; WOLLANKE, 2002; WOLLANKE et al., 2004b; BRANDES et al., 2007). WOLLANKE und Mitarbeiter vermuteten, dass auch andere Erreger als Leptospiren und weitere Faktoren an der Entstehung der ERU beteiligt sein könnten (WOLLANKE et al., 1998). Zudem könnte es sich in den betroffenen Fällen um ein rein autoimmunes Geschehen

⁵siehe Kapitel 5.7 auf Seite 125

⁶siehe Kapitel 5.5.2 auf Seite 123 und 5.6 auf Seite 124

handeln, einen Ansatz, den andere Arbeitsgruppen favorisierten (GILGER et al., 2008).

5.1.3 PCR-Nachweis und kulturelle Isolierung von Leptospiren aus Glaskörpermaterial

In 61% der Glaskörperproben an ERU erkrankter Pferde konnte Leptospiren-DNA nachgewiesen werden. Der Unterschied zur Kontrollgruppe, bei der kein einziger Ansatz positiv in der PCR reagierte, war wiederum höchstsignifikant. Andere Autoren konnten in Augen von Pferden mit ERU von 70 bis 100% positiven PCR-Ergebnissen berichten (FABER et al., 2000; WOLLANKE, 2002; WOLLANKE et al., 2004b; BRANDES et al., 2007). Bei ROCZEK (2008) gelang der Erregernachweis auch ausschließlich in Proben aus an ERU erkrankten Pferdeaugen. FABER und Mitarbeiter sowie GESELL hingegen konnten jeweils in 6% der intraokularen Proben gesunder Pferde Leptospirennukleinsäure nachweisen (FABER et al., 2000; GESELL, 2004). Die Berichte über Prozentsätze positiver PCR- sowie MAR-Resultate auf Leptospiren und deren Antikörper in gesunden Pferdeaugen aus verschiedenen Studien spiegeln in etwa die Prävalenz der ERU wieder (GESELL, 2004; WOLLANKE et al., 2004b).

In der vorliegenden Arbeit gelang die Isolierung von Leptospiren aus 23% der Glaskörperproben ERU-kranker Pferde. In der neueren Literatur erstreckten sich die Angaben zu positiven Kulturergebnissen von 29% (FABER et al., 2000) bis 75% (BRANDES et al., 2007).

Die entscheidende Rolle der Leptospiren in der Ätiologie und Pathogenese der ERU wird mit dem frequenten direkten Erregernachweis in Material aus erkrankten Pferdeaugen weiter untermauert. Der vermehrte Einsatz der PCR als Nachweismethode für eine Leptospireninfektion im Auge könnte sogar zum besseren Verständnis der ERU beitragen (SLATTER, 2001). Schwerpunktmäßig wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch auf den Nachweis gegen Leptospiren gerichteter Antikörper mittels ELISA eingegangen. Eine ausführlichere Studie zur Dynamik des direkten Erregernachweises in Relation zum Patientenvorbericht und den ophthalmologischen Befunden könnte jedoch zur Klärung der Pathogenese bei der leptospirenbedingten Uveitis des Pferdes beitragen. Zu beachten gilt allerdings, dass auch abgetötete Bakterien noch zu einem positiven PCR-Ergebnis führen können. Die Kultur wiederum erscheint aufgrund ihrer geringen Sensitivität weniger geeignet (FAINE, 1982; ELLIS, 1986; BREM et al., 1988a).

5.1.4 Antikörper gegen Leptospiren im Kammerwasser

Antikörper gegen Leptospiren im Kammerwasser waren in der vorliegenden Arbeit wiederum sowohl in der MAR als auch mittels ELISA-Technik nachweisbar. Ansätze aus den vorberichtlich und klinisch gesunden Augen der Kontrollpferde reagierten in keiner der beiden Testmethoden positiv. 19% der Kammerwasserproben aus dem unauffälligen anderen Auge von Tieren mit einseitiger ERU enthielten hingegen Leptospirenantikörper, die mittels beider indirekter Nachweisverfahren detektierbar waren. Während also eine Vorsorgeuntersuchung angesichts der Narkoserisiken und Infektionsgefahren für das Auge bei vorberichtlich und ophthalmoskopisch beidseits gesunden Pferdeaugen nicht sinnvoll erscheint (GESELL, 2004), kann die diagnostische Parazentese bei Tieren mit einseitiger ERU während der zur Vitrektomie ohnehin erforderlichen Vollnarkose durchaus in Erwägung gezogen werden. Auch bei GESELL gelang der Nachweis von Leptospirenantikörpern mittels MAR und ELISA in der Kammerwasserprobe eines klinisch unauffälligen Auges. Das Pferd litt jedoch am anderen Auge bereits an rezidivierender Uveitis (GESELL, 2004).

Die Handlungskonsequenzen bei einer positiven mikrobiologischen Untersuchung des Kammerwassers aus vorberichtlich und klinisch gesunden Pferdeaugen sollten ebenfalls sorgfältig durchdacht werden. So muss abgewogen werden, ob sofort eine Glaskörperentfernung und -spülung mit den damit verbundenen Narkoserisiken und der Infektionsgefahr für das Auge durchgeführt werden soll, oder ob eine aufmerksame Beobachtung des Auges durch den Besitzer sowie eine regelmäßige ophthalmoskopische Untersuchung durch den Haustierarzt mit der Gefahr des Auftretens eines schweren, unter Umständen das Augenlicht gefährdenden Uveitisschubes ratsam erscheint. Derzeit liegen keine ausführlichen Publikationen über Folgen eines positiven Kammerwasserbefundes ohne anschließende Vitrektomie für das betroffene, klinisch ansonsten unauffällige Pferdeauge vor. Auch die Patienten der vorliegenden Arbeit mit positiver Untersuchung auf Leptospirenantikörper und -DNA wurden kurze Zeit später einer Vitrektomie unterzogen und standen nicht für eine weitere Beobachtung im Hinblick auf eine möglicherweise später einsetzende innere Augenzündung zur Verfügung. GESELL (2004) konnte die Entwicklung des betroffenen, augengesunden Pferdes aus seiner Studie mit positivem mikrobiologischen Kammerwasserbefund bis ein Jahr nach der Parazentese nachverfolgen und bei einem Besitzergespräch feststellen, dass das Pferd keine klinischen Anzeichen einer ERU entwickelt hatte. WOLLANKE und Mitarbeiter hielten die Entwicklung einer ERU bei betroffenen Pferden im Laufe der Zeit jedoch für möglich (WOLLANKE et al., 2001).

Auch im Kammerwasser waren in der vorliegenden Arbeit am häufigsten Immunglobuline vom Isotyp A gegen Leptospiren nachweisbar. So enthielten alle im ELISA positiv rea-

gierenden Ansätze IgA-Antikörper. Zudem war IgA als einzige Klasse in einigen Proben alleinig detektierbar, was dessen Rolle in der intraokularen Leptospirendiagnostik weiter untermauert.

5.1.5 PCR-Nachweis von Leptospiren im Kammerwasser

Von den Kammerwasserproben der drei Pferde, bei denen am klinisch unauffälligen Auge mittels Antikörpernachweis (MAR und ELISA) schon auf einen Befall des Auges mit Leptospiren geschlossen werden konnte, enthielt nur eine mittels PCR detektierbare Leptospiren-DNA. Daher erscheint in diesen Fällen der Nachweis von Leptospirenantikörpern sensitiver für den Nachweis einer intraokularen Leptospireninfektion. Auch bei der Untersuchung der anderen Kammerwasserproben aus Augen mit fraglicher ERU, die zu diagnostischen Zwecken entnommen worden waren, lieferte die PCR keine zusätzliche Information zu den durchgeführten Antikörpernachweisen.

Die vorliegende Arbeit ergab daher bei Betrachtung der ausschließlich aus diagnostischer Notwendigkeit durchgeführten Kammerwasseruntersuchungen kein Erfordernis für eine Untersuchung des Kammerwassers mittels PCR zusätzlich zur Anwendung von MAR und ELISA, um einen Hinweis auf eine intraokulare Leptospireninfektion zu erhalten. Eine andere Untersuchung an größeren Patientenzahlen ließ jedoch erkennen, dass die PCR gerade bei Augen mit Veränderungen, die nicht eindeutig für das Vorliegen einer ERU sprechen, sinnvoll zur Abklärung der Ätiologie der Augenbefunde ist (GESELL et al., 2006). Möglicherweise lässt sich das abweichende Ergebnis der vorliegenden Arbeit auf Unterschiede im Patientengut, die geringe Anzahl untersuchter Kammerwasserproben oder unterschiedliche Kriterien bei der Patientenselektion zurückführen. Sowohl in der vorliegenden Studie als auch in der Untersuchung von GESELL und Mitarbeitern wurde das Probenmaterial im VetMedLabor auf Leptospiren-DNA getestet, womit ein Einfluss unterschiedlicher PCR-Methoden nicht als Ursache in Frage kommt.

Beachtenswert ist auch, dass der PCR-Nachweis von Leptospiren in der vorliegenden Arbeit mit 54% im Kammerwasser (gesamt betrachtet) fast ebenso oft glückte wie in Glaskörpermaterial von Pferden, die aufgrund eindeutiger klinischer Veränderungen oder eines positiven Kammerwasserbefundes einer Vitrektomie unterzogen wurden (61%). Dies kann als Hinweis gedeutet werden, dass sich gerade zu Beginn der Erkrankung die Leptospiren noch gleichmäßiger im Auge verteilen, bevor sie bei Fortgang der Erkrankung im avaskulären Glaskörperraum persistieren (WOLLANKE, 2002).

5.1.6 Leptospirennachweise bei zwei Pferden mit Ciclosporin A-Implantat

Keine zuverlässigen Aussagen lassen sich derzeit über die lokale humorale Immunantwort von Pferden mit ERU, die ein Ciclosporin A-Implantat erhalten hatten, sowie den Einfluss des Immunsuppressivums auf die Persistenz der Leptospiren im Glaskörper treffen, da lediglich die mikrobiologischen Untersuchungsergebnisse zweier Pferde vorliegen, und diese sich zudem weitgehend unterschieden. Dennoch waren die Befunde des einen Pferdes („Caddillac“) überraschend, da in seiner Glaskörperprobe sowohl ein Antikörpertiter von 1:1600 als auch vitale Leptospiren sowie deren DNA nachweisbar waren.

Durch seine potenten inhibitorischen Fähigkeiten gegenüber der Produktion von Zytokinen durch CD4+ T-Lymphozyten hemmt Ciclosporin A indirekt das Wachstum, die Differenzierung und die Aktivität von B-Lymphozyten (THOMSON, 1992). Auch eine direkte Hemmwirkung von Ciclosporin A gegenüber der B-Zell-Antwort auf Ca²⁺-abhängige Signale, beispielsweise Anti-IgM, ist aus der Literatur bekannt. Ca²⁺-unabhängige, beispielsweise durch LPS stimulierte, Proliferationen von B-Zellen werden dagegen erst durch weitaus höhere Arzneimittelkonzentrationen beeinflusst (WICKER et al., 1990). Der hohe Antikörpertiter gegen Leptospiren im Glaskörper dieses Pferdes lässt jedoch im vorliegenden Fall eine wenn überhaupt nur sehr schwache inhibitorische Wirkung des Implantates auf die Aktivität der B-Lymphozyten im Sinne einer lokalen Antikörperproduktion vermuten. Möglicherweise ist diese Beobachtung durch die bedeutende antigene Wirkung von leptospiralem LPS (CHAPMAN et al., 1988, 1991; GITTON et al., 1994), das auch in Anwesenheit von Ciclosporin A eine Immunantwort zu stimulieren im Stande zu sein scheint, zu erklären. Ein Durchtritt der Immunglobuline durch eine gestörte Blut-Augen-Schranke erscheint unwahrscheinlich, da der Leptospirentiter im Serum des Patienten lediglich 1:200 betrug.

In einer in-vitro-Studie konnten GILGER und Mitarbeiter des Weiteren einen wachstumshemmenden Effekt von Ciclosporin A auf Leptospiren feststellen. In höheren Konzentrationen schien Ciclosporin A sogar eine bakterizide Wirkung zu besitzen (GILGER et al., 2006). Unter diesem Aspekt lässt das positive Kulturergebnis des Patienten die Annahme zu, dass die Bakterienhemmung bzw. insbesondere -abtötung in vivo eine unbedeutende Rolle spielt. Um den tatsächlichen Einfluss des lokal wirkenden Immunsuppressivums auf die Laborbefunde von Pferden mit leptospirenbedingter Uveitis interpretieren zu können, wäre eine Untersuchung an einer größeren Anzahl Patienten interessant.

5.1.7 Antikörper gegen die einzelnen Leptospirenserovare und Isolierung von Leptospirenserogruppen

Sowohl in Seren als auch intraokularen Proben von Pferden mit ERU waren am häufigsten Antikörper gegen *L. kirschneri* Serovar *grippotyphosa* in der höchsten Verdünnung nachweisbar. Aus Glaskörpermaterial wurden nur Leptospiren der Serogruppe *Grippotyphosa* isoliert. Das Isolat der einen mittels Kultur untersuchten Kammerwasserprobe eines Pferdes mit eindeutiger ERU konnte der Serogruppe *Pomona* zugeordnet werden. Auch WOLLANKE und Mitarbeiter konnten in Seren und intraokularen Proben von Pferden mit ERU am häufigsten spezifische Antikörper gegen *Grippotyphosa* nachweisen. Ebenso erwiesen sich die kulturellen Isolate aus Glaskörpermaterial betroffener Tiere zumeist als Leptospiren der Serogruppe *Grippotyphosa* (WOLLANKE et al., 2001; WOLLANKE, 2002; WOLLANKE et al., 2004b). Das Vorherrschen von Antikörpern gegen die Serovar *Grippotyphosa* in Seren und intraokularen Proben von Pferden mit ERU aus Mitteleuropa wurde auch von anderen Autoren beschrieben (BREM et al., 1999a; GESELL, 2004; HARTSKEERL et al., 2004; BRANDES et al., 2007), während die Serovar *Pomona* in Nordamerika weit verbreitet ist (HALLIWELL et al., 1985b). Die Tatsache, dass auch in der vorliegenden Arbeit Antikörper gegen verschiedene Leptospirenserovare intraokular nachweisbar waren, kulturell jedoch nur *Grippotyphosa* und *Pomona* isolierbar zu sein schienen, stützt die Vermutung von HARTSKEERL und Mitarbeitern, dass nicht alle Leptospirenserovare zur Persistenz im Auge befähigt sind (HARTSKEERL et al., 2004).

5.2 Zusammenhänge von ELISA- und PCR-Resultaten mit dem Vorbericht und den Ergebnissen anderer Untersuchungen

5.2.1 Korrelationen der ELISA-Ergebnisse mit dem Vorbericht

Serumuntersuchung

Im Serum von Pferden, die erst kurze Zeit unter ERU litten, konnten geringfügig häufiger und vereinzelt auch höhere Konzentrationen an Antikörpern gegen Leptospiren mittels ELISA-Technik nachgewiesen werden als bei bereits länger erkrankten Tieren. Auch gelang der Nachweis häufiger, und die Serumproben enthielten mehr spezifische Antikörper, wenn die Tiere erst einen oder zwei Schübe durchgemacht hatten, oder die letzte akute Phase kürzlich abgeklungen war. Dennoch waren die statistischen Zusammenhänge zwischen dem Vorbericht und den ELISA-Ergebnissen im Serum nicht signifikant. In der Literatur wurde

ebenfalls beschrieben, dass der Nachweis von Serumtitern gegen Leptospiren bei Pferden mit regelmäßig rezidivierenden Schüben einer inneren Augenentzündung verglichen mit Tieren, deren letzte akute Episode bereits mindestens 18 Monate zurücklag, häufiger glückte (MATTHEWS et al., 1987). Auch WOOD und DAVIS sowie SOVA konnten höhere Titer bei Pferden beobachten, die gerade einen akuten Schub erlitten, als bei solchen im Ruhestadium (WOOD und DAVIS, 1950; SOVA, 1964a). HEUSSER, KALISCH sowie KEMENES und TAMAS gruppierten die in der MAR erhaltenen Serumtiterwerte von Pferden mit Augenveränderungen im Sinne einer ERU je nach Stadium der Krankheit und fanden heraus, dass die Seren akut erkrankter Pferde in 82%, 80% bzw. 88% der Fälle positiv reagierten, während in subakuten Fällen je 88% bzw. 92% und in chronischen Stadien nur 69%, 70% bzw. 86% positive Reaktionen erhalten werden konnten. Die Arbeitsgruppen schlossen in ihren Untersuchungen auf eine primäre Rolle der Leptospiren bei der Erkrankung, da sich die Antikörpertiter analog zum Titerverlauf bei Infektionskrankheiten verhielten. So sind bei Beginn einer Infektionskrankheit zunächst nur geringe Mengen an Antikörpern vorhanden, im subakuten Stadium dagegen hohe Werte anzutreffen. In chronischen Fällen nimmt die Menge der Antikörper wieder ab (HEUSSER, 1948; KALISCH, 1952; KEMENES und TAMAS, 1952). In der Arbeit von WOLLANKE (2002) wurden anders als in der vorliegenden Studie minimal höhere Serumtiter bei Pferden mit mindestens einem Jahr Erkrankungsdauer als bei denen, die erst maximal ein Jahr unter ERU litten, nachgewiesen.

Glaskörper- und Kammerwasseruntersuchung

Auch im Glaskörper und Kammerwasser konnten Leptospirenantikörper weitgehend unabhängig von den betrachteten Aspekten des Vorberichtes mittels ELISA nachgewiesen werden, wenn auch Proben von erst bis zu einem halben Jahr erkrankten Tieren mit wenigen Schüben einer inneren Augenentzündung oder solchen, deren letzte Entzündungsphase erst abgeklungen war, häufiger detektierbare Immunglobuline enthielten. Jedoch war lediglich der Zusammenhang zwischen dem Zeitpunkt des letzten Uveitisschubes und einem positiven Testresultat für IgA im Glaskörper signifikant. Der signifikant häufigere Nachweis von IgA gegen Leptospiren zeitnah zum Auftreten eines akuten Entzündungsschubes im Auge kann als Hinweis auf die bedeutende Rolle dieser Immunglobulinklasse in der Immunologie und Pathogenese der leptospirenbedingten Uveitis des Pferdes gewertet werden. Ebenso unterstreicht das Ergebnis den Wert von spezifischem IgA für die intraokulare Labordiagnostik. Des Weiteren war zu beobachten, dass zeitnah zu einer akuten Entzündungsphase im Glaskörper höhere Gehalte an spezifischen Antikörpern vorherrschten. Ein signifikanter Zusammenhang war jedoch nur für IgG ersichtlich.

Auch im Kammerwasser sanken die Immunglobulingehalte mit steigender Krankheitsdauer oder Anzahl an ERU-Schüben (Signifikanz nur für IgG und IgA). HEUSSER (1948) konnte ebenfalls eine Abhängigkeit der Höhe des Leptospirentiters im Kammerwasser vom Entnahmzeitpunkt feststellen. So waren die Antikörpertiter bei Pferden, deren letzter Uveitisschub bereits länger zurücklag, niedriger als bei Tieren, deren Kammerwasser während oder kurze Zeit nach einer akuten Entzündung entnommen wurde. Entsprechende Titerverläufe mit einem Anstieg der Antikörperkonzentration im Rahmen akuter Uveitisschübe sind auch aus der Humanmedizin bekannt (O'CONNOR, 1973). WOLLANKE (2002) beschrieb, dass bei bis zu einem Jahr erkrankten Pferden mit ERU höhere Antikörpertiter gegen Leptospiren im Glaskörper mittels MAR nachweisbar waren als bei längerer Gesamtdauer der Erkrankung, wenn auch der Unterschied zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant war.

5.2.2 Korrelationen der PCR-Ergebnisse mit dem Vorbericht

Glaskörper- und Kammerwasseruntersuchung

Für den direkten Leptospirennachweis mittels PCR im Glaskörpermaterial von Pferden mit ERU ließen sich ebenfalls Zusammenhänge mit einer Erkrankungsdauer von bis zu sechs Monaten, erst maximal zwei aufgetretenen Uveitisschüben sowie einer gerade abgeklungenen Entzündungsattacke feststellen. Diese waren allerdings nicht signifikant. So war Leptospiren-DNA auch bei bereits länger erkrankten Pferden mit häufigen Schüben oder einem länger zurückliegenden letzten Schub nachweisbar. Dennoch kann der frequentere Nachweis von Leptospiren-DNA zeitnah zu einer akuten Uveitisepisode als Hinweis darauf interpretiert werden, dass den Bakterien eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der ERU zukommt. Auch WOLLANKE (2002) vermutete, dass sich intraokular vermehrende Leptospiren maßgeblich am Auftreten der Uveitisrezidive im Rahmen der ERU beteiligt wären. Jedoch gilt es zu bedenken, dass ein positives Resultat einer PCR-Untersuchung keine Aussage zulässt, ob die nachgewiesene DNA von vitalen Bakterien oder lediglich den Fragmenten abgetöteter Erreger stammt. Im Kammerwasser glückte der Erregernachweis in der vorliegenden Arbeit nur bei mehr als zwei abgelaufenen Schüben einer inneren Augenentzündung. ROCZEK (2008) konnte keine Korrelationen zwischen den Ergebnissen der PCR-Untersuchung intraokularer Proben von Pferden mit ERU und der Gesamtdauer der Erkrankung beobachten. Bei WOLLANKE (2002) gelang die kulturelle Isolierung von Leptospiren aus Glaskörpermaterial von Pferden mit ERU signifikant häufiger bei Augen, die vorberichtlich kürzer als ein Jahr erkrankt waren, als bei solchen, die länger von einer ERU betroffen waren. Da aber vitale Bakterien im Glaskörper auch nach mehreren ERU-Schüben und einer vorberichtlichen Erkrankungsdauer von bis zu sieben Jahren nachweisbar blieben (WOLLANKE et al., 2004b), scheinen die Erreger intraokular zu persistieren und sich dort

lokal zu vermehren (BRANDES et al., 2007). Jedoch wären an dieser Stelle weitergehende Untersuchungen mittels direkter Nachweisverfahren für Leptospiren, insbesondere der Kultur, interessant, die nicht Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit waren.

5.2.3 Korrelationen der ELISA-Ergebnisse mit den Augenbefunden und makroskopischen Glaskörperveränderungen

Serumuntersuchung

Das Vorliegen typischer Anzeichen einer ERU ging in der vorliegenden Arbeit deutlich häufiger mit einem positiven IgG-Resultat, dem Nachweis von Immunglobulinen aller drei Klassen sowie einer höheren Konzentration an IgM und IgG im Serum einher. Dennoch scheint der Nachweis aller drei Immunglobulinklassen gegen Leptospiren auch bei Pferden mit fraglicher ERU von diagnostischem Wert zu sein. Auch bei WOLLANKE (2002) war der mittlere Serumtiter gegen Leptospiren von Pferden mit fraglicher ERU niedriger als der von Patienten mit eindeutigen Augenbefunden. Für den Grad der ophthalmologischen Veränderungen, die Form der Uveitis oder die Art und den Grad an makroskopischen Glaskörperveränderungen waren jedoch keine wesentlichen Korrelationen mit den Ergebnissen der ELISA-Untersuchung des Serums erkennbar. WOLLANKE (2002) verglich die MAR-Titer gegen Leptospiren im Serum von Pferden mit gering-, mittel- sowie hochgradiger ERU und stellte höhere Titer bei Tieren mit hoch- sowie geringgradiger ERU fest als bei denen mit mittelgradigen Augenveränderungen. DWYER und Mitarbeiter konnten bei bereits erblindeten Pferden (und somit höhergradigen Augenveränderungen) höhere Titer gegen Leptospiren beobachten als bei Tieren, deren Sehfähigkeit noch erhalten war (DWYER et al., 1995). Analog betrachtete WOLLANKE die Seren von Patienten mit vorderer, intermediärer und Panuveitis, wobei die Tiere mit einer Lokalisation der Befunde vornehmlich im vorderen Augenabschnitt im Durchschnitt niedrigere MAR-Titer gegen Leptospiren im Serum aufwiesen als die der anderen beiden Gruppen (WOLLANKE, 2002).

Glaskörper- und Kammerwasseruntersuchung

IgM und IgG gegen Leptospiren waren in der vorliegenden Arbeit signifikant häufiger bei Pferden mit typischen Anzeichen einer ERU nachweisbar. In der Anwendung des ELISA-Codes spiegelte sich der Zusammenhang wieder. Während bei Tieren mit unklaren Augenbefunden im Sinne der ERU am häufigsten nur IgA-Antikörper nachweisbar waren und nur in etwa 7% der Fälle alle drei Immunglobulinklassen, reagierten nur etwa 6% der Glaskörperproben eindeutig unter ERU leidender Pferde alleinig im IgA-ELISA positiv, etwa 40% der Proben enthielten alle drei Immunglobulinklassen. Dies unterstreicht wiederum

die Rolle von IgA in der intraokularen Leptospirendiagnostik vor allem auch in solchen Fällen, in denen nach einer klinischen Augenuntersuchung noch keine definitive Diagnose gestellt werden kann. Zudem waren eindeutige Augenbefunde mit erhöhten Gehalten an spezifischen Antikörpern aller drei Klassen im Glaskörper assoziiert. WOLLANKE und Mitarbeiter untersuchten ebenfalls Glaskörpermaterial von Pferden mit ERU sowie solchen, die zwar vorberichtlich unter ERU litten, bei denen aber ophthalmoskopisch keine verlässlichen Anzeichen für eine Uveitis erkennbar waren. Dabei waren ebenfalls häufiger und höhere Leptospirentiter bei Pferden mit typischen Anzeichen einer ERU nachweisbar (WOLLANKE, 2002; WOLLANKE et al., 2004b).

Des Weiteren war in der vorliegenden Arbeit ein zunehmender Grad an uveitischen Veränderungen des Auges sowie des gewonnenen Glaskörpermaterials gemeinsam mit mehr positiven ELISA-Ergebnissen sowie einem intraokularen Anstieg der Konzentrationen der einzelnen Immunglobulinklassen gegen Leptospiren zu beobachten. In einer Studie an Patienten, die unter schwerer systemischer Leptospirose mit Nieren- und Lungenbeteiligung litten, konnten die Humanmediziner ABDULKADER und Mitarbeiter ebenfalls einen (linearen) Zusammenhang zwischen der Intensität der humoralen Immunantwort auf den Erreger in Form messbarer IgM-, IgG- und IgA-Antikörper im ELISA und dem Schweregrad der Erkrankung feststellen (ABDULKADER et al., 2002). Die Autoren referenzierten in ihrer Publikation verschiedene weitere Autoren, um einen möglichen Zusammenhang zwischen einer starken Immunantwort und dem Schweregrad der Leptospirose zu erläutern. So berichteten HARTMAN und Mitarbeiter über zehn Hunde mit natürlicher akuter Leptospiroseinfektion und begleitendem Nachweis spezifischer IgM- und seltener IgG-Antikörper, von denen nur zwei Tiere überlebten. Möglicherweise wurde in diesen Fällen durch die Immunantwort eine massive Entzündungsreaktion induziert, ohne dass aber ein ausreichender Schutz hervorgerufen wurde (HARTMAN et al., 1986; ABDULKADER et al., 2002). Andere Autoren konnten sehr hohe Level des Zytokins TNF_{α} induziert durch eine starke Immunantwort mit akutem Nierenversagen oder letalem Ausgang einer Leptospirose assoziieren (ESTAVOYER et al., 1991; TAJIKI und SALOMAO, 1996). Die Anwesenheit spezifischer Antikörper kann sogar Zellschäden verschlimmern, da das Anheften virulenter Leptospiren an Zellen durch subagglutinierende Mengen homologen Antiserums verstärkt wird (FAINE et al., 1999; ABDULKADER et al., 2002). In der Literatur über die Pathogenese der leptospirenbedingten Uveitis beim Pferd wurde neben direkten bakteriellen Effekten auch die schädigende Wirkung der lokalen Immunantwort als Ursache für die zu beobachtenden Augenveränderungen angeführt (BREM et al., 1999a).

Ein Augenmerk wurde im Rahmen der vorliegenden Untersuchung auch auf die Glas-

körperveränderungen und ihren Zusammenhang mit der insbesondere lokalen humoralen Immunantwort gelegt, da eine Persistenz der Leptospiren im Glaskörperraum als wahrscheinlich erachtet wird (WOLLANKE et al., 2001; WOLLANKE, 2002; GERHARDS und WOLLANKE, 2006). Zudem steht der Glaskörper in engem Kontakt mit der ihn umgebenden Uvea und könnte daher gut die dort ablaufenden Entzündungsvorgänge wiederspiegeln. In der vorliegenden Arbeit war der Schweregrad der Uveitis sowie der Glaskörperveränderungen mit der Stärke der lokalen Immunantwort assoziiert. Unter Berücksichtigung der vorliegenden Literatur (HARTMAN et al., 1986; ESTAVOYER et al., 1991; TAJIKI und SALOMAO, 1996; FAINE et al., 1999; ABDULKADER et al., 2002) und der in Kapitel 4.5.8 auf Seite 85 sowie Kapitel 5.2.7 auf Seite 117 beschriebenen bzw. diskutierten Korrelationen zwischen dem direkten Nachweis von Leptospiren im Glaskörper und der Stärke der lokalen humoralen Immunantwort erscheint es auch bei der Pathogenese der ERU plausibel, dass die durch den intraokularen Aufenthalt der Leptospiren induzierte Antikörperproduktion und Entzündung zwar nicht in der Lage ist, die Infektion zu beseitigen, aber dennoch zu schweren Schäden am Auge führt.

Auch WOLLANKE (2002) konnte einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Höhe der mittels MAR ermittelten Antikörpertiter gegen Leptospiren im Auge von Pferden mit ERU und dem Grad der Schäden am Auge ausmachen. Die Autorin ging davon aus, dass eine große Anzahl Bakterien das Auge mehr schädigen sowie eine heftigere Entzündungsreaktion und eine massivere Antikörperproduktion hervorrufen würde als eine geringe Keimzahl (WOLLANKE, 2002). KEMENES und Mitarbeiter konnten in ihrer Studie ebenfalls die höchsten gemessenen Leptospirentiter dem Glaskörpermaterial bereits atrophierter (und damit ebenfalls hochgradig veränderter) Augen von Pferden mit einer inneren Augenentzündung zuordnen (KEMENES et al., 1984).

Wesentliche statistische Beziehungen waren in der vorliegenden Arbeit zwischen einer Lokalisation der uveitischen Veränderungen im hinteren Augenabschnitt sowie einer Manifestation der ERU als Panuveitis und positiven Testergebnissen auf Leptospirentikörper im ELISA (v.a. IgG und IgA) sowie einem höheren Gehalt an spezifischem IgG gegeben. WOLLANKE (2002) beschrieb ebenfalls, dass signifikant höhere mittlere Antikörpertiter in der MAR bei Glaskörperproben aus Pferdeaugen mit intermediärer oder Panuveitis nachgewiesen werden konnten als bei solchen aus Augen mit lediglich vorderer Uveitis. Die Autorin vermutete, dass bei einer schmerzhaften vorderen Uveitis mehr Bakterien eliminiert würden, und im anschließenden entzündungsfreien Intervall keine anhaltend hohe Antikörperproduktion mehr stattfände. Zudem scheint im hinteren Augenabschnitt eine bessere Maskierung der Leptospiren vor der Immunantwort des Pferdes denkbar (WOLLANKE,

2002).

5.2.4 Korrelationen der PCR-Ergebnisse mit den Augenbefunden und makroskopischen Glaskörperveränderungen

Glaskörper- und Kammerwasseruntersuchung

Ein positives Ergebnis in der PCR war stark mit dem klinischen Bild einer hinteren oder Panuveitis assoziiert. Das Ergebnis weist Parallelen zu den Untersuchungen von WOLLANKE (2002) auf, die einen statistischen Zusammenhang zwischen einem direkten Leptospirenachweis im Glaskörper von ERU-Pferden in der Kultur und einer Manifestation der Erkrankung als intermediäre (hintere) Uveitis nachwies. Für das klinische Bild der Panuveitis konnte die Autorin dies jedoch nicht feststellen. Anders als beim Antikörpernachweis mittels ELISA war Leptospiren-DNA in der vorliegenden Arbeit am häufigsten in Proben mit nur mittelgradigen Veränderungen detektierbar. WOLLANKE (2002) sah keinen Zusammenhang zwischen einer positiven Leptospirenkultur und dem Schweregrad der Uveitis.

5.2.5 Eignung des ELISAs zur Darstellung von Infektionsverläufen

Serumuntersuchung mittels ELISA

Aufgrund der fehlenden Signifikanz der Zusammenhänge von ELISA-Ergebnissen im Serum der ERU-Pferde mit dem Vorbericht und den Veränderungen des Auges sowie des Glaskörpers ließen sich keine verlässlichen Hinweise zur systemischen humoralen Immunantwort der Tiere auf die Entzündungsvorgänge und die Leptospirenpersistenz im Auge gewinnen. Dies könnte auf eine zeitlich lange zurückliegende systemische Leptospireninfektion vor Auftreten des ersten Uveitisschubes zurückgeführt werden. Dennoch scheint das Krankheitsbild der ERU mit einer veränderten systemischen Immunantwort gegen Leptospiren assoziiert zu sein, da sich signifikante Unterschiede beim Vergleich der ELISA-Profile erkrankter und augengesunder Pferde zeigten. Auch waren schwache, nicht signifikante Korrelationen zwischen Serumergebnissen und der Anamnese bzw. den Augenbefunden der Patienten erkennbar, sodass die Methode nicht prinzipiell ungeeignet erscheint. Interessant wäre eine regelmäßige Gewinnung von Serum mehrerer ERU-Pferde mit anschließender Untersuchung auf Leptospirenantikörper mittels ELISA, um die Dynamik der Antikörper im Krankheitsgeschehen eines einzelnen Pferdes zu analysieren. In der vorliegenden Arbeit konnten jedoch keine bedeutenden Erkenntnisse bezüglich der systemischen Antikörperproduktion bei Pferden mit leptospirenbedingter Uveitis erlangt werden.

Glaskörper- und Kammerwasseruntersuchung mittels ELISA

Bei der Analyse von Zusammenhängen zwischen dem Patientenvorbericht von Pferden mit ERU sowie den Befunden am erkrankten Auge und den ELISA-Ergebnissen intraokularer Proben waren signifikante Korrelationen vor allem für die Immunglobulinklassen G und A im Glaskörpermaterial zu erkennen, während spezifisches IgM weitgehend unabhängig von anderen Parametern detektiert wurde. Die Betrachtung des intraokularen ELISA-Profiles, d.h. bestimmter Kombinationen positiver und negativer Resultate der einzelnen Immunglobulinklassen, in den intraokularen Proben der ERU-Pferde lieferte jedoch nicht wie erhofft signifikante Unterschiede für die Kategorien des Vorberichtes. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang es daher nicht, die Infektionsverläufe in an leptospirenbedingter Uveitis erkrankten Pferdeaugen vollständig zu charakterisieren. Dennoch konnte festgestellt werden, dass die Kinetik der Antikörperproduktion mit den äußerlich erkennbaren Entzündungssymptomen am Auge assoziiert ist.

Im Rahmen der Studie erwies sich Glaskörpermaterial als deutlich geeigneter zur Analyse von Infektionsverläufen im Auge als Kammerwasser. Jedoch muss bedacht werden, dass nur zwei Kammerwasserproben aus Pferdeaugen mit eindeutiger ERU untersucht wurden. Die anderen Ansätze hingegen stammten aus Augen, deren Vorbericht sowie ophthalmologische Veränderungen untypisch für das Vorliegen einer ERU waren. Somit waren weniger Korrelationen zu erwarten. Des Weiteren gingen nur 14 Kammerwasserproben verglichen mit 80 Glaskörperproben von Pferden mit ERU in die Auswertung ein.

5.2.6 Statistische Zusammenhänge von MAR- und ELISA-Ergebnissen

(Anmerkung: Die Ergebnisse der Untersuchung einer Übereinstimmung von MAR- und ELISA-Resultaten mittels Cohens Kappa werden in Kapitel 5.5.1 ab Seite 121 diskutiert.)

Serumuntersuchung

Bei 70% der Seren von ERU-kranken Pferden lieferten MAR und ELISA dasselbe positive oder negative Ergebnis. 30% der Ansätze reagierten nur im ELISA positiv. Da sich die Serumuntersuchung mittels MAR ohnehin wiederholt nicht für eine Abklärung der Ätiologie einer Uveitis beim Pferd eignete (MATTHEWS et al., 1987; WOLLANKE et al., 1998, 2000; WOLLANKE, 2002; GESELL, 2004), und die Methode auch in der vorliegenden Arbeit dem ELISA im Nachweis von Leptospirenantikörpern unterlegen zu sein scheint, sollte darüber nachgedacht werden, dem ELISA bei der Untersuchung von Seren von Pferden mit Augenveränderungen auf Leptospirenantikörper gegenüber der MAR zukünftig den Vorzug

zu geben. Ein Problem stellt hierbei allerdings die Tatsache dar, dass aufgrund des hohen Zeit- und Arbeitsaufwandes der am LGL etablierten ELISA-Methode bisher jeder Ansatz nur auf etwa zwei Leptospirenserovare getestet wurde. Dadurch erhöht sich die Gefahr falsch-negativer Ergebnisse im ELISA. Die Wahl eines nicht-serovarspezifischen ELISAs, wie der basierend auf dem LipL41-Antigen pathogener Leptospiren von THEODORIDIS und Mitarbeitern (2005), wäre an dieser Stelle eine denkbare Lösung.

Glaskörperuntersuchung

Die Untersuchung des Glaskörpermaterials ERU-kranker Pferde auf Leptospirenantikörper lieferte in 90% der Fälle ein übereinstimmendes Testergebnis der beiden indirekten Nachweisverfahren. Ein Mal waren nur in der MAR, sieben Mal nur im ELISA Antikörper nachweisbar. Die Tatsache, dass die sieben Proben, in denen Leptospirenantikörper ausschließlich mittels ELISA-Technik nachgewiesen werden konnten, keine detektierbaren IgM-Antikörper enthielten, ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass IgM hauptverantwortlich für Agglutination ist und damit von allen Immunglobulinklassen am besten mittels MAR nachgewiesen werden kann (MYRON et al., 1971; HANSON, 1973; HEATH und JOHNSON, 1994; PRIYA et al., 2003). Da die Proben scheinbar keine mittels MAR detektierbaren Mengen an IgM enthielten, reagierten sie erst bei Anwendung des ELISAs positiv. Jedoch gilt es zusätzlich zu bedenken, dass IgM gegen Leptospiren in der vorliegenden Arbeit intraokular prinzipiell am seltensten nachweisbar war (34% im Glaskörper sowie 14% im Kammerwasser von ERU-Pferden). Auffällig war zudem, dass sechs der in der MAR als negativ beurteilten Proben spezifische IgA-Antikörper und drei davon wiederum ausschließlich IgA enthielten. Daher scheint von den drei untersuchten Immunglobulinklassen insbesondere der Nachweis von IgA mittels ELISA geeignet, eine MAR-Untersuchung von Glaskörpermaterial auf Leptospirenantikörper zu ergänzen. Eine der im MAR negativ beurteilten Proben enthielt jedoch nur IgG-Antikörper.

Kammerwasseruntersuchung

64% der Kammerwasserproben von Pferden mit ERU wurden mittels MAR und ELISA gleich positiv oder negativ beurteilt. Vier Mal war nur die ELISA-Untersuchung und einmal nur die MAR positiv. Die Beobachtung, dass nur einer der ausschließlich im ELISA positiv reagierenden Ansätze IgM-Antikörper gegen Leptospiren enthielt, unterstreicht das Resultat der Glaskörperuntersuchung, bei der in keiner der Proben mit positivem ELISA-Ergebnis bei gleichzeitig negativer MAR IgM-Antikörper nachweisbar waren. IgA war in allen in der MAR negativ reagierenden Ansätzen detektierbar und zwei Mal als einzige Immunglobulinklasse. Wiederum bestätigt dies die Hypothese, dass der Nachweis von IgA

besonders geeignet ist, ein MAR-Ergebnis in der intraokularen Leptospirendiagnostik zu ergänzen.

5.2.7 Statistische Zusammenhänge zwischen dem direkten intraokularen Leptospirennachweis und ELISA-Ergebnissen

Serumuntersuchung

Während zwischen dem Testergebnis der PCR auf Leptospiren-DNA im Glaskörper und den ELISA-Ergebnissen auf Leptospirenantikörper im Serum von Pferden mit ERU keine wesentlichen statistischen Beziehungen erkennbar waren, war ein positives Kulturresultat aus Glaskörpermaterial signifikant mit erniedrigten Gehalten an spezifischem IgM und IgA im Serum assoziiert. WOLLANKE hingegen konnte bei Pferden mit ERU keinen statistischen Zusammenhang zwischen mittels MAR bestimmten Antikörpertitern gegen Leptospiren im Serum und positiven Kulturergebnissen im Glaskörper feststellen (WOLLANKE, 2002).

Glaskörperuntersuchung

Der direkte Erregernachweis in Glaskörpermaterial von Pferden mit ERU mittels PCR und Kultur war in der vorliegenden Arbeit mit einem frequenteren Nachweis von IgG und IgA gegen Leptospiren sowie höheren Gehalten an spezifischen Antikörpern aller drei Klassen in derselben Probe assoziiert. Eine ähnliche Beobachtung machten auch andere Autoren: Glaskörpermaterial aus Pferdeaugen mit einem positiven Kulturergebnis für Leptospiren lieferte signifikant höhere Leptospirentiter in der MAR (WOLLANKE et al., 2001; WOLLANKE, 2002; WOLLANKE et al., 2004b). Aus diesem Grund wird die Antikörpersynthese gegen Leptospiren im Glaskörper wahrscheinlich durch den Aufenthalt der Bakterien im Auge hervorgerufen und aufrechterhalten. Gestützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass durch Durchführung der Vitrektomie bei Pferden mit ERU die Entzündungsschübe mit sehr hoher Zuverlässigkeit gestoppt werden (WINTERBERG und GERHARDS, 1997; WOLLANKE et al., 2001).

Hohe intraokulare Antikörpertiter gegen Leptospiren und gleichzeitig positive Kulturergebnisse aus demselben Auge von Pferden mit ERU konnten auch weitere Arbeitsgruppen beobachten (BREM et al., 1998; BRANDES et al., 2007). BRANDES und Mitarbeiter vermuteten daher, dass die spezifischen Antikörper allein nicht in der Lage wären, die intraokulare Leptospireninfektion zu beseitigen (BRANDES et al., 2007). Die Möglichkeit einer Maskierung der Bakterien durch körpereigenes Protein wurde beschrieben (FAINE, 1994). BRANDES und Mitarbeiter hielten eine Änderung der Oberflächenstruktur der Leptospiren zum Schutz vor einer Immunantwort für eine mögliche Erklärung der Leptospirenpersistenz

im Auge von Pferden mit ERU (BRANDES et al., 2007). NIEDERMAIER (2002) konnte mittels elektronenmikroskopischer Untersuchungen an Glaskörperproben von Pferden mit ERU eine Umhüllung der Leptospiren mit einer homogenen, feinkörnigen Masse feststellen, bei der es sich möglicherweise ebenfalls um einen Schutzmechanismus der Bakterien handelt.

Kammerwasseruntersuchung

Der PCR-Nachweis von Leptospiren im Kammerwasser von Pferden mit ERU war mit erniedrigten Gehalten an IgG und IgA gegen Leptospiren oder gar einem negativen Resultat für IgG in der ELISA-Untersuchung derselben Probe assoziiert. Dies könnte darauf hindeuten, dass bei ausreichend starker lokaler Immunantwort gegen die Leptospiren diese aus dem flüssigen Kammerwasser besser eliminiert werden können als dies beispielsweise für den Glaskörper der Fall ist. Zumindest erscheint die gelartige Konsistenz des Glaskörpers sowie dessen Kollagenfasergestützte Struktur günstiger für einen dauerhaften Aufenthalt der Bakterien im Auge (WISSDORF et al., 2002). Jedoch gilt es zu bedenken, dass die PCR keinen Hinweis darauf gibt, ob die nachgewiesene DNA von vitalen Bakterien oder lediglich den Fragmenten abgetöteter Erreger stammt. Zudem wurde die vorliegende Untersuchung nur an einer sehr geringen Patientenzahl (n=13) durchgeführt. Eine Studie über die Ausscheidung von Leptospiren über den Urin bei experimentell und natürlich mit *Leptospira interrogans* Sero-var *hardjo* infizierten Rindern und die systemische und lokale humorale Immunantwort der Tiere zeigte ebenfalls einen deutlichen Zusammenhang zwischen dem starken Anstieg der Immunglobuline G und A im Harn und einer Beendigung der Erregerausscheidung (LEONARD et al., 1993). Dies stützt die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit und gibt einen weiteren Hinweis auf die entscheidende Rolle des Glaskörpers bei der Leptospirenpersistenz im Rahmen der ERU.

5.3 Vergleich der Antikörperkonzentrationen gegen Leptospiren im Serum und intraokular

Beim Vergleich der mittels ELISA gemessenen Extinktionswerte für die drei Immunglobulinklassen gegen Leptospiren in Serum und intraokularen Proben wurden im Glaskörpermaterial für IgA am häufigsten (60% der Probenpaare) höhere Werte als im Begleitserum gemessen. Für diese Fälle kann mit hoher Wahrscheinlichkeit von einer intraokularen Antikörperproduktion ausgegangen werden (HARTMANN et al., 1991; ROBERT-GANGNEUX et al., 2004; FEKKAR et al., 2008). Über höhere intraokulare Leptospirentiter bei Pferden mit Augenveränderungen als im Serum desselben Patienten berichteten auch zahlrei-

che andere Autoren (GSELL et al., 1946; HEUSSER, 1948, 1952; WITMER et al., 1953; WITMER, 1954; KEMENES et al., 1984; HALLIWELL et al., 1985b; DAVIDSON et al., 1987; SCHWINK et al., 1989; BREM et al., 1998; WOLLANKE et al., 1998, 2000; FABER et al., 2000; WOLLANKE, 2002; WOLLANKE et al., 2004b). Oftmals wurde bei Pferden mit ERU der Antikörperspiegel gegen Leptospiren im Serum sogar um ein Vielfaches durch denjenigen im Glaskörper oder Kammerwasser übertroffen (HALLIWELL et al., 1985b; DAVIDSON et al., 1987; WOLLANKE et al., 1998, 2001; BREM et al., 1999a). Die Berechnung eines modifizierten Goldmann-Witmer-Koeffizienten wies für 94% von 36 Probenpaaren von ERU-Pferden eine intraokulare Antikörperproduktion gegen Leptospiren nach (WOLLANKE, 2002; WOLLANKE et al., 2004b). Weitere Untersuchungen ergaben Hinweise auf die lokale Bildung von Antikörpern gegen Leptospiren bei der ERU. So war im Rahmen eines Infektionsversuches mit *Erysipelothrix rhusiopathiae* (Schweinerotlauferreger) bei einem Pferd mit ERU nur ein Titeranstieg im Serum, nicht aber im Auge, zu beobachten, was gegen einen Übertritt von Antikörpern aus dem Blut ins Auge spricht (WITMER et al., 1953). Auch waren bei unter Uveitis leidenden Pferden trotz hoher Serumantikörpertiter gegen Borrelien in der Regel keine Borrelientiter im Glaskörper dieser Tiere messbar (GERHARDS und WOLLANKE, 1996).

Histologische Untersuchungen an Augen von Pferden mit ERU ließen des Weiteren erkennen, dass auch B-Lymphozyten bzw. Plasmazellen am Entzündungsgeschehen beteiligt sind (DROMMER et al., 1996; KALSOW und DWYER, 1998; ROMEIKE et al., 1998; DEEG et al., 2002a; NIEDERMAIER et al., 2006a; BRANDES et al., 2007). Diese waren vorrangig in Augen von Pferden zu finden, die erst kürzlich einen Schub einer inneren Augenentzündung erlitten hatten (KALSOW und DWYER, 1998). Laut BRANDES und Mitarbeitern könnte dies gemeinsam mit früheren Beschreibungen der Migration von Plasmazellen durch das Ziliarkörperepithel (DUBIELIZIG et al., 1997) die lokale Bildung der Antikörper erklären (BRANDES et al., 2007). Weitere Autoren deuteten die Infiltration der Uvea mit Plasmazellen ebenfalls als Hinweis auf eine lokale Antikörperproduktion (ROMEIKE et al., 1998; EULE et al., 2000). Bei der Bestimmung der Titer der Immunglobulinisotypen IgGa und IgGb in intraokularen und allogenen Serumproben an ERU erkrankter Pferde konnten EULE und Mitarbeiter neben einer signifikanten Titererhöhung im Auge auch eine Verschiebung und/oder Umkehr des Verhältnisses dieser beiden IgG Isotypen verglichen mit dem Serum feststellen, was die Autoren als Hinweis auf eine lokale Produktion dieser Immunglobuline werteten (EULE et al., 2000).

Jedoch ist neben einer intraokularen Antikörpersynthese gegen Leptospiren auch eine Permeabilitätsstörung der Blut-Augen-Schranke, verursacht durch die zunehmende Zerstörung

der intraokularen Strukturen und Barrieren im Rahmen der Uveitis, vorstellbar. Dies könnte in der vorliegenden Arbeit zumindest als Möglichkeit für die gepaarten Serum- und intraokularen Proben in Betracht gezogen werden, bei denen der Gehalt an Antikörpern im Serum denjenigen im Auge deutlich übertraf. An dieser Stelle wäre eine Bestimmung der Albuminfraktion am intraokularen Gesamteiweißgehalt hilfreich für die Beurteilung der Herkunft der Antikörper. Der Albumingehalt steigt im Falle einer bloßen Durchlässigkeit der Blut-Augen-Schranke aufgrund des im Vergleich zu den Globulinen geringeren Molekulargewichtes zuerst an, bevor sich bei stärkerer Schädigung der Barrieren auch die Konzentration an Globulinen erhöht (WOLLANKE, 1995, 2002). MATTHEWS hielt eine, mit dem an Schleimhautoberflächen stattfindenden Sekretionsmechanismus von Immunglobulinen, insbesondere von IgA, vergleichbare Funktion des nichtpigmentierten Ziliarkörperepithels im Auge für unwahrscheinlich. Er verwies auf den unterschiedlichen embryonalen Ursprung und die umgekehrte anatomische Orientierung der Epithelien (MATTHEWS, 1989).

5.4 Vergleichbarkeit der Leptospirennachweise in Kammerwasser und Glaskörper an einem Auge

Obwohl in der vorliegenden Studie nur an einer sehr geringen Anzahl von Augen mit ERU ein Vergleich der Ergebnisse der Kammerwasser- und Glaskörperuntersuchungen durchgeführt wurde, erscheint eine Beurteilung dennoch gerechtfertigt, da bereits in anderen Arbeiten (WOLLANKE, 2002; GESELL et al., 2006) ähnliche Ergebnisse erzielt worden waren. So konnten WOLLANKE sowie GESELL und Mitarbeiter für etwa 70% der Probenpaare aus Pferdeaugen mit ERU beobachten, dass sich die MAR-Titer mit maximal einer Titerstufe Differenz weitgehend entsprachen. Waren Antikörper im Glaskörper nachweisbar, so reagierten auch die Kammerwasserproben positiv (WOLLANKE, 2002).

Auch in dieser Arbeit lieferten sowohl MAR als auch ELISA in etwa 85% der Fälle eine Übereinstimmung hinsichtlich der Qualität ihrer Aussagen („Leptospirenantikörper nachweisbar“ bzw. „keine Leptospirenantikörper nachweisbar“). Bei Betrachtung des ELISA-Profiles wiesen 75% der Probenpaare dieselbe Kombination positiver und negativer Ergebnisse für die einzelnen Immunglobulinklassen auf. Für bis zu 90% der Paare konnte auch quantitativ eine weitgehende Übereinstimmung der Resultate (mit maximal einer Titer- oder Wertstufe Unterschied) festgestellt werden. Da die Antikörperverteilung aufgrund der Kammerwasserdynamik innerhalb des Auges relativ gleichmäßig ist, kann ohnehin davon ausgegangen werden, dass ein Vorderkammerbefund gut mit der Situation im hinteren Augenabschnitt korreliert (THURAU, 2003). Somit konnte ein weiteres Mal bestätigt werden, dass

sich bei Pferden, deren klinische Befunde nicht eindeutig für das Vorliegen einer leptospirenbedingten Uveitis sprechen, die Durchführung einer diagnostischen Parazentese zur Überprüfung einer Indikation für die Vitrektomie hervorragend eignet, da es sich bei dem Eingriff zudem um eine weitgehend komplikationslose Methode handelt (WOLLANKE, 2002).

Ein anderes Bild lieferte hingegen die Betrachtung des DNA-Nachweises in Kammerwasser und Glaskörpermaterial von Pferden mit ERU in der vorliegenden Arbeit. So stimmten nur 36% der Probenpaare in einem negativen Ergebnis überein. In 55% der Fälle glückte der Nachweis nur im Kammerwasser und damit sechs Mal häufiger als im Glaskörper (9%). WOLLANKE (2002) führte eine ähnliche Untersuchung jedoch mit der kulturellen Isolierung von Leptospiren durch und kam zu dem Ergebnis, dass der direkte Erregernachweis (in diesem Fall allerdings mittels Kultur) häufiger in Glaskörpermaterial glückte. Auch ROCZEK (2008) verglich die PCR-Ergebnisse von 13 Kammerwasser- und Glaskörperproben aus Pferdeaugen mit ERU, wobei Leptospiren-DNA ausschließlich im Glaskörper nachweisbar war. Dies könnte tatsächlich darauf hindeuten, dass sich Leptospiren im Laufe der Erkrankung in den Glaskörperraum zurückziehen und dort persistieren, während sie dann im Kammerwasser seltener nachweisbar werden. Jedoch reichen die wenigen derzeit vorliegenden Daten nicht, um diesbezüglich eine zuverlässige Aussage zu treffen. Interessant (und im Falle der Kultur auch aussagekräftiger) wäre eine vergleichende Untersuchung von Kammerwasser- und Glaskörperproben mittels Kultur oder mikroskopischer Darstellung. Dies könnte jedoch an der hohen Menge Probenmaterial, das für die Kultur benötigt wird, bei der Parazentese jedoch nicht immer gefahrlos entnommen werden kann, sowie der geringen Sensitivität (FAINE, 1982; BREM et al., 1988a; SMITH et al., 1994) der Leptospirenkultur scheitern.

5.5 Übereinstimmung der angewandten Testverfahren untereinander sowie mit der klinischen Diagnose „ERU“

5.5.1 Übereinstimmung von MAR, ELISA, PCR und Kultur hinsichtlich positiver oder negativer Testergebnisse

Eine Überprüfung der Übereinstimmung der serologischen Testverfahren für Leptospirenantikörper in den verschiedenen Proben von Pferden mit ERU mittels Cohens Kappa erbrachte im Serum die größte Übereinstimmung zwischen der MAR und dem IgM-ELISA und im Glaskörper zwischen der MAR und dem Nachweis von IgA mittels ELISA. Im Kammerwasser konnten keine wesentlichen Übereinstimmungen der indirekten Nachweis-

methoden für Leptospirenantikörper festgestellt werden. Der hohe Wert für Kappa bei Betrachtung der MAR und des IgM-ELISAs im Serum lässt sich dadurch erklären, dass IgM hauptverantwortlich für Agglutination ist (HANSON, 1973), und mittels MAR nur agglutinierende Antikörper erfasst werden können (ADLER et al., 1980). Die hohe Übereinstimmung zwischen der MAR und dem Nachweis von IgA gegen Leptospiren im Glaskörper muss ebenfalls auf die Fähigkeit von IgA zur Agglutination zurückgeführt werden (TIZARD, 2004). Zudem war in der vorliegenden Arbeit spezifisches IgA die intraokular am häufigsten nachweisbare Immunglobulinklasse.

Jedoch waren sowohl in Serumproben, die ausschließlich im ELISA positiv reagierten, IgM-Antikörper enthalten, als auch IgA-Antikörper in Glaskörperproben, die mittels MAR als negativ beurteilt wurden. Daher liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den erst mittels ELISA detektierten Immunglobulinen um nicht-agglutinierende Antikörper handelte. Zudem könnte die fehlende Erfassung dieser Proben mittels MAR auf eine Festsetzung des Cut-off-Wertes bei einem Antikörpertiter von 1:100 zurückgehen. Eine Studie über die Übereinstimmung von MAR-Resultaten bei verschiedenen Cut-off-Werten mit denen eines parallel durchgeführten IgG-ELISAs zur Bestimmung der Konzentrationen von Serumantikörpern gegen Leptospiren bei Nagern zeigte, dass die Herabsetzung des MAR-Titers, der als diagnostisch erachtet wurde, zu einer höheren und bis zu 100%igen Übereinstimmung mit den Ergebnissen des ELISAs führte. Aufgründessen schlugen die Autoren vor, bereits niedrigere MAR-Titer gegen Leptospiren als signifikant anzusehen (VANASCO et al., 2001). Auch SUWIMONTEERABUTR und Mitarbeiter hielten es für denkbar, dass zunächst nur mittels ELISA nachweisbare Leptospirenantikörper bei Herabsetzung des Cut-off-Wertes auch in der MAR detektiert würden (SUWIMONTEERABUTR et al., 2005).

Bei Betrachtung der Übereinstimmung zwischen den indirekten Nachweisverfahren und dem direkten Erregernachweis mittels PCR oder Kultur in der vorliegenden Arbeit konnte nur für die Untersuchung des Glaskörpermaterials eine moderate bzw. ausreichende Übereinstimmung zwischen MAR und PCR bzw. Kultur sowie eine geringe zwischen ELISA und PCR festgestellt werden. Auffallend war, dass die Anwendung der PCR nur bei zwei (3%) (MAR) bzw. einer (1%) (ELISA) Glaskörperprobe(n) ohne detektierbare Leptospirenantikörper zu einem positiven Ergebnis führte. Im Kammerwasser enthielten vier (31%) (MAR) bzw. zwei (15%) (ELISA) Ansätze nur Leptospiren-DNA, nicht aber spezifische Antikörper. Jedoch reagierte unter den getesteten Glaskörper- und Kammerwasserproben jeweils nur ein Ansatz in beiden indirekten Nachweisverfahren negativ, in der PCR hingegen positiv. Das Resultat könnte einerseits darauf zurückgeführt werden, dass es in diesen beiden Fällen im Rahmen der intraokularen Leptospireninfektion nicht zur lokalen Bildung von

spezifischen Antikörpern kam. Andererseits könnte es sich um ein falsch-negatives Testergebnis aufgrund einer Infektion mit einer Leptospirenserovar handeln, auf die weder in der MAR noch im ELISA getestet wurde. Obwohl die betreffende Kammerwasserprobe nicht für die Abklärung einer Indikation für die Vitrektomie entscheidend war, erscheint dennoch insbesondere bei der diagnostischen Kammerwasseruntersuchung die Kombination eines Antikörpernachweises mit der PCR sinnvoll zur Abklärung der Ätiologie von Augenveränderungen (GESELL et al., 2006). ROCZEK (2008) konnte in ihrer Arbeit bei 5% der untersuchten intraokularen Proben von Pferden mit ERU ausschließlich Leptospiren-DNA, nicht jedoch spezifische Antikörper, nachweisen und durch Anwendung der PCR eine Sensitivitätssteigerung von einem bis 15% erzielen.

Die beiden direkten Nachweismethoden für Leptospiren stimmten in ihrem Resultat bei der Untersuchung von Glaskörpermaterial der ERU-Patienten moderat überein. Bei ROCZEK (2008) wiesen die beiden Verfahren eine gute Übereinstimmung mit dem gleichen Testergebnis in 83% der Fälle auf.

5.5.2 Übereinstimmung von Leptospirennachweisen im Glaskörper mit der klinischen Diagnose „ERU“

Die Klinik für Pferde der LMU besitzt langjährige Erfahrung in der Untersuchung und Diagnosestellung bei Pferdeaugen mit uveitischen Veränderungen, und Studien belegen eine hohe Übereinstimmung der klinischen Diagnose „ERU - bedingt durch Leptospiren“ mit einem erfolgreichen Antikörpernachweis aus intraokularem Probenmaterial dieser Tiere in der MAR (WOLLANKE, 2002; WOLLANKE et al., 2004b; GESELL, 2004). Aus diesem Grund erschien es gerechtfertigt, die Sensitivität und Spezifität sowie den positiven und negativen prädiktiven Wert der verwendeten Untersuchungsmethoden für einen Leptospirennachweis anhand vorhandener oder fehlender Augenveränderungen im Sinne einer ERU zu beurteilen.

Die höchste Übereinstimmung mit der klinischen Diagnose „ERU“ zeigte die Anwendung der ELISA-Technik mit 86% (und dabei insbesondere der Nachweis von IgA) und wies damit die höchste Sensitivität bei einer Spezifität von 100% auf. Der Nachweis von IgG gegen Leptospiren besaß eine Sensitivität von 80% bei einer Spezifität von ebenfalls 100% und war somit der MAR (Sensitivität: 82%, Spezifität: 90%) und PCR (Sensitivität: 72%, Spezifität: 100%) überlegen. Lediglich die Untersuchung auf lokale IgM-Antikörper erwies sich als wenig sensitiv für eine intraokulare Leptospireninfektion (39%). Auch bei Berechnung der prädiktiven Werte stellte sich die ELISA-Untersuchung auf IgA als geeigneteste Methode heraus, eine intraokulare Leptospireninfektion bei zuvor als eindeutig unter ERU

leidend eingestuften Pferden mit Augenveränderungen nachzuweisen. Am zuverlässigsten ließen sich die beurteilten Nachweisverfahren an Proben von als solche bekannten Trägertieren evaluieren. In der Leptospirendiagnostik erweist sich jedoch gerade die Kultur als sehr insensitiv (FAINE, 1982; BREM et al., 1988a; SMITH et al., 1994) und erscheint somit ungeeignet.

5.6 Beurteilung der ELISA-Ergebnisse bei der Untersuchung von Glaskörpermaterial

Gemessen an der in der Literatur oftmals als „Goldstandard der Leptospirendiagnostik“ beschriebenen MAR (ELLIS, 1986; VINETZ, 1997) besäße die ELISA-Technik bei der Untersuchung von Glaskörperproben von Pferden mit ERU und solchen ohne Augenveränderungen in dieser Studie eine Sensitivität von 98% und eine Spezifität von 61%. Der positive prädiktive Wert läge bei 90% und der negative bei 92%. Beachtet man aber, dass die beiden serologischen Testverfahren unterschiedliche Antigen-Antikörper-Systeme nachzuweisen scheinen (ADLER et al., 1980, 1982; BALLARD et al., 1984), entstehen Zweifel an der tatsächlichen Vergleichbarkeit der Methoden und der Evaluierung der ELISA-Technik anhand ihrer Übereinstimmung mit den Testergebnissen der MAR. Auch WOODWARD und Mitarbeiter warnten zur Vorsicht bei der Interpretation von ELISA-Ergebnissen im Vergleich zur MAR, da die MAR selbst keine exakt korrekten Resultate liefern würde (WOODWARD et al., 1997). YAN und Mitarbeiter kritisierten ebenfalls, dass die Hauptfehlerquelle bei der Beurteilung einer ELISA-Technik in einem Vergleich mit den Ergebnissen aus der MAR läge, da der serologische Status, wie in der MAR ermittelt, oftmals nicht den tatsächlichen Infektionsstatus des Tieres (Rind) widerspiegelte (YAN et al., 1999).

RIBOTTA und Mitarbeiter vermuteten sogar, dass der ELISA eine höhere Sensitivität besäße als die MAR, da er in der Lage ist, sowohl agglutinierende als auch nicht-agglutinierende Antikörper nachzuweisen. So würde die tatsächliche Spezifität des ELISAs bei einer Evaluierung am Goldstandard MAR unterschätzt. Die Autoren lieferten zudem einen Überblick über Veröffentlichungen aus der Veterinär- und Humanmedizin, in denen von einer höheren Sensitivität der ELISA-Technik verglichen mit der MAR beim Nachweis von Leptospirenantikörpern berichtet wurde (ADLER et al., 1980; THIERMANN und GARRETT, 1983; HARTMAN et al., 1984a; TRUEBA et al., 1990; RIBEIRO et al., 1995; SURUJBALLI et al., 1997b; RIBOTTA et al., 2000). Eine höhere Sensitivität des ELISAs im Vergleich zur MAR nahmen auch andere Autoren an (WINSLOW et al., 1997; BREM et al., 1999b; CUMBERLAND et al., 1999; DUTTA und CHRISTOPHER, 2005).

Bei Betrachtung der Resultate von MAR und ELISA bei der Untersuchung der Glaskörperproben anamnestisch und klinisch nicht unter ERU leidender Pferde scheint in der vorliegenden Arbeit die ELISA-Technik sogar gegenüber der MAR überlegen, da die ELISA-Ergebnisse (100% negativ) eine höhere Übereinstimmung mit den fehlenden ophthalmologischen Befunden aufwiesen als die der MAR (90% negativ). Da des Weiteren der positive Nachweis von Leptospirenantikörpern im Glaskörper der vier gesunden Augen mittels MAR im darauffolgenden ELISA nicht mehr bestätigt werden konnte, obwohl sich die Wahl der Serovare für die ELISA-Untersuchung am Ergebnis der MAR orientierte, und zudem auch die Untersuchung der zugehörigen Kammerwasserproben sowohl in der MAR als auch im ELISA ein negatives Ergebnis erbrachte, gilt es zu bedenken, dass es sich beim positiven MAR-Resultat in der Glaskörperprobe womöglich um ein falsch-positives Ergebnis handelt. Auch wurde in der MAR jeweils nur ein Titer von 1:100 nachgewiesen, wobei es sich um die niedrigste als signifikant zu erachtende Verdünnungsstufe handelt (OIE, 2008).

Andere Autoren hielten jedoch auch eine inapparente intraokulare Leptospireninfektion, eine Persistenz der Erreger im Auge mit erst im Laufe der Zeit einsetzenden Anzeichen einer ERU, eine intraokulare Leptospireninfektion mit Antikörperproduktion und Erregereliminierung, eine Verunreinigung des Untersuchungsmaterials mit Antikörpern aus dem Blut oder eine Kreuzreaktion in Form primär nicht gegen Leptospiren gerichteter Antikörper für mögliche Erklärungen des Nachweises intraokularer Leptospirenantikörper bei klinisch gesunden Augen (WOLLANKE, 2002; GESELL, 2004).

5.7 Die Rolle des ELISAs, insbesondere von IgA, bei der (intraokularen) Leptospirendiagnostik

Im Rahmen der Auswertung archivierter Patientendaten der Jahre 2005 bis 2007 aus der Klinik für Pferde der LMU über den Nachweis von Leptospirenantikörpern in 258 Glaskörper- und Kammerwasserproben von Pferden mit Augenveränderungen mittels ELISA nach einem negativen Testergebnis in der MAR konnte festgestellt werden, dass eine zusätzliche Untersuchung des Probenmaterials mittels ELISA in 37% der Fälle noch zu einem positiven Testergebnis führte. Bemerkenswert ist hierbei, dass in über 60% der betreffenden Proben das positive Resultat einzig und allein auf den Nachweis von IgA zurückzuführen war, und dass IgA nur in einer einzigen der 95 erst im ELISA positiv reagierenden Proben nicht nachgewiesen werden konnte.

Auch in der vorliegenden prospektiven Studie an 94 Glaskörper- und Kammerwasserproben von Pferden mit ERU, in der standardmäßig beide indirekten Nachweismethoden eingesetzt

wurden, reagierten 12% ausschließlich im ELISA positiv. Davon war in 45% der Fälle das positive Ergebnis nur auf den Nachweis von IgA gegen Leptospiren zurückzuführen. Bei wiederum nur einem Ansatz war kein spezifisches IgA detektierbar.

Der deutlich niedrigere Prozentsatz der durch Einsatz der ELISA-Technik erst als positiv beurteilten Proben ist möglicherweise auf die sorgfältigere Selektion der Patienten für eine Teilnahme an der vorliegenden Studie zurückzuführen. Den archivierten Patientendaten konnte entnommen werden, dass in nicht unerheblicher Anzahl intraokulare Proben auch von Pferden mit Glaukom oder verschiedenen Keratitisformen untersucht worden waren, von denen aber bekannt ist, dass sie nur etwa in 14% (Glaukom) bzw. 7% (andere Augenerkrankungen) der Fälle in der MAR nachweisbare Antikörpertiter gegen Leptospiren enthalten (WOLLANKE, 2002). Möglicherweise wurde daher ein so viel höherer Prozentsatz von ihnen erst mit der sensitiveren Testmethode, dem ELISA, erfasst. In die Untersuchungen von 2008 hingegen gingen lediglich die Laborbefunde von Pferden ein, die bereits das typische klinische Bild einer ERU zeigten oder deren Kammerwasserbefund positiv war und somit vorab schon auf eine Leptospirenbeteiligung schließen ließ. Aus diesem Grund war die Wahrscheinlichkeit höher, diese Patienten bereits mittels MAR zu erfassen, ohne dass von der höheren Sensitivität des ELISAs profitiert werden musste.

Betrachtet man nämlich ausschließlich die 12 Kammerwasserproben, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit zu diagnostischen Zwecken gewonnen wurden, und somit Material aus Augen mit nicht eindeutigen Befunden im Sinne der ERU, wurden in vier Fällen (33%) nur bei Anwendung der ELISA-Technik Antikörper gegen Leptospiren detektiert. Bei allen vier war der Nachweis von IgA gegen Leptospiren erfolgreich. Zwei Mal war nur IgA nachweisbar (50%). Das Ergebnis entspricht somit eher dem der Auswertung der archivierten Patientendaten.

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit erscheint ein falsch-positives Ergebnis im IgA-ELISA sehr unwahrscheinlich, da in den intraokularen Proben der augengesunden Kontrollpferde mittels ELISA im Gegensatz zur MAR keine Leptospirenantikörper und mittels PCR auch keine Erregernukleinsäure nachweisbar waren⁷, was für die Zuverlässigkeit der ELISA-Technik in der intraokularen Leptospirendiagnostik spricht.

Da IgG trotz eines mit IgA verglichen frequenteren Nachweises im Serum intraokular seltener detektiert werden konnte als IgA⁸, es aber mit 180 kDa ein geringeres Molekulargewicht besitzt als das Dimer IgA (als Monomer 150 kDa) (TIZARD, 2004), kann das

⁷siehe Kapitel 4.4.2 auf Seite 62, Kapitel 4.4.5 auf Seite 64 sowie Kapitel 4.4.3 auf Seite 63

⁸siehe Kapitel 4.4.1 auf Seite 59

Vorkommen von IgA im Auge wahrscheinlich auf eine lokale Produktion und Sekretion zurückgeführt werden. Zudem war IgA sowohl im Kammerwasser als auch im Glaskörper die am häufigsten alleinig nachweisbare Immunglobulinklasse.

WAGNER und Mitarbeiter führten ebenfalls eine Differenzierung der Immunglobulinisotypen im Glaskörper an ERU erkrankter und augengesunder Pferde mittels ELISA durch. Die Autoren konnten lediglich bei Pferden mit ERU im Glaskörper eine selektive und deutliche relative Erhöhung des IgA-Gehaltes gegenüber dem autologen Serum beobachten, was nach ihrer Ansicht für eine lokal gesteigerte Synthese von IgA als Ausdruck einer lokalen immunologischen Reaktion auf ein im Auge befindliches Antigen sprach (WAGNER et al., 1997). VERMA und Mitarbeiter konnten ausschließlich in uveitisch veränderten Pferdeaugen IgA-Antikörper gegen die leptospiralen Lipoproteine LruA und LruB mittels ELISA nachweisen (VERMA et al., 2005). In der Untersuchung von ROCZEK (2008) war IgA gegen Leptospiren in intraokularen Proben von Pferden mit ERU ebenfalls oftmals als einzige Immunglobulinklasse im ELISA nachweisbar.

Die Resultate der vorliegenden Arbeit (wie etwa der frequentere Nachweis von IgA gegen Leptospiren im Glaskörper zeitnah zum akuten Entzündungsgeschehen im Auge⁹ oder IgA als alleinig intraokular nachweisbare Immunglobulinklasse bei Pferden mit fraglicher ERU¹⁰) sowie die Erkenntnisse aus der Literatur (WAGNER et al., 1997; VERMA et al., 2005; ROCZEK, 2008) weisen auf die besondere Rolle von (spezifischem) IgA im Krankheitsbild der ERU hin.

Zudem ließ sich feststellen, dass die ELISA-Untersuchung des Kammerwassers, insbesondere auf IgA, in hohem Maße geeignet ist, vor allem bei Pferden mit fraglichen ophthalmologischen Befunden im Sinne einer leptospirenbedingten Uveitis doch noch eine Beteiligung des Erregers nachweisen zu können. Von dieser Erkenntnis könnte möglicherweise auch die Humanophthalmologie profitieren, da beim Menschen ein nur sehr viel geringeres Kammerwasservolumen gefahrlos gewonnen werden kann (WOLLANKE, 2002), und somit eine starke Limitierung in der mikrobiologischen Diagnostik besteht. Da aber auch beim Menschen das Bild der leptospirenbedingten Uveitis bekannt ist, könnte im Falle einer Vergleichbarkeit der lokalen humoralen Immunantwort bei Pferd und Mensch der Nachweis von IgA gegen Leptospiren ebenfalls von hohem diagnostischen Wert sein und möglicherweise eine Untersuchung intraokularer Proben mittels PCR ergänzen.

Da darüber hinaus in der Humanmedizin weltweit von einer zunehmenden Inzidenz der

⁹Kapitel 5.2.1 auf Seite 109

¹⁰Kapitel 5.2.3 auf Seite 112

Leptospireninfektion sowohl in Entwicklungs- als auch Industrieländern berichtet wurde (BHARTI et al., 2004; HIGGINS, 2004), und zudem nur wenige Speziallabore die Expertise und Ausstattung zur Durchführung einer MAR in der Leptospirendiagnostik besitzen (GUSSENHOVEN et al., 1997; CUMBERLAND et al., 1999; FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001), erscheint die ELISA-Technik sowie die Entwicklung neuer indirekter Nachweisverfahren für eine Routinediagnostik insbesondere von Bedeutung (FLANNERY et al., 2001; NATARAJASEENIVASAN et al., 2008). Dies zeigt sich auch im zunehmenden Einsatz der Methode in der Human- und Veterinärmedizin (TERPSTRA et al., 1985; WINSLOW et al., 1997; CUMBERLAND et al., 1999; BOMFIM et al., 2005; DEY et al., 2007, 2008).

5.8 Mögliche Vorgehensweise in der Labordiagnostik bei Pferden mit fraglichen Augenbefunden

5.8.1 Serumuntersuchung als „Screeningmethode“

Die Eignung einer Serumuntersuchung bei Pferden mit klinisch nicht eindeutigen Augenbefunden auf Leptospirenantikörper mittels ELISA-Technik einschließlich einer Differenzierung der Immunglobulinklassen M, G und A wurde in Kapitel 5.1.1 auf Seite 102 diskutiert. Daher soll an dieser Stelle nicht mehr näher darauf eingegangen werden.

5.8.2 Kammerwasseruntersuchung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten die Vermutung unterstützen, dass die ELISA-Technik und insbesondere der Nachweis von IgA gegen Leptospiren sehr sensitiv sowie spezifisch und der MAR im Nachweis intraokularer Leptospirenantikörper bei Pferden mit ERU überlegen ist. Aufgrund des höheren Zeitaufwandes der am LGL etablierten ELISA-Methode sowie der Untersuchung auf lediglich zwei bis drei in Frage kommende Leptospirenservovaren mit dem Risiko falsch-negativer Ergebnisse erscheint es dennoch ratsam, zunächst wie bisher mittels MAR auf ein größeres Spektrum an Serovaren (*Bratislava*, *Canicola*, *Copenhageni*, *Grippotyphosa*, *Hardjo*, *Icterohaemorrhagiae*, *Javanica*, *Pomona*, *Pyrogenes*, *Saxkoebing*, *Sejroe* und *Tarassovi*) zu testen. Bei negativem Ergebnis der MAR sollte im Anschluss auf wenige ausgewählte Serovare mittels ELISA untersucht werden. Die Eignung von IgA als nachzuweisender spezifischer Antikörper bestätigte sich in vielen Resultaten der vorliegenden Arbeit. Zudem fehlte das Immunglobulin in nur einer einzigen von zahlreichen Kammerwasserproben, die im Zeitraum von 2005–2007 sowie während der Durchführung der Studie von 2008 im ELISA, nach negativem Testergebnis in der MAR, positiv auf Leptospirenantikörper getestet wurden. Daher kann mit hoher diagno-

stischer Sicherheit sowie reduziertem Zeit- und Kostenaufwand die Untersuchung zukünftig auf IgA gegen die hauptsächlich vorkommenden Leptospirenserovare *Grippityphosa* und *Bratislava* beschränkt werden. Die PCR erscheint des Weiteren von Bedeutung, die indirekten Nachweisverfahren zu unterstützen (GESELL et al., 2006; ROCZEK, 2008). ROCZEK (2008) kam in ihrer Arbeit zu dem Ergebnis, dass die Kombination aus ELISA und einem direkten Verfahren zum Leptospirennachweis verglichen mit anderen Kombinationen zweier Testmethoden zu den meisten Positivbefunden führte.

6 Zusammenfassung

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) ist meist Folge einer intraokular persistierenden Leptospireninfektion. Das bei den aus therapeutischen Gründen durchgeführten Vitrektomien anfallende Glaskörpermaterial sowie das bei diagnostischen Parazentesen gewonnene Kammerwasser betroffener Pferde kann für weiterführende Untersuchungen genutzt werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe von Resultaten aus ELISA-Untersuchungen von Seren und intraokularem Material (Glaskörper und Kammerwasser) auf Leptospirenantikörper der Klassen M, G und A Hinweise auf die systemische und lokale humorale Immunantwort von Pferden mit ERU zu gewinnen. Zusätzlich wurde die Eignung der ELISA-Technik für den Nachweis einer intraokularen Leptospireninfektion überprüft, um dadurch zur Verbesserung der Labordiagnostik im Rahmen von Kammerwasseruntersuchungen beizutragen.

Bei 80 Augen von 72 Pferden mit ERU wurden neben der Erfassung von Anamnese, klinischen Befunden und makroskopischen Glaskörperveränderungen auch Glaskörperproben mittels MAR, ELISA und PCR sowie teils kulturell auf Leptospiren und spezifische Antikörper untersucht. 44 Serum- und 29 Kammerwasserproben wurde ebenfalls auf Leptospirenantikörper bzw. spezifische Antikörper und Erreger-DNA getestet. Zusätzlich dienten Seren und intraokulare Proben von 22 vorberichtlich und klinisch augengesunden Pferden als Kontrolle.

Seren ERU-kranker Pferde (n=44) unterschieden sich signifikant in ihrem ELISA-Ergebnis auf Leptospirenantikörper (insbesondere im Nachweis von IgG) von der augengesunden Kontrollgruppe (n=22) ($p=0,004$). In ausgewählten Fällen erscheint daher die Serumuntersuchung auf Leptospirenantikörper mittels ELISA zur Unterstützung oder Absicherung einer klinischen Verdachtsdiagnose auf Vorliegen einer ERU diskussionswürdig. Zudem ließen die Ergebnisse des ELISAs annehmen, dass das Krankheitsbild der ERU mit einer veränderten systemischen humoralen Immunantwort assoziiert ist.

Ebenfalls signifikant waren die Unterschiede zwischen Pferden mit ERU (n=80 bzw. 29)

und augengesunden Tieren (n=42) bei der Untersuchung intraokularen Materials (Glaskörper und Kammerwasser) mittels MAR, ELISA und PCR ($p < 0,001$). Die entscheidende Rolle der Leptospiren in der Ätiologie und Pathogenese der ERU konnte somit ein weiteres Mal untermauert werden. Zudem reagierte kein Ansatz der Kontrollpferde im ELISA oder in der PCR positiv, was für eine hohe Spezifität der beiden Methoden spricht.

In intraokularen Proben von Pferden mit ERU waren am häufigsten spezifische Immunglobuline der Klasse A nachweisbar. Der Nachweis von IgA-Antikörpern gegen Leptospiren erwies sich daher in der vorliegenden Arbeit als besonders sensitiv für eine intraokulare Leptospireninfektion und somit als bedeutend für die Labordiagnostik der ERU. Zudem scheint IgA eine wichtige Rolle in der Immunologie und Pathogenese der ERU zu spielen.

Zwischen den ELISA-Ergebnissen im Serum von unter ERU leidenden Pferden und dem Patientenvorbericht (Gesamtdauer der Erkrankung, Anzahl an Uveitisschüben, Zeitpunkt des letzten Schubes) waren keine wesentlichen statistischen Zusammenhänge erkennbar. Es konnten somit keine verlässlichen Hinweise auf die Dynamik der Antikörperproduktion gegen Leptospiren im Serum gewonnen werden. Für die Untersuchung intraokularer Proben mittels ELISA-Technik ließen sich jedoch signifikante Korrelationen (insbesondere für spezifisches IgG und IgA) mit der Krankheitsgeschichte, den Augen- und Glaskörperveränderungen beobachten. Diese Zusammenhänge lieferten Hinweise auf die lokale humorale Immunantwort gegen Leptospiren. Eine vollständige Charakterisierung der Infektionsverläufe gelang jedoch nicht.

In bis zu 90% der untersuchten Serum- und intraokularen Proben von Pferden mit ERU stimmten MAR und ELISA in einem positiven oder negativen Resultat überein. Andernfalls waren die Leptospirenantikörper meist nur mittels ELISA-Technik nachweisbar. In diesen Fällen war im Serum meist die Untersuchung auf IgG und in den intraokularen Proben auf IgA erfolgreich. Die Anwendung der ELISA-Technik scheint daher für den Nachweis intraokularer Leptospirenantikörper der MAR an Sensitivität überlegen zu sein.

Ein direkter Erregernachweis in intraokularen Proben an ERU erkrankter Pferde war in Serum und Kammerwasser mit erniedrigten Gehalten oder dem fehlenden Nachweis von Antikörpern gegen Leptospiren assoziiert. Im Glaskörpermaterial hingegen korrelierte der Leptospirennachweis mit höheren Konzentrationen an spezifischen Antikörpern. Bei ausreichend starker intraokularer Immunantwort können die Leptospiren vermutlich aus dem flüssigen Kammerwasser leichter eliminiert werden als aus dem Glaskörperraum. Dies unterstützt die Vermutung, dass dem Glaskörper im Rahmen der intraokularen Leptospirenpersistenz bei Pferden mit ERU eine besondere Rolle zukommt. Die durch den intraokularen

Aufenthalt der Leptospiren induzierte Antikörperproduktion scheint nicht in der Lage zu sein, die Infektion zu beseitigen. Sie führt jedoch zu schweren Schäden am Auge.

Beim Vergleich der Antikörpergehalte gegen Leptospiren in Serum und intraokularen Proben der ERU-Patienten waren bei bis zu 60% der Probenpaare (IgA im Glaskörper) die Konzentrationen im Auge höher als im Serum. Ein bedeutender Anteil spezifischer Antikörper (insbesondere IgA) wird daher vermutlich lokal produziert.

Kammerwasser- und Glaskörperprobenpaare aus an ERU erkrankten Pferdeaugen stimmten hinsichtlich eines positiven oder negativen Testergebnisses am häufigsten bei der Untersuchung mittels MAR überein. Nahezu ebenso häufig lieferten die Probenpaare ein übereinstimmendes Resultat im ELISA. Daher konnte die Eignung der diagnostischen Parazentese zur Überprüfung einer Indikation für die Vitrektomie bei Pferdeaugen mit fehlenden eindeutigen klinischen Befunden im Sinne der ERU bestätigt werden.

Gemessen am Goldstandard MAR errechnete sich für den ELISA eine diagnostische Sensitivität von 98% und eine Spezifität von 61%. Der positive prädiktive Wert lag bei 90% und der negative prädiktive Wert bei 92%. Die höchste Übereinstimmung mit einem klinisch eindeutigen Bild wies von den eingesetzten Nachweismethoden dagegen die Anwendung der ELISA-Technik und hierbei der Nachweis von spezifischem IgA auf. Für das Testverfahren wurden des Weiteren die höchste Sensitivität (86%) und Spezifität (100%) sowie die höchsten prädiktiven Werte bei der Untersuchung von Glaskörperproben eindeutig erkrankter sowie gesunder Pferdeaugen berechnet.

37% der intraokularen Proben von Pferden mit Augenveränderungen aus den Jahren 2005–2007, in denen mittels MAR keine Antikörper gegen Leptospiren nachweisbar waren, reagierten im daraufhin durchgeführten ELISA positiv. Dabei war insbesondere die Untersuchung auf IgA (alleinig) positiv. Dies unterstreicht ein weiteres Mal die Bedeutung der ELISA-Technik und des Nachweises von spezifischem IgA für die intraokulare Leptospirendiagnostik bei Pferden mit ERU.

Eine diagnostische Parazentese am klinisch gesunden Auge bei Pferden mit einseitiger ERU kann während der zur Vitrektomie ohnehin erforderlichen Allgemeinnarkose in Erwägung gezogen werden, da 19% der im Rahmen der vorliegenden Studie untersuchten entsprechenden Kammerwasserproben Leptospirenantikörper enthielten.

Bei Betrachtung der Resultate der vorliegenden Arbeit erscheint es ratsam, zu diagnostischen Zwecken entnommene Kammerwasserproben von Pferden mit fraglicher ERU zu-

nächst mittels PCR auf Leptospiren-DNA und in der MAR auf spezifische Antikörper zu untersuchen. Bei einem negativen MAR-Ergebnis empfiehlt sich im Anschluss die Anwendung der ELISA-Technik zum Nachweis von IgA-Antikörpern gegen Leptospiren.

7 Summary

Equine recurrent uveitis (ERU) is in the majority of cases a consequence of a persistent intraocular leptospiral infection. Intraocular fluids of affected horses can be easily obtained during therapeutical vitrectomy or anterior chamber paracentesis, and are therefore available for further analysis.

The purpose of this study was to detect antibodies directed against leptospire in the sera and intraocular specimens of horses with ERU using an indirect ELISA-technique. The results for specific immunoglobulins M, G and A were expected to provide information on the systemic as well as local humoral immune responses of horses suffering from recurrent uveitis. A further aim of the study was to evaluate the suitability of the ELISA for the detection of intraocular leptospiral infection, thus helping to improve laboratory diagnosis on the basis of aqueous humour analysis.

The history of 80 uveitic eyes (72 horses) was taken, an ocular examination performed and changes of the vitreous body recorded. Vitreous samples were submitted for the following laboratory tests: MAR and ELISA for the detection of leptospiral antibodies and PCR and culture for the detection of leptospire. 44 sera and 29 aqueous humour samples were also tested for specific antibodies or antibodies and leptospiral DNA. The sera and intraocular specimens of 22 horses without a history or clinical signs of ocular disease served as controls.

There was a significant difference in the serum ELISA results (especially in the detection of IgG) of horses with ERU (n=44) compared with those in the control group (n=22) (p=0,004). This suggested that it would be worth considering the use of an ELISA to evaluate sera from horses with suspected recurrent uveitis, and thus support clinical evidence in making a diagnosis. Besides, the results proposed that ERU is associated with an altered systemic humoral immune response against leptospire.

There was also a significant difference between the control horses (n=42) and those suffering from ERU (n=80 and 29 respectively) when investigating vitreous and aqueous humour samples using MAR, ELISA and PCR (p<0,001). These results confirmed that leptospire

have a decisive role in the aetiology and pathogenesis of ERU. None of the control group reacted positively in ELISA nor PCR. This shows the high specificity of these two laboratory tests.

Intraocular samples from horses with recurrent uveitis most often contained specific IgA. In this study, detection of IgA against leptospire proved to be especially sensitive for an intraocular leptospiral infection and, thus important for the laboratory diagnosis of ERU. Based on these results, it seems likely that IgA further plays a crucial role in immunology and pathogenesis of ERU.

No significant statistical relationship was found between the horses' history (total duration of disease, number of uveitic attacks, time passed since the last inflammatory episode) and the results from the detection of leptospiral antibodies in sera by ELISA. Therefore, no reliable information was gained on the dynamics of antibody production in sera of affected cases. Significant correlations (especially for specific IgG and IgA), however, were observed for ELISA results from intraocular samples and the history, ocular symptoms and vitreal changes of horses with ERU. These relations served as information on the local humoral immune response against leptospire. However, the course of infection could not be fully characterised.

In up to 90% of the tested specimens taken from horses with ERU, MAR and ELISA agreed in their positive or negative results. Otherwise, leptospiral antibodies were mostly detected solely by ELISA. In these cases specific IgG was most frequently detected in sera and IgA in intraocular samples. Thus, the application of the ELISA-technique seems superior to the MAR in the detection of intraocular leptospiral antibodies regarding its sensitivity.

In serum and aqueous humour of horses with ERU, direct intraocular detection of bacteria was associated with low levels or absence of leptospiral antibodies. In contrast, high levels of specific immunoglobulins were detected in vitreous material in which bacteria were observed. It is possible that, faced with a sufficiently strong local immune response, leptospire are eliminated more easily from the liquid aqueous humour than from the vitreous cavity. This observation supports the assumption that the vitreous plays a particular role in the intraocular persistence of leptospire in horses with ERU. The local antibody synthesis evoked by intraocularly residing leptospire does not seem to be able to eliminate the infection but may cause severe ocular damage.

Comparing the antibody concentrations against leptospire in sera and intraocular specimens of horses with ERU, in up to 60% of paired samples (IgA in vitreous humour) the

concentrations found in the eye were higher than those found in the serum. Therefore, an important fraction of specific antibodies (especially IgA) is presumably produced locally.

Paired aqueous and vitreous humour samples from eyes affected with ERU agreed in a positive or negative test result most often when MAR was applied. Using the ELISA-technique, agreement was achieved at nearly the same frequency. Thus, the suitability of a diagnostic anterior chamber paracentesis to verify an indication for vitrectomy in cases missing definite clinical signs in terms of ERU could be confirmed in this study.

Setting the MAR as goldstandard, the ELISA had a sensitivity of 98% and a specificity of 61%. The positive predictive value was 90% and the negative 92%. The highest level of agreement with the definite clinical diagnosis ERU, however, was calculated for the ELISA-technique and especially for the detection of specific IgA. It was also ascribed the highest sensitivity (86%), specificity (100%) and predictive values in assessing vitreous samples from clinically sick and healthy eyes.

37% of intraocular samples of horses with ocular complaints analysed between 2005 and 2007 that did not contain any detectable leptospiral antibodies in the MAR showed a positive reaction in the ELISA which followed. Therein, especially the detection of IgA was (solely) successful. This result further confirmed the importance of the ELISA-technique and especially the detection of specific IgA for the diagnosis of an intraocular leptospiral infection in horses suffering from recurrent uveitis.

Performing an anterior chamber paracentesis in the clinically healthy eye of horses with unilateral recurrent uveitis can be taken into consideration during general anesthesia for vitrectomy of the affected eye, as 19% of aqueous humour samples withdrawn under the described conditions contained anti-leptospiral antibodies.

Taking into account the results of this study, it seems advisable to first apply both PCR and MAR for the detection of leptospiral DNA and antibodies in the aqueous humour of horses without definite clinical diagnosis of ERU. Following a negative result in the MAR the sample should further be analysed using IgA-ELISA.

Literaturverzeichnis

- ABDULKADER R.C.R.M., DAHER E.F., CAMARGO E.D., SPINOSA C. und DA SILVA M.V. (2002) *Leptospirosis severity may be associated with the intensity of humoral immune response*. Rev Inst Med Trop S Paulo **44** (2): 79–83.
- ADLER B., COUSINS D.V., FAINE S. und ROBERTSON G.M. (1982) *The bovine IgM and IgG response to Leptospira interrogans serovar hardjo as measured by enzyme-immunoassay*. Vet Microbiol **7** (6): 577–85.
- ADLER B. und FAINE S. (1978) *The antibodies involved in the human immune response to leptospiral infection*. J Med Microbiol **11** (4): 387–400.
- ADLER B., FAINE S. und GORDON L.M. (1981) *The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as a serological test for detecting antibodies against Leptospira interrogans serovar hardjo in sheep*. Aust Vet J **57** (9): 414–7.
- ADLER B., MURPHY A.M., LOCARNINI S.A. und FAINE S. (1980) *Detection of specific anti-leptospiral immunoglobulins M and G in human serum by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay*. J Clin Microbiol **11** (5): 452–7.
- AHMAD S.N., SHAH S. und AHMAD F.M. (2005) *Laboratory diagnosis of leptospirosis*. J Postgrad Med **51** (3): 195–200.
- ALEXANDER A., BAER A., FAIR J.R., GOCHENOUR W.S., KING J.H. und YAGER R.N. (1952) *Leptospiral uveitis: report of a bacteriologically verified case*. AMA Arch Ophthalmol **48** (3): 292–7.
- ALEXANDER C.S. und KELLER H. (1990) *Ätiologie und Vorkommen der periodischen Augenzündung des Pferdes im Raum Berlin*. Tierärztl Prax **18**: 623–7.
- ANGELOS J., OPPENHEIM Y. und REBHUN W. (1988) *Evaluation of breed as a risk factor for sarcoid and uveitis in horses*. Anim Genet **19** (4): 417–25.
- AUSTONI M. (1967) *Klinik der Leptospirosen des Menschen*. In: KATHE J. u. MOCHMANN J. (Hrsg.): Leptospiren und Leptospirosen. Bd. I, Gustav Fischer Verlag, Jena, S. 21–66.

- BAARSMA G.S., LUYENDIJK L., KIJLSTRA A., VRIES J.D., PEPPERKAMP E., MERTENS D.A.E. und MEURS J.C.V. (1991) *Analysis of local antibody production in the vitreous humor of patients with severe uveitis*. Am J Ophthalmol **112** (2): 147–50.
- BABUDIERY B. (1961) *Laboratory diagnosis of Leptospirosis*. Bull Wld Hlth Org **24**: 45–58.
- BAL A.E., GRAVEKAMP C., HARTSKEERL R.A., MEZA-BREWSTER J.D., KORVER H. und TERPSTRA W.J. (1994) *Detection of leptospire in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis*. J Clin Microbiol **32** (8): 1894–8.
- BALLARD S.A., ADLER B., MILLAR B.D., CHAPPEL R.J., JONES R.T. und FAINE S. (1984) *The immunoglobulin response of swine following experimental infection with Leptospira interrogans serovar pomona*. Zbl Bakt Hyg A **256** (4): 510–7.
- BARNETT J.K., BARNETT D., BOLIN C.A., SUMMERS T.A., WAGAR E.A., CHEVILLE N.F., HARTSKEERL R.A. und HAAKE D.A. (1999) *Expression and distribution of leptospiral outer membrane components during renal infection of hamsters*. Inf Immun **67** (2): 853–61.
- BARNETT K.C. (1987) *Equine periodic ophthalmia: a continuing aetiological riddle*. Equine Vet J **19** (2): 90–1.
- BARNETT K.C., CRISPIN S.M., LAVACH J.D. und MATTHEWS A.G. (1998a) *Glaskörper*. In: Augenkrankheiten beim Pferd. Farbatlas für die Praxis, Schlütersche, Hannover, S. 173-81.
- BARNETT K.C., CRISPIN S.M., LAVACH J.D. und MATTHEWS A.G. (1998b) *Iris und Ziliarkörper*. In: Augenkrankheiten beim Pferd. Farbatlas für die Praxis, Schlütersche, Hannover, S. 157-72.
- BAYER J. (1906) *Mondblindheit oder periodische Augenentzündung*. In: Augenheilkunde, S. 427-47.
- BECKER M.D., BODAGHI B., HOLZ F.G., HARSCH N. und LE HOANG P. (2003) *Diagnostische Vitrektomie bei Uveitis. Möglichkeiten der Molekularbiologie*. Ophthalmologie **100** (10): 796–801.
- BERNARD W.V. (1993) *Leptospirosis*. Vet Clin North Am Equine Pract **9** (2): 435–44.
- BHARTI A.R., NALLY J.E., RICARDI J.N., MATTHIAS M.A., DIAZ M.M., LOVETT M.A., LEVETT P.N., GILMAN R.H., WILLIG M.R., GOTUZZO E. und VINETZ J.M.

- (2004) *Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance*. Lancet Infect Dis **3** (12): 757–71.
- BISTNER S. (1984) *Fundus examination of the horse*. Vet Clin North Am Large Anim Pract **6** (3): 541–51.
- BISTNER S. und SHAW D. (1980) *Uveitis in the horse: Part II - diagnosis and therapy*. Minnesota Vet **20**: 36–42.
- BODAGHI B. und LE HOANG P. (2002) *Testing ocular fluids in uveitis*. Ophthalmol Clin North Am **15** (3): 271–9.
- BOHL E.H. und FERGUSON L.C. (1952) *Leptospirosis in domestic animals*. J Am Vet Med Assoc **121** (909): 421–8.
- BOMFIM M.R., KO A.I. und KOURY M.C. (2005) *Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis*. Vet Microbiol **109** (1-2): 89–94.
- BOOM R., SOL C.J.A., SALIMANS M.M.M., JANSEN C.L., DILLEN P.E.W.V. und NOORDAA J.V.D. (1990) *Rapid and simple method for purification of nucleic acids*. J Clin Microbiol **28** (3): 495–503.
- BRANDES K., WOLLANKE B., NIEDERMAIER G., BREM S. und GERHARDS H. (2007) *Recurrent uveitis in horses: vitreal examination with ultrastructural detection of leptospire*s. J Vet Med A **54** (5): 270–5.
- BRANGER C., BLANCHARD B., FILLONNEAU C., SUARD I., AVIAT F., CHEVALIER B. und ANDRÉ-FONTAINE G. (2005) *Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic Leptospira based on the gene hap1 encoding the hemolysis-associated protein-1*. FEMS Microbiol Lett **243** (2): 437–45. (Abstract).
- BREM S., GERHARDS H., WOLLANKE B., MEYER P. und KOPP H. (1998) *Intraokularer Leptospirennachweis bei 4 Pferden mit rezidivierender Uveitis (ERU)*. Berl Münch Tierärztl Wschr **111** (11-12): 415–7.
- BREM S., GERHARDS H., WOLLANKE B., MEYER P. und KOPP H. (1999a) *35 Leptospirenisolationen aus Glaskörpern von 32 Pferden mit rezidivierender Uveitis (ERU)*. Berl Münch Tierärztl Wschr **112** (10-11): 390–3.
- BREM S., GRABNER A., HÄNICHEN T., KOPP H. und MEYER P. (1992) *Leptospireninfektion (Leptospira grippotyphosa) als Ursache einer hämolytischen Anämie bei einem Pferd*. Pferdeheilk **8** (5): 297–301.

- BREM S., KOPP H., MEYER P. und HOLLMANN P. (1988a) *Erste Isolation von Leptospira Serovar hardjo in der Bundesrepublik Deutschland*. Berl Münch Tierärztl Wschr **101**: 419–21.
- BREM S. und SCHREYER K. (1988b) *Untersuchungen an Rinderseren aus Bayern über das Auftreten von Leptospirenantikörpern*. Berl Münch Tierärztl Wschr **101**: 416–9.
- BREM S., STAAK C., SCHÖNBERG A., KOPP H. und MEYER P. (1999b) *Beitrag zur Leptospirenserologie des Hundes. Vergleich von MAR- und ELISA-Ergebnissen*. Tierärztl Umsch **54**: 83–7.
- BÜRKI F., EGLI P. und WIESMANN E. (1963) *Experimentelle Infektion von Pferden mit Leptospira pomona*. Berl Münch Tierärztl Wschr **76 (14)**: 265–9.
- BROOKS D.E. (1998/99) *Equine Ophthalmology. Equine recurrent uveitis*. In: GELATT K. N. (Hrsg.): *Veterinary Ophthalmology*, 3. Aufl., Lipincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Baltimore, New York, London, Buenos Aires, Hong Kong, Sydney, Tokyo, S. 1101-5.
- BRYANS J.T. (1955) *Studies on equine leptospirosis*. Cornell Vet **45 (1)**: 16–50.
- CASPI R.R. (1999) *Immune mechanisms in uveitis*. Springer Semin Immunopathol **21 (2)**: 113–24.
- CASPI R.R., ROBERGE F.G., CHAN C.C., WIGGERT B., CHADER G.J., ROZENSZAJN L.A., LANDO Z. und NUSSENBLATT R.B. (1988) *A new model of autoimmune disease. Experimental autoimmune uveoretinitis induced in mice with two different retinal antigens*. J Immunol **140 (5)**: 1490–5.
- CHAPMAN A.J., ADLER B. und FAINE S. (1988) *Antigens recognised by the human immune response to infection with Leptospira interrogans serovar hardjo*. J Med Microbiol **25 (4)**: 269–78.
- CHAPMAN A.J., EVERARD C.O., FAINE S. und ADLER B. (1991) *Antigens recognized by the human immune response to severe leptospirosis in Barbados*. Epidemiol Infect **107 (1)**: 143–55.
- CHERNUKHA Y.G., SHISHKINA Z.S., BARYSHEV P.M. und KOKOVIN I.L. (1976) *The dynamics of IgM- and IgG-antibodies in leptospiral infection in man*. Zbl Bakt A **236 (2-3)**: 336–43.

- CHO H.J., GALE S.P., MASRI S.A. und MALKIN K.L. (1989) *Diagnostic specificity, sensitivity and cross-reactivity of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody against Leptospira interrogans serovars pomona, sejroe and hardjo in cattle.* Can J Vet Res **53** (3): 285–9.
- CHU K.M., RATHINAM R., NAMPERUMALSAMY P. und DEAN D. (1998) *Identification of Leptospira species in the pathogenesis of uveitis and determination of clinical ocular characteristics in south India.* J Infect Dis **177** (5): 1314–21.
- COLE J.R., SULZER C.R. und PURSELL A.R. (1973) *Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test.* Appl Microbiol **25** (6): 976–80.
- COOK C.S., PEIFFER R.L. und HARLING D.E. (1983) *Equine recurrent uveitis.* Equine Vet J Suppl **2** (4): 57–60.
- COUSINS D.V. und ROBERTSON G.M. (1986) *Use of enzyme immunoassay in a serological survey of leptospirosis in sheep.* Aust Vet J **63** (2): 36–9.
- COUSINS D.V., ROBERTSON G.M. und HUSTAS L. (1985) *The use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect the IgM and IgG antibody response to Leptospira interrogans serovars hardjo, pomona and tarassovi in cattle.* Vet Microbiol **10** (5): 439–50.
- COUSINS D.V., ROBERTSON G.M., PARKINSON J. und RICHARDS R.B. (1991) *Use of the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) to detect the IgM and IgG antibody response to Leptospira interrogans Serovar hardjo in pregnant ewes.* Zbl Bakt **275** (3): 335–42.
- CRAWFORD R.P. (1972) *Identification of the immunoglobulins in serums of guinea pigs infected with serogroup pomona leptospire.* Am J Vet Res **33** (11): 2289–98.
- CROSS R.S.N. (1966) *Equine periodic ophthalmia.* Vet Rec **78** (1): 8–13.
- CUMBERLAND P.C., EVERARD C.O.R. und LEVETT P.N. (1999) *Assessment of the efficacy of the IgM enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis.* Am J Trop Med Hyg **61** (5): 731–4.
- DAVIDSON M.G., NASISSE M.P. und ROBERTS S.M. (1987) *Immunodiagnosis of leptospiral uveitis in two horses.* Equine Vet J **19** (2): 155–7.

- DEEG C., EHRENHOFER M., THURAU S.R., REESE S., WILDNER G. und KASPERS B. (2002a) *Immunopathology of recurrent uveitis in spontaneously diseased horses*. Exp Eye Res **75** (2): 127–33.
- DEEG C.A. (2008a) *Ocular immunology in equine recurrent uveitis*. Vet Ophthalmol **11** (Suppl. 1): 61–5.
- DEEG C.A., AMANN B. und HAUCK S.M. (2006b) *Defining cytochemical markers for different cell types in the equine retina*. Anat Histol Embryol **35** (6): 412–5. (zit. nach DEEG et al., 2008a).
- DEEG C.A., HAUCK S.M., AMANN B., POMPETZKI D., ALTMANN F., RAITH A., SCHMALZL T., STANGASSINGER M. und UEFFIG M. (2008b) *Equine recurrent uveitis - a spontaneous horse model of uveitis*. Ophthalmic Res **40**: 151–3.
- DEEG C.A., KASPERS B., GERHARDS H., THURAU S., WOLLANKE B. und WILDNER G. (2001) *Immune response to retinal autoantigens and peptides in equine recurrent uveitis*. Invest Ophthalmol Vis Sci **42** (2): 393–8.
- DEEG C.A., MARTI E., GAILLARD C. und KASPERS B. (2004a) *Equine recurrent uveitis is strongly associated with the MHC class I haplotype ELA-A9*. Equine Vet J **36** (1): 73–5.
- DEEG C.A., POMPETZKI D., RAITH A.J., HAUCK S.M., AMANN B., SUPPMANN S., GOEBEL T.W.F., OLAZABAL U., GERHARDS H., REESE S., STANGASSINGER M., KASPERS B. und UEFFIG M. (2006a) *Identification and functional validation of novel autoantigens in equine uveitis*. Mol Cell Proteomics **5** (8): 1462–70.
- DEEG C.A., REESE S., GERHARDS H., WILDNER G. und KASPERS B. (2004b) *The uveitogenic potential of retinal S-antigen in horses*. Invest Ophthalmol Vis Sci **45** (7): 2286–92.
- DEEG C.A., THURAU S.R., GERHARDS H., EHRENHOFER M., WILDNER G. und KASPERS B. (2002b) *Uveitis in horses induced by interphotoreceptor retinoid-binding protein is similar to the spontaneous disease*. Eur J Immunol **32** (9): 2598–2606.
- DEY S., MOHAN C.M., RAMADASS P. und NACHIMUTHU K. (2007) *Recombinant antigen-based dipstick ELISA for the diagnosis of leptospirosis in dogs*. Vet Rec **160** (6): 186–8.

- DEY S., MOHAN C.M., RAMADASS P. und NACHIMUTHU K. (2008) *Diagnosis of leptospirosis by recombinant antigen based single serum dilution ELISA*. Indian J Med Res **128** (2): 172–7.
- DEY S., MOHAN M.C., KUMAR T.M., RAMADASS P., NAINAR A.M. und NACHIMUTHU K. (2004) *Recombinant LipL32 antigen-based single serum dilution ELISA for detection of canine leptospirosis*. Vet Microbiol **103** (1-2): 99–106.
- DGHM (1984) *Diagnostik bei Leptospiren*. Zbl Bakt Hyg A **258**: 480–91. (zit. nach BREM und SCHREYER, 1988b).
- DIAMOND J.G. und KAPLAN H.J. (1978) *Lensectomy and Vitrectomy for complicated cataract secondary to uveitis*. Arch Ophthalmol **96** (10): 1798–1804.
- DIMOCK W.W., BRUNER D.W. und EDWARDS P.R. (1948) *Periodic ophthalmia of horses and mules*. Kentucky Agric Exper Sta Bull **512**: 3–35.
- DIVERS T.J., BYARS T.D. und SHIN S.J. (1992) *Renal dysfunction associated with infection of Leptospira interrogans in a horse*. J Am Vet Med Assoc **201** (9): 1391–2.
- DONAHUE J.M., SMITH B.J. und J. K. DONAHOE J.K.E.A. (1992) *Prevalence and serovars of leptospira involved in equine abortions in central Kentucky during the 1990 foaling season*. J Vet Diagn Invest **4** (3): 279–84.
- DONAHUE J.M., SMITH B.J., POONACHA K.B., DONAHOE J.K. und RIGSBY C.L. (1995) *Prevalence and serovars of leptospira involved in equine abortions in central Kentucky during the 1991-1993 foaling seasons*. J Vet Diagn Invest **7** (1): 87–91.
- DONAHUE J.M., SMITH B.J., REDMON K.J. und DONAHOE J.K. (1991) *Diagnosis and prevalence of leptospira infections in aborted and stillborn horses*. J Vet Diagn Invest **3** (2): 148–51.
- DONAHUE J.M. und WILLIAMS N.M. (2000) *Emergent causes of placentitis and abortion*. Vet Clin North Am Equine Pract **16** (3): 443–56.
- DROMMER W., ROMEIKE A. und DEEGEN E. (1996) *Immunpathologische Befunde bei equiner rezidivierender Uveitis*. Tagungsbericht der 14. Arbeitstagung der DVG Arbeitsgruppe Pferd, S. 334-44.
- DUBIELZIG R.R., RENDER J.A. und MORREALE R.J. (1997) *Distinctive morphologic features of the ciliary body in equine recurrent uveitis*. Vet Comp Ophthalmol **7**: 163–7. (zit. nach BRANDES et al., 2007).

- DUTTA T.K. und CHRISTOPHER M. (2005) *Leptospirosis - an overview*. J Assoc Physicians India **53**: 545–51.
- DWYER A. und GILGER B.C. (2005) *Equine recurrent uveitis*. In: GILGER B. C. (Hrsg.): *Equine Ophthalmology*, Elsevier, St. Louis, S. 285-322.
- DWYER A.E., CROCKETT R.S. und KALSOW C.M. (1995) *Association of leptospiral seroreactivity and breed with uveitis and blindness in horses: 372 cases (1986-1993)*. J Am Vet Med Assoc **207 (10)**: 1327–31.
- EHRENHOFER M. (2001) *Histologische Untersuchungen der physiologischen Retina des Pferdes und retinaler Veränderungen bei equiner rezidivierender Uveitis (ERU)*. Diss. med. vet., München.
- ELLIS W.A. (1986) *The diagnosis of leptospirosis in farm animals*. In: ELLIS W. A. u. LITTLE T. W. A. (Hrsg.): *The present state of leptospirosis diagnosis and control*, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Netherlands, S. 13-32.
- ELLIS W.A., BRYSON D.G., O'BRIEN J.J. und NEILL S.D. (1983a) *Leptospiral infection in aborted equine fetuses*. Equine Vet J **15**: 321–4.
- ELLIS W.A., O'BRIEN J.J., CASSELS J.A. und MONTGOMERY J. (1983b) *Leptospira infection in horses in Northern Ireland: serological and microbiological findings*. Equine Vet J **15**: 317–20.
- ERRINGTON B.J. (1941) *Ophthalmology in Equidae*. J Am Vet Med Assoc **98**: 115–23.
- ESTAVOYER J.M., RACDOT E., COUETDIC G., LEROY J. und GROSPERRIN L. (1991) *Tumor necrosis factor in patients with leptospirosis*. Rev Inf Dis **13 (6)**: 1245–6.
- EULE J.C., WAGNER B., LEIBOLD W. und DEEGEN E. (2000) *Vorkommen verschiedener Immunglobulinisotypen bei Pferden mit equiner rezidivierender Uveitis (ERU)*. Berl Münch Tierärztl Wschr **113 (6)**: 253–7.
- FABER N.A., CRAWFORD M., FEBVRE R.B.L., BUYUKMIHCI N.C., MADIGAN J.E. und WILLITS N.H. (2000) *Detection of Leptospira spp. in the aqueous humor of horses with naturally acquired recurrent uveitis*. J Clin Microbiol **38 (7)**: 2731–3.
- FAINE S. (1982) *Guidelines for the control of leptospirosis*. WHO Offset Publication No. 67, WHO, Geneva.
- FAINE S. (1994) *Leptospira and leptospirosis*. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo.

- FAINE S., ADLER B., PEROLAT P. und BOLIN C. (1999) *Leptospira and Leptospirosis*. 2. Aufl., Melbourne, MediSci. (zit. nach ABDULKADER et al., 2002).
- FAIRBROTHER J.M. (1985) *Antibody response to genus- and serovar-specific leptospiral antigens in Leptospira-infected cows*. Am J Vet Res **46** (7): 1422–6.
- FARR R.W. (1995) *Leptospirosis*. Clin Inf Dis **21**: 1–8.
- FEKKAR A., BODAGHI B., TOUAFEK F., LE HOANG P., MAZIER D. und PARIS L. (2008) *Comparison of immunoblotting, calculation of the Goldmann-Witmer coefficient, and real-time PCR using aqueous humor samples for diagnosis of ocular toxoplasmosis*. J Clin Microbiol **46** (6): 1965–7.
- FIELDER A.R. und RAHI A.H.S. (1979) *Immunoglobulins of normal aqueous humour*. Trans Ophthalmol Soc UK **99** (1): 120–5.
- FLANNERY B., COSTA D., CARVALHO F.P., GUERREIRO H., MATSUNAGA J., DA SILVA E.D., FERREIRA A.G.P., RILEY L.W., REIS M.G., HAAKE D.A. und KO A.I. (2001) *Evaluation of recombinant Leptospira antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis*. J Clin Microbiol **39** (9): 3303–10.
- FRÜHAUF B., OHNESORGE B., DEEGEN E. und BOEVE M. (1998) *Surgical management of equine recurrent uveitis with single port pars plana vitrectomy*. Vet Ophthalmol **1** (2-3): 137–51.
- GARRITY G.M. und HOLT J.G. (2001) *Taxonomic outline of the archaea and bacteria*. In: GARRITY G. M., BOONE D. R. u. CASTENHOLZ R. W. (Hrsg.): *Bergey's manual of systemic bacteriology* Vol. 1, 2. Aufl., Springer Verlag, New York, Berlin, Heidelberg.
- GERHARDS H. und WOLLANKE B. (1996) *Antikörpertiter gegen Borrelien bei Pferden im Serum und im Auge und Vorkommen der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU)*. Berl Münch Tierärztl Wschr **109** (8): 273–8.
- GERHARDS H. und WOLLANKE B. (2001) *Uveitis bei Pferden*. Pferdeheilk **17** (4): 319–29.
- GERHARDS H. und WOLLANKE B. (2005) *Surgical treatment of equine recurrent uveitis: Trans-pars-plana vitrectomy in horses*. In: GILGER B. C. (Hrsg.): *Equine ophthalmology*, Elsevier Saunders, St. Louis, S. 314-9.
- GERHARDS H. und WOLLANKE B. (2006) *Equine rezidivierende Uveitis*. In: DIETZ O. u. HUSKAMP B. (Hrsg.): *Handbuch Pferdepraxis*, Enke Verlag, Stuttgart, S. 775-86.

- GERHARDS H., WOLLANKE B. und BREM S. (1999) *Vitreotomy as a diagnostic and therapeutic approach for equine recurrent uveitis (ERU)*. Proceedings 45th Ann. Conv. AAEP, Albuquerque, S. 89-93.
- GESELL S. (2004) *Gibt es eine asymptomatische intraokulare Leptospireninfektion beim Pferd?*. Diss. med. vet., München.
- GESELL S., WOLLANKE B., BREM S. und GERHARDS H. (2006) *Vergleich der Antikörpertiter gegen Leptospiren in Kammerwasser- und Glaskörperproben bei Pferden mit rezidivierender Uveitis*. Poster 19. DVG-Fachtagung Pferdekrankheiten, Hannover.
- GILGER B.C. (2004b) *Current understanding and advances in therapy for equine recurrent uveitis*. Proceedings of the Annual Meeting of the Italian Association of Equine Veterinarians, Perugia, Italy.
- GILGER B.C., MALOK E., CUTTER K.V., STEWART T., HOROHOV D.W. und ALLEN J.B. (1999) *Characterisation of T-lymphocytes in the anterior uvea of eyes with chronic equine recurrent uveitis*. Vet Immunol Immunopathol **71** (1): 17–28.
- GILGER B.C., MALOK E., STEWART T., HOROHOV D., ASHTON P., SMITH T., JAFFE G.J. und ALLEN J.B. (2000) *Effect of an intravitreal cyclosporine implant on experimental uveitis in horses*. Vet Immunol Immunopathol **76** (3-4): 239–55.
- GILGER B.C. und MICHAU T.M. (2004a) *Equine recurrent uveitis: new methods of management*. Vet Clin Equine **20** (2): 417–27.
- GILGER B.C., SALMON J.H., WILKIE D.A., CRUYSBERG L.P.J., KIM J., HAYAT M., KIM H., KIM S., YUAN P., LEE S.S., HARRINGTON S.M., MURRAY P.R., EDELHAUSER H.F., CSAKY K.G. und ROBINSON M.R. (2006) *A novel bioerodible deep scleral lamellar cyclosporine implant for uveitis*. Invest Ophthalmol Vis Sci **47** (6): 2596–2605.
- GILGER B.C., SALMON J.H., YI N.Y., BARDEN C.A., CHANDLER H.L., WENDT J.A. und COLITZ C.M.H. (2008) *Role of bacteria in the pathogenesis of recurrent uveitis in horses from the southeastern United States*. Am J Vet Res **69** (10): 1329–35.
- GILGER B.C., WILKIE D.A., DAVIDSON M.G. und ALLEN J.A. (2001) *Use of an intravitreal sustained-release cyclosporine delivery device for treatment of equine recurrent uveitis*. Am J Vet Res **62** (12): 1892–6.

- GITTON X., DAUBIE M.B., ANDRE F., GANIERE J.P. und ANDRE-FONTAINE G. (1994) *Recognition of Leptospira interrogans antigens by vaccinated or infected dogs.* Vet Microbiol **41** (1-2): 87–97.
- GOCHENOUR W.S. (1953) *Laboratory diagnosis of Leptospiral infections.* Bull N Y Acad Med **29** (8): 648–9.
- GODDARD R.D., LUFF P.R. und THORNTON D.H. (1991) *The serological response of calves to Leptospira interrogans serovar hardjo vaccines and infection as measured by the microscopic agglutination test and anti-IgM and anti-IgG enzyme-linked immunosorbent assay.* Vet Microbiol **26** (1-2): 191–201.
- GOLDMANN H. und WITMER R. (1954) *Antikörper im Kammerwasser.* Ophthalmologica **127**: 323–30.
- GRISANTI S. (1998) *Das Immunprivileg des Auges.* Ophthalmologe **95** (2): 124–135.
- GRUS F. (2007) *Immunologie.* AUGUSTIN A.J., ed., In: AUGUSTIN A. J. (Hrsg.): Augeneheilkunde, 3. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S. 1240-1.
- GSELL O. (1952) *Leptospirosis und Auge.* Klin Monatsblatt Augenheilk **120**: 449–69.
- GSELL O., REHSTEINER K. und VERREY F. (1946) *Iridocyclitis als Spätfolge von Leptospirosis pomona (Schweinehüterkrankheit). Agglutinin- und Lymphozytose-Befund im Kammerwasser.* Ophthalmologica **112**: 320–34.
- GUERREIRO H., CRODA J., FLANNERY B., MAZEL M., MATSUNAGA J., REIS M.G., LEVETT P.N., KO A.I. und HAAKE D.A. (2001) *Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans.* Infect Immun **69** (8): 4958–68.
- GUM G.G. (1991) *Physiology in the eye.* In: GELATT K. N. (Hrsg.): Textbook of veterinary ophthalmology, 2. Aufl., Verlag Lea & Febinger, Philadelphia, S.124-61.
- GUSSENHOVEN G.C., HORN M.A.W.G.V.D., GORIS M.G.A., TERPSTRA W.J., HARTSKEERL R.A., MOL B.W., INGEN C.W.V. und SMITS H.L. (1997) *LEPTO dipstick, a dipstick assay for detection of Leptospira-specific immunoglobulin M antibodies in human sera.* J Clin Microbiol **35** (1): 92–7.
- HAAKE D.A., CHAO G., ZUERNER R.L., BARNETT J.K., BARNETT D., MAZEL M., MATSUNAGA J., LEVETT P.N. und BOLIN C.A. (2000) *The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection.* Inf Immun **68** (4): 2276–85.

- HALL J.M. und O'CONNOR G.R. (1970) *Correlation between ocular inflammation and antibody production. I. Serum antibody response following intravitreal immunization with protein antigens.* J Immunol **104** (2): 432–9.
- HALLIWELL R.E., BRIM T.A., HINES M.T., WOLF D. und WHITE F.H. (1985b) *Studies on equine recurrent uveitis. II: The role of infection with Leptospira interrogans serovar pomona.* Curr Eye Res **4** (10): 1033–9.
- HALLIWELL R.E. und HINES M.T. (1985a) *Studies on equine recurrent uveitis. I: Levels of immunoglobulin and albumin in the aqueous humor of horses with and without intraocular disease.* Curr Eye Res **4** (10): 1023–31.
- HANSON L.E. (1973) *Immunologic problems in bovine leptospirosis.* J Am Vet Med Assoc **163**: 919–21.
- HANSON L.E. (1976) *Pathogenesis of leptospirosis.* In: JOHNSON R. C. (Hrsg.): *The biology of parasitic spirochetes*, Academic Press, New York, San Francisco, London, S. 295-305.
- HARKIN K.R., ROSHTO Y.M., SULLIVAN J.T., PURVIS T.J. und CHENGAPPA M.M. (2003) *Comparison of polymerase chain reaction assay, bacteriologic culture and serologic testing in assessment of prevalence of urinary shedding of leptospire in dogs.* J Am Vet Med Assoc **222** (9): 1230–3.
- HARTMAN E., INGH T.S.V.D. und ROTHUIZEN J. (1986) *Clinical, pathological and serological features of spontaneous canine leptospirosis. An evaluation of the IgM- and IgG-specific ELISA.* Vet Immunol Immunopathol **13** (3): 261–71.
- HARTMAN E.G. (1984b) *An IgM- and IgG-specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect antileptospiral immunoglobulins in dogs.* Zbl Bakt Hyg A **257** (4): 508–10.
- HARTMAN E.G., HOUTEN M.V., DONK J.A.V.D. und FRIK J.F. (1984a) *Serodiagnosis of canine leptospirosis by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay.* Vet Immunol Immunopathol **7** (1): 33–42.
- HARTMAN E.G., HOUTEN M.V., DONK J.A.V.D. und FRIK J.F. (1984c) *Determination of specific anti-leptospiral immunoglobulins M and G in sera of experimentally infected dogs by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay.* Vet Immunol Immunopathol **7** (1): 43–51.

- HARTMANN C., FELGENHAUER K. und HANSSSEN C. (1983) *Filtration und lokale Synthese von Proteinen im Kammerwasser und Liquor cerebrospinalis*. Fortschr Ophthalmol **80**: 103–7.
- HARTMANN C., SEVERIN M., RITTER D. und SCHÄDLICH H.J. (1991) *Der diagnostische Wert von immunologischen Kammerwasser- und Glaskörperuntersuchungen bei entzündlichen Netzhaut-/Aderhauterkrankungen*. Sitzungsbericht der 153. Vers. des Vereins Rheinisch-Westfälischer Augenärzte, S. 187-95. (zit. nach WOLLANKE et al., 1998).
- HARTSKEERL R.A., GORIS M.G.A., BREM S., MEYER P., KOPP H., GERHARDS H. und WOLLANKE B. (2004) *Classification of Leptospira from the eyes of horses suffering from recurrent uveitis*. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health **51** (3): 110–5.
- HARTWIGK H. (1953) *Die periodische Augenentzündung des Pferdes als Spätsymptom der Leptospirose*. Tierärztl Umsch **8**: 154–7.
- HARTWIGK H. und STOEBBE E. (1952) *Kultureller Nachweis von Leptospiren bei Hund und Pferd*. Berl Münch Tierärztl Wschr **65** (9): 188–90; 212–4.
- HATHAWAY S.C., LITTLE T.W.A., FINCH S.M. und STEVENS A.E. (1981) *Leptospirosis infection in horses in England: a serological study*. Vet Rec **108** (18): 396–8.
- HEATH S.E. und JOHNSON R. (1994) *Leptospirosis*. J Am Vet Med Assoc **205** (11): 1518–23.
- HEUSSER H. (1948) *Die periodische Augenentzündung, eine Leptospirose?*. Schweiz Arch Tierheilk **90**: 287–314.
- HEUSSER H. (1952) *Zur Ätiologie der periodischen Augenentzündung*. Schweiz Arch Tierheilk **94**: 296–306.
- HIGGINS R. (2004) *Emerging or re-emerging bacterial zoonotic diseases: bartonellosis, leptospirosis, Lyme borreliosis, plague*. Rev Sci Tech **23** (2): 569–81.
- HINES M.T. (1984) *Immunologically mediated ocular disease in the horse*. Vet Clin North Am Large Anim Pract **6** (3): 501–12.
- HINES M.T., JARPE A. und HALLIWELL R.E.W. (1990) *Equine recurrent uveitis: immunization of ponies with equine retinal S antigen*. Prog Vet Comp Ophthalmol **2**: 3–11.
- HODGIN E.C., MILLER D.A. und LOZANO F. (1989) *Leptospira abortion in horses*. J Vet Diagn Invest **1** (4): 283–7.

- HULTSCH E. (1979) *Vitreous structure and ocular inflammation*. In: SILVERSTEIN u. O'CONNOR (Hrsg.): *Immunology and immunopathology of the eye*, Masson, USA, S. 97-102.
- HURTIENNE H. (1972) *Klinische Diagnostik bei Glaskörperveränderungen des Pferdes*. Dtsch Tierärztl Wschr **79**: 537-9.
- JACKSON R.S., JONES E.E. und CLARK D.S. (1957) *Abortion in mares associated with leptospirosis*. J Am Vet Med Assoc **131** (12): 564-5.
- JAKOBIEC F.A., LEFKOWITCH J. und KNOWLES D.M. (1984) *B- and T-lymphocytes in ocular disease*. Ophthalmology **91** (6): 635-54.
- JANEWAY C.J., TRAVERS P., WALPORT M. und SHLOMCHIK M. (2002) *Immunologie*. 5. Aufl., Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg, Berlin.
- JOHNSON R.C. und ROGERS P. (1964) *5-Fluorouracil as a selective agent for growth of Leptospirae*. J Bacteriol **87**: 422-6.
- JONES T.C. (1942) *Equine periodic ophthalmia*. Am J Vet Res **3**: 45-71.
- JUNGHERR E. (1944) *Bovine leptospirosis*. J Am Vet Med Assoc **105**: 276-81.
- KAEBERLE M.L. (1973) *Immune response to antigens of inactivated microbial agents*. J Am Vet Med Assoc **163**: 810-5.
- KALISCH J. (1952) *Leptospirose und periodische Augenentzündung*. Berl Münch Tierärztl Wschr **65** (1): 5-9.
- KALSOW C.M. und DWYER A.E. (1997) *Role of leptospiral infection in equine recurrent uveitis*. United States Animal Health Association Proceedings.
- KALSOW C.M. und DWYER A.E. (1998) *Retinal immunopathology in horses with uveitis*. Ocular Immunol Inflamm **6** (4): 239-51.
- KAYSER F.H., BIENZ K.A., ECKERT J. und ZINKERNAGEL R.M. (2001) *Leptospira (Leptospirose, Morbus Weil)*. In: *Medizinische Mikrobiologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, S. 341-3.
- KEMENES F., SURJÁN J. und KASZA L. (1984) *Studies on equine leptospirosis with emphasis on eye-lesions/ Equine periodic ophthalmia*. Ann Immunol Hung **24**: 345-55.
- KEMENES F. und TAMAS L. (1952) *Ist die fibrinöse Iridozyklitis der Pferde eine Leptospirose?*. Acta Veterinaria **2**: 327-36.

- KEMENES P., SURJÁN J. und VIZY L. (1961) *Leptospira as the cause of periodic ophthalmia in horses*. Vet Bull **31**: 12.
- KETTNER H. (1997) *Untersuchungen zur klinischen Epizootiologie und Diagnostik der Leptospireninfektion beim Pferd*. Diss. med. vet., München.
- KIJLSTRA A., HORN G.J.V.D., LUYENDIJK L., BAARSMA G.S., SCHWEITZER C.C., ZAAL M.J.M., TIMMERMAN Z., BEINTEMA M. und ROTHOVA A. (1990) *Laboratory tests in uveitis. New developments in the analysis of local antibody production*. Doc Ophthalmol **75** (3-4): 225–31.
- KIM S., LEE D.S., SUZUKI H. und WATARAI M. (2006) *Detection of Brucella canis and Leptospira interrogans in canine semen by multiplex nested PCR*. J Vet Med Sci **68** (6): 615–8.
- KINDE H., HIETALA S.K., BOLIN C.A. und DOWE J.T. (1996) *Leptospiral abortion in horses following a flooding incident*. Equine Vet J **28** (4): 327–30.
- KOSITANONT U., RUGSASUK S., LEELAPORN A., PHULSUKSOMBATI D., TANTITANAWAT S. und NAIGOWIT P. (2007) *Detection and differentiation between pathogenic and saprophytic Leptospira spp. by multiplex polymerase chain reaction*. Diagn Microbiol Infect Dis **57** (2): 117–22.
- LANDIS J.R. und KOCH G.G. (1977) *The measurement of observer agreement for categorical data*. Biometrics **33**: 159–74. (zit. nach <http://de.wikipedia.org>).
- LAVACH J.D. (1990a) *Periodic Ophthalmia*. In: Large Animal Ophthalmology, C. W. Mosby Company, St. Louis, Baltimore, S. 162-71.
- LAVACH J.D. (1990b) *Vitreous*. In: Large Animal Ophthalmology, C. W. Mosby Company, St. Louis, Baltimore, S. 202-8.
- LEONARD F.C., QUINN P.J., ELLIS W.A. und O'FARRELL K. (1993) *Association between cessation of leptospiruria in cattle and urinary antibody levels*. Res Vet Sci **55** (2): 195–202.
- LEVETT P.N. (1999) *Leptospirosis: re-emerging or re-discovered disease?*. J Med Microbiol **48** (5): 417–8.
- LEVETT P.N. (2001) *Leptospirosis*. Clin Microbiol Rev **14** (2): 296–326.
- LIGHTMAN S. und TOWLER H. (1998) *Fundamentals of ophthalmology: Uveitis*. BMJ Books, London.

- LÉON A., PRONOST S., TAPPREST J., FOUCHER N., BLANCHARD B., ANDRÉ-FONTAINE G., LAUGIER C., FORTIER G. und LECLERCQ R. (2006) *Identification of pathogenic Leptospira strains in tissues of a premature foal by use of polymerase chain reaction analysis*. J Vet Diagn Invest **18** (2): 218–21.
- LUCCHESI P.M. und PARMA A.E. (1999) *A DNA fragment of Leptospira interrogans encodes a protein which shares epitopes with equine cornea*. Vet Immunol Immunopathol **71** (3-4): 173–9.
- LUPIDI R., CINCO M., BALANZIN D., DELPRETE E. und VARALDO P.E. (1991) *Serological follow-up of patients involved in a localized outbreak of leptospirosis*. J Clin Microbiol **29** (4): 805–9.
- MAIR T.S. und CRISPIN S.M. (1989) *Immunological mechanisms in uveitis*. Equine Vet J **21** (6): 391–3.
- MARIYA R., CHAUDHARY P., KUMAR A.A., THANGAPANDIAN E., AMUTHA R. und SRIVASTAVA S.K. (2006) *Evaluation of a recombinant LipL41 antigen of Leptospira interrogans serovar Canicola in ELISA for serodiagnosis of bovine leptospirosis*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis **29** (5-6): 269–77.
- MATTHEWS A.G. und POULTER T. (1986) *Albumin and immunoglobulins G, A and M in aqueous humour from clinically normal equine eyes*. Equine Vet J **18** (2): 117–20.
- MATTHEWS A.G., WAITKINS S.A. und PALMER M.F. (1987) *Serological study of leptospiral infections and endogenous uveitis among horses and ponies in the United Kingdom*. Equine Vet J **19** (2): 125–8.
- MATTHEWS A.M. (1989) *Immunohistochemical investigation of the distribution of immunoglobulins G, A and M within the anterior uvea of the normal equine eye*. Equine Vet J **21** (6): 438–41.
- McGUIRE T.C. und CRAWFORD T.B. (1972) *Identification and quantitation of equine serum and secretory immunoglobulin A*. Inf Immunol **6** (4): 610–5.
- MEEK B., SPEIJER D., JONG P.T.V.M.D., SMET M.D.D. und PEEK R. (2003) *The ocular humoral immune response in health and disease*. Prog Retin Eye Res **22** (3): 391–415.
- MENDOZA L. und PRESCOTT J.F. (1992) *Serodiagnosis of leptospirosis in pigs using an axial filament enzyme-linked immunosorbent assay*. Vet Microbiol **31** (1): 55–70.

- MERIEN F., AMOURIAUX P., PEROLAT P., BARANTON G. und GIRON S. (1992) *Polymerase chain reaction for detection of Leptospira spp. in clinical samples.* J Clin Microbiol **30** (9): 2219–24.
- MERIEN F., BARANTON G. und PEROLAT P. (1995) *Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis.* J Inf Dis **172** (1): 281–5.
- MERIEN F., PEROLAT P., MANCEL E., PERSAN D. und BARANTON G. (1993) *Detection of leptospiral DNA by polymerase chain reaction in aqueous humor of a patient with unilateral uveitis.* J Infect Dis **168** (5): 1335–6.
- MESTECKY J., RUSSELL M.W., JACKSON S. und BROWN T.A. (1986) *The human IgA system: a reassessment.* Clin Immunol Immunopathol **40** (1): 105–14.
- MICHOT J.M., LIDOVE O., BOUTBOUL D., AGUILAR C., MERLE H., OLINDO S., CABRE P. und PAPO T. (2007) *La leptospirose : une cause inhabituelle d'uvéite antérieure.* Rev Med Interne **28** (8): 566–7.
- MILNER A.R., JACKSON K.B., WOODRUFF K. und SMART I.J. (1985) *Enzyme-linked immunosorbent assay for determining specific immunoglobulin M in infections caused by Leptospira interrogans serovar hardjo.* J Clin Microbiol **22** (4): 539–42.
- MOCHMANN H. (1963) *Laboratoriumsdiagnose der Leptospirose und der Leptospiren.* Zbl Bakt Par Inf I Orig **192**: 385–99.
- MORRIS J.A. und HUSSAINI S.N. (1974) *Characterisation of the antibodies detected by the microscopic agglutination test for bovine leptospirosis.* J Hyg **73** (3): 425–32.
- MORTER R.L., HERSCHLER R.C., FESSLER J.F. und LAVIGNETTE A. (1964) *Experimental equine leptospirosis (Leptospira pomona).* Proceedings US Livestock Sanit Assoc Vol. 68, S. 147-52. (zit. nach LAVACH, 1990).
- MORTER R.L., WILLIAMS R.D., BOLTE H. und FREEMAN M.J. (1969) *Equine leptospirosis.* J Am Vet Med Assoc **155** (2): 436–42.
- MULLA S., CHAKRABORTY T., PATEL M., PANDYA H.P., DADHANIYA V. und VAGHELA G. (2006) *Diagnosis of leptospirosis and comparison of ELISA and MAT techniques.* Indian J Pathol Microbiol **49** (3): 468–70.
- MYRON J.T., ROSENBERG E.B., VOTTERI B.A. und TSAI C. (1971) *Immunological response in leptospirosis.* Am J Trop Med Hyg **20** (4): 625–30.

- NAITO M., SAKODA Y., KAMIKAWA T., NITTA Y., HIROSE K., SAKASHITA M., KUROKAWA S. und KIDA H. (2007) *Serological evidence of leptospiral infection in pig populations in different districts in Japan*. *Microbiol Immunol* **51** (6): 593–9.
- NATARAJASEENIVASAN K., VIJAYACHARI P., SHARMA S., SUGUNAN A.P., SELVIN J. und SEHGAL S.C. (2008) *Serodiagnosis of severe leptospirosis: evaluation of ELISA based on the recombinant OmpL1 or LipL41 antigens of Leptospira interrogans serovar autumnalis*. *Ann Trop Med Parasitol* **102** (8): 699–708.
- NIEDERMAIER G. (2002) *Elektronenmikroskopische Untersuchung des Glaskörpers des Pferdes mit equiner rezidivierender Uveitis*. Diss. med. vet., München.
- NIEDERMAIER G., WOLLANKE B., HOFFMANN R., BREM S. und GERHARDS H. (2006a) *Darstellung von Leptospiren im Glaskörper augengesunder und an ERU erkrankter Pferde mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie*. *Dtsch Tierärztl Wschr* **113** (11): 418–22.
- NIEDERMAIER G., WOLLANKE B., HOFFMANN R., MATIASEK K. und GERHARDS H. (2006b) *Darstellung der Glaskörperstruktur von augengesunden Pferden und von Pferden mit equiner rezidivierender Uveitis (ERU) mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie*. *Dtsch Tierärztl Wschr* **113** (6): 211–7.
- O’CONNOR G.R. (1973) *The uvea*. *Arch Ophthalmol* **89**: 505–18.
- O’CONNOR G.R. (1983) *Factors related to the initiation and recurrence of uveitis*. *Am J Ophthalmol* **96** (5): 577–99.
- ODONTSETSEG N., SAKODA Y. und KIDA H. (2005) *Serological evidence of the persistence of infection with Leptospira interrogans serovar Hardjo in cattle in Mongolia*. *Microbiol Immunol* **49** (9): 865–9.
- OIE (2008) 2.1.9. - *Leptospirosis*. In: OIE Terrestrial Manual, S. 251-64, online: www.oie.int.
- O’KEEFE J.S. (2002) *A brief review on the laboratory diagnosis of leptospirosis*. *N Z Vet J* **50** (1): 9–13.
- OKUDA M., SAKAI Y., MATSUUCHI M., OIKAWA T., WATANABE M., ITAMOTO K., IWATA H., KANO R., HASEGAWA A., ONISHI T. und INOKUMA H. (2005) *Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of canine Leptospira antibodies using recombinant OmpL1 protein*. *J Vet Med Sci* **67** (3): 249–54.

- PALMER M.F. (1988) *Laboratory diagnosis of leptospirosis*. Med Lab Sci **45**: 174–8.
- PARK Y.G., GORDON J.C., BECH-NIELSEN S. und SLEMONS R.D. (1992) *Factors for seropositivity to leptospirosis in horses*. Prev Vet Med **13**: 121–7.
- PARMA A.E., CERONE S.I. und SANSINANEA S.A. (1992) *Biochemical analysis by SDS-PAGE and Western Blotting of the antigenic relationship between Leptospira and equine ocular tissues*. Vet Immunol Immunopathol **33 (1-2)**: 179–85.
- PARMA A.E., FERNANDEZ A., SANTISTEBAN C., BOWDEN R. und CERONE S. (1987) *Tears and aqueous humor from horses inoculated with Leptospira contain antibodies which bind to cornea*. Vet Immunol Immunopathol **14 (2)**: 181–5.
- PARMA A.E., SANTISTEBAN C., FERNANDEZ A., CERONE S. und BOWDEN R. (1986) *Antigenic relationship between Leptospira interrogans, equine crystalline and cornea tested by ELISA*. Revista Med Vet **67**: 72–6.
- PARMA A.E., SANTISTEBAN C., VILLALBA J.S. und BOWDEN R.A. (1985) *Experimental demonstration of an antigenic relationship between Leptospira and equine cornea*. Vet Immunol Immunopathol **10 (2-3)**: 215–24.
- PEARCE J.W., GALLE L.E., KLEIBOEKER S.B., TURK J.R., SCHOMMER S.K., DUBIELZIG R.R., MITCHELL W.J., MOORE C.P. und GIULIANO E.A. (2007) *Detection of Leptospira interrogans DNA and antigen in fixed equine eyes affected with end-stage equine recurrent uveitis*. J Vet Diagn Invest **19 (6)**: 686–90.
- PEIFFER R.L. (1980) *Ocular immunology and mechanisms of ocular inflammation*. Vet Clin North Am Small Anim Pract **10 (2)**: 281–302.
- POONACHA K.B., DONAHUE J.M., GILES R.C., HONG C.B., PETRITES-MURPHY M.B., SMITH B.J., SWERCZEK T.W., TRAMONTIN R.R. und TUTTLE P.A. (1993) *Leptospirosis in equine fetuses, stillborn foals, and placentas*. Vet Pathol **30 (4)**: 362–9.
- PRIYA C.G., BHAVANI K., RATHINAM S.R. und MUTHUKKARUPPAN V.R. (2003) *Identification and evaluation of LPS antigen for serodiagnosis of uveitis associated with leptospirosis*. J Med Microbiol **52 (8)**: 667–73.
- PRIYA C.G., RATHINAM S.R. und MUTHUKKARUPPAN V. (2008) *Evidence for endotoxin as a causative factor for leptospiral uveitis in humans*. Invest Ophthalmol Vis Sci **49 (12)**: 5419–24.

- QUINN P.J., CARTER M.E., MARKEY B.K. und CARTER G.R. (1994) *Clinical veterinary microbiology*. Mosby Verlag, Edinburgh, London, New York.
- RAHI A.H.S. und GARNER A. (1976) *Immunopathology of the eye*. Blackwood Scientific Publications Oxford, London, Edinburgh, Melbourne.
- RATHINAM S.R. (2002) *Ocular leptospirosis*. *Curr Opin Ophthalmol* **13** (6): 381–6.
- RATHINAM S.R. (2005) *Ocular manifestations of leptospirosis*. *J Postgrad Med* **51** (3): 189–94.
- RATHINAM S.R. und NAMPERUMALSAMY P. (1999) *Leptospirosis*. *Ocul Immunol Inflamm* **7** (2): 109–18.
- RATHINAM S.R., RATHNAM S., SELVARAJ S., DEAN D., NOZIK R.A. und NAMPERUMALSAMY P. (1997) *Uveitis associated with an epidemic outbreak of leptospirosis*. *Am J Ophthalmol* **124** (1): 71–9.
- REBHUN W.C. (1979) *Diagnosis and Treatment of Equine Uveitis*. *J Am Vet Med Assoc* **175** (8): 803–8.
- REMKY H. (1961) *Zur Epidemiologie und Diagnostik von Leptospiren*. *Münch Med Wschr* **103** (II): 2013–16.
- REMKY H. (1998) *Leserbrief zur Arbeit von C.-D. Quentin und H. Reiber (1997) 95: 728-31: Kammerwasseranalytik bei intraokularer Toxoplasmose*. *Ophthalmologie* **95**: 120–21.
- RIBEIRO M., SOUZA C.C. und ALMEIDA S.H.P. (1995) *Dot-ELISA for human leptospirosis employing immunodominant antigen*. *J Trop Med Hyg* **98** (6): 452–6.
- RIBOTTA M.J., HIGGINS R., GOTTSCHALK M. und LALLIER R. (2000) *Development of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of leptospiral antibodies in dogs*. *Can J Vet Res* **64** (1): 32–7.
- RICHTER K. und LANGE S. (1997) *Methoden der Diagnoseevaluierung*. *Internist* **38** (4): 325–36.
- RIMPAU W. (1947) *Leptospirose beim Pferde (Periodische Augenentzündung)*. *Tierärztl Umsch* **2**: 177–8.
- ROBERT-GANGNEUX F., BINISTI P., ANTONETTI D., BREZIN A., YERA H. und DUPOUY-CAMET J. (2004) *Usefulness of immunoblotting and Goldmann-Witmer coefficient for biological diagnosis of toxoplasmic retinochoroiditis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **23** (1): 34–8.

- ROBERTS S.J. (1958) *Sequelae of leptospirosis in horses on a small farm*. J Am Vet Med Assoc **133** (4): 189–95.
- ROBERTS S.J., YORK C.J. und ROBINSON J.W. (1952) *An outbreak of leptospirosis in horses on a small farm*. J Am Vet Med Assoc **121** (907): 237–42.
- ROCZEK A. (2008) *Entwicklung einer quantitativen PCR zum Nachweis von DNA pathogener Leptospiren in Glaskörper- und Kammerwasserproben von Pferden*. Diss. med. vet., München.
- ROHRBACH B.W., WARD D.A., HENDRIX D.V.H., CAWRSE-FOSS M. und MOYERS T.D. (2005) *Effect of vaccination against leptospirosis on the frequency, days to recurrence and progression of disease in horses with equine recurrent uveitis*. Vet Ophthalmol **8** (3): 171–9.
- ROMEIKE A., BRÜGMANN M. und DROMMER W. (1998) *Immunohistochemical Studies in Equine Recurrent Uveitis (ERU)*. Vet Pathol **35** (6): 515–26.
- RUIZ V.M.B., VEGA L.E.O. und VELÁZQUEZ R.M.U. (2005) *Use of polymerase chain reaction for the identification of Leptospira sp. in urine of carriers*. Rev Cubana Med Trop **57** (1): 47–8.
- SAUNDERS L.Z. und RUBIN L.R. (1975) *Equine recurrent uveitis*. In: Ophthalmic pathology of animals. An atlas and reference book, Karger Verlag, Basel, München, Paris, London, New York, Sydney, S. 78-81.
- SCHEBITZ H. (1954) *Zur Ätiologie der periodischen Augenentzündung*. Berl Münch Tierärztl Wschr **67** (2): 29–31.
- SCHEBITZ H. und DEDIÉ K. (1955) *Zur Bewertung von Leptospirentitern im Pferdeserum*. Zbl Veterinärmedizin **2**: 522–43.
- SCHWINK K., CRISMAN M. und RIGG D. (1989) *Chronic recurrent uveitis in a horse with an elevated aqueous humor antibody titer to Leptospira interrogans serovar autumnalis*. Equine Pract **11** (3): 41–3.
- SCHWINK K.L. (1992) *Equine uveitis*. Vet Clin North Am Equine Pract **8** (3): 557–73.
- SEBASTIAN M., GILES R., ROBERTS J., POONACHA K., HARRISON L., DONAHUE J. und BENIRSCHKE K. (2005) *Funinitis associated with leptospiral abortion in an equine placenta*. Vet Pathol **42** (5): 659–62.

- SELBITZ H.J. (2001) *Bakterielle Krankheiten der Tiere*. In: MAYR A. (Hrsg.): Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 7. Aufl., Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, S. 417-8 u. 423-7.
- SHOTTS E.B. (1976) *Laboratory diagnosis of leptospirosis*. In: JOHNSON R. C. (Hrsg.): The biology of parasitic spirochetes, Academic Press, New York, San Francisco, London, S. 209-23.
- SILLERUD C.L., BEY R.F., BALL M. und BISTNER S.I. (1987) *Serologic correlation of suspected Leptospira interrogans serovar pomona-induced uveitis in a group of horses*. J Am Vet Med Assoc **191** (12): 1576–8.
- SILVA M.V., CAMARGO E.D., BATISTA L., VAZ A.J., BRANDAO A.P., NAKAMURA P.M. und NEGRAO J.M. (1995) *Behaviour of specific IgM, IgG and IgA class antibodies in human leptospirosis during the acute phase of the disease and during convalescence*. J Trop Med Hyg **98** (4): 268–72.
- SLATTER D. (2001) *Equine recurrent uveitis*. In: Fundamentals of veterinary ophthalmology, W. B. Saunders Company, S. 340-3.
- SMITH C.R., KETTERER P.J., MCGOWAN M.R. und CORNEY B.G. (1994) *A review of laboratory techniques and their use in the diagnosis of Leptospira interrogans serovar hardjo infection in cattle*. Aust Vet J **71** (9): 290–4.
- SOVA Z. (1964a) *Die Beziehung leptospiröser Infektionen bei Pferden zur Iridocyklochorioiditis recidiva*. Zbl Bakt **197** (1): 100–10.
- SOVA Z. (1964b) *Febris grippotyphosa bei Pferden, inapparente Infektionen und Iridozyklochorioiditis*. Zbl Bakt **193** (2): 139–47.
- SPIESS B.M. (1997) *Zur equinen rezidivierenden Uveitis (ERU)*. Schweiz Arch Tierheilk **139**: 126–33.
- STING R. und DURA U. (1994) *Isolation of serovar-specific leptospiral antigens for use in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) compared with the microscopic agglutination test and immunofluorescence*. Zbl Veterinärmed B **41** (3): 166–75.
- STREILEIN J.W. (1999) *Immunologic privilege of the eye*. Springer Semin Immunopathol **21** (2): 95–111.
- STREILEIN J.W., OHTA K., MO J.S. und TAYLOR A.W. (2002) *Ocular immune privilege and the impact of intraocular inflammation*. DNA Cell Biol **21** (5-6): 453–9.

- SURUJBALLI O., HENNING D., MARENGER R. und HOWLETT C. (1997b) *Development of a monoclonal antibody-based competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of Leptospira borgpetersenii serovar hardjo type hardjobovis antibodies in bovine sera*. Can J Vet Res **61** (4): 267–74.
- SURUJBALLI O. und MALLORY M. (2001) *Competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Leptospira interrogans serovar pomona antibodies in bovine sera*. Clin Diagn Lab Immunol **8** (1): 40–3.
- SURUJBALLI O. und MALLORY M. (2004) *An indirect enzyme linked immunosorbent assay for the detection of bovine antibodies to multiple Leptospira serovars*. Can J Vet Res **68** (1): 1–6.
- SURUJBALLI O.P., MARENGER R.M., EAGLESOME M.D. und SUGDEN E.A. (1997a) *Development and initial evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of Leptospira interrogans serovar hardjo antibodies in bovine sera*. Can J Vet Res **61** (4): 260–6.
- SUWIMONTEERABUTR J., CHAICUMPA W., SAENGJARUK P., TAPCHAISRI P., CHONGSANGUAN M., KALAMBAHETI T., RAMASOOTTA P., SAKOLVAREE Y. und VIRAKOL P. (2005) *Evaluation of a monoclonal antibody-based dot-blot ELISA for detection of Leptospira spp in bovine urine samples*. Am J Vet Res **66** (5): 762–6.
- SWART K.S., CALVERT K. und MENEY C. (1982) *The prevalence of antibodies to serovars of Leptospira interrogans in horses*. Aust Vet J **59** (1): 25–7.
- SZEMES P.A. und GERHARDS H. (2000) *Untersuchungen zur Prävalenz der equinen rezidivierenden Uveitis im Großraum Köln-Bonn*. Prakt Tierarzt **81**: 408–20.
- SZEREDI L. und HAAKE D.A. (2006) *Immunohistochemical identification and pathologic findings in natural cases of equine abortion caused by leptospiral infection*. Vet Pathol **43** (5): 755–61.
- TAJIKI M.H. und SALOMAO R. (1996) *Association of plasma levels of tumor necrosis factor alpha with severity of disease and mortality among patients with leptospirosis*. Clin Inf Dis **23** (5): 1177–8.
- TERPSTRA W.J., LIGTHART G.S. und SCHOONE G.J. (1985) *ELISA for the detection of specific IgM and IgG in human leptospirosis*. J Gen Microbiol **131** (2): 377–85.

- THEODORIDIS D., BÖHMER J., HOMUTH M. und STRUTZBERG-MINDER K. (2005) *Development of a novel ELISA for serodiagnosis of Leptospirosis and additional detection of pathogenic Leptospira by polymerase chain reaction for veterinary routine diagnostics*. Rev Cubana Med Trop **57** (1): 49–50.
- THIERMANN A.B. (1984) *Leptospirosis: Current developments and trends*. J Am Vet Med Assoc **184** (6): 722–5.
- THIERMANN A.B. und GARRETT L.A. (1983) *Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to Leptospira interrogans serovars hardjo and pomona in cattle*. Am J Vet Res **44** (5): 884–7.
- THOMSON A.W. (1992) *The effects of Cyclosporin A on non-T cell components of the immune system*. J Autoimmun **5** (Suppl A): 167–76.
- THURAU S. (2003) *Praktische Hinweise zur Gewinnung und erfolgreichen Aufbereitung von Vorderkammerpunktat und Vitrektomiematerial*. Ophthalmologe **100** (10): 802–7.
- TIZARD I.R. (2004) *Veterinary Immunology. An introduction*. W. B. Saunders Company.
- TORTEN M. und MARSHALL R.B. (1994) *Leptospirosis*. In: BERAN G. W. u. STEELE J. H. (Hrsg.): *Handbook of Zoonoses*, CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, S. 245–64.
- TRUEBA G.A., BOLIN C.A. und THOEN C.O. (1990) *Evaluation of an enzyme immunoassay for diagnosis of bovine leptospirosis caused by Leptospira interrogans serovar hardjo type hardjo-ovis*. J Vet Diagn Invest **2** (4): 323–9.
- TURNER L.H. (1968) *Leptospirosis II. Serology*. Trans Royal Soc Trop Med Hyg **62**: 880–89.
- TURNER L.H. (1970) *Leptospirosis III. Maintenance, isolation and demonstration of leptospire*. Trans Royal Soc Trop Med Hyg **64** (4): 623–46.
- ULBIG M. und KAMPIK A. (1989) *Pars plana-Vitrektomie bei chronischer Uveitis des Kindes*. Klin Mbl Augenheilk **194** (1): 10–12.
- VAERMAN J.P., QUERINJEAN P. und HEREMANS J.F. (1971) *Studies on the IgA system of the horse*. Immunol **21** (3): 443–54.
- VANASCO N.B., LOTTESBERGER J., SEQUEIRA M.D. und TARABLA H. (2001) *Development and validation of an ELISA for the detection of leptospire-specific antibodies in rodents*. Vet Microbiol **82** (4): 321–30. (Abstract).

- VERMULAPALLI R., LANGOHR I.M., SANCHEZ A., KIUPEL M., BOLIN C.A., WU C.C. und LIN T.L. (2005) *Molecular detection of Leptospira kirschneri in tissues of a prematurely born foal*. J Vet Diagn Invest **17** (1): 67–71.
- VERMA A., ARTIUSHIN S., MATSUNAGA J., HAAKE D.A. und TIMONEY J.F. (2005) *LruA and LruB, novel lipoproteins of pathogenic Leptospira interrogans associated with equine recurrent uveitis*. Infect Immun **73** (11): 7259–66.
- VERMA A., RATHINAM S.R., PRIYA C.G., MUTHUKKARUPPAN V.R., STEVENSON B. und TIMONEY J.F. (2008) *LruA and LruB antibodies in sera of humans with leptospiral uveitis*. Clin Vacc Immunol **15** (6): 1019–23.
- VINETZ J.M. (1997) *Leptospirosis*. Curr Opinion Inf Dis **10**: 357–61.
- WAGNER B., BRANDT K., SHEORAN A., HOLMES M.A., DEEGEN E. und LEIBOLD W. (1997) *Nachweis von Immunglobulinisotypen im Glaskörper als Beitrag zur Ätiologie der equinen rezidivierenden Uveitis*. Dtsch Tierärztl Wschr **104** (11): 461–70.
- WALTMAN W.D. und DAWE L.D. (1983) *Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antileptospiral antibodies in swine sera*. Am J Vet Res **44** (6): 1120–2.
- WEIL A. (1886) *Ueber eine eigenthümliche, mit Milztumor, Icterus und Nephritis einhergehende, acute Infectionskrankheit*. Dtsch Arch Klin Med **39**: 209–32.
- WERRY H. und GERHARDS H. (1991) *Möglichkeiten der und Indikationen zur chirurgischen Behandlung der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU)*. Pferdeheilk **7** (6): 321–31.
- WERRY H. und GERHARDS H. (1992) *Zur operativen Therapie der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU)*. Tierärztl Prax **20**: 178–86.
- WERRY H. und HONEGGER H. (1987) *Pars plana-Vitrektomie bei chronischer Uveitis*. Klin Mbl Augenheilk **191**: 9–12.
- WHO (1999) *Leptospirosis worldwide*. Wkly Epidemiol Rec **74**: 237–42. (zit. nach LEVETT, 2001).
- WHO (2003) *Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control*. online: <http://whqlibdoc.who.int>.
- WICKER L.S., BOLTZ R.C., MATT V., NICHOLS E.A., PETERSON L.B. und SIGAL N.H. (1990) *Suppression of B cell activation by cyclosporin A, FK506 and rapamycin*. Eur J Immunol **20**: 2277–83.

- WIESNER E. und RIBBECK R. (2000) Lexikon der Veterinärmedizin. Enke im Hippokrates Verlag GmBH, Stuttgart.
- WIKIPEDIA (2009) *Enzyme-linked immunosorbent assay*. In: Wikipedia. Die freie Enzyklopädie. online: <http://de.wikipedia.org/wiki/ELISA>.
- WILCOCK B.P. (1992) *The Eye and the Ear. Equine recurrent ophthalmitis*. In: JUBB K. V. F., KENNEDY P. C. u. PALMER N. A. (Hrsg.): Pathology of domestic animals Vol. 1, Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, S. 480-3.
- WILLIAMS D.M., SMITH B.J., DONAHUE J.M. und POONACHA K.B. (1994) *Serological and microbiological findings on 3 farms with equine leptospiral abortions*. Equine Vet J **26** (2): 105–8.
- WILLIAMS R.D., MORTER R.L., FREEMAN M.J. und LAVIGNETTE A.M. (1971) *Experimental chronic uveitis. Ophthalmic signs following equine leptospirosis*. Invest Ophthalmol **10** (12): 948–54.
- WINSLOW W.E., MERRY D.J., PIRC M.L. und DEVINE P.L. (1997) *Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin M antibody in diagnosis of human leptospiral infection*. J Clin Microbiol **35** (8): 1938–42.
- WINTERBERG A. und GERHARDS H. (1997) *Langzeitergebnisse der Pars-plana-Vitrektomie bei equiner rezidivierender Uveitis*. Pferdeheilk **13** (4): 377–83.
- WINTZER H.J. (1982) Krankheiten des Pferdes. Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg.
- WISSDORF H., OTTO B. und GERHARDS H. (2002) *Glaskörper, Corpus vitreum*. In: WISSDORF H., GERHARDS H., HUSKAMP B. u. DEEGEN E. (Hrsg.): Praxisorientierte Anatomie und Propädeutik des Pferdes, M. & H. Schaper Alfeld, Hannover, S. 147-8.
- WITMER R. (1954) *Periodic ophthalmia in horses*. Am J Ophthalmol **37** (2): 243–53.
- WITMER R. (1978) *Clinical implications of aqueous humor studies in uveitis*. Am J Ophthalmol **86** (1): 39–44.
- WITMER R., LÖHRER J. und WIESMANN E. (1953) *Zur Ätiologie, Diagnose und Therapie der periodischen Augenentzündung (p. A.) des Pferdes*. Schweiz Arch Tierheilk **95** (8): 419–39.
- WOLLANKE B. (1995) *Untersuchungen zur Ätiologie der equinen rezidivierenden Uveitis*. Diss. vet. med., München.

- WOLLANKE B. (2002) *Die equine rezidivierende Uveitis*. Habil. med. vet., München.
- WOLLANKE B., BREM S., MEYER P., FORBRIG T., GRASSL P., GERHARDS H. und KOPP H. (2004a) *Prophylaxe der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU): Erste Erfahrungen mit einem Leptospiren-Impfstoff bei Pferden*. *Pferdeheilk* **20** (5): 447–54.
- WOLLANKE B., GERHARDS H., BREM S., KOPP H. und MEYER P. (1998) *Intraokulare und Serumantikörpertiter gegen Leptospiren bei 150 wegen equiner rezidivierender Uveitis (ERU) vitrektomierten Pferden*. *Berl Münch Tierärztl Wschr* **111**: 134–9.
- WOLLANKE B., GERHARDS H., BREM S., MEYER P. und KOPP H. (2004b) *Ätiologie der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU): Autoimmunkrankheit oder intraokulare Leptospireninfektion?*. *Pferdeheilk* **20** (4): 327–40.
- WOLLANKE B., GERHARDS H., BREM S., WOLF E., KOPP H. und MEYER P. (2000) *Zur Leptospirenätiologie der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU): Ergebnisse der Untersuchungen von Serum- und Glaskörperproben*. *Tierärztl Prax* **28** (G): 153–8.
- WOLLANKE B., ROHRBACH B.W. und GERHARDS H. (2001) *Serum and vitreous humor antibody titers in and isolation of Leptospira interrogans from horses with recurrent uveitis*. *J Am Vet Med Assoc* **219** (6): 795–800.
- WOOD R. und DAVIS G.R. (1950) *The correlation of periodic ophthalmia with Leptospira agglutinins in horses*. *Am J Ophthalmol* **33** (1): 961–2.
- WOODWARD M.J., SWALLOW C., KITCHING A., DALLEY C. und SAYERS A.R. (1997) *Leptospira hardjo serodiagnosis: a comparison of MAT, ELISA and Immunocomb*. *Vet Rec* **141** (23): 603–4.
- YAGER R.H., GOCHENOUR W.S. und WETMORE W. (1950) *Recurrent iridocyclitis (Periodic Ophthalmia) of horses*. *J Am Vet Med Assoc* **117** (882): 207–9.
- YAN K.T., ELLIS W.A., MACKIE D.P., TAYLOR M.J., McDOWELL S.W. und MONTGOMERY J.M. (1999) *Development of an ELISA to detect antibodies to a protective lipopolysaccharide fraction of Leptospira borgpetersenii serovar hardjo in cattle*. *Vet Microbiol* **69** (3): 173–87.

Abbildungsverzeichnis

4.1	Nachweis von Leptospirenantikörpern in Serumproben von Pferden mit ERU und augengesunden Kontrolltieren mittels MAR und ELISA	59
4.2	Qualitative Unterschiede im Nachweis von Leptospirenantikörpern im Serum von Pferden mit ERU und augengesunden Kontrolltieren mittels ELISA	60
4.3	Nachweis von Leptospirenantikörpern in Glaskörperproben von Pferden mit ERU und augengesunden Kontrolltieren mittels MAR und ELISA . . .	61
4.4	Kombinationen positiver und negativer Testergebnisse für IgM, IgG und IgA gegen Leptospiren im Glaskörper von Pferden mit ERU	63
4.5	Nachweis von Leptospiren-DNA in Glaskörperproben von Pferden mit ERU und augengesunden Kontrolltieren mittels PCR	64
4.6	Prozentualer Anteil positiver ELISA-Ergebnisse beim Nachweis von Leptospirenantikörpern in Glaskörperproben von Pferden mit ERU in Abhängigkeit von der Gesamtdauer der Erkrankung	68
4.7	Prozentualer Anteil positiver ELISA-Ergebnisse beim Nachweis von Leptospirenantikörpern in Glaskörperproben von Pferden mit ERU in Abhängigkeit vom Zeitpunkt des letzten Schubes	69
4.8	Prozentualer Anteil positiver ELISA-Ergebnisse beim Nachweis von Leptospirenantikörpern in Glaskörperproben von Pferden mit ERU in Abhängigkeit von der Anzahl erlittener Schübe	69
4.9	Prozentualer Anteil positiver Ergebnisse für den Nachweis von IgA gegen Leptospiren mittels ELISA-Technik in Glaskörperproben von Pferden mit ERU in Abhängigkeit vom Zeitpunkt des letzten Schubes	70
4.10	Prozentualer Anteil positiver Ergebnisse für den Nachweis von Leptospiren-DNA mittels PCR in Kammerwasserproben von Pferden mit ERU in Abhängigkeit von der Anzahl erlittener Schübe	73
4.11	Qualitative Unterschiede in der systemischen humoralen Immunantwort gegen Leptospiren von Pferden mit klinisch eindeutiger ERU und solchen mit fraglichen ophthalmologischen Befunden	74

4.12	Qualitative Unterschiede in der lokalen humoralen Immunantwort gegen Leptospiren von Pferden mit klinisch eindeutiger ERU und solchen mit fraglichen ophthalmologischen Befunden	75
4.13	Anteil positiver ELISA-Ergebnisse beim Nachweis von Leptospirentikörpern im Glaskörper von Pferden mit ERU in Abhängigkeit vom Grad der uveitischen Veränderungen	76
4.14	Übereinstimmung von MAR- und ELISA-Resultaten beim Nachweis von Leptospirentikörpern in Glaskörperproben von Pferden mit ERU	83
4.15	Übereinstimmung von MAR- und ELISA-Resultaten beim Nachweis von Leptospirentikörpern in Kammerwasserproben von Pferden mit ERU	84
4.16	Statistische Zusammenhänge zwischen dem Nachweis von Leptospiren-DNA im Glaskörpermaterial von Pferden mit ERU und dem Nachweis der verschiedenen Immunglobulinklassen gegen Leptospiren in derselben Probe	85
4.17	Statistische Zusammenhänge zwischen dem Nachweis von Leptospiren-DNA im Kammerwasser von Pferden mit ERU und dem Nachweis der verschiedenen Immunglobulinklassen gegen Leptospiren in derselben Probe	87

Tabellenverzeichnis

2.1	Übersicht über die akuten Symptome sowie die chronischen Augenveränderungen bei der ERU	21
2.2	Berichte über den Nachweis intraokularer Leptospirenantikörper mittels ELISA-Technik bei Pferden mit ERU in der Literatur	35
3.1	Schema zur Einteilung der Pferdeaugen mit ERU anhand des Vorberichtes .	45
3.2	Schema zur Einteilung der Pferdeaugen mit ERU anhand der ophthalmologischen Befunde	46
3.3	Schema zur Einteilung der Pferdeaugen mit ERU anhand der makroskopischen GK-Veränderungen	48
3.4	Übersicht über die Gruppen der Pferde, bei denen Kammerwasserproben untersucht wurden	49
3.5	AK-Titer in der MAR und nach logarithmischer Umrechnung entsprechende ganze Zahlen	50
3.6	Mögliche ELISA-Resultate entsprechend der Werte der photometrisch ermittelten optischen Dichte	51
3.7	Codierung der Kombinationsmöglichkeiten für positive und negative Ergebnisse im ELISA	52
3.8	Festlegung der Wertbereiche für ρ bzw. C	54
3.9	Festlegung der Signifikanzniveaus	54
3.10	Übersicht über die augengesunden Pferde der Kontrollgruppe	56
4.1	Nachweis von Leptospirenantikörpern der verschiedenen Klassen (IgM, IgG und IgA) in Serumproben von Pferden mit ERU und augengesunden Kontrolltieren mittels ELISA	60
4.2	Prozentualer Anteil positiver Resultate beim Nachweis von Leptospirenantikörpern sowie von Leptospiren-DNA im Glaskörper von Pferden mit ERU in Abhängigkeit von der Form der Uveitis	77

4.3	Prozentualer Anteil positiver Resultate beim Nachweis von Leptospirenantikörpern sowie von Leptospiren-DNA in Glaskörperproben von Pferden mit ERU in Abhängigkeit vom Grad der makroskopischen Glaskörpertrübung	80
4.4	Prozentualer Anteil positiver Resultate beim Nachweis von Leptospirenantikörpern sowie von Leptospiren-DNA in Glaskörperproben von Pferden mit ERU in Abhängigkeit vom Grad der makroskopischen Glaskörpereinlagerungen	80
4.5	Vergleich der Höhe der Antikörperkonzentrationen gegen Leptospiren für die einzelnen Immunglobulinklassen in Serum und Glaskörper	88
4.6	Vergleich der Höhe der Antikörperkonzentrationen gegen Leptospiren für die einzelnen Immunglobulinklassen in Serum und Kammerwasser	88
4.7	Qualitative Übereinstimmung in Kammerwasser und Glaskörpermaterial desselben Auges von Pferden mit ERU bei Betrachtung der Resultate von MAR, ELISA und PCR beim Nachweis von Leptospirenantikörpern und Leptospiren-DNA	89
4.8	Übereinstimmung von MAR und ELISA hinsichtlich positiver oder negativer Testergebnisse beim Nachweis von Leptospirenantikörpern in Serum und intraokularen Proben	91
4.9	Übereinstimmung von MAR bzw. ELISA und PCR hinsichtlich positiver oder negativer Testergebnisse beim Nachweis einer intraokularen Leptospireninfektion	92
4.10	Übereinstimmung von MAR, ELISA bzw. PCR und Kultur hinsichtlich positiver oder negativer Testergebnisse beim Nachweis einer intraokularen Leptospireninfektion	92
4.11	Eindeutigkeit des klinischen Bildes und Leptospirennachweis im GK	93
4.12	Eindeutigkeit des klinischen Bildes und Leptospirennachweis im GK mittels ELISA	94
4.13	Diagnostische Sensitivität und Spezifität der einzelnen Testverfahren auf Leptospiren gemessen am klinischen Bild	95
4.14	Positiver und negativer prädiktiver Wert der einzelnen Testverfahren auf Leptospiren gemessen am klinischen Bild	95

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter PD Dr. Bettina Wollanke für die Überlassung des interessanten Themas und für die immerzu gewährte hervorragende Betreuung, die das Anfertigen dieser Arbeit ermöglichte. Vielen Dank auch für die kritischen und konstruktiven Vorschläge vor der Abgabe, die zur Verbesserung der Arbeit beigetragen haben, sowie die wertvolle Unterstützung in meiner weiteren Berufsplanung.

Herrn Professor Dr. Hartmut Gerhards danke ich für die Möglichkeit, die Untersuchungen und Probennahmen an der Klinik für Pferde durchzuführen. Ihm (und dem gesamten Team) möchte ich für die lehrreichen Jahre während meines Studiums und der Dissertationszeit danken. Ihm verdanke ich auch meine Begeisterung für die Pferdemedizin und insbesondere -ophthalmologie. Besonderer Dank gilt darüber hinaus Frau Dr. Gabriele Niedermaier für ihre unermüdliche Bereitschaft, Wissen und Fälle zu teilen. Den Famulanten danke ich für ihre Hilfe bei der Rekrutierung meiner Kontrollpferde.

Herrn Dr. Heribert Raschel als Leiter des Leptospirenlabors am Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit danke ich sehr dafür, so zahlreiche Proben dort zur gewissenhaften und kompetenten Untersuchung versenden zu können. Ebenso möchte ich mich bei Frau Maria Hauser für die unzähligen Extra-ELISAs bedanken.

Dem Stipendienausschuss der LMU München und insbesondere Herrn Prof. Dr. Roberto Köstlin als Vorsitzenden des Ausschusses des Dr. Karl-Heinz Kurtze-Stipendiums möchte ich für die finanzielle Unterstützung während eines Teils der Dissertationszeit danken.

Ebenso gilt mein herzlicher Dank dem Statistischen Beratungslabor der LMU München (Prof. Helmut Küchenhoff) für die Hilfe bei der statistischen Auswertung meiner Daten und hierbei insbesondere Monia Mahling.

Des Weiteren danke ich meinen Mitdoktoranden Matthias Engel, Roman Herbener und Michaela Popp für die gute Zusammenarbeit. Jana Rendic gilt mein Dank für unterhaltsame Mittagspausen und Sophia Wiebe für den aufmunternden Emailkontakt in der anstrengenden Endphase der Doktorarbeit. Bei Michi und Jana sowie Andreas Gutbrod und Jasmin

Paris möchte ich mich insbesondere für die geduldige und mühevoll fachliche und orthographische Durchsicht des Manuskriptes sowie die Verbesserungsvorschläge bedanken.

Von ganzem Herzen danke ich Oliver Hanka für die großartige Computer- und LaTeX-Unterstützung und ganz besonders dafür, dass er mir in der stressigen Zeit der Anfertigung dieser Dissertation immer mit viel Geduld und Verständnis zur Seite gestanden und mir viel Kraft geschenkt hat, sowie für die ruhigen Stunden abseits meines Schreibtisches.

Zu guter Letzt geht mein großes Dankeschön an meine Familie, die immer für mich da war und mir eine sorgenfreie Studiums- und Promotionszeit ermöglicht hat.