

## Open Access

Berl Münch Tierärztl Wochenschr 129,  
209–215 (2016)  
DOI 10.2376/0005-9366-129-15085

© 2016 Schlütersche  
Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG  
ISSN 0005-9366

Korrespondenzadresse:  
schusser@vetmed.uni-leipzig.de

Eingegangen: 28.07.2015  
Angenommen: 20.11.2015

Online first: 23.03.2016  
[http://vetline.de/open-access/  
158/3216/](http://vetline.de/open-access/158/3216/)

### Zusammenfassung

### Summary

U.S. Copyright Clearance Center  
Code Statement:  
0005-9366/2016/12905-209 \$ 15.00/0

Tierärztliche Klinik Domäne Karthaus, Dülmen<sup>1</sup>  
Medizinische Tierklinik, Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Leipzig<sup>2</sup>

## Kultureller Nachweis von Leptospiren in Glaskörperflüssigkeit und Antikörpernachweis gegen Leptospiren in Glaskörperflüssigkeit und Serum von 225 Pferden mit equiner rezidivierender Uveitis (ERU)

### *Detection of leptospira by culture of vitreous humor and detection of antibodies against leptospira in vitreous humor and serum of 225 horses with equine recurrent uveitis*

Elisa Dorrego-Keiter<sup>1</sup>, József Tóth<sup>1</sup>, Lieke Dikker<sup>1</sup>, Jutta Sielhorst<sup>1</sup>,  
Gerald Fritz Schusser<sup>2</sup>

Ziel der vorliegenden Studie war es, in der anhaltenden Diskussion über die Ätiopathogenese der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU) Informationen über den Zusammenhang zwischen Leptospireninfektion und ERU zu erhalten. Dazu wurden von 225 Pferden mit ERU Glaskörperflüssigkeit kulturell auf Leptospiren und Glaskörperflüssigkeit und Serum auf Antikörper gegen Leptospiren untersucht. Bei 221/225 ERU-Patienten unterschiedlichen Alters, Geschlechts und Rasse wurde präoperativ Blutserum gewonnen. Unverdünntes Glaskörpermaterial wurde von 198/225 Patienten, die einer Pars-Plana-Vitrektomie unterzogen wurden, zu Beginn der Operation und bei 27/225 aus dem Bulbus oculi nach einer Bulbusexstirpation steril entnommen. Serum und Glaskörpermaterial wurden mithilfe des Mikroagglutinationstests (MAT) auf das Vorhandensein spezifischer Antikörper gegen Leptospiren untersucht. Das Glaskörpermaterial wurde zudem kulturell auf Leptospiren untersucht. Als Kontrolle dienten 20 Pferde, die mit einer anderen, lebensbedrohlichen Diagnose als ERU vorgestellt und euthanasiert wurden. Insgesamt wurden bei 127/221 (57,5 %) Pferden positive Antikörpertiter ( $\geq 1:100$ ) im Blutserum festgestellt. Am häufigsten wurden Antikörper gegen das Serovar *Leptospira (L.) interrogans* serovar Grippotyphosa nachgewiesen (79/127), gefolgt von *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae (34/127) und *L. interrogans* serovar Bratislava (29/127). Im Glaskörpermaterial konnten lediglich bei 79/225 Pferden (35,1 %) Antikörper gegen Leptospiren nachgewiesen werden, wobei *L. interrogans* serovar Grippotyphosa am häufigsten (67/79), gefolgt von *L. interrogans* serovar Pomona (18/79) und *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae (8/79) als Einzel- oder Mehrfachreaktion nachgewiesen wurde. Die kulturelle Leptospirenanzucht aus Glaskörpermaterial erbrachte bei 34/212 Pferden (16 %) ein positives Ergebnis. Bei 10/20 Kontrollpferden wurde im Serum und bei 2/20 Kontrollpferden ein positiver Titer gegen Leptospiren im Glaskörper ermittelt, während in der kulturellen Anzucht keine Leptospiren nachweisbar waren. Das Ergebnis, dass bei 84 % der 212 ERU-Patienten keine Leptospiren in der Glaskörperflüssigkeit nachgewiesen wurden, ist sowohl für die Diagnosestellung als auch für die Therapie der ERU bedeutsam.

**Schlüsselwörter:** Serumantikörper, intraokulare Antikörper, Vorkommen

In the ongoing discussion regarding the aetiopathogenesis of equine recurrent uveitis (ERU) it was the aim of the present study to elucidate the relationship of leptospira infection and ERU. In a population of 225 horses leptospira were examined in vitreous humor by culture and leptospira antibody were detected in vitreous humor and serum samples. Preoperative serum samples were collected from 221/225 ERU patients of different age, gender and breed. Undiluted vitreous humor was aseptically taken from 198/225 patients that underwent pars plana vitrectomy at the beginning of surgery and from 27/225 patients' eyeball after enucleation. Serum and vitreous humor were tested for specific leptospiral antibodies by microscopic agglutination test (MAT). Furthermore, vitreous humor was examined by culture. 20

patients which were euthanized due to a live-threatening disease other than ERU served as a control group. A total of 127/221 (57.5%) horses had serum antibodies ( $\geq 1:100$ ). Most frequently antibodies against *L. interrogans* serovar Grippotyphosa were detected (79/127), followed by *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae (34/127) and *L. interrogans* serovar Bratislava (29/127). Only 79/225 horses (35.1%) had leptospiral antibodies in vitreous humor, in which *L. interrogans* serovar Grippotyphosa (67/79) was identified most frequently followed by *L. interrogans* serovar Pomona (18/79) and *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae (8/79) which was identified as single or multiple reaction. Isolation of leptospira from vitreous humor was positive in 34/212 horses (16%). 10/20 control horses had a positive antibody titer against leptospira in serum and 2/20 horses in vitreous humor, whereas there was no leptospira detected in culture. The result of 84% negative cultures from vitreous humor of 212 ERU patients is decisive for the diagnosis and therapy of ERU.

**Keywords:** serum antibodies, intraocular antibodies, distribution

## Einleitung

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) stellt weltweit die häufigste Ursache für die Erblindung des Pferdes dar (Errington, 1941; Hartskeerl et al., 2004). Aufgrund des rezidivierenden Verlaufs und der progredienten Zerstörung intraokularer Strukturen kann die Entzündung der mittleren Augenhaut bis zur Erblindung führen.

In der Literatur schwanken die angegebenen Prävalenzen für ERU in England, Kontinentaleuropa und Amerika zwischen 2 % und 25 % (Alexander und Keller, 1990; Szemes und Gerhardts, 2000; Dwyer und Gilger, 2005; Lowe, 2010). Im Großraum Köln-Bonn wiesen Ende der 90er Jahre von 1014 Pferden 7,6 % Veränderungen im Sinne einer ERU auf (Szemes und Gerhardts, 2000).

In verschiedenen Studien wurde der Einfluss des Geschlechts und Alters des Pferdes auf die Erkrankung der ERU untersucht. Dabei wurde einheitlich bei männlichen Pferden signifikant häufiger ERU diagnostiziert als bei Stuten (Wollanke, 1995; Szemes und Gerhardts, 2000; Kulbrock et al., 2013), wobei die Angaben hinsichtlich des Einflussfaktors Alter in der Literatur stark divergieren. So werden Altersprädispositionen zwischen ein bis vier Jahren (Alexander und Keller, 1990), zwischen vier und sechs Jahren (Wollanke, 1995; Bartel, 2004) und über 15 Jahren (Szemes und Gerhardts, 2000) beschrieben. Dagegen wurde in einer aktuellen Veröffentlichung keine signifikante Häufung einer bestimmten Altersklasse im Vergleich zur Altersstruktur in dem Klientel festgestellt (Kulbrock et al., 2013).

Die ophthalmologische Forschung beschäftigt sich in den letzten Jahren intensiv mit der Ätiopathogenese der ERU. Die Ätiologie der ERU ist jedoch noch nicht abschließend geklärt (Werry und Gerhards, 1991; Spiess, 1997; Kulbrock et al., 2013). Seit den ersten Berichten von Rimpau (1947) und Heusser (1948) stand lange Zeit vorwiegend der enge Zusammenhang zwischen Leptospireninfektion und ERU im Fokus verschiedener Forschergruppen (Rimpau 1947; Heusser 1948; Williams et al., 1971; Halliwell et al., 1985; Dwyer et al., 1995; Brem et al., 1999; Faber et al., 2000; Wollanke et al., 2001; Hartskeerl et al., 2004; Brandes et al., 2007). An Uveitis erkrankte Pferde zeigten im Serum und Glaskörper signifikant häufiger und deutlich höhere Antikörpertiter als augengesunde Patienten (Dwyer et al., 1995; Wollanke et al., 1998). Oftmals wurde dabei bei Patienten, die an Uveitis litten, der Serumantikörpertiter vom Anti-

körpertiter des Glaskörpers um ein Vielfaches übertraffen (Brem et al., 1998; Wollanke et al., 2001). Dies wurde zunächst ausschließlich auf eine stärkere Schädigung der Blut-Glaskörper-Schranke zurückgeführt. Diese Schädigung zeigte sich auch in einer aktuellen Studie, in der nach systemischer Enrofloxacinapplikation erhöhte Enrofloxacinkonzentrationen in Glaskörpern mit mehreren Entzündungsschüben und in Augen mit stärkeren entzündlichen Einlagerungen im Glaskörper festgestellt wurden (Popp et al., 2013). Über den Vergleich des Antikörpertiters im Serum und Kammerwasser in Bezug auf die Immunglobulinkonzentration, dargestellt unter Bildung eines modifizierten Goldmann-Witmer-Koeffizienten, gelang es jedoch in 94 % der untersuchten ERU-kranken Augen eine intraokulare Antikörperproduktion zu bestätigen und somit eine durch die intraokulare Leptospireninfektion induzierte und gegen den Erreger gerichtete Reaktion zu postulieren (Wollanke, 2002). Während europaweit in bis zu 90 % der Glaskörperproben von ERU-kranken Pferden Leptospirenantikörper und in bis zu 70 % Leptospirenantigen nachgewiesen wurden (Brem et al., 1998; Faber et al., 2000; Wollanke et al., 2001, 2002; von Borstel et al., 2010; Wiehen, 2012), wurden bei der Serum- und Glaskörperuntersuchung mittels PCR und bei der Leptospirenantikörperuntersuchung von 52 ERU-kranken Pferden in den südöstlichen US-Bundesstaaten keine Hinweise auf eine leptospirenassoziierte Erkrankung gefunden (Gilger et al., 2008). In einer aktuellen Studie von Kulbrock et al. (2013) wurden in 49 % der Glaskörperproben von 45 vitrektomierten Augen Antikörper gegen Leptospiren nachgewiesen. Der Nachweis von Leptospiren-DNA gelang bei 20 Glaskörperproben. 25 der 45 vitrektomierten Augen konnten in dieser Studie als Leptospiren-positiv gewertet werden, da die Glaskörperproben Leptospiren-DNA und/oder Leptospirenantikörper aufwiesen.

Ebenso gibt es hinsichtlich der Serovare geografische Unterschiede. Während in den beschriebenen Fällen der Leptospiren-verursachten ERU in den USA das Serovar Pomona am häufigsten nachgewiesen wurde (Halliwell et al., 1985), wird in Europa Grippotyphosa als dominierende Serovarietät beschrieben (78.2 %) (Hartskeerl et al., 2004; von Borstel et al., 2010; Tomördy et al., 2010). Fast jedes Pferd kommt im Laufe seines Lebens in Kontakt mit Leptospiren, die nicht immer zur Erkrankung führen. So wurden in Kontrollgruppen mit gesunden Pferden bis zu 62,5 % positive Titer

( $\geq 1:100$ ) für *Leptospira* spp. im Serum ermittelt (Faber, 2000).

Neben dem kontrovers diskutierten Zusammenhang zwischen Leptospiroseinfektion und ERU werden Autoimmunreaktionen als Ursache der ERU erörtert (Tizard, 1992; Regan et al., 2012; Zipplies et al., 2012). Die Arbeitsgruppe von Deeg et al. (2006) postulierte in zahlreichen Forschungsarbeiten, dass die Auslösung und Erhaltung der wiederkehrenden Erkrankung nicht ausschließlich auf eine infektiöse Ursache zurückzuführen sei. Die wiederkehrende Entzündung, der therapeutische Effekt von Corticosteroiden (Spiess, 1997) und Cyclosporinen (Gilger et al., 2000, 2001) und die ausbleibende Wirksamkeit einer Antibiotikatherapie sprechen für einen autoimmunen Krankheitsprozess (Deeg et al., 2008).

In diesem Autoimmunprozess kommt den T-Zellen, vorwiegend den CD4+ T-Zellen mit Th1-Phänotyp eine besondere Rolle zu, die in die Iris und Retina invadieren können und charakteristische Lymphfollikel im Irisstroma bilden (Deeg et al., 2002; Romeike et al., 1998). In einer aktuellen Studie wurde aufgrund der starken Immunreaktivität der Zytokine IL-6, IL-17 und IL-23 in Abwesenheit einer Immunreaktivität gegen *Leptospira* spp. auf eine Th-17-zellvermittelte Autoimmunreaktion geschlossen (Regan et al., 2012).

Bereits 1985 entdeckten Parma et al. (1985) identische Antigene in der equinen Kornea und bei vier von fünf getesteten Serovaren von *Leptospira interrogans* (Pomona, Tarassovi, Icterohaemorrhagiae und Hardjo). Aufgrund einer Hornhauttrübung, die durch Inokulation mit abgetöteten Leptospirose oder equinem Korneagebewebematerial ausgelöst wurde und der nachgewiesenen Anti-Kornea- und Anti-Leptospirose-Antikörper, die zu der IgG-Klasse gehörten und in vivo und in vitro an equine Kornea banden, wurde eine organspezifische Autoimmunerkrankung vermutet (Tizard, 1992).

Auf eine Synthese der Leptospirose- und Autoimmunhypothese deuten auch neue Erkenntnisse über eine Kreuzreaktion der Antikörper gegen Leptospiroseantigene hin. So teilen die Leptospiroseproteine LruA und LruB immunrelevante Epitope mit den Augenproteinen Alpha-Crystallin B, Vimentin und Beta-Crystallin B2. Eine Kreuzreaktion der Leptospiroseantikörper lässt eine Immunpathogenese der zunächst leptospiroseassoziierten ERU vermuten (Verma et al., 2010).

Erste Hinweise auf genetische Ursachen der ERU ergaben sich aus Rassedispositionen (Alexander und Keller, 1990; Dwyer et al., 1995) und der Beobachtung, dass Pferde mit dem MHC-Klasse I Haplotyp ELA-A9 ein erhöhtes Risiko zeigten, an ERU zu erkranken. 13 von 32 (41 %) der ERU-positiven Warmblutpferde trugen in einer Studie von Deeg et al. (2004) den ELA-Haplotyp A9, wobei bei keinem der 37 Kontrollpferde dieser Haplotyp auftrat.

Apaloosa zeigten eine 3,8-fach höhere Empfänglichkeit für ERU (Angelos et al., 1988; Dwyer et al., 1995) und eine Beteiligung beider MHC-Loci an der genetischen Disposition für ERU (Kaese et al., 2005).

Bei einer genomweiten Assoziationsstudie (GWAS) in Zusammenarbeit des Instituts für Tierzucht und der Klinik für Pferde der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover wurde im August 2013 eine genetische Komponente der Regulation von IL-17A und IL-17F in der Pathogenese der ERU festgestellt (Kulbrock et al., 2013). Auf dem Pferdechromosom 20 wurden in unmittelbarer Nähe zu den Genen IL-17A und IL-17F mittels

bead chip-Technologie signifikante Einzelnukleotidpolymorphismen (singlenucleotidpolymorphism = snps) ermittelt, die eine genetische Ätiopathogenese belegen.

Aufgrund eigener klinischer Erfahrungen ist es die Hypothese der Autoren der vorliegenden Studie, dass eine wiederkehrende Entzündung der mittleren Augenhaut nicht zwangsläufig mit einem positiven Leptospirose nachweis verbunden ist. Ziel der vorliegenden Studie war es daher, die Häufigkeit des direkten und indirekten Leptospirose nachweises bei Pferden mit ERU zu analysieren.

## **Material und Methoden**

Die in dieser Studie verwendeten klinischen Daten, Blut- und Glaskörperproben entstammen Patienten, die im Zeitraum 2004–2013 vorgestellt wurden. Die 225 Pferde waren unterschiedlichen Alters, Geschlechts und Rasse. Die Diagnose der ERU wurde gestellt bei Auftreten von klassischen, akuten Entzündungssymptomen (Photophobie, Blepharospasmus, Lidschwellung, gerötete Konjunktiva, Epiphora, Miosis) mit vorberichtlich mindestens zwei gesicherten Uveitisschüben oder in Kombination mit dem Auftreten typischer chronischer Augenveränderungen (dauerhafte Korneatrübung, Synechien, Präzipitate auf der Linse, Glaskörpertrübungen, Bulbusatrophie). Präoperativ wurde von 221/225 Pferden Blut aus der Vena jugularis externa entnommen und steril in ein Vacuette® Serumröhrchen überführt. Nach vierstündiger Gerinnung bei Raumtemperatur und zehninütiger Zentrifugation bei 1000 rpm wurde das Serum gewonnen und bis zum Versand gekühlt (+4° C) gelagert.

Von 198/225 Patienten, die einer Pars-Plana-Vitrektomie unterzogen wurden (Tóth et al., 2006, 2010), wurde zu Beginn der Vitrektomie unverdünntes Glaskörpermaterial steril entnommen. Bei 27/225 wurde eine Bulbusexstirpation durchgeführt (Tóth et al., 2008) und aus dem Bulbus unverdünntes Glaskörpermaterial steril gewonnen.

Für die serologische Untersuchung und den kulturellen Nachweis wurden von allen Pferden 0,5 ml unverdünntes Glaskörpermaterial und 0,5 bzw. 1 ml Glaskörpermaterial mit „Transportmedium für Leptospirose“ 1:10 bzw. 1:20 verdünnt (Qualitätssicherung-Arbeitsanweisung QSA-O-0512-02 „Leptospirose-Nährmedien und Lösungen“ des Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) in Oberschleißheim).

Entsprechend der von Brandes et al. (2007) publizierten Verfahren wurde als Transportmedium das Leptospirosegrundnährmedium BSA-Tween-Medium (Basis Medium EMJH plus Enrichment) verwendet, das mit Agar (Fa. Becton Dickinson, New Jersey, USA) und dem Hemmstoff Fluorouracil (100 mg/ml, Fa. Sigma, Darmstadt, Deutschland) versehen war.

Serum und Glaskörpermaterial wurden an das Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) in Oberschleißheim gesandt. Dort wurden beide Proben mithilfe des Mikroagglutinationstests (MAT) auf das Vorhandensein spezifischer Antikörper gegen Leptospirose (*L. interrogans* serovar Hardjo, *L. interrogans* serovar Canicola, *L. interrogans* serovar Grippotyphosa, *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae, *L. interrogans* serovar Pomona, *L. interrogans* serovar Bratislava, *L. interrogans* serovar Javanica und



**TABELLE 1:** Nachweis von Leptospiren-Antikörper-Titern in Serum- und Glaskörperproben mittels Mikroagglutinationstest ( $\geq 1:100$ ) und Isolierung von Leptospiren aus Glaskörpermaterial von Pferden mit rezidivierender Uveitis

Anzahl Pferde (n)/Leptospirenserovar	Leptospiren-Antikörper-Titer					Kultureller Nachweis		
	Serum			Glaskörpermaterial		Glaskörpermaterial		
	positiv	negativ	nicht getestet	positiv	negativ	positiv	negativ	nicht getestet
225	127	94	4	79	146	34	178	13
Grippotyphosa	79	142		67	158	25		
Icterohaemorrhagiae	34	187		8	217	0		
Bratislava	29	192		7	218	2		
Copenhagani	16	205		2	223	0		
Canicola	21	200		7	218	0		
Javanica	13	208		1	224	0		
Pyrogenes	15	206		7	218	0		
Saxkoebing	11	210		0	225	0		
Pomona	4	217		18	207	1		
Hardjo	0	0		0	0	0		
Keine Serovardifferenzierung						6		

*L. interrogans* serovar Pyrogenes) untersucht. Der MAT wurde vom Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Oberschleißheim entsprechend der OIE-Referenzmethode ab einem Titer von  $\geq 1:100$  als positiv gewertet. Die Identifizierung der Serovare aus den Isolatn erfolgte im Kreuzabsorptionstest mittels Referenzseren. Die Operationen, Vor- und Nachsorge der ERU-Patienten erfolgte, wie bereits beschrieben (Tóth et al., 2006, 2010).

Als Kontrolle dienten 20 Pferde, die nicht an ERU erkrankt waren, und die wegen lebensbedrohlicher orthopädischer oder gastrointestinaler Ursachen euthanasiert wurden.

## Ergebnisse

Bei 220/225 Pferden lagen Angaben zum Alter und bei 224/225 Pferden hinsichtlich des Geschlechtes vor. Das durchschnittliche Lebensalter dieser Pferde zum Zeitpunkt der Probenentnahme betrug  $9,23 \pm 3,72$  Jahre (min 0,12, max 23). 147/220 Pferde (66,8 %) waren zwischen fünf und zwölf Jahren alt, wobei die Altersgruppe der fünf- ( $n = 28$ ), sechs- ( $n = 22$ ), sieben- ( $n = 15$ ) und achtjährigen ( $n = 25$ ) Pferde am stärksten vertreten war. Nur sieben Pferde waren älter als 18 Jahre und nur sechs Pferde jünger als vier Jahre.

Es wurden Proben von 124 Wallachen (55 %), 85 Stuten (38 %) und 15 Hengsten (7 %) untersucht.

Zur Ermittlung der Häufigkeit von ein- und beidseitigen Uveitis liegen die Ergebnisse von 159 Pferden vor. Bei 122/159 trat die ERU einseitig und bei 37/159 beidseitig auf.

Insgesamt konnte bei 127 (57,5 %) der 221 untersuchten Pferde im Serum ein Antikörpertiter  $\geq 1:100$  mithilfe des MAT gegen eines oder mehrere der getesteten Serovare im Blutserum festgestellt werden. 94/221 Pferde (42,5 %) waren hingegen serologisch negativ (Antikörpertiter  $< 1:100$ ). Bei vier Pferden wurde keine Untersuchung des Blutes auf Leptospiren-Antikörper vorgenommen. Am häufigsten wurden Antikörper gegen das Serovar Grippotyphosa nachgewiesen (79/127 positive Serumproben), gefolgt von dem Serovar Icterohaemorrhagiae (34/127 positive Serumproben) und dem Serovar Bratislava (29/127 positive Serumproben) (Tab. 1).

Aus dem Glaskörpermaterial konnten lediglich bei 79/225 Pferden (35,1 %) Leptospiren-Antikörper mittels Mikroagglutinationsreaktion nachgewiesen werden, während bei den übrigen 146/225 Pferden (64,9 %) der Antikörpernachweis gegen Leptospiren im Glaskörpermaterial negativ verlief. Antigen des *L. interrogans* serovar Grippotyphosa wurde auch im Glaskörpermaterial am häufigsten nachgewiesen (67/79 positive Glaskörperproben) gefolgt von *L. interrogans* serovar Pomona (18/79 positive Glaskörperproben) und *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae (8/79 positive Glaskörperproben) (Tab.1).

42 Pferde mit Antikörpertitern gegen *L. interrogans* serovar Grippotyphosa im Serum zeigten ebenfalls einen positiven Antikörpertiter im Glaskörpermaterial, wobei bei 37 Pferden im Glaskörpermaterial ein deutlich höherer Antikörpertiter als im Serum, bei neun Pferden ein höherer Antikörpertiter im Serum und bei sechs Pferden identisch hohe Antikörpertiter in Serum und Glaskörper ermittelt wurden. 14 von diesen 42 Tieren wiesen zudem eine positive Kultur auf.

Die Anzahl der Pferde mit Antikörpertitern gegen *L. interrogans* serovar Pomona im Glaskörpermaterial überzog gegenüber der Anzahl von Tieren mit positivem Titer im Serum. Bei den übrigen Serovaren übertraf die Häufigkeit positiver Titer im Serum die Anzahl positiver Glaskörpertiter (Abb. 1).

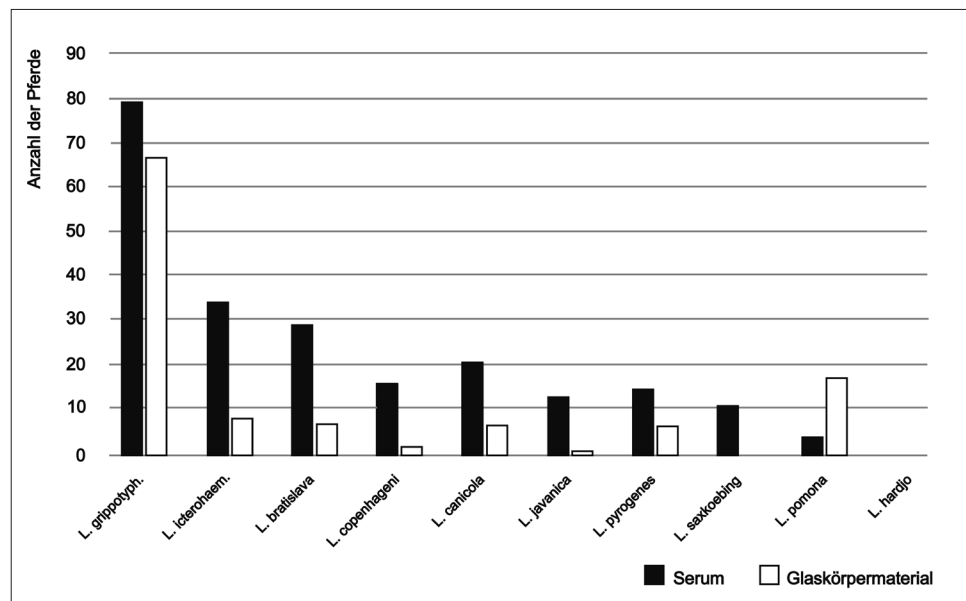
Die kulturelle Leptospirenanzucht aus Glaskörpermaterial erbrachte bei 34/212 Pferden (16 %) ein positives Ergebnis, bei 178/212 Pferden (84,0 %) konnten hingegen keine Leptospiren isoliert werden. Bei 13/225 Pferden wurde keine kulturelle Anzucht durchgeführt.

Bei 34/212 Tieren, bei denen kulturell Leptospiren nachgewiesen wurden, konnte in 25/34 Proben (73,5 %) das Serovar Grippotyphosa isoliert werden. Bei zwei Pferden wurde das Serovar Bratislava und in einer Glaskörperprobe das Serovar Pomona nachgewiesen. Für die übrigen sechs Glaskörperproben liegt aufgrund eines Übermittlungsfehlers keine Serovardifferenzierung vor (Tab. 1.). Von den 25 Tieren, bei denen kulturell *L. interrogans* serovar Grippotyphosa angezüchtet werden konnte, wurden bei zwölf Tieren auch serologisch Antikörper gegen *L. interrogans* serovar Grippotyphosa nachgewiesen. Bei 22/25 Tieren mit positiver Kultur wurden im Glaskörpermaterial Antikörper festgestellt, sodass Leptospiren und spezifische Antikörper nebeneinander im Auge vorlagen. Lediglich bei drei Pferden konnte *L. interrogans* serovar Grippotyphosa kulturell nachgewiesen werden, ohne dass gleichzeitig Antikörper gegen dieses Serovar detektiert werden konnte.

Insgesamt wiesen 67/225 Pferden mit ERU keinerlei Antikörper gegen die getesteten Leptospirenserovare in Serum und Glaskörpermaterial auf, zwei Pferde zeigten jedoch ein positives Kulturergebnis (*L. interrogans* serovar Grippotyphosa). 78 Pferde wiesen nur Antikörper im Serum, jedoch keine Antikörper im Glaskörper auf. Bei 26 Pferden lag der umgekehrte Fall vor.

**ABBILDUNG 1:**

Verteilung uveitis-kranker Pferde ( $n = 156$ ) mit positiven *Leptospiren*-Antikörpertitern ( $\geq 1:100$ ) im Serum und Glaskörperflüssigkeit nach Serovar (Mikroagglutinationstest,  $\geq 1:100$ ).



Bei lediglich 46 Pferden wurden Antikörper sowohl im Serum als auch im Glaskörpermaterial nachgewiesen. Bei 10/20 Kontrollpferden wurde im Serum und bei 2/20 Kontrollpferden ein positiver Titer im Glaskörpermaterial gegen *L. interrogans* serovar Grippotyphosa ermittelt, während in der kulturellen Anzucht keine *Leptospiren* nachweisbar waren.

## Diskussion

Obwohl sich in den letzten Jahrzehnten verschiedene Arbeitsgruppen intensiv mit der Ätiopathogenese der ERU befassen, sind die Ursachen der ERU noch nicht abschließend geklärt (Werry und Gerhards, 1991; Spiess, 1997; Kulbrock et al., 2013).

In Übereinstimmung mit anderen Autoren (Wollanke, 1995; Szemes und Gerhards, 2000; Kulbrock et al., 2013) wurde in der vorliegenden Studie im Zeitraum 2004–2013 signifikant häufiger bei Wallachen und Hengsten als bei Stuten die ERU-Diagnose gestellt. Wollanke (1995) führte dies in einer Studie in der Stuten ebenfalls signifikant seltener an ERU erkrankten, jedoch vergleichbar hohe Antikörpertiter gegen *Leptospiren* aufwiesen, auf eine schützende Wirkung von weiblichen Geschlechtshormonen zurück.

Laut vorliegender Studie betrug das durchschnittliche Lebensalter der untersuchten Pferde zum Zeitpunkt der Probenentnahme  $9,23 \pm 3,72$  Jahre, wobei die Altersgruppe der fünf bis zwölfjährigen Pferde (66,8 %) am stärksten vertreten war. Nur sechs Pferde waren jünger als vier Jahre, sodass die ERU bei Jungpferden seltener aufzutreten oder erkannt zu werden scheint. Die Tatsache, dass nur sieben Pferde zum Zeitpunkt der Vitrektomie älter als 18 Jahre waren, ist vermutlich auch mit der abnehmenden Besitzerakzeptanz operativer Eingriffe beim alternden Pferd verbunden.

In der Ätiopathogenese der ERU wurde lange Zeit ein enger Zusammenhang zwischen dem direkten oder indirekten *Leptospiren*nachweis und dem Auftreten der Erkrankung gesehen. So wurden in verschiedenen Studien der veterinärmedizinischen Fakultät der LMU München in 81 % (34/42) (Brem et al., 1999), 67 %

(217/324) (Wollanke et al., 2001 bzw. in 94 % (16/17) (Brandes et al., 2007) der Glaskörperproben Antikörper gegen *Leptospiren* nachgewiesen. Dagegen wurden nur aus 9,5 % (4/42) (Brem et al., 1999), 39,4 % (41/104) (Wollanke et al., 2001) bzw. 75 % (9/12) (Brandes et al., 2007) der Glaskörperproben *Leptospiren* isoliert. In der vorliegenden Studie wurden jedoch lediglich bei 35,1 % (79/225) der Glaskörperproben Antikörpertiter ermittelt.

Während Brandes et al. (2007) aus 75 % der Glaskörperproben von Pferden aus Bayern ein positives Kulturergebnis erhielt, erbrachte der kulturelle *Leptospiren*nachweis in der vorliegenden Studie nur bei 34/212 Pferden (16,1 %) aus Nordrheinwestfalen ein positives Ergebnis. In 83,9 % der an ERU erkrankten Pferde konnte kein *Leptospiren*wachstum bestätigt werden. Interessanterweise erfolgte die Probenaufbereitung, der Versand an das Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Ober-schleißheim und die Laboruntersuchungen nach den von Brandes et al. (2007) publizierten Verfahren, sodass regionale Unterschiede der *leptospiren*assoziierten ERU möglich sind. Die Glaskörperproben der vitrektomierten Patienten sind bei antibiotisch vorbehandelten Pferden mit einer Ruhephase von mindestens vier Wochen entnommen worden. Dementsprechend wäre der Nachweis nach intensiver Vorbehandlung weniger erfolgversprechend.

Es ist außerdem möglich, dass der kulturelle Nachweis von *Leptospiren* in Glaskörperflüssigkeit und der Nachweis von Antikörpern gegen *Leptospiren* in Glaskörperflüssigkeit und Serum von der Infektionsphase abhängen. Um diese Annahme zu bestätigen, wären Studien notwendig, in denen Serum und Glaskörperflüssigkeit zu verschiedenen Zeitpunkten der klinischen Symptome einer ERU untersucht werden. Die Entnahme von Glaskörperflüssigkeit aus einem akut entzündeten Auge sollte jedoch aufgrund der erhöhten Blutungsgefahr unterlassen werden.

Die Ergebnisse dieser Studie ähneln den Ergebnissen von Kulbrock et al. (2013) die in 49 % der Glaskörperproben Antikörper feststellten und bei denen der Nachweis von *Leptospiren*-DNA mittels PCR in 20 von 45 Proben gelang.

Aufgrund der konstanten Häufigkeit des Leptospirenachweises wird die ERU mit Leptospiren assoziiert, wobei die Vitrektomie ohne positiven Leptospirenachweis infrage gestellt wird (Brandes et al., 2007). Tomördy et al. (2010) beobachteten in einer Studie, dass sechs von sieben Pferden mit negativem Leptospirenachweis im Glaskörper weitere Uveitisschübe zeigten. Aus der vorliegenden Studie ergeben sich jedoch erste Hinweise, dass die von Tomördy et al. (2010) veröffentlichten Daten, die an einer sehr begrenzten Pferdepopulation erhoben wurden, keine allgemeine Gültigkeit besitzen.

Bei einer genomweiten Assoziationsstudie (GWAS) in Zusammenarbeit des Instituts für Tierzucht und der Klinik für Pferde der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover wurde im August 2013 eine genetische Komponente in der Pathogenese der ERU festgestellt. Mittels equine SNP50 bead chip wurden bei 144 Warmblutpferden signifikante Einzelnukleotidpolymorphismen auf dem Pferdechromosom 20 in unmittelbarer Nähe zu den Genen IL-17A und IL-17F festgestellt. Hier ergibt sich ein Zusammenhang zu der durch Th 17 induzierten Autoimmunreaktion. Die IL-17A, IL-17F, IL-22 und IL-6 sezernierenden CD4+Helfer-T-Zellen regeln eine immunvermittelte Reaktion gegen verschiedene Autoantigene in der Retina und den Membranstrukturen der an ERU erkrankten Pferdeaugen (Regan et al., 2012). Zu den ersten nachgewiesenen Autoantigenen im Pferdeauge zählten S-Antigen (S-Ag) und Interphotoreceptor-Retinoidbindingprotein (IRBP) (Deeg et al., 2001), die in vitro die T-Zell-Proliferation stimulieren und durch die experimentell eine Uveitis ausgelöst werden kann (Deeg et al., 2002, 2004). Moderne Analyseverfahren, insbesondere die Proteomanalyse, erweiterten in den letzten Jahren das Spektrum der ERU Autoantigene (Deeg et al., 2006; Deeg, 2009; Zipplies et al., 2012; Swadzba et al., 2012). So zählen zu den weiteren Autoantigenen das Recoverin und zelluläres Retinaldehyd-Binding-Protein (CRALBP) (Deeg, 2009) sowie das Membranautoantigen-Synaptotagmin-1 (Swadzba et al., 2012). Neben den T-Zellen wurden auch B-Zellen in der Retina erkrankter Pferde nachgewiesen (Deeg, 2009), durch die spezifische IgM-Autoantikörper in 44 % der ERU-Fälle produziert wurden (Swadzba et al., 2012).

Aus Sicht der Autoren sollte die genetische Veranlagung der autoimmuninduzierten ERU vermehrt in den Fokus der ERU-Forschung rücken. Der genetische Faktor allein führt jedoch nicht zu der Entwicklung der Erkrankung. Es wird vermutet, dass eine initiiierende Infektion oder Umweltfaktoren dazu führen, dass die Erkrankung in einem genetisch empfänglichen Tier ausgelöst wird (Deeg et al., 2004). Inwiefern die primäre Leptospireninfektion zu einer Öffnung der Blut-Glaskörper-Schranke, einer Demaskierung der Autoantigene, dem Priming der CD4+Helfer-T-Zellen oder eine Kreuzreaktion der Antikörper der Leptospirenproteine LruA und LruB gegen die Autoantigene herbeiführt, bedarf weiterer Untersuchungen.

Zusammenfassend verdeutlicht die vorliegende Studie die klinische Relevanz der Debatte um die Ätiopathogenese der equinen rezidivierenden Uveitis.

Das Ergebnis, dass von 225 Patienten mit ERU bei 79,1 % der vitrektomierten Glaskörper keine Leptospiren nachgewiesen wurden, ist ausschlaggebend für die Diagnosestellung und Therapie der ERU. Entgegen der Einschätzung anderer Arbeitsgruppen, die die ERU-Diagnose und -Therapie von einem positiven Leptospirenbefund abhängig machen, führen die Autoren dieser

Studie in der Klinik eine Vitrektomie nach der klinischen ERU-Diagnose unabhängig vom Leptospirenbefund durch. Dieses Vorgehen wurde auch von von Borstel et al. (2010) empfohlen, da eine möglichst frühzeitige Vitrektomie empfehlenswert ist, um die Spätfolgen und um das Fortschreiten des Kataraktes oder die partielle Netzhautablösung zu reduzieren.

In der vorliegenden Studie wiesen 67 von 225 Pferden (29,7 %) keine Leptospirenantikörper in Serum und Glaskörpermaterial auf, wobei Rezidive bei diesen Pferden, wie in anderen zitierten Studien beschrieben, noch nicht beobachtet wurden. In weiterführenden Untersuchungen sollte an einer größeren ERU-kranken Pferdepopulation der Zusammenhang zwischen dem Leptospirenachweis mittels Kultur und PCR und dem Komplikationsrisiko nach der Pars Plana Vitrektomie untersucht werden, um eine eindeutige Vorgehensweise in der Diagnosestellung und Therapie der ERU zu ermöglichen.

## Conflict of interest

Es bestehen keine geschützten, finanziellen, beruflichen oder anderen persönlichen Interessen an einem Produkt, Service und/oder einer Firma, welche die in diesem Manuskript dargestellten Inhalte oder Meinungen beeinflussen könnten.

## Literatur

- Alexander CS, Keller H (1990):** Ätiologie und Vorkommen der periodischen Augenentzündung des Pferdes im Raum Berlin. *Tierärztl Prax* 18: 623–627.
- Angelos J, Oppenheim Y, Rebhu W, Mohammed H, Antczak DF (1988):** Evaluation of breed as a risk factor for sarcoid and uveitis in horses. *Anim Genet* 19: 417–425.
- Bartel S (2004):** Retrospektive kasuistische Analyse von 369 Pferden mit equiner rezidivierender Uveitis (ERU). Ludwig-Maximilians-Universität München, veterinärmed. Fak., Diss.
- Brandes K, Wollanke B, Niedermaier G, Brem S, Gerhards H (2007):** Recurrent uveitis in horses: vitreal examination with ultrastructural detection of leptospire. *J Vet Med A* 54: 270–275.
- Brem S, Gerhards H, Wollanke B, Meyer P, Kopp H (1998):** Intraokularer Leptospirenachweis bei 4 Pferden mit rezidivierender Uveitis (ERU). *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 111: 415–417
- Brem S, Gerhards H, Wollanke B, Meyer P, Kopp H (1999):** 35 Leptospirenisolationen aus Glaskörpern von 32 Pferden mit rezidivierender Uveitis (ERU). *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 112: 390–393.
- Deeg CA, Kaspers B, Gerhards H, Thureau SR, Wollanke B, Wildner G (2001):** Immune Responses to Retinal Autoantigens and Peptides in Equine Recurrent Uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 42: 393–398.
- Deeg CA, Ehrenhofer M, Thureau SR, Reese S, Wildner G, Kaspers B (2002):** Immunopathology of Recurrent Uveitis in Spontaneously Diseased Horses. *Exp Eye Res* 75: 127–133.
- Deeg CA, Marti E, Gaillard, Kaspers B (2004):** Equine recurrent uveitis is strongly associated with the MHC class 1 haplotype ELA-A9. *Equine Vet J* 36: 73–75.
- Deeg CA, Pompetzki D, Raith AJ, Hauck SM, Amann B, Suppmann S, Goebel TWF, Olazabal U, Gerhards H, Reese S, Stangassinger M, Kaspers B, Ueffig M (2006):** Identification and functional validation of novel autoantigens in equine uveitis. *Mol Cell Proteomics* 5: 1462–1470.
- Deeg CA, Hauck SM, Amann B, Pompetzki D, Altamann E, Raith A, Schmalz T, Stangassinger M, Ueffig M (2008):**



- Equine Recurrent Uveitis – A Spontaneous Horse Model of Uveitis. *Ophthalmic Res* 40: 151–153.
- Deeg CA (2009):** A proteomic approach for studying the pathogenesis of spontaneous equine recurrent uveitis (ERU). *Vet Immunol Immunopathol* 128: 132–136.
- Dwyer AE, Rockett RS, Kalsow CM (1995):** Association of leptospiral activity and breed with uveitis and blindness in horses: 372 cases (1986–1993). *J Am Vet Med Assoc* 207: 1327–1331.
- Dwyer A, Gilger BC (2005):** Equine recurrent uveitis. In: Gilger BC (ed.): *Equine Ophthalmology*, Elsevier, St. Louis, 285–322.
- Errington BJ (1941):** Ophthalmology in Equidae. *J Am Vet Med Assoc* 108: 115–123.
- Faber NA, Crawford M, LeFebvre RB, Buyukmihci NC, Madigan JE, Willits H (2000):** Detection of *Leptospira* spp. in the Aqueous Humor of Horses with Naturally Acquired Recurrent Uveitis. *J Clin Microbiol* 38: 2731–2733.
- Gilger BC, Malok E, Stewart T, Horohov D, Ashton P, Smith T (2000):** Effect of an intravitreal cyclosporine implant on experimental uveitis in horses. *Vet Immunol Immunopathol* 76: 239–255.
- Gilger BC, Wilkie DA, Davidson MG, Allen JA (2001):** Use of an intravitreal sustained-release cyclosporine delivery device for treatment of equine recurrent uveitis. *Am J Vet Res* 62: 1892–1896.
- Gilger BC, Salmon JH, Yi NY, Barden CA, Chandler HL, Wendt JA, Colitz CMH (2008):** Role of bacteria in the pathogenesis of recurrent uveitis in horses from the southeastern United States. *Am J Vet Res* 69: 1329–1335.
- Halliwell RE, Brim TA, Hines MT, Wolf D, White FH (1985):** Studies on equine recurrent uveitis. II: The role of infection with *Leptospira interrogans* serovar pomona. *Curr Eye Res* 4: 1033–1040.
- Hartskeerl RA, Goris MG, Brem S, Meyer P, Kopp H, Gerhards H, Wollanke B (2004):** Classification of leptospira from the eyes of horses suffering recurrent uveitis. *J Vet Med B* 51: 110–115.
- Heusser H (1948):** Die periodische Augenentzündung, eine Leptospirose? *Schweiz Arch Tierheilk* 90: 287–314.
- Kaese HJ, Flickinger G, Valberg SJ, Mickelson JR, Binns MM (2005):** ELA microsatellite association with uveitis in the Appaloosa horse. *Vet Ophthalmol* 8: 437–450.
- Kulbrock M, von Bostel M, Rohn K, Distl O, Ohnesorge B (2013):** Studie zu Häufigkeit und Schweregrad der Equinen Rezidivierenden Uveitis bei Warmblütern. *Pferdeheilkunde* 29: 27–36.
- Lowe RC (2010):** Equine Uveitis: A UK perspective. *Equine Vet J* 42: 46–49.
- Parma AE, Santisteban CG, Villalba JS, Bowden RA (1985):** Experimental demonstration of an Antigenic Relationship between *Leptospira* and Equine Cornea. *Vet Immunol Immunopathol* 10: 215–224.
- Popp M, Gerhards H, Wollanke B (2013):** Enrofloxacinkonzentrationen im Glaskörper und im Serum an equiner rezidivierender Uveitis (ERU) erkrankter Pferde nach wiederholter intravenöser Verabreichung. *Pferdeheilkunde* 29: 574–580.
- Regan DP, Aarnio MC, Davis WS, Carmichael KP, Vandenplas ML, Lauderdale JD, Moore PA (2012):** Characterization of cytokines associated with Th17 cells in the eyes of horses with recurrent uveitis. *Vet Ophthalmol* 15: 145–152.
- Rimpau W (1947):** Leptospirose beim Pferd (Periodische Augenentzündung). *Tierärztl Umsch* 2: 177–178.
- Romeike A, Brüggemann M, Drommer W (1998):** Immunohistochemical Studies in Equine Recurrent Uveitis (ERU). *Vet Pathol* 35: 515–526.
- Spiess BM (1997):** Zur Equinen Rezidivierenden Uveitis (ERU). *Schweiz Arch Tierheilk* 139: 126–133.
- Swadzba ME, Hirmer S, Amann B, Hauck SM, Deeg CA (2012):** Vitreal IgM Autoantibodies Target Neurofilament Medium in a Spontaneous Model of Autoimmune Uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53: 294–300.
- Szemes PA, Gerhards H (2000):** Untersuchungen zur Prävalenz der equinen rezidivierenden Uveitis im Großraum Köln-Bonn. *Prakt Tierarzt* 81: 408–420.
- Tizard I (1992):** *Veterinary Immunology: An introduction* 2<sup>nd</sup> ed Saunders WB Co. Hancourt Brace Jovanovich Inc. Philadelphia 445–466.
- Tomördy E, Hässig M, Spiess BM (2010):** The outcome of pars plana vitrectomy in horses with equine recurrent uveitis with regard to the presence or absence of intravitreal antibodies against various serovars of *Leptospira interrogans*. *Pferdeheilkunde* 26: 251–254.
- Tóth J, Hollerrieder J, Huskamp B (2006):** Spezielle Indikationen zur Vitrektomie beim Pferd. *Pferdeheilkunde* 22: 296–300.
- Tóth J, Hollerrieder J, van der Geer C, Huthmann S (2008):** Transpalpebrale Bulbusentfernung am stehenden Pferd. *Tierärztl Prax* 36: 119–123.
- Tóth J, Hollerrieder J, Sótonyi P (2010):** Augenheilkunde beim Pferd. *Schattauer* 181–186
- Verma A, Kumar P, Babb K, Timoney JF, Stevenson B (2010):** Cross-Reactivity of Antibodies against Leptospiral Recurrent Uveitis-Associated Proteins A and B (LruA and LruB) with Eye Proteins. *PLoS Negl Trop Dis* 4(8): e778. doi:10.1371/journal.pntd.0000778.
- Von Borstel M, Oey L, Strutzberg-Minder K, Boevé MH, Ohnesorge B (2010):** Direkter und indirekter Nachweis von Leptospiren aus Glaskörperproben von Pferden mit ERU. *Pferdeheilkunde* 26: 219–225.
- Werry H, Gerhards H (1991):** Möglichkeiten zur chirurgischen Behandlung der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU). *Pferdeheilkunde* 7: 321–331.
- Wiehen LE (2012):** Retrospektive Analyse zum Vorkommen der Equinen rezidivierenden Uveitis – unter Berücksichtigung der Leptospireninfektion – an der LMU München von 01/2005 bis 06/2010. Ludwig-Maximilians-Universität München, veterinärmed. Fak. Diss.
- Williams RD, Morter RL, Freeman MJ, Lavignette AM (1971):** Experimental chronic uveitis. Ophthalmic signs following equine leptospirosis. *Invest Ophthalmol* 10: 948–954.
- Wollanke B (1995):** Untersuchungen zur Ätiologie der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU). Ludwig-Maximilians-Universität München, veterinärmed. Fak., Diss
- Wollanke B, Gerhards H, Brem S, Kopp S, Meyer P (1998):** Intraokulare und Serumantikörper gegen Leptospiren bei 150 wegen equiner rezidivierenden Uveitis (ERU) vitrektomierten Pferden. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 111: 134–139.
- Wollanke B, Rohrbach BW, 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: 795–800.
- Wollanke B (2002):** Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) als intraokulare Leptospirose. Ludwig-Maximilians-Universität München, veterinärmed. Fak., Habil.
- Zipplies JK, Hauck SM, Eberhardt C, Hirmer S, Amann B, Stangassinger M, Ueffing M, Deeg CA (2012):** Miscellaneous vitreous derived IgM antibodies target numerous retinal proteins in equine recurrent uveitis. *Vet Ophthalmol* 15: 57–64.

**Korrespondenzadresse:**

Prof. Dr. Dipl. ECEIM Gerald Fritz Schusser  
 Medizinische Tierklinik  
 Veterinärmedizinische Fakultät  
 Universität Leipzig  
 An den Tierkliniken 11  
 04103 Leipzig  
 schusser@vetmed.uni-leipzig.de