

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

Arbeit eingereicht über PD. Dr. B. Wollanke

angefertigt unter der Leitung von apl. Prof. Dr. M. Büttner
am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
Oberschleißheim (Präsident: Prof. Dr. V. Hingst)

Entwicklung einer quantitativen PCR zum Nachweis von DNA pathogener Leptospiren in Glaskörper- und Kammerwasserproben von Pferden

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

von
Alexandra Helena Roczek
aus Karlsruhe

München 2008

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Wollanke
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. Breuer

Tag der Promotion: 8. Februar 2008

Erste Ergebnisse dieser Arbeit wurden als Poster am 27. DVG Kongress in Berlin „Tierseuchenbekämpfung im Spannungsfeld zwischen Wissenschaft und öffentlichem Interesse“ im April 2007 unter dem Titel „Real-time PCR for the detection of pathogenic *Leptospira* using LUX™ primers“ vorgestellt.

Im Epidemiologischen Bulletin Nr. 9/2007 vom Robert Koch Institut (RKI) wird in dem Fallbericht „Leptospirose unter dem Bild eines Multiorganversagens nach Rattenbiss“ das Ergebnis einer Untersuchung mit dieser PCR erwähnt. Ausführlicher wird die Vorgehensweise in dem Artikel „Severe course of rat bite-associated Weil’s disease in a patient diagnosed with a new *Leptospira*-specific real-time quantitative LUX-PCR“ im Journal of Medical Microbiology (57/2008) beschrieben.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
2 Literatur	2
2.1 Leptospiren	2
2.1.1 Morphologie	2
2.1.2 Taxonomie und Nomenklatur	3
2.1.3 Ernährung und Stoffwechsel	5
2.1.4 Vorkommen.....	5
2.1.5 Genom	6
2.2 Leptospirose.....	7
2.2.1 Epidemiologie.....	7
2.2.2 Krankheitsbild.....	11
2.2.3 Pathogenese	13
2.2.4 Immunantwort	15
2.2.5 Virulenzfaktoren	17
2.2.6 Therapie.....	19
2.2.7 Prophylaxe	20
2.3 Leptospiren bedingte Augenveränderungen	21
2.3.1 Vorkommen.....	21
2.3.2 Krankheitsbild.....	23
2.3.3 Pathogenese	24
2.3.4 Labordiagnose	26
2.3.5 Therapie.....	29
2.4 Labordiagnostik.....	31
2.4.1 Mikroskopischer Agglutinationstest (MAT)	32
2.4.2 „Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay“ (ELISA)	34
2.4.3 Mikroskopie.....	35
2.4.3.1 Histologie.....	36
2.4.4 Isolierung und Vermehrung in Kultur.....	37
2.4.4.1 Typisierung von Isolaten.....	40
2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	41
2.5.1 Probenvorbereitung und DNA-Extraktion	42
2.5.2 Konventionelle PCR	47
2.5.3 „Real-time“ PCR.....	55
2.5.4 LUX™ PCR.....	59
2.5.5 Sensitivität.....	61
2.5.6 Kontrollen.....	62
3 Material und Methoden	65
3.1 Untersuchungsmaterial	65
3.1.1 Leptospirenkultur.....	65
3.1.2 Glaskörper- und Kammerwasserproben	65

Inhaltsverzeichnis

3.1.3	Sonstiges	66
3.1.4	DNA für die Spezifitätsprüfung	67
3.2	Das Leptospiroselabor	67
3.2.1	Allgemeines.....	67
3.2.2	Mikroskopischer Agglutinationstest (MAT)	68
3.2.3	„Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay“ (ELISA)	68
3.2.4	Kulturelle Isolierung.....	70
3.2.5	Die mikroskopische Untersuchung.....	70
3.3	LipL32 PCR.....	71
3.3.1	DNA-Extraktion	71
3.3.1.1	Probenvorbereitung.....	71
3.3.1.2	DNeasy® Blood & Tissue Kit.....	72
3.3.1.3	Extraktionskontrollen	73
3.3.1.4	Reinigung und Dekontamination.....	73
3.3.2	Primerdesign.....	74
3.3.3	LUX™ qPCR.....	76
3.3.4	Semi-nested PCR	79
3.3.5	Agarosegel-Elektrophorese.....	80
3.4	Klonierung von PCR-Produkten	81
3.4.1	PCR	81
3.4.2	Gelextraktion.....	81
3.4.3	Ligation und Transformation.....	82
3.4.4	Überprüfen der Transformation	82
3.4.5	Plasmidpräparation	83
3.4.6	Berechnung der Genomkopien	83
3.5	Sequenzierung von PCR-Produkten	84
3.5.1	PCR	84
3.5.2	Gelextraktion.....	85
3.5.3	Ethanolpräzipitation.....	85
3.5.4	Sequenzierung.....	85
3.6	Experimentalphase.....	86
3.7	Statistische Auswertung	87
4	Ergebnisse.....	89
4.1	Entwicklung und Auswertung	89
4.1.1	Probenvorbereitung und DNA-Extraktion	89
4.1.2	Primer	91
4.1.2.1	Design	91
4.1.2.2	Spezifität.....	94
4.1.3	LUX™ qPCR.....	94
4.1.3.1	Standardkurve	94
4.1.3.2	Kontrollen	102
4.1.3.3	Inhibitionskontrolle.....	103
4.1.3.4	Proben.....	104
4.1.3.5	Quantifizierung	104
4.1.3.6	Fehlersuche.....	104

4.1.4	Agarosegel-Elektrophorese.....	105
4.1.5	Semi-nested PCR	106
4.1.6	Klonierung von PCR-Produkten	107
4.1.7	Sequenzierung von PCR-Produkten	107
4.2	Glaskörper- und Kammerwasserproben.....	108
4.2.1	Übersicht.....	108
4.2.2	Mikroskopischer Agglutinationstest (MAT)	112
4.2.3	„Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay“ (ELISA)	114
4.2.4	Kulturelle Isolierung.....	115
4.2.5	Mikroskopie.....	117
4.2.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	118
4.2.7	Vergleich: MAT/ELISA/PCR/Kultur.....	120
4.3	Leptospiren bedingte Augenveränderungen	123
4.3.1	Klinik	123
4.3.2	Pferde mit einem direkten Erregernachweis.....	124
5	Diskussion	127
5.1	Ausblick.....	140
5.2	Schlussfolgerung.....	142
6	Zusammenfassung.....	143
6.1	Summary	144
	Literaturverzeichnis	145

Abkürzungsverzeichnis

Acl	Adenylatcyclase
al.	alii
Aust	Australis
Aut	Autumnalis
Bal	Ballum
Bat	Bataviae
BB	Brandenburg
BE	Berlin
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BHQ	Black Hole Quencher
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	base pair
Brat	Bratislava
BSA	Bovines Serum-Albumin
BW	Baden-Württemberg
BY	Bayern
Can	Canicola
CD	Cluster of Differentiation
Cop	Copenhageni
Ct	threshold Cycle
Cy5	Carbocyanin 5
DEPC	DiEthylPyroCarbonat
DMSO	DiMethylSulfOxid
DNA	DeoxyriboNucleic Acid
dNTP	deoxyNucleosid-5'-TriPhosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	EthylenDiaminTetraAcetat
Eff.	Effizienz
ELISA	Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay
EMJH	Ellinghausen McCullough Johnson Harris
ERU	Equine Rezidivierende Uveitis
f.	femininum
FAM	Fluorescein Addition Monomer, 6-Carboxyfluorescein
FITC	FluoresceinIsoThioCyanat
<i>g</i>	gravity
GLP	GlykoLipoProtein
gr.	griechisch
Grip	Grippotyphosa
H ₂ O	Wasser
Hard	Hardjo
HE	Hessen
Heb	Hebdomadis

Abkürzungsverzeichnis

HH	Freie und Hansestadt Hamburg
ICCH	IridoCycloCHorioiditis recidiva
Ict	Icterohaemorrhagiae
IFN	InterFeroN
Ig	Immunglobulin
IL	InterLeukin
Jav	Javanica
JOE	6-Carboxy-4',5'-dichloro- 2',7'-dimethoxyfluorescein
<i>L.</i>	<i>Leptospira</i>
LB	Luria Bertani
LGL	Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
LigA	immunoglobulin-like Protein A von <i>Leptospira</i>
LipL32	Lipoprotein 32 bei <i>Leptospira</i>
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LPS	LipoPolySaccharide
LUX	Light Upon eXtension
MAT	Mikroskopischer AgglutinationsTest
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MV	Mecklenburg-Vorpommern
NCBI	National Center of Biotechnology Information
neg	negativ
NI	Niedersachsen
NTC	No Template Control
NW	Nordrhein-Westfalen
o.b.B.	ohne besonderen Befund
OD	Optische Dichte
OIE	Office International des Epizooties
OMPs	Outer Membrane Proteins
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
qPCR	quantitative PCR
Pom	Pomona
pos	positiv
Pyr	Pyrogenes
RKI	Robert Koch Institut
RNA	RiboNucleic Acid
mRNA	messenger RNA
16S rRNA	16Svedberg ribosomale RNA
ROX	6-carboxy-X-RhOdamin
RP	Rheinland-Pfalz
RSq	R squared, Bestimmtheitsmaß
Sax	Saxkoebing
SDS	SodiumDodecylSulfat
Sej	Sejroe
VI	

SH	Schleswig-Holstein
SL	Saarland
SN	Freistaat Sachsen
spp.	species pluralis
ST	Sachsen-Anhalt
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAMRA	6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Tar	Tarassovi
TE	Tris EDTA
Temp.	Temperatur
TH	Thüringen
Th1	T-Helferzellen vom Typ 1
TLR	Toll-Like Rezeptor
Tm	melting Temperature
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TPR	TetratricoPeptide Repeat
UDG	Uracil-DNA-Glycosylase
UV	UltraViolett
Wbl	Warmblut
WHO	World Health Organisation

1 Einleitung

In Indien ist die Leptospirose die häufigste Ursache einer infektiösen Uveitis beim Menschen. Bis vor knapp zwanzig Jahren war sich dessen jedoch kaum einer bewusst. Durch einen Wandel in der Epidemiologie erlangte die Leptospireninfektion weltweit erhöhte Aufmerksamkeit. Die Einführung molekularbiologischer Methoden brachte eine Wende in das Verständnis um die Genomstruktur und Taxonomie der Leptospiren. Mit der Zeit werden die Pathogenese und Immunantwort, Virulenzfaktoren und Wirt-Bakterium Interaktionen bekannt und bereiten den Weg für neue Ansätze in Diagnostik, Therapie und Prophylaxe. Leptospiren sind ein Genus der Spirochäten, einer der ältesten Bakterienklassen auf der Welt. Der direkte Erregernachweis in Form einer kulturellen Isolierung ist aufgrund ihres langsamen Generationszyklus mühsam und eignet sich daher nur bedingt für eine Laboruntersuchung. Einen bemerkenswerten Fortschritt brachte die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und ist heutzutage aus der modernen Infektionsdiagnostik sowohl in der Human-, als auch in der Veterinärmedizin nicht mehr wegzudenken. Nun handelt es sich bei einer Leptospirose primär um eine systemische Erkrankung, die jährlich in der Tierzucht und Nutztierhaltung durch Fruchtbarkeitsstörungen, Aborte, Geburt lebensschwacher Jungtiere sowie Rückgang der Milchleistung zu hohen wirtschaftlichen Einbußen führt und in der Humanmedizin aufgrund der nicht zu unterschätzenden Mortalitätsrate gefürchtet wird. Genauso gut kann sie sich aber auch als leichte „Erkältung“ darstellen oder völlig symptomlos verlaufen. Die Mannigfaltigkeit der Symptome lässt eine klinische Diagnose nicht zu und sorgt dafür, dass eine Leptospireninfektion beinahe immer auf der Liste an Differentialdiagnosen in der Ätiologie von Infektionskrankheiten steht. Laboruntersuchungen in Deutschland weisen darauf hin, dass die Leptospirose die häufigste Ursache einer infektiösen Uveitis beim Pferd darstellt. Immerhin gilt die equine rezidivierende Uveitis (ERU) als eine klinische Ausdrucksform einer intraokularen Leptospireninfektion und steht weltweit an erster Stelle der bedeutendsten Augenerkrankungen beim Pferd.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, für das Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) in Oberschleißheim eine quantitative „real-time“ PCR (qPCR), auf Basis der „Light Upon eXtension“ (LUX™) Technologie, zum Nachweis der Deoxyribonucleinsäure (DNA) pathogener Leptospiren in biologischen Proben für die Routinediagnostik zu entwickeln. Eine praktikable Extraktionsmethode wurde ausgewählt und optimiert. Eine interne Kontrolle wurde etabliert und fand Anwendung, um mögliche falsch negative Ergebnisse aufgrund einer PCR-Hemmung zu erkennen. Das Verfahren wurde in erster Linie genutzt, um die Menge an Leptospiren in Glaskörper- und Kammerwasserproben aus der Klinik für Pferde der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU), München, zu bestimmen. Die Anwendung der neuen und kostengünstigen qPCR hat sich auch bei einem aktuellen Zoonosefall, ausgelöst durch infizierte Hausratten, bewährt.

2 Literatur

2.1 Leptospiren

2.1.1 Morphologie

Leptospiren (gr., leptós: dünn, fein, zart; gr., speíra: das Gewundene, die Windung) sind bewegliche Bakterien der Klasse Spirochaetes. Sie sind etwa 6 µm bis 30 µm lang und erreichen einen Durchmesser von 0,1 µm bis 0,2 µm. Damit gelingt es ihnen selbst 0,22 µm Filter zu passieren. Ihr Zellaufbau entspricht weitestgehend dem gramnegativer Bakterien, weshalb sie heute noch diesen zugeordnet werden (Levett, 2001).

Jeweils an einem Pol entspringt ein Flagellum, welches nach Durchtritt der Peptidoglykanschicht im periplasmatischem Raum in Richtung gegenüberliegendem Ende verläuft (Abbildung 1). Auf halber Strecke enden beide Flagellen ohne sich zu überlappen. Das proximale Ende des Flagellums ist gebogen und sorgt für das unter dem Mikroskop charakteristisch, erkennbare abgeknickte Ende („Kleiderbügel“) der Leptospiren. Das Flagellum, auch als Axialfilament bezeichnet, ist aus Proteinuntereinheiten aufgebaut (flaB Gen), welche von einer Hülle aus FlaA Proteinen umgeben sind.

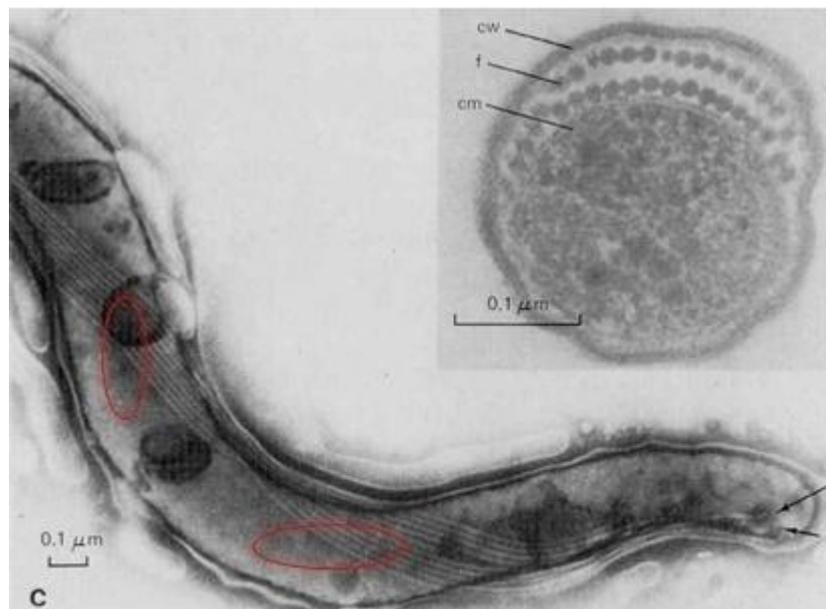
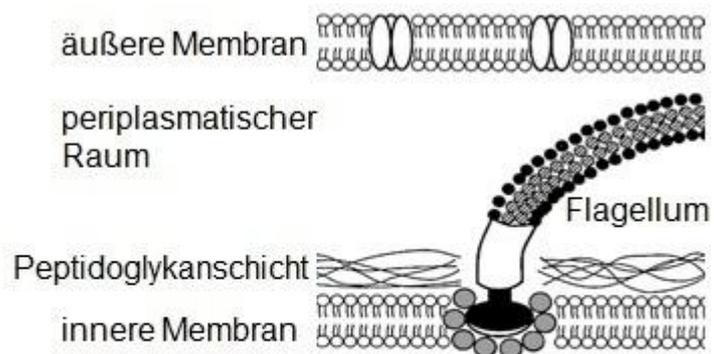


Abbildung 1. Das gebogene Ende eines Schraubenbakteriums mit der Insertionsstelle für ein Flagellum. Querschnitt mit Darstellung der Flagellum Protein Untereinheiten FlaB. Chromosome: 0. Modifiziert nach: <http://afowler8.myweb.uga.edu/spirochaetes.htm>; Charon et Goldstein, 2002

Leptospiren können rotierende, kreiselnde, beugende und vorwärts-gerichtete Bewegungen durchführen. Eine Inaktivierung des flaB Genes zeigte, dass die Bakterien sich nicht mehr bewegen können, weil die beiden polaren Flagellen fehlen. Außerdem scheinen sie unter dem Mikroskop gerade, doch immer noch gewunden. Die klassische helikale Form ist unabhängig von der Existenz der Flagellen (Bharti et

al., 2003; Canale-Parola, 1977; Charon et Goldstein, 2002; Kan et Wolgemuth, 2007; Li et al., 2000; Mitchison et al., 1991; Picardeau et al., 2001; Wolgemuth et al., 2006). Die äußere Membran der Leptospiren enthält Proteine, Lipide, Lipoproteine und Lipopolysaccharide (LPS). Im Vergleich zu *Escherichia coli* (*E. coli*) ist die Konzentration von Proteinen um das Hundertfache niedriger (Haake et al., 1991). Dafür enthält die äußere Membran eine große Anzahl an Lipoproteinen, welche zum Teil direkt in die Pathogenese und Immunantwort involviert sind (Babu et al., 2006; Barnett et al., 1999; Cullen et al., 2002; Haake, 2000; Setubal et al., 2006; Sonrier et al., 2000; Yang, 2007). Die Peptidoglykanschicht liegt der inneren Membran eng an. Ihr wird eine Rolle in der Phagozytosestimulierung und Produktion von Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α) durch Monozyten zugesprochen (Cinco et al., 1996; Dobrina et al., 1995). Penicillin bindende Proteine sind mit dem Peptidoglykan/innere Membran Komplex assoziiert (Brenot et al., 2001).

2.1.2 Taxonomie und Nomenklatur

Traditionell werden die Leptospiren in zwei Spezies eingeteilt, den apathogenen *Leptospira* (*L.*) *biflexa* (sensu lato) und den pathogenen *L. interrogans* (sensu lato). Mithilfe von Hyperimmunseren, die aus Kaninchen gewonnen werden, können die Bakterien Serovaren zugeordnet werden, die wiederum in Serogruppen zusammengefasst sind (Levett, 2001).

Die Einführung molekularbiologischer Methoden brachte eine Wende in der taxonomischen Einteilung (Abbildung 2). Mithilfe der DNA-DNA Hybridisierung und der 16S rRNA Gen-Sequenzierung konnten den Leptospiren bisher 18 Genospezies zugeordnet werden (Arzouni et al., 2002; Brenner et al., 1999; Chappel et al., 1998; Levett et al., 2006; Morey et al., 2006; Paster et Dewhirst, 2000; Perolat et al., 1990, 1998; Petersen et al., 2001; Ramadass et al., 1992; Slack et al., 2006a; Yasuda et al., 1987; Yersin et al., 1998). Grundsätzlich bedarf eine Spezies mindestens 70% ähnlicher DNA mit höchstens 5% Divergenz, sprich ungepaarter Basen. Die Genospezies *L. interrogans* (sensu strictu), *L. kirschneri*, *L. borgpetersenii*, *L. fainei*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. weilii* und *L. alexanderi*, sowie *L. genospecies 1* werden der Gruppe der pathogenen Leptospiren zugeordnet. Dahingegen sind *L. biflexa* (sensu strictu), *L. meyeri*, *L. wolbachii*, sowie *L. genospecies 3*, *4* und *5* Leptospirenspezies, die rein saprophytär leben und sich im Gegensatz zu den pathogenen Leptospiren auch außerhalb des Wirtsorganismus vermehren; sie werden den apathogenen Leptospiren zugeordnet. Zu drei Genospezies, *L. inadai*, *L. broomii* und *L. licerasiae* liegen dazu noch nicht ausreichende Informationen vor; ihnen wird bisher eine intermediäre Stellung zugesprochen. Je mehr Leptospirenstämme klassifiziert werden, desto eher ist auch mit einer Umgruppierung dieser Einteilung zu rechnen (Ganoza et al., 2006; Haake, 2006; Levett, 2001; Levett et Smythe, 2006).

Literatur

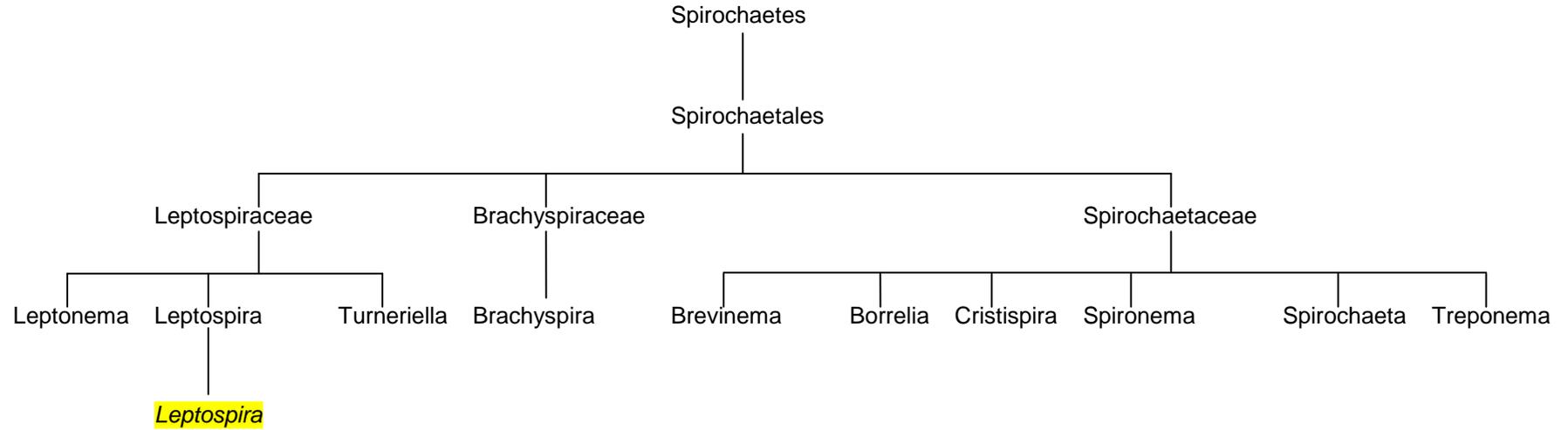
Klasse

Ordnung

Familie

Genus

Spezies



P
A
T
H
O
G
E
N

genetisch
L. interrogans
L. borgpetersenii
L. kirschneri
L. noguchii
L. santarosai
L. weilii
L. alexanderi
L. genospecies 1
L. fainei
L. inadai ?
L. broomii ?
L. licerasiae ?

traditionell
L. interrogans
 Serogruppen: 31
 Serovare: > 268

genetisch
L. biflexa
L. meyeri
L. wolbachii
L. genospecies 3
L. genospecies 4
L. genospecies 5

traditionell
L. biflexa
 Serogruppen: 3
 Serovare: > 60

A
P
A
T
H
O
G
E
N

Abbildung 2. Taxonomische Einteilung der Leptospiren. ? intermediär

Nach internationaler Vereinbarung („International Leptospirosis Society“, ILS: www.med.monash.edu.au/microbiology/staff/adler/ils.html) wird folgende Schreibweise verwendet, zum Beispiel: *Leptospira interrogans* Serovar Hardjo Stamm Hardjoprajitno. Aber man beachte: *Leptospira borgpetersenii* Serovar Hardjo Stamm Hardjobovis. Dieses Beispiel zeigt, dass zwei Spezies, die sich auf DNA-Ebene eindeutig voneinander unterscheiden, sich antigenetisch, sprich auf LPS-Ebene, gleichen und somit serologisch nicht eindeutig differenziert werden können (Hartskeerl, 2005; Hotka et al., 2007; Masri et al., 1997).

2.1.3 Ernährung und Stoffwechsel

Leptospiren haben einfache, aber ungewöhnliche Bedürfnisse. Sie benötigen als Kohlenstoffquelle langkettige Fettsäuren, in der Regel C12 bis C18. Ihre Energie gewinnen die Bakterien durch β -Oxidation. Mit „Zucker“ (Kohlenhydraten) können sie nichts anfangen. Auch sind sie nicht in der Lage, langkettige Fettsäuren de novo zu synthetisieren. Gleichzeitig wirken freie Fettsäuren toxisch auf die Leptospiren. Daher enthalten Kulturmedien meist Sorbitolkomplexe (Tween) welche von bovinem Serum-Albumin (BSA) adsorbiert werden. Dadurch werden den Leptospiren die notwendigen Fettsäuren in wohl dosierter Konzentration zur Verfügung gestellt. Glycerol fördert bei manchen Leptospiren die Wachstumsrate. Auch der Zusatz von Pyruvat kann, vor allem bei kleinen Ausgangsmengen einiger Stämme, hilfreich sein. Als einzig bekannte Stickstoffquelle nutzen die Leptospiren Ammoniumionen, welche sie aus dem Zusatz von Ammoniumsalzen oder der Desaminierung von Aminosäuren erhalten. Leptospiren sind Katalase und Oxidase positiv. Cyanocobalamin (Vitamin B₁₂) und Thiamin (Vitamin B₁) sind lebensnotwendig, für manche Stämme auch Biotin. Schließlich sind für die Leptospiren Phosphate, Magnesium, Calcium und Eisen essentiell, wobei ihnen das Eisen in Form von dreiwertigen Ionen (Fe⁺⁺⁺) oder als Häm-Verbindung, wie im Hämoglobin oder Hämatin, am liebsten ist (Henneberry et Cox, 1970; Johnson et al., 1969, 1973; Levett, 2001; Louvel et al., 2006; Ren et al., 2003; Sambasiva et al., 2003; Sritharan et al., 2006; Velineni et al., 2006; WHO, 2003; Zou et al., 2007).

2.1.4 Vorkommen

Leptospiren kommen weltweit vor: Wo immer man sie auch sucht, werden sie gefunden (Cachay et Vinetz, 2005). Apathogene Leptospiren sind in der Lage, sich außerhalb eines Wirtsorganismus zu vermehren; anstatt dem Begriff apathogen, wird auch häufig von saprophytär lebenden Leptospiren gesprochen. Pathogene Leptospiren hingegen brauchen unter natürlichen Bedingungen einen Wirt, um weiter zu bestehen; nichtsdestotrotz können sie auch außerhalb eines Organismus unter günstigen Bedingungen mehrere Wochen überleben und infektiös bleiben; eine Ausnahme scheinen Leptospiren der Genospezies *L. borgpetersenii* zu bilden, die aufgrund ihrer erheblichen Genomreduktion möglicherweise die Fähigkeit außerhalb des Wirtes zu überleben verloren haben (Bulach et al., 2006; Matsunaga et al., 2007; Trueba et al., 2004). Werden pathogene Leptospiren über einige Zeit in vitro

Literatur

subkultiviert, so mindert sich ihre Infektiosität erheblich, die sie nach einer in vivo Passage jedoch wieder erlangen. Leptospiren können sich in allen Wirbeltieren vermehren; die größte Bedeutung haben aber wohl die Kleinsäuger (Ratten, Mäuse, Sumpfbiber, Stinktiere) sowie für den Menschen als bedeutsame Kontakttiere die Nutz- und Haussäugetiere, insbesondere die Rinder, Schweine und Hunde sowie Ratten und Mäuse (Colagross-Schouten et al., 2002; Everard et al., 1988; Hartskeerl et al., 1996; Kik et al., 2006; Michel et al., 2001; Straube, 2007).

Ein Schmarotzer hat nicht viel davon, wenn er seinen Gastgeber erheblich schwächt, krank macht oder gar tötet. Daher haben die Leptospiren sich an das Leben einiger Wirte soweit adaptiert, dass sie diese kaum bzw. selten schädigen. Die Nieren, bevorzugt die proximalen Tubuli, können voll von Leptospiren sein, ohne dass pathohistologisch Veränderungen sichtbar sind oder Antikörper im Blut mittels einem mikroskopischem Agglutinationstest (MAT) nachweisbar. Reserviertiere, wie z.B. die Ratten, können ein Leben lang Träger von Leptospiren sein, ohne scheinbar in ihrem Verhalten, der Fortpflanzung und Lebenserwartung gestört zu sein (Bunnell et al., 2000; Caley et al., 2001; Cox et al., 2005; Day et al., 1998; Leonard et al., 1992; Mino, 1942; Sunbul et al., 2001; Thiermann, 1981).

Wenn Leptospiren den Wirt wechseln, gelangen sie vornehmlich mit dem Urin in die Umwelt. Welche Faktoren Einfluss haben, ob und wie viele Bakterien mit dem Urin ausgeschieden werden, sind noch Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. Sicher ist, dass die Ausscheidung diskontinuierlich erfolgt und zwar nicht nur bei Reserviertieren, sondern auch bei erkrankten Tieren und Menschen (Ellis et al., 1986a; Heath et al., 1994; Michna, 1970; Thiermann, 1982). Für ein Überleben in der Umwelt brauchen es die Bakterien wenigstens feucht, angenehm (moderat) warm und weitestgehend pH neutral bis leicht alkalisch (Johnson et al., 2004; Karaseva et al., 1973).

2.1.5 Genom

Bisher sind in der „National Center of Biotechnology Information“ (NCBI) Gendatenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) Vollsequenzen von vier Leptospirenstämmen zu finden (Bulach et al., 2006; Fang et al., 2005; He et al., 2007; Nascimento et al., 2004a, 2004b; Ren et al., 2003). Leptospiren haben zwei DNA doppelsträngige, zu einem Ring geschlossene Chromosomen (Boursaux-Eude et al., 1998). Das Chromosom I enthält beträchtlich mehr Nucleotide als das Chromosom II. Vergleicht man die Größe des Genoms der vier Leptospiren, so fallen deutliche Unterschiede auf (Tabelle 1). Im Durchschnitt ergeben sich $4,3 \times 10^6$ Basenpaare (bp). Würde man die DNA beider Chromosomen von 200 Leptospiren extrahieren, so erhielte man ungefähr eine Lösung von 1 pg/ μ l (Palaniappan et al., 2005). Bourhy et al. (2007) konnten erstmals im Genom von *Leptospira interrogans* Serovar Lai eine genomische Insel charakterisieren, welche sich aus dem Chromosom lösen und ein eigenständiges Plasmid bilden kann.

Tabelle 1. Übersicht vollsequenzierte Leptospirenstämme

	<i>L. interrogans</i> Serovar Lai Stamm 56601		<i>L. interrogans</i> Serovar Copenhagener Stamm Fiocruz L1-130		<i>L. borgpetersenii</i> Serovar Hardjo-bovis Stamm JB197		<i>L. borgpetersenii</i> Serovar Hardjo-bovis Stamm L550	
Chromosom	I	II	I	II	I	II	I	II
Refseq	NC_004342	NC_004343	NC_005823	NC_005824	NC_008510	NC_008511	NC_008508	NC_008509
Genbank	AE010300	AE010301	AE016823	AE016824	CP000350	CP000351	CP000348	CP000349
Länge nt	4.332.241	358.943	4.277.185	350.181	3.576.473	299.762	3.614.446	317.336
GC %	35	35	35	34	40	40	40	40
Kodierung %	77	79	74	74	72	74	73	73
Gene	4401	367	3481	272	2980	262	3003	270
Proteine	4360	367	3394	254	2645	235	2703	242
Struktur	41	keine	42	keine	40	keine	42	keine
RNAs								
Pseudogene	keine	keine	1	keine	274	27	237	27
Andere	keine	keine	keine	1	148	8	147	8

Informationen entnommen von <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, Stand Juli 2007

2.2 Leptospirose

2.2.1 Epidemiologie

Die Leptospirose ist die am weitesten verbreitete Zoonose der Welt. Nach einem „World Health Organization“ (WHO) Bericht (1999) gehören Länder wie Brasilien, Barbados und Neukaledonien mit mehr als 100 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner im Jahr unter anderem zu den Ländern mit der höchsten Inzidenz. Dort machen allein die Patienten mit Leptospirose 8% aller Einlieferungen auf die Intensivstation aus. Aber selbst in Australien, in dem Queensland mit einer Rate von 3 Personen pro 100.000 Menschen die höchste Inzidenz aufweist, konnte man nachweisen, dass die Hälfte aller Menschen, die nachweislich an Leptospirose erkranken, stationär behandelt werden müssen und dieser Aufenthalt durchschnittlich drei Tage dauert. Die Dunkelziffer an tatsächlich an Leptospirose erkrankter Menschen wird als sehr hoch angenommen (Ashford et al., 2000; Bharti et al., 2003; Bovet et al., 1999; Ciceroni et al., 1995; Everard et al., 1984; Ferguson, 1993; Levett, 2001; Martone et Kaufmann, 1979; Mérien et Perolat, 1996; Michel et al., 2002; Slack et al., 2006c; de Souza, 2006; Vinetz, 1997, 2001).

Bevor der Mensch dem Erreger einen Namen geben konnte, erkannte er doch bald einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer bestimmten Erkrankung und zum Beispiel dem Arbeiten auf dem Feld (Feldfieber) oder dem Baden in einem Fluss (Charentefieber). Man nimmt heute an, dass zumindest einige der seit Beginn von Aufzeichnungen erwähnten fieberhaften Erkrankungen mit Gelbsucht auf eine Leptospirose zurückzuführen sind. Immerhin gelten Spirochäten als eine der ältesten Bakterienklassen überhaupt. Ihre phylogenetische Abspaltung in der Bakterienevolution ereignete sich sehr früh (Paster et al., 1991). Die ersten

Literatur

klinischen Fallberichte von Leptospirosen, nach Bekanntwerden des Bakteriums durch Inada und seine Kollegen 1914/1915, hatten zur Folge, dass man den Leptospiren den Namen der verursachten Erkrankung zuteilte (Gsell, 1984; Kobayashi, 2001); so war man zunächst der Überzeugung, *L. Grippotyphosa* verursacht klassischer Weise eine Magendarmgrippe bei Menschen, *L. Canicola* ist für die Leptospirose beim Hund zuständig und *L. Icterohaemorrhagiae* löst die schwere ikterische Weil'sche Krankheit beim Menschen aus. Doch es stellte sich heraus, dass in Australien *L. Australis* dieselbe Erkrankung auslöste, wie *L. Andamana* auf den Andamaneninseln oder *L. Autumnalis* im Herbst (Tabelle 2). Inzwischen ist bekannt, dass die meisten pathogenen Leptospiren nahezu jede Form der Leptospirose bei jedem Wirbeltier auslösen können. Bestimmte Leptospirenstämme haben sich im Laufe der Evolution unabhängig voneinander an das Überleben in bestimmten Wirtsspezies adaptiert und sich ihre bevorzugte ökologische Nische gesucht. Daher rührt die unterschiedliche geographische Häufigkeitsverteilung der Leptospiren von der vorherrschenden Wirtspopulation in einer Gegend (Alexander et al., 1963; Bharti et al., 2003; Everard et al., 1976, 1980; Juszat, 1941; Levett et al., 1998; Matthias et Levett, 2002; Mino, 1942; Rimpau, 1942; Santa Rosa et al., 1975; Terpstra, 2006). Ein Beispiel: In Nord- und Südamerika verursacht *L. Pomona* jedes Jahr verheerende wirtschaftliche Verluste bei den dortigen Pferdezüchtern. In Osteuropa respektive Deutschland dominieren dagegen die Infektionen mit *L. Grippotyphosa* und in Großbritannien sowie Nordirland solche mit *L. Bratislava* (Anon, 2007; Brem et al., 1999, Donahue et Williams, 2000; Ellis et al., 1983; Hajikolaie et al., 2005; Halliwell et al., 1985, Hartskeerl et al., 2004). Eine Langzeitstudie in der Slowakei untersuchte den Einfluss der Dezimierung (mittels Rodentiziden) von Feldmäusen, die bis dato als das wichtigste Reservoir für *L. kirschneri* Serovar *Grippotyphosa* galten, auf die Epizootie der Leptospirose in der Gegend. Von der Reduzierung der Feldmäuse profitierten die Rötelmaus und die Gelbhalsmaus; die Leptospiren wechselten kurzerhand den Wirt und blieben von der ganzen Aktion relativ unbeeindruckt (Bakoss et al., 2007).

Tabelle 2. Eine Auswahl an Namen bzw. Synonymen im Zusammenhang mit einer Leptospireninfektion

Leptospirose

Stuttgarter Hundeseuche, Canicola Fieber, Hundetyphus

Mondblindheit, periodische Augenentzündung, Equine rezidivierende Uveitis (ERU), Panophthalmia equi, Iridocyclochorioiditis recidiva (ICCH)

Morbus Weil, Weil'sche Krankheit, Mathieu Krankheit, biliöses Typhoid

Schweinehüter-, Erbsenpflückerkrankheit

Molkereigrippe

Ansteckende Gelbsucht der Rinder, Hardjo Fieber, Russische Rindergelbsucht

Schlamm-, Sumpf-, Wasser-, Charente-, Ernte-, Feld-, Zuckerrohrschneider-, Reisfeldfieber

Australisches Siebentagefieber, Japanisches Herbstfieber, Bushy - creek Fieber, Fort - Bragg Fieber, Andamanenfieber

Langzeitstudien auf Barbados, der östlichsten Insel der Kleinen Antillen, konnten zeigen, dass die Prävalenz der Leptospirose für Männer am höchsten ist und dass im Allgemeinen die Wahrscheinlichkeit, im Blut Antikörper gegen Leptospiren nachzuweisen, mit dem Alter zunimmt. Da der Schweregrad der Erkrankung nicht nur von der Virulenz des Erregers, sondern auch von einer frühen intensiven Immunantwort reinfizierter Patienten abhängt, steigt demnach das Risiko für (in Barbados lebende) Männer mit dem Alter an Leptospirose zu sterben. Tatsächlich hat das Geschlecht des Wirtes keinen Einfluss auf eine Erkrankung, wohl aber die Exposition. Erkrankten Frauen und Männer gleichermaßen und sind vor allem junge Menschen unter 18 Jahren betroffen, so besteht ein allgemein hoher endemischer Infektionsdruck. Werden die meisten Erkrankungsfälle dagegen bei Männern im Alter zwischen 18 und 60 Jahren registriert, kann von einem signifikanten Berufsrisiko ausgegangen werden (Abdulkader et al., 2002; Colagross-Schouten et al., 2002; Everard et al., 1984, 1995; Jansen et al., 2007a; Katz et al., 2002).

Im Juli 2007 gingen erschreckende Bilder durch die Presse: „Zwei Milliarden“ Ratten und Mäuse strömten auf der Flucht vor dem Hochwasser, durch die schweren Unwetter in den vorangegangenen zwei Wochen, über Felder und durch die Städte der Provinz Hunan in China. Sie fraßen mehr als 1,6 Millionen Hektar Ackerfläche mit Getreide leer (Tageschau). Wenige Wochen später wird mit einem Ausbruch von Leptospirose unter den vielen von der Flut geplagten Menschen zu rechnen sein. Denn Regen und Überschwemmungen fördern die Verbreitung und den Kontakt zu mit dem Nagerurin ausgeschiedenen Leptospiren. Die Inzidenz der Erkrankung steigt zur „Regenzeit“ deutlich an (Berlioz-Arthaud et al., 2007; CDC, 2006; Gaynor et al., 2007; Kinde et al., 1996; Kupek et al., 2000; Levett, 2004; Maskey et al., 2006; Pappachan et al., 2004b; Rentko et al., 1992; Sanders et al., 1999; Sehgal et al., 2002; Trevejo et al., 1998; Ward, 2002).

Mit der Industrialisierung setzte eine Landflucht ein. Viele Städte wurden überbevölkert. In Ländern mit Slums, ärmsten Stadtvierteln, ohne ordentliche sanitäre Anlagen, ohne eine Kanalisierung, ist die Inzidenz der Leptospirose inzwischen weitaus größer als auf dem Land (Bharti et al., 2003; Vinetz, 2004). Großstädte in Indien (Bharadwaj et al., 2002; Jena et al., 2004), Lateinamerika, der Karibik (Brandling-Bennett et Penheiro, 1996) und Hawaii (Katz et al., 2003) stellen als endemische „hot spots“ ein ernst zu nehmendes Problem der öffentlichen Gesundheit dar. Die Bevölkerung in den Elendsvierteln kommt um einen Kontakt mit der kontaminierten Umwelt nicht herum (Flannery et al., 2001b; Ganoza et Vinetz, 2006; Ko et al., 1999). Während in ländlichen Gegenden die Leptospirose für mehr als 50% der Betroffenen tatsächlich noch eine Berufskrankheit darstellt, verhält es sich in den Stadtgebieten genau umgekehrt. Nicht bei der Arbeit, oder während der Freizeit, sondern „zu Hause“ werden die Menschen krank (Berlioz-Arthaud et al., 2007; Bovet et al., 1999).

Die Leptospirose ist eine moderne Krankheit, eine „re-emerging disease“. Über die Hälfte der jährlich in Deutschland registrierten Erkrankungen finden sich bei Menschen, die gerade im Ausland waren, sei es beruflich oder zwecks Erholung. Die hohe Mobilität und Flexibilität unserer Zeit bringen Länder wie Indien oder Brasilien vor unsere Haustür (van Crevel et al., 1994; Gelman et al., 2002; Grobusch et al., 2003; Jansen et al., 2005; Ricaldi et Vinetz, 2006; RKI, 2001; Steffens et al., 2006).

Literatur

Aber auch der Tiertourismus kennt kaum noch Grenzen; Hunde und andere Tiere aus aller Herren Länder gelangen nach Deutschland. Zwar werden in Deutschland die meisten Hunde noch geimpft, doch eine zunehmende Impfmüdigkeit und der Eintrag immer mehr ungeimpfter Tiere aus dem Ausland dünnt den prozentualen Anteil gegen Leptospiren weitestgehend geschützter Tier aus. Die Durchseuchungsrate der wildlebenden Reserviertiere wird jedoch nicht weniger, der mögliche direkte und indirekte Kontakt zwischen den Hunden und den Wildtieren auch nicht. Im Gegenteil, Waschbären erobern Köln, die Wildschweine ziehen durch Berlins Vorgärten und Ratten und Mäuse gibt es sowieso überall. Im Nordosten der USA und Kanada steigt die Inzidenz der caninen Leptospirose und korreliert mit der Seroprävalenz der Vorstadt -Waschbären, -Skunks und -Eichhörnchen. Der Kontakt zu Hunden stellt damit für den Menschen einen zunehmenden Risikofaktor dar (Barry et al., 2006; Bharadwaj, 2004; Douglin et al., 1997; Ghneim et al., 2007; Harkin et Gartrell, 1996; Harkin et al., 2003a, 2003b; Jansen et al., 2007b; Langston et Heuter, 2003; Moore et al., 2006; Prescott et al., 2002; Richardson et Gauthier, 2003; Townsend et al., 2006; Vinetz et al., 1996; Ward et al., 2004).

Der moderne, gesunde Mensch bewegt sich, treibt Sport. Immer wieder kommt es bei einem Triathlon oder ähnlichen Veranstaltungen während des Schwimmens in einem Fluss oder stehendem Gewässer zur Ansteckung mit Leptospiren. Nach einem Triathlon in Springfield, Illinois, erkrankten alleine 12% der Teilnehmer; ein signifikanter Zusammenhang bestand dabei nicht mit der Aufenthaltsdauer im Wasser, sondern mit dem Schlucken desselben (Haddock et al., 2002; Morgan et al., 2002; RKI, 2006; Sejvar et al., 2003). Aber auch jeder andere Wassersport, wie Kanufahren oder Wasserski, zählt heutzutage zu den Risikofaktoren. Die extremen Schwankungen des Wasserpegels aufgrund des merklichen Klimawandels in den letzten Jahren führen dazu, dass die Konzentration an Leptospiren in den Gewässern zunimmt (van den Berg et al., 2003; Haake et al., 2002; Levett, 2001; Michot et al., 2007; Narita et al., 2005; Shaw, 1992; Sperhake et Schulz, 2006).

Grundsätzlich kann jedes Wirbeltier, jeder Mensch, in jedem Alter asymptomatisch oder klinisch manifest Träger von Leptospiren sein. Natürlich gibt es für den Menschen immer noch die klassische Einteilung in Risikogruppen (Tabelle 3); doch eigentlich lässt sich diese Liste beliebig fortsetzen: Bananenpflücker, Barfußläufer, ... Denn jeder Mensch wird im Laufe seines Lebens mit Erde, Oberflächengewässer oder irgendwelchen Tieren in Kontakt kommen und damit die Möglichkeit erlangen, sich mit Leptospiren anstecken zu können (Farr, 1995; Jansen et al., 2006; Jauréguiberry et al., 2005; Levett, 2001; Morgan et al., 2002; Padre et al., 1988; Smythe et al., 1997; Swapna et al., 2006; Wenz et al., 2001). Doch das Vorkommen und die Häufigkeitsverteilung der Leptospirose bietet mehr: Es erzählt eine Geschichte über das Land, seine Wirtschaft, seine Traditionen, das Gesundheitssystem, den Entwicklungszustand, die Vegetation, den Klimawandel und damit verbundene Naturkatastrophen; erzählt uns Geschichten über den Umgang des Menschen mit seiner Umwelt, der Natur und den Tieren (Barwick et al., 1998; Berlioz-Arthaud et al., 2007; Bharadwaj, 2004; Bharti et al., 2003; Bovet et al., 1999; Cachay et Vinetz, 2005; Ganoza et al., 2006; Haake, 2006; John, 2005; Patel et al.,

2006; Rathinam et Namperumalsamy, 2007; RKI, 2005; LaRocque et al., 2005; Sehgal, 2006).

Tabelle 3. Menschen mit einer Prädisposition, an einer Leptospirose zu erkranken

Risikogruppen
Bauern/ Landwirte, Erntehelfer
Bewohner von Slums
Feldforscher
Fischer/ Angler
Gärtner
Jäger/ Förster
Melker
Opfer von Überschwemmungen
Schlachter, Metzger, Fleischer, Koch
Soldaten
Tierärzte, - züchter, - pfleger, - halter
Wald -, Berg -, Feld -, Silo -, Kanalarbeiter
Wassersportler (Schwimmen, Kanufahren, u.v.m.)

2.2.2 Krankheitsbild

Typischerweise sind die Symptome einer Leptospirose vielgestaltig und unspezifisch. Im englischsprachigen Raum wird sie daher auch als „great imposter“ bezeichnet (Bharadwaj, 2004). Die Liste an Differentialdiagnosen ist lang und ganz vorne weg stehen z.B. die Borrelien und Influenzaviren. Warum manche Menschen und Tiere genau an diesen oder jenen Symptomen erkranken und manche gar nicht, ist bis heute ein Rätsel und Grundlage zahlreicher Spekulationen (Bharti et al., 2003; Cachay et Vinetz, 2005; Jansen et al., 2007a; Thai et al., 2006). Nach Berichten aus Brasilien und Indien, sowie anderen Ländern mit vor allem endemischer Verbreitung und zeitweise epidemischen Ausbrüchen, wandelte sich in den letzten 20 Jahren das klinische Bild der Leptospirose beträchtlich (Daher et al., 1999; Esen et al., 2004; Heron et al., 1997; Monsuez et al., 1997; O’Neil et al., 1991; Segura et al., 2005; Sehgal et al., 1995; Seijo et al., 2002, Singh et al., 1999; Trevejo et al., 1998; Vinetz, 2004; Yersin et al., 2000; Zaki et Shieh, 1996). Dabei werden die unterschiedlichsten Leptospirenserovare nachgewiesen. Die Häufigkeit an Arthralgien, Dehydratation, Dyspnoe, Lungenblutungen und Pneumonien nimmt zu. Erste Untersuchungen lassen vermuten, dass dies mit der Immunantwort des Wirtes zusammenhängt. Patienten mit schwersten Leptospiroseformen, mit Involvierung der Lunge, zeigten signifikant höhere IgG und IgA Titer bereits zu Beginn der Untersuchung, als andere an Leptospirose erkrankte Patienten mit weitaus milderer Symptomatik. Es wird angenommen, dass Reinfektionen für den ungünstigen Verlauf verantwortlich sind (Abdulkader et al., 2002; Bharti et al., 2003). Eine weitere Erkenntnis der letzten

Literatur

Jahre ist, dass Leptospireninfektionen nicht selten eine Co-Infektion darstellen. Insbesondere zusammen mit Viruserkrankungen, wie dem Dengue Fieber Virus, Hantavirus, Subtyp Dobrava Virus, Subtyp Puumala Virus, Hepatitis E und B Virus, Humanen Immundefizienz Virus, Herpes simplex Virus aber auch mit Malaria, Melioidose, *Streptococcus zooepidemicus* und dem Tsutsugamushi Fieber konnte eine Leptospirose diagnostiziert werden. Welcher Erreger zuerst infiziert, ist meistens nicht festzustellen; das Problem ist die Vergesellschaftung der Symptome und Komplikationen (Bal, 2005a; Bek et al., 1996; Chen et al., 2007; Cvetko et al., 2006; Flannery et al., 2001b; Harkin et al., 2003a; Kaur et John, 2002; Kaushik et al., 1999; Kudesia et al., 1988; Lee et Liu, 2007; Léon et al., 2006, Levett et al., 2000; Lu et Tseng, 2005; Markotic et al., 2002; Murray et al., 2004; Parker et al., 2007; LaRocque et al., 2005; Suttinont et al., 2006; Suzuki et al., 2003; Watt et al., 2003; Wongsrichanalai et al., 2003).

Tabelle 4 gibt einen groben Überblick über bisher beschriebene Phänomene im Zusammenhang mit einer Leptospirose; auf daraus resultierende, veränderte Laborparameter, sowie pathohistologische Ergebnisse wird nicht weiter eingegangen. Auch wird absichtlich keine Unterscheidung von Mensch und Tier vorgenommen. Scheinbare Schwerpunkte bei Mensch und Tier entstehen weniger aufgrund einer unterschiedlichen Pathogenese, als vielmehr aufgrund der unterschiedlichen Lebens-, Ausdrucks- und Behandlungsweise (Bal, 2005a; Bharti et al., 2003; Farr, 1995; Katz et al., 2001; Levett, 2001; Panicker et al., 2001; Pappas et al., 2003; Plank et Dean, 2000; Straube, 2007; Vinetz, 2001; Yang, 2007; Yang et al., 2006).

Tabelle 4. Bei Mensch und Tier beschriebene Phänomene im Zusammenhang mit einer Leptospireninfektion

von A bis V

Abort, Agalaktie, Agonie, Anämie, Anorexie, Aortenstenose, Apathie, Arteritis, Arthralgie, Arthritis, Ataxie, Bauchschmerzen, Blutungsneigung, Brudzinski-Zeichen, Cerebellitis, Cholezystitis, Dehydratation, Delirium, Diarrhoe, Dyspnoe, Enteritis, Enzephalitis, Enzephalomyelitis, Epididymitis, Erbrechen, Erschöpfung, Erythema nodosum, Exantheme, Fieber, Fruchtbarkeitstörung, Frühgeburten, Geburt lebensschwacher Jungtiere/Kinder, Gerinnungsstörung, Gewichtsverlust, Grippe, Guillain-Barré Syndrom, Hämoptysis, Halluzinationen, Hämorrhagien, Hepathopathie, Hepatitis, Hepatomegalie, Herzrhythmusstörungen, Husten, Hyperästhesie, Hypotension, Ikterus, Imbalancen des Elektrolythaushaltes, intrakranielle Blutung, kardiovaskulärer Kollaps, Kawasaki Syndrom, Koma, konjunktivale Suffusion, Konjunktivitis, Kopfschmerzen, Krämpfe, Kreislaufschwäche, Leistungsrückgang, Lungenblutung, Lustlosigkeit, Lymphadenopathie, Manien, Mastitis, Meningitis, Meningoenzephalitis, Murphy-Zeichen, Myalgie, Myelitis, Myokarditis, Nackensteifigkeit, interstitielle Nephritis bis Nierenversagen (akut/chronisch), Nervenlähmung, Neuralgie, Neuritis, Ödem (Gliedmaßen, Unterbauch), Pankreatitis, Perikarditis, Peritonitis, petechiale Blutungen, Photophobie, Pneumonie, Psychose, Rhabdomyolyse, Schüttelfrost, Schwindel, Schwitzen, Selbstmordversuche, Septikämie, Somnolenz, Splenomegalie, Thrombozytopenie, thrombotisch thrombozytopenische Purpura, Tod, Totgeburt, Übelkeit, Urtikaria, Uveitis bis Erblindung, Vaskulitis, Verstopfung

In der Regel wird die Leptospirose nicht oder zu spät diagnostiziert, da es keine pathognomonischen Krankheitsanzeichen gibt und eine Labordiagnose meist etwas länger dauert oder zunächst nur unbefriedigende Ergebnisse liefert (Cumberland et al., 1999; Salkade et al., 2005; Terpstra et al., 1980). Die Einleitung einer adäquaten Therapie alleine auf Verdacht senkt nachweislich die Mortalitätsrate (Watt et al., 1988; Bal, 2005b). Ungünstige prognostische Marker einer schweren Leptospireninfektion sind eine Hypotension, Oligourie, Hyperkaliämie, Lungenrasseln, Dyspnoe, Herzrhythmusstörungen, Hämoptysis, Thrombozytopenie und/oder eine metabolische Azidose (Daher et al., 1999; Dupont et al., 1997; Esen et al., 2004; Marotto et al., 1999; Panaphut et al., 2002; Pappachan et al., 2004a; Tantitanawat et Tanjatham, 2003).

2.2.3 Pathogenese

Gelangen Leptospiren auf die Haut oder Schleimhäute, dringen sie aktiv in den Organismus ein, ohne jedoch an der Eintrittspforte Spuren zu hinterlassen. Prädisponiert sind natürlich Verletzungen der Haut und seien sie noch so klein, doch das ist nicht einmal nötig. Eine einzige Leptospire ist ausreichend, um bei einem empfänglichen Wirt eine fatale Infektion auszulösen. Es folgt eine Phase der Bakteriämie; bereits einen Tag nach Infektion sind die Leptospiren im Blut nachweisbar. Über das Blut gelangen sie in sämtliche Organe. Diaplazentar überschwemmen sie den Fötus und führen zum Fruchttod. Bei Reserviertieren wird eine intrauterine Übertragung toleriert (Bielanski et al., 1998; Caley et Ramsey, 2001; Dadhwal et al., 2007; Donahue et al., 1991, 1992, 1995; Ellis, 1994; Kirkbride et Johnson, 1989; Palaniappan et al., 2005; Szeredi et Haake, 2006; Thiermann, 1982). Die Inkubationszeit beträgt zwischen 2 Tagen und 30 Tagen (Farr, 1995). Dabei gilt es zu berücksichtigen, dass die Leptospirose in der Regel biphasisch verläuft und die ersten Anzeichen gerne übersehen werden (Bharti et al., 2003). Bis zu 10 Tagen nach Einsetzen der ersten Symptome sind die Leptospiren in nahezu allen Organsystemen des Körpers nachweisbar. Dann ziehen sie sich zurück, vornehmlich in die Nieren, den Geschlechtstrakt, die Augen und über den Liquor in das Gehirn (Ellis et al., 1985, 1986b; Harkin et al., 2003a; Levett, 2001; Mancel et al., 1999; Schönberg et al., 2005).

Sofern die Leptospiren sich ausschließlich in den Geschlechtstrakt oder die Nieren zurückgezogen haben, kann die Erkrankung bis zu diesem Zeitpunkt völlig unbemerkt vorübergehen. Die Bakterien vermehren sich eine Zeit lang und werden dabei über die natürlichen Körperöffnungen ausgeschieden (Harkin et al., 2003b; Heinemann et al., 1999; Sleight et Williams, 1961; Sleight et al., 1964). Zu Spitzenzeiten können über 10^8 Leptospiren mit 1 ml Urin in die Umwelt gelangen (Ellis et al., 1986a; Heath et Johnson, 1994; Thiermann, 1982). Über die Muttermilch können Leptospiren auf den Säugling übertragen werden (Bolin et Koellner, 1988; Kumar et al., 2001; Songer et Thiermann, 1988). Dabei scheint die Zusammensetzung der Milch, insbesondere der Fettgehalt eine Rolle zu spielen. Eine sehr lipidreiche Milch führt zur Lyse der Leptospiren. Bei Seelöwen z.B. vermutet man daher, dass eine Übertragung mit der Milch auf den Welpen nicht

Literatur

funktionieren würde (Acevedo-Whitehouse et al., 2003; Stalheim, 1965). In den meisten Fällen werden die Bakterien früher oder später wieder aus dem Körper eliminiert (Bal et al., 1994; Bharti et al., 2003; Dierauf et al., 1985). Asymptomatische Leptospirenausscheider spielen in der Tierzucht und -industrie eine bedeutende Rolle (Alt et Bolin, 1996). Das Problem ist, sie mittels moderner Diagnostik ausfindig zu machen. Eine einmalige PCR-Untersuchung, z.B. vom Urin, die zufällig negativ ist, weil ausgerechnet an dem Tag keine Leptospiren ausgeschieden wurden, ist wenig hilfreich (OIE, 2004). Genauso wenig zuverlässig erweist sich in dem Fall aber auch der Antikörpernachweis. Man konnte feststellen, dass solche Tiere zum Teil gar keine detektierbaren Antikörper im Blut aufweisen oder aber der Titer so niedrig ist und suggeriert, dass eine Infektion bereits lange Zeit zurück liegt. Nur selten sind mit MAT oder einem „Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay“ (ELISA) bei symptomlosen Trägertieren aussagekräftige Antikörpertiter nachweisbar. Für Schweine, Rinder und Schafe eignen sich am besten Screeninguntersuchungen, wobei Nierenproben (und/oder Urin-, Blut-, Leberproben) auf dem Schlachthof für die PCR entnommen werden (Cheema et al., 2007; Ellis et al., 1986a; Harkin et al., 2003b; Myers, 1976; Silva et al., 2007; Talpada et al., 2003).

Neben einer symptomlosen Infektion gibt es alle anderen Krankheitsverläufe: perakut, akut, subakut, chronisch und chronisch rezidivierend. Die perakuten bis subakuten Verläufe dürften es wohl sein, die am häufigsten diagnostiziert werden, sofern man die Leptospirose als Differentialdiagnose überhaupt in Betracht zieht (Ashford et al., 2000; Bovet et al., 1999; Heath et al., 1965; Vinetz et al., 1996). Schwere, lebensbedrohliche Erscheinungen der Leptospirose mit Thrombozytopenie, Hepatopathie, Nierenversagen und Lungenblutungen gehen mit der Ausbildung einer humoralen Immunantwort einher. Je mehr agglutinierende Antikörper vom Organismus gebildet werden, desto schwerwiegender die Symptome (Abdulkader et al., 2002; Davenport et al., 1989). Am ungünstigsten ist es für den Patienten, wenn er erst kürzlich eine Leptospireninfektion durchgemacht hat und sich erneut infiziert. Trucollo et al. (2001) unternahmen erstmals den Versuch, die Menge an Leptospiren in einer Blutprobe von Menschen mit einer akuten Leptospirose zu quantifizieren. Dabei stellten sie fest, dass trotz eines hohen Titers agglutinierender Antikörper eine starke Bakteriämie mit bis zu 10^6 Leptospiren pro ml Blut möglich ist. Eine protektive Immunantwort beim Menschen wird demnach nicht alleine durch die Bildung von Antikörpern gegen Leptospirenlipopolysaccharide erreicht. Als prognostisch ungünstig sahen sie eine Dichte von $\geq 10^4$ Leptospiren pro ml Blut an.

Während der Phase der Bakteriämie sind Entzündungen der kleinen Gefäße charakteristisch. Schäden am Endothel führen zum Austritt von Flüssigkeit und Zellen. Bei schweren Verlaufsformen treten regelrechte Blutungen auf (Salkade et al., 2005). Die Leptospiren lagern sich an die Wirtszellen an und führen in den betroffenen Geweben zu schweren Zellschäden, welche einerseits auf die Schädigung durch den Mikroorganismus selbst, andererseits durch die Interaktion mit dem Wirtsorganismus zustande kommen (de Brito et al., 1979; Lomar et al., 2000; Visith et Kearkiat, 2005). Ein 36 kDa Fibronektin bindendes Protein fördert die Adhäsion an das Gewebe (Mérien et al., 2000). Andere bakterielle Komponenten können eine zytotoxische Aktivität verursachen (Cinco et al., 1980b). Wird die

Bakterienzelle zerstört und die Peptidoglykanschicht freigelegt, so induziert sie die Produktion von TNF- α durch periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC, „peripheral blood mononuclear cells“) (Cinco et al., 1996). Je höher der Spiegel an TNF- α desto schwerwiegender die Erkrankung (Estavoyer et al., 1991; Tajiki et Salomao, 1996). Eine wesentliche Rolle in der Pathogenese spielt ein Glykolipoprotein (GLP) Komplex. GLP wirkt direkt zytotoxisch, perforiert die Zellmembran, führt zum Austritt von Zellinhaltsstoffen und schließlich zum Tod der Zelle (Vinh et al., 1986). Dosisabhängig konnte in Nierenepithelzellen von Kaninchen die Hemmung der Na⁺,K⁺-ATPase nachgewiesen werden (Younes-Ibrahim et al., 1995, 1997a, 1997b). Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zu Herzrhythmusstörungen (Bal, 2005a). Nach einer experimentellen Infektion von Meerschweinchen mit pathogenen Leptospiren fand sich GLP in den geschädigten Geweben an den Endothelzellen und epithelialen Membranen wieder (Alves et al., 1991). GLP führt zu einem signifikanten Anstieg an TNF- α und Interleukin 10 (IL-10) und induziert die Expression von CD69 („Cluster of Differentiation“) auf T-Lymphozyten und Monozyten sowie von HLA-DR (Humanes Leukozyten Antigen D „Related“) auf Monozyten (Diament et al., 2002).

2.2.4 Immunantwort

Das dominierende Antigen der Leptospiren ist das LPS; die immundominanten Epitope stellen einen Komplex aus Oligosacchariden mit phosphorylierten Kohlenhydraten und Aminozuckern dar. In einem immunkompetentem Wirt stimuliert LPS zunächst die Bildung von spezifischen Immunglobulinen der Klasse M (IgM) (Jost et al., 1989; Midwinter et al., 1994; Vinh et al., 1994). Die Antikörper machen die Leptospiren schmackhaft (Opsonisierung); daraufhin nehmen Phagozyten die Bakterien in den retikuloendothelialen Organen, wie Leber, Lunge, Milz und den Lymphknoten auf und sorgen für eine rasche Beseitigung der zirkulierenden Leptospiren aus dem Blutstrom. Doch die Bakterien sind in der Lage an bestimmten, immunprivilegierten Orten des Körpers zu persistieren, nachdem sie aus allen anderen Organen durch Antikörper und phagozytierende Zellen entfernt wurden.

Die Ausbildung und der Charakter einer Immunantwort gegen Leptospiren hängt von der Wirtsspezies, dem Alter, Geschlecht, der individuellen genetischen Grundlage, dem Hormonstatus, dem Ernährungs-, dem Gesundheitszustand, einer Medikamenteneinnahme und natürlich von dem infizierendem Leptospirenstamm ab. Beim Menschen sind die ersten IgM bereits am dritten Tag nach Auftreten der Symptome im Serum detektierbar. Kurz darauf, ab dem 5. Tag bis 9 Monate nach der Infektion, können zusätzlich IgA nachgewiesen werden. Handelt es sich um eine Erstinfektion, sind IgG etwa ab der zweiten Erkrankungswoche im Serum nachweisbar. Werden schon früher spezifische IgG mit einer hohen Avidität zusammen mit IgM detektiert, so gilt dies als Hinweis für eine Reinfektion. Solche Patienten leiden häufiger unter schwerwiegenden Folgeerscheinungen der Leptospirose als Erstinfizierte. Es wird vermutet, dass die IgG Subklasse den entscheidenden Einfluss darauf hat, ob die Immunantwort eher protektiv (IgG3) oder zerstörend (IgG1) wirkt. Nicht jeder Patient bildet IgG, manches Mal sind die IgG aber auch die ersten detektierbaren Antikörper. Spezifische IgM und IgG können im

Literatur

Blut lange persistieren und zum Teil auch noch einige Zeit, Monate bis Jahre nach überstandener Infektion nachgewiesen werden (Abdulkader et al., 2002; Adler et al., 1980; Bharti et al., 2003; Brandão et al., 1998; Cumberland et al., 2001; Lupidi et al., 1991; Silva et al., 1995; da Silva et al., 1997; Terpstra et al., 1985; Vinetz, 2004).

Die Immunantwort gegenüber Leptospiren ist zunächst von der B-Zellreaktivität dominiert. Es gibt Spezies, bei denen spezifische Antikörper gegen das LPS des Leptospirenserovares der Infektion eine ausreichende protektive Immunantwort darstellen. Diese Individuen sind vor einer Reinfektion mit dem gleichen Serovar geschützt. Eine erneute Erkrankung weist auf eine Infektion mit einem anderen Serovar hin. Meerschweinchen und Hamster zum Beispiel sind für dieses Modell hervorragend geeignet (Adler et Faine, 1977; Adler et Bragger 1979; Jost et al., 1986; Peña-Moctezuma et al., 1999, 2001; Schoone et al., 1989). Rinder hingegen können noch so hohe Antikörpertiter gegen Leptospiren spezifisches LPS aufweisen, sie erkranken trotzdem (Bolin et al., 1989a, 1989b, 1991). Eine protektive Immunantwort bei Rindern besteht in einer Kombination aus humoraler Immunität und einer durch T-Helferzellen vom Typ 1, Th1-Zell medierten Immunantwort. Eine Immunisierung der Tiere mit einer Vollvakzine getöteter Leptospiren des Serovar Hardjo, aktiviert in hohem Masse PBMC vom Typ $\alpha\beta$ CD4⁺ T-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen zur Produktion von Interferon γ (IFN- γ) (Baldwin et al., 2002; Blumerman et al., 2007a, 2007b; Brown et al., 2003; Naiman et al., 2001, 2002). Auch beim Menschen scheint die zelluläre Immunantwort bei einer Leptospireninfektion eine wichtige Rolle zu spielen (Barry et al., 2006; Bharti et al., 2003; Flannery et al., 2001b; Klimpel et al., 2003). De Fost et al. (2007) fanden im Plasma von Menschen mit einer akuten Leptospirose einen erhöhten Spiegel an Granzymen, Interferon induzierendes Protein 10 (IP-10) und „Monokine induced by“ IFN- γ (Mig). Inzwischen existiert bereits das erste Hamstermodell zur Induktion einer Th1 Immunantwort durch virulente Leptospiren (Vernel-Pauillac et Mérien, 2006). Augen von Pferden, die unter einer rezidivierenden Uveitis leiden, einer klinischen Manifestation einer chronisch, organbezogenen Leptospirose, sind mit CD4⁺ T-Zellen infiltriert, welche eine erhöhte Genexpression für IL-2 und IFN- γ gegenüber IL-4 aufweisen (Gilger et al., 1999).

Verschiedene Proteine von Leptospiren induzieren eine Bildung von IgM und/oder IgG (Bharadwaj, 2004). Im Serum Leptospirose erkrankter Menschen konnten Antikörper gegen sieben Proteine (p76, p62, p48, p45, p41, p37 und p32) nachgewiesen werden (Guerreiro et al., 2001). Das häufigste Lipoprotein der äußeren Membran pathogener Leptospiren, LipL32 (p32, Hap1 = „Hemolysis associated protein“ 1), scheint das stärkste, immundominante Protein zu sein, welches bei einer natürlichen Infektion eine humorale Immunantwort auslöst. Gleichzeitig wird eine Kreuzprotektion zu heterologen Serovaren gebildet (Branger et al., 2001; Haake et al., 2000, 2004). Die Immunisierung von Gerbils mit LipL32 alleine, zeigte im Vergleich zu LPS (100%) nur eine Schutzwirkung von 87%. Bei den Proteinen kommt es vielmehr auf die Kombination an, um eine optimale Immunantwort zu erzielen. So induziert OmpL1, ein Protein der äußeren Membran (OMPs = „Outer Membrane Proteins“), keine nachweisbare Immunantwort, verstärkt aber die Antikörperproduktion gegen LipL41 (p41). In einem Hamstermodell konnte auf diese Weise eine Schutzwirkung von 71% erreicht werden (Amutha et al., 2006;

Haake et al., 1999; Shang et al., 1995, 1996; Sonrier et al., 2000). Inzwischen wurden weitere äußere Membranproteine identifiziert, kloniert und charakterisiert etwa LipL21, LipL36, LipL45, LipL48 und das „immunoglobulin-like“ Protein LigA; insbesondere unterscheidet sich das Expressionsmuster der OMPs und anderer Proteine und Lipoproteine bei Kulturleptospiren und Leptospiren, welche eine Infektion induzieren (Barnett et al., 1999; Cheema et al., 2007; Cullen et al., 2002, 2003, 2004, 2005; Haake et al., 1991, 1993, 1998; Haake et Matsunaga, 2002, 2005; Matsunaga et al., 2002, 2003; Nally et al., 2001a, 2001b, 2007; Natarajaseenivasan et al., 2004; Neves et al., 2007; Palaniappan et al., 2002, 2004; Zuerner et al., 2000). Welche Leptospirenproteine an der Ausbildung einer protektiven und Serovar übergreifenden Immunantwort beteiligt sind, ist Grundlage intensivster Forschung.

2.2.5 Virulenzfaktoren

Das Verstehen um die pathogenen Wirkmechanismen der Leptospiren gleicht einem Puzzlespiel. Das Resultat ist weitestgehend bekannt, alleine der Weg dorthin liegt noch im Dunkeln (Haake, 2000). Die beiden Axialfilamente machen die Bakterien mobil und ermöglichen ihnen, die Haut bzw. Schleimhaut zu penetrieren und sich aktiv durch den Körper zu bewegen (Greenberg et Canale-Parola, 1977; Trueba et al., 1992). Virulente Leptospiren lagern sich in vitro Tubulusepithelzellen der Mausniere an (Ballard et al., 1986). Spezifische Antikörper verstärken die Adhäsion an kultivierte Fibroblasten (Ito et Yanagawa, 1987; Vinh et al., 1984). Ein Adhäsion konnte jedoch in beiden Fällen nicht ausgemacht werden. In einem naiven Wirt entgehen virulente Leptospiren den bakteriziden Bemühungen des Komplementsystems und der neutrophilen Granulozyten (Wang et al., 1984a, 1984b). In Anwesenheit von spezifischen Antikörpern werden die Bakterien durch beide Mechanismen jedoch rasch vernichtet (Farrelly et al., 1987). Bisher fehlt ein zweifelfreier Beweis für sekretorische Toxine von Leptospiren (Arean et al., 1964). Jedoch konnten de Brito et al. (1992) bei Meerschweinchen nachweisen, dass die Anwesenheit der Bakterien in den Nieren mit multiplen Endothelschäden assoziiert ist. Virulente Leptospiren können in Vero Zellen (Nierenzelllinie grüner Meerkatzen) eindringen und in Makrophagen eine Apoptose oder Nekrose induzieren. Eine einzige Subkultivierung in vitro reicht aus, um diese Eigenschaft zu verlieren (Li et al., 2007; Mérien et al., 1997). Leptospiren durchdringen epitheliale und endotheliale Barrieren, um hämatogen verbreitet zu werden und sich schließlich an immunprivilegierte Orte des Körpers zurückzuziehen. Sie sind keine intrazellulären Erreger (Ballard et al., 1986; Marangoni et al., 2000; Miller et al., 1970; Miller et al., 1966; Thomas et Higbie, 1990; Tsuchimoto et al., 1984). Offenbar ohne Störung zytoskeletaler Strukturen gelingt es den Bakterien, virulenten besser als avirulenten, mittels Transzytose eine Wand aus polarisierten „Madin Darby Canine Kidney“ (MDCK) Zellen zu durchdringen (Barocchi et al., 2002). Die Fähigkeit, ATPasen von Wirtszellen zu hemmen, wird einer Fraktion zytotoxischer Glykolipoproteinen zugesprochen (Younes-Ibrahim et al., 1995). Virulente Leptospiren zeigen eine Chemotaxis zu Hämoglobin (Yuri et al., 1993). Ein 36 kDa Fibronectin bindendes Protein wurde ausschließlich bei virulenten Spezies identifiziert; seine Aufgabe wird

Literatur

mit der initialen Adhäsion und Invasion der Haut und Schleimhaut in Verbindung gebracht (Bharti et al., 2003; Mérien et al., 2000). Barbosa et al. (2006) identifizierten als Adhäsion ein 24 kDa Lipoprotein (Lsa24), mit der Fähigkeit an Laminin zu binden. Inzwischen wurden weitere Gene identifiziert, die Homologien zu Sequenzen aufweisen, deren Proteine eine bekannte Funktion der Anlagerung und Invasion besitzen (Palaniappan et al., 2002; Ren et al., 2003). Bisher konnten acht verschiedene Sphingomyelinasen (SphA, ..., SphH) bei pathogenen Leptospiren nachgewiesen werden. Die Anzahl aber auch die Lokalisation (zellassoziiert und/oder extrazellulär) variiert dabei zwischen den einzelnen Stämmen. Ihnen wird vor allem eine hämolytische Aktivität auf Erythrozyten und eine zytotoxische Aktivität auf das Endothel zugesprochen, dennoch bleibt ihre Rolle in der Pathogenese und Immunantwort noch weitestgehend ungeklärt. In Hamster lösten SphA und SphB keine protektive Immunantwort aus (Bernheimer et Bey, 1986; Lee et al., 2002; Segers et al., 1990, 1992; Trowbridge et al., 1981). Seren von Stuten, die abortiert hatten, wiesen Antikörper gegen ein Sphingomyelinase ähnliches Protein Lk73,5 auf (Artiushin et al., 2004); in vitro exprimierten Leptospiren dieses Protein jedoch nicht. Lipopolysaccharide bilden die Hauptkomponente der äußeren Membran von Leptospiren. Der MAT nutzt den Nachweis agglutinierender Antikörper in einer Patientenprobe gegen die LPS. Ihre antigenetische Variabilität bildete die Grundlage für die Einteilung der Leptospiren in Serovare und Serogruppen. Der rfb Genlokus des O-Antigenes ist an seinem 3' Ende hoch konserviert, wohingegen das 5' Ende eine klare genetische Differenz zwischen den Serovaren aufzeigt. Die Expression des O-Antigenes kann reguliert werden. Erste Infektionsversuche bei Meerschweinchen konnten zeigen, dass im Gegensatz zu Kulturleptospiren, bei einer Infektion das O-Antigen herunter reguliert wird (Bulach et al., 2000a, 2000b; Nally et al., 2005b; Nascimento et al., 2004b; Peña-Moctezuma et al., 1999, 2001; Ren et al., 2003). Im Vergleich zu den LPS anderer gramnegativer Bakterien ist deren Wirkung zehnmal weniger toxisch (Shimizu et al., 1987a, 1987b; Vinh et al., 1986). Die Aktivierung der Makrophagen geschieht nicht über den „Toll-Like“ Rezeptor 4 (TLR4) sondern, wie z.B. bei grampositiven Bakterien über den TLR2. Die Wirkung als B-Zell-Mitogen ist ungemindert (Isogai et al., 1990; Schröppel et He, 2006; Werts et al., 2001; Yang, 2007). So ganz Pauschalisieren mit einer ausschließlichen Wirkung auf den TLR2 der Wirtszellen lässt sich das wohl nicht; möglicherweise spielt es eine Rolle ob in Abhängigkeit vom Wirtsorganismus die Zellen auch partiell in der Lage sind Leptospiren-LPS über den TLR4 zu erkennen (Nahori et al., 2005; Viriyakosol et al., 2006). Immunoblots und immunhistochemische Untersuchungen am Hamstermodell konnten zeigen, dass verschiedene Lipoproteine pathogener Leptospiren während einer Infektion verstärkt exprimiert werden. Inzwischen sind einige Proteine, wie die hoch immunkompetenten LipL32 und LipL41 oder LigA, Qlp42 (P31_{LipL45}) und Loa22 bekannt, auf die das zutrifft; andere Lipoproteine dagegen, wie das LipL36, werden in ihrer Expression in vivo herunter reguliert (Barnett et al., 1999; Haake, 2000; Haake et Matsunaga, 2002, 2005; Haake et al., 1991, 1998, 2000; Nally et al., 2001a, 2001b, 2005a; 2007; Palaniappan et al., 2002). Dosisabhängig stimuliert in vitro rekombinantes LipL32 Mausnierenzellen zur Expression von „Monocyte Chemoattractant Protein 1“ (MCP-1) und

Stickstoffmonoxid Synthase mRNAs und aktiviert die Transkriptionsfaktoren „Nuclear Factor κ B“ (NF- κ B) und „Activating Protein 1“ (AP-1); anti-TLR2 Antikörper supprimieren im Gegensatz zu anti-TLR4 Antikörpern die Expression der proinflammatorischen Zytokine (Yang, 2007; Yang et al., 2000, 2002, 2006). Schließlich wirkt LipL32 als Hämolyse auf die Erythrozyten (Branger et al., 2005; Hauk et al., 2005).

2.2.6 Therapie

Eine Erkrankung mit Leptospiren wird häufig als selbst limitierend bezeichnet. Diese Aussage trifft mit Sicherheit auf die zahlreichen asymptomatischen, subklinischen und sich als eine „Erkältung“ oder Ähnliches tarnenden Verläufe einer Leptospireninfektion zu, bei denen eine Diagnose alleine auf dem Antikörpernachweis beruhte. Gelingt jedoch der direkte Erregernachweis oder liegt eine akute bis chronische, klinisch manifeste Leptospirose vor, so sollte immer, frühzeitig und konsequent therapiert werden. Wird der richtige Zeitpunkt verpasst, ist die Mortalität einer Leptospirose, unabhängig ob bei Mensch oder Tier, nicht zu unterschätzen (Bal, 2005b; Bharadwaj, 2004; Bharti et al., 2003; Dupont et al., 1997; Kobayashi, 2005; Kuo et al., 2003; Lomar et al., 2000; Panaphut et al., 2002; Steffens et al., 2006; Takafuji et al., 1984; Turhan et Cavuslu, 2006; Vinetz, 2003; Vinetz et al., 1996; Watt, 1997; WHO, 1999).

Generell sind Leptospiren in vitro empfindlich gegenüber β -Lactamantibiotika (z.B. Penicillin, Ampicillin, Amoxicillin, Cephalosporine ab der 3. Generation z.B. Ceftriaxon), Tetracycline (z.B. Oxytetracyclin, Doxycyclin), Makrolide (z.B. Tylosin, Azithromycin), Lincosamiden (z.B. Clindamycin), Fenicole (z.B. Florfenicol), Chinolone (z.B. Ciprofloxacin, Ofloxacin) und Aminoglykoside (z.B. Dihydrostreptomycin, Streptomycin) (Ahmad et al., 2005; Baburaj et al., 2006; Hospenthal et Murray, 2003; Laber et Schutze, 1977; Oie et al., 1983; Prescott, 1991; Schönberg, 1981; Stalheim, 1966; Takashima et al., 1993; Theodoridis et al., 2007). Zwischen und innerhalb der einzelnen Leptospirengenospezies können aber deutliche Unterschiede in der Empfindlichkeit bestehen (Faine et Kaipainen, 1955; Yoshimori et al., 1965). In vivo entscheidet die erkrankte Spezies (Hamster, Pferd, Mensch, Elefant, etc.), der Zustand des Patienten und das Stadium der Erkrankung (akut, chronisch, systemisch, organbezogen) sowie der infizierende Leptospirenstamm über die Wahl des richtigen Medikamentes (Alexander et Rule, 1986; McClain et al., 1984; Dadhawal et al., 2007; Griffith et al., 2006; Münnich et Lakatos, 1976; Pappas et Cascio, 2006; Shalit et al., 1989; Vinetz, 2003). Untersuchungen an mit *L. interrogans* Serovar Pomona persistent infizierten Schweinen zeigten, dass z.B. Ceftiofur oder Ampicillin nicht in der Lage waren die Leptospiren aus der Niere zu eliminieren, wohingegen akut infizierte Hamster, mit dem gleichen Serovar, erfolgreich mit Ampicillin therapiert werden konnten, Enrofloxacin aber keine Wirkung zeigte (Alt et Bolin, 1996). Die Behandlungsdauer betrug in jedem Fall drei bis fünf Tage. Die Wirkung der Medikamente war sehr dosisabhängig; die Empfehlungen auf der Packungsbeilage reichten oft nicht aus. Das beste Ergebnis, sowohl bei Hamster als auch Schwein, wurde mit einer

Literatur

Kombination von Dihydrostreptomycin/Penicillin G erreicht. Truccolo und seine Kollegen (2002) beschreiben die Anwendung eines quantitativen Mikrotiterplatten „Assays“ bei der Untersuchung der Wirkungsweise von Ofloxacin, Ampicillin und Doxycyclin auf die „Clearance“ von *L. interrogans* Serovar Icterohaemorrhagiae Stamm Verdun aus dem Blut sowie Leber, Lunge, Nieren, Milz und Herz von experimentell infizierten Syrischen Goldhamstern. Doxycyclin (10 mg/kg) sorgte bereits nach zwei Tagen dafür, dass keine Leptospiren mehr detektiert werden konnten. Nur für die Leber waren es drei Tage. Unter der Behandlung mit Ampicillin (100 mg/kg) waren selbst nach sechs Tagen noch mindestens 100 Leptospiren pro g Herz- bzw. Nierengewebe nachweisbar und Ofloxacin (30 mg/kg) war nicht in der Lage die Bakterien aus dem Blut und den Nieren zu entfernen. Fazit aus solchen und anderen ähnlichen Untersuchungen: Es ist nicht ganz einfach das richtige Medikament auszuwählen, insbesondere wenn es sich um eine chronische Infektion handelt (Alexander et Rule, 1986; Alt et al., 2001; Bal et al., 1994; Emmanouilides et al., 1994; Gerritsen et al., 1994; Guidugli et al., 2000; Katz et al., 2001; Kingscote, 1986; Mérien et al., 1993; Panaphut et al., 2003; Watt et al., 1988). Da sich die Diagnose einer Leptospirose oftmals als genauso schwierig darstellt, dient in der Regel alleine der klinische Gesundheitszustand des Patienten als Therapiekontrolle. Dahinter verbirgt sich die Gefahr, dass eine Behandlung zu früh abgebrochen wird. Fünf Tage werden grundsätzlich nicht als ausreichend empfunden; als Empfehlung gilt mindestens eine 10-tägige Antibiotika Gabe. Als Folge auf eine Antibiotika Therapie kann sich eine Jarish-Herxheimer Reaktion einstellen; in keinem Fall darf eine derartige Komplikation von einer antibiotischen Behandlung abhalten (Arzouni et al., 2002; Baitchman et al., 2006; Chappel et al., 1998; Faucher et al., 2004; Hong et Foster, 2006; Langston et Heuter, 2003; Sambasiva et al., 2003; Yersin et al., 1998).

2.2.7 Prophylaxe

Personalhygiene, das Tragen von Schutz- bzw. Arbeitskleidung sind wichtige Maßnahmen, die der Mensch für sich selber treffen kann, um grundsätzlich den Kontakt zu potentiellen Krankheitserregern zu vermindern. Im Bezug auf die Leptospirose gilt ferner: Schädnerbekämpfung, sichere und trockene Lagerung von Lebens- und Futtermitteln, Weidehygiene, Trockenlegung von Weiden und Feldflächen, Hochwasserprophylaxe, Vermeidung zu Kontakt mit potentiell kontaminiertem Wasser, Tränkehygiene, Stallhygiene, Mechanisierung der Arbeitsvorgänge und im Hinblick auf eine mögliche Übertragung der Leptospiren mit Samenflüssigkeit respektive Genitalschleim die Zuchthygiene bei Tieren (Barwick et al., 1998; Caley et Ramsey, 2001; John, 2005). Die Schädnerbekämpfung muss umfassend sein, es reicht nicht aus nur eine Spezies zu dezimieren (Bakoss et al., 2007; Holt et al., 2006; Rao, 2006). Gerade für Urlaubsreisende gilt ein umsichtiger Kontakt mit streunenden Hunden (Berlioz-Arthaud et al., 2007). Der prophylaktische Einsatz von Antibiotika sollte sich auf ausgewählte Risikogruppen wie Soldaten beschränken (Bharadwaj et al., 2002; Bharti et al., 2003; Rathinam et al., 1997; Sanders et al., 1999; Sehgal et al., 2000; Takafuji et al., 1984). Es gibt durchaus weltweit erhältliche Impfstoffe für Mensch und Tier (Barr et al., 2005; Green et al.,

2007; Hill et Wyeth, 1991; Laurichesse et al., 2007; Martins Soto et al., 2007; Núñez, et al., 2005; Rohrbach et al., 2005). Während jedoch beim Tier die Anwendung mehr oder weniger regelmäßig erfolgt (z.B. in Deutschland für den Hund), so sind beim Menschen die Impfungen aufgrund des Allergiepentials nur als Prophylaxe für Risikogruppen wie Kanalarbeiter vorgesehen. Das Problem bei den im Moment erhältlichen Impfstoffen (auf LPS-Basis) sind die kurzen Impfindervalle (schlechte „Compliance“) und der geringe protektive Effekt gegen eine Leptospirose im Allgemeinen. Ein MAT erlaubt a) keine Unterscheidung zwischen einem Geimpften, Ungeimpften oder natürlich Infizierten und b) keine Aussage über eine protektive Immunantwort bzw. den Impfstatus (Bolin et Alt, 2001; Branger et al., 2005; Hodges et Day, 1987; Mackintosh et Marshall, 1980; Millar et al., 1987b; Sanford et Morris, 1990). Die Impfung ist Serovar-abhängig und schützt nur vor einer klinischen Manifestation mit diesen Serovaren. Trotzdem können auch Geimpfte für eine kurze Zeit eine Leptospirurie durchmachen. Vor einer Infektion und auch schweren Erkrankung mit anderen Serovaren ist man nicht gefeit (Andre-Fontaine et al., 2003; Feigin et al., 1973; Geisen et al., 2007; Mackintosh et al., 1980). Genauso wie in der Diagnostik wird die Hoffnung in neue, sich in der Entwicklung befindliche, Impfstoffe mit rekombinanten Proteinen gesetzt, welche spezifisch für pathogene Leptospiren, jedoch Serovar übergreifend, auch das Potential besitzen sollen, eine asymptomatische Leptospirurie zu vermeiden (Branger et al. 2001; Gamberini et al., 2005; Haake et al., 1999; Koizumi et Watanabe, 2005; Maneewatch et al., 2007; Palaniappan et al., 2006, 2007; Seixas et al., 2007; Sonrier et al., 2000; Srivastava, 2006; Wiwanitkit, 2007; Yan et al., 2003; Yang et al., 2006).

2.3 Leptospiren bedingte Augenveränderungen

2.3.1 Vorkommen

Die Leptospirose ist eine weltweit verbreitete Erkrankung bei Mensch und Tier; dementsprechend kann auch angenommen werden, dass durch Leptospiren bedingte Augenveränderungen weltweit vorkommen. Tatsächlich existieren mit englischem Sprachgebrauch Berichte aus Deutschland, Frankreich, Tschechien, Rumänien, Ungarn, Finnland, Russland, Schweiz, Italien, Holland, England, Brasilien, Australien, Israel, Japan, China, Nordamerika, Kanada, Indien und Neukaledonien (PubMed: leptospir* and uveitis). Lange Zeit wurden jedoch Augenveränderungen als Zeichen einer Leptospirose weitestgehend ignoriert (Bharti et al., 2003; Chu et al., 1998; Levett, 2001). Welch ein Irrtum sich dahinter verbirgt, zeigt ein „Review“ von Rathinam et Namperumalsamy (2007): Gleich hinter der idiopathischen Uveitis mit 44,6% machen die infektiösen Uveitiden mit 30,5% den Großteil der Augenentzündungen bei Menschen in Indien aus. Und an aller erster Stelle stehen die Leptospiren bedingten Uveitiden mit 9,7% noch vor den Mykobakterien (5,6%) und den Herpesviren (4,9%). Signifikant war dabei die Altersgruppe von 17 bis 59 Jahren am häufigsten vertreten. Bisher konnten die Genospezies *L. interrogans* und *L. kirschneri*, seltener *L. borgpetersenii*, aus Augen erkrankter Tiere und Menschen isoliert bzw. deren DNA in Kammerwasser oder

Literatur

Glaskörper erkrankter Augen nachgewiesen werden (Tabelle 5) (Brem et al., 1998, 1999; Bulach et al., 2006; Hartskeerl et al., 2004; Lucchesi et al., 2002; Niedermaier et al., 2006; Wollanke, 2002; Wollanke et al., 2001, 2004a).

Tabelle 5. Serovare, die mit einer Leptospiren bedingten Augenveränderung in Verbindung gebracht werden

Leptospira (L.) Genospezies Serovar

L. borgpetersenii Serovar Javanica
L. interrogans Serovar Australis
L. interrogans Serovar Autumnalis
L. interrogans Serovar Bataviae
L. interrogans Serovar Bratislava
L. interrogans Serovar Canicola
L. interrogans Serovar Copenhageni
L. interrogans Serovar Icterohaemorrhagiae
L. interrogans Serovar Pomona
L. interrogans Serovar Saxkoebing
L. kirschneri Serovar Grippotyphosa

Die meisten Berichte über eine Leptospiren bedingte Augenveränderung beschränken sich auf den Menschen und die Pferde. Doch auch Hund und Katze, Rind und Schwein, sowie Silberfuchs, Meerschweinchen, Hamster und Kaninchen, sind von einer intraokularen Leptospireninfektion, und sei es auch nur experimentell, nicht ausgenommen (Alexander et al., 1952; Dziezyc, 2000; Gleiser, 1957; Green et Arean, 1964; Greenlee et al., 2004; Gutman et al., 1983; Hanno et Cleveland, 1949; Hartwig, 1953; Hoag et Bell, 1954; Townsend et al., 2006; Witmer, 1954b). In der Humanmedizin werden zunehmend Uveitiden nach epidemischen Leptospirose-Ausbrüchen registriert (Pappachan et al., 2007). Möglicherweise liegt dies jedoch an der erhöhten Aufmerksamkeit für die Leptospirose im Allgemeinen, an der inzwischen routinemäßig durchgeführten ophthalmoskopischen Untersuchung bei Verdacht auf eine Leptospireninfektion, dem Hinweis bei Patienten mit Leptospirose auf Augenveränderungen in naher Zukunft zu achten, sowie einer verbesserten Diagnostik nach Einführung der PCR. Retrospektiv wird hinter zahlreichen einst idiopathischen Uveitiden eine Leptospirose vermutet (Rathinam, 2005; Rathinam et Namperumalsamy, 2007; Rathinam et al., 1997). Chu et al. (1998) untersuchten 46 Patienten mit einer Uveitis, die wissentlich vor einiger Zeit eine Leptospireninfektion durchgemacht hatten. Als Kontrolle dienten Patienten mit einer Uveitis unbekannter Genese oder mit einer Katarakt. Diesen Patienten war ein Kontakt mit Leptospiren nicht bewusst. Die Untersuchung fand allerdings in einem Leptospirenendemiegebiet statt, mit landesweit hoher Inzidenz. So war es auch nicht verwunderlich, dass immerhin bei 8% der Kontrollpatienten im Kammerwasserpunktat DNA pathogener Leptospiren mittels PCR nachgewiesen wurde. Im Nachhinein konnte eine Untersuchung des Kammerwassers auf Antikörper nicht mehr durchgeführt werden,

doch eine Überprüfung des Serums zeigte, dass viele der Kontrollpatienten eine Immunantwort gegen Leptospiren ausgebildet hatten.

Beim Pferd ist man inzwischen sicher, dass sich hinter einem Großteil der seit Jahrhunderten beschriebenen Ophthalmien, wie der Mondblindheit („moon blindness“, Morbus lunaticus), periodischen Augenentzündung („periodic ophthalmia“, fluxion périodique), Panophthalmia equi, nonulzerativer Keratouveitis, Iridocyclochorioiditis recidiva (ICCH), equiner rezidivierender Uveitis („equine recurrent uveitis“, ERU), die Erscheinungsform einer intraokularen Leptospirose verbirgt (von den Driesch et Peters, 2003; Jones, 1942; Paglia et al., 2004; Sandmeyer et al., 2007; Sova, 1964b; Wada et al., 2003; Wollanke, 2002; Wollanke et al., 1998, 2000, 2001, 2004a).

2.3.2 Krankheitsbild

Typischerweise sind die Symptome einer Leptospirose vielgestaltig und unspezifisch. Das Gleiche gilt auch für eine organspezifische Leptospirose. Vorbericht und Klinik lassen meist nur eine Verdachtsdiagnose zu (Bal, 2005a). Während einer akuten, systemischen Leptospirose sind eine Konjunktivitis, Vaskulitis, ikterische Skleren und/oder konjunktivale Einblutungen klassische Symptome (Barkay et Garzozzi, 1984; Bharti et al., 2003; Farr, 1995; Hanno et Cleveland, 1949; Heath et al., 1965; Levett, 2001; Mathew et al., 2006; Wagenaar et al., 2000). Manch einer beschreibt gerade die konjunktivale Suffusion, mit einer Häufigkeitsverteilung von 20% bis 99%, als das einzig existierende, pathognomonische Krankheitszeichen einer Leptospirose. Eine schwere Augenentzündung in Form einer Panuveitis mit oder ohne Hypopyon ist in dieser Phase selten. Andererseits konnten Chandrasekaran et al. (1998) in 82% der Blutproben, bei Patienten mit einer Panuveitis, Leptospiren unter einem Dunkelfeldmikroskop sehen (Costa et al., 2000; Katz et al., 2001; Lin et al., 2006; Martins et al., 1998; Rathinam, 2005; Rathinam et Namperumalsamy, 1999; Townsend et al., 2006). In der Regel werden Leptospiren bedingte Augenveränderungen als eine Spätfolge bzw. eine chronische Manifestation einer Leptospireninfektion angesehen. Dabei ist „die Folge“ den Betroffenen meist gar nicht bewusst. Wie soll man auch eine Augenentzündung mit einem „Schnupfen“ oder noch harmloser, unspezifischer Klinik, welche vor einem halben Jahr oder länger plagte, in Verbindung bringen. Noch weniger erzählt uns ein Tier und wir Menschen übersehen die Zusammenhänge bei uns und den Tieren. Wie ernst die Erkrankung jedoch zu nehmen ist, belegen über 35% der Menschen, die in ihrer Sehfähigkeit dauerhaft eingeschränkt wurden bzw. erblindeten (Dziezyc, 2000; Hartwig, 1953; Kotorii, 1935; Mancel et al., 1999; Morter et al., 1969; Pietruschka et Hergt, 1974; Rathinam et al., 1997; Roberts, 1958; Shpilberg et al., 1990; Sturman et al., 1959; Williams et al., 1971).

Tabelle 6 gibt eine grobe Übersicht über bisher beschriebene Phänomene im Zusammenhang mit einer Leptospiren bedingten Ophthalmie bei Mensch und Tier. Generell können ein Auge, beide Augen gleichzeitig oder zeitlich versetzt betroffen sein. Dabei werden sämtliche Verlaufsformen beobachtet: Eine milde Uveitis, die nach ein bis zwei Wochen ausheilt und keinen nennenswerten Schaden hinterlassen

Literatur

hat bis hin zu einer hochgradigen Uveitis, die innerhalb von wenigen Wochen zur Erblindung führt; kaum merkliche schleichende Verlaufsformen, die langsam aber sicher mit einem Visusverlust einhergehen; rezidivierende Entzündungen in unterschiedlichen Intervallen, die zunehmend eine Zerstörung intraokularer Strukturen bewirken (Bal, 2005a; Barkay et Garzosi, 1984; Chu et al., 1998; Doret et Rohm, 1951; Dwyer et al., 1995; Faber et al., 2000; Fischer et al., 1955; Gsell et al., 1946; Gupta et al., 2007; Levin et al., 1994; Mancel et al., 1999; Pappachan et al., 2007; Rathinam, 2002; Sandmeyer et al., 2007; Wada et al., 2003; Wollanke, 2002).

Tabelle 6. Bei Mensch und Tier beschriebene Phänomene im Zusammenhang mit einer Leptospiren bedingten Augenveränderung

von B bis V

Blaubindheit, Blepharospasmus, Blutungen, Bulbusatrophie, Chorioretinitis, „Cotton-wool“ Herde, Doppeltsehen, Drohreflex (vermindert, negativ), Dyskorie, Epiphora, epiretinale Membranen, Episkleritis, Erblindung, Fibrin in der vorderen Augenkammer, Gesichtsfeldausfall, Glaskörpereinlagerung, Glaskörpermembranen, Glaskörpertrübung, Glaskörperverflüssigung, Glaukom, hintere Uveitis (posterior), Hornhautdefekt, Hornhautödem, Hornhauttrübung, Hornhautvaskularisation, Hyalitis, Hypopyon, Hypotonie, Ikterus, intermediäre Uveitis, Augeninnendruck erniedrigt, Iridozyklitis, Iridozyklochorioiditis, Irisatrophie, Irisödem, Irisresiduen, Iritis, Katarakt, Keratitis, Keratouveitis, konjunktivale Suffusion, Konjunktivitis, Kammerwassertrübung, Nervenlähmung, Lakrimation, Linsluxation/-subluxation, Linsenruptur, Miosis, Netzhautablösung, Netzhautfalten, Netzhautnekrose, Netzhautödem, Neuroretinitis, Optikusatrophie, Optikusneuritis, Panuveitis, Papillenödem, Papillitis, Photophobie, Phthisis bulbi, Präzipitate auf Hornhautendothel, Präzipitate auf Linsenrückfläche, Pupillenreflex (negativ, verzögert), Retinitis; retinale Periphlebitis, Rotblindheit, Rubeosis iridis, Schmerzen, Seclusio pupillae, Synechie (hintere/vordere), Vaskulitis, verminderte Sehschärfe, vordere Uveitis (anterior)

Beim Menschen stellt die häufigste Uveitisform im Allgemeinen eine Uveitis anterior (57,4%) dar, gefolgt von einer Panuveitis (22,4%), der Uveitis posterior (10,6%) und schließlich der intermediären Uveitis (9,5%). Das Verhältnis bei einer Leptospiren bedingten Uveitis ist jedoch signifikant umgedreht. Es dominiert bei weitem die Panuveitis, vor der Uveitis anterior, gefolgt von der intermediären Uveitis und das Schlusslicht bildet die Uveitis posterior. Immerhin 31% beidseitiger Uveitiden waren auf eine Leptospireninfektion zurückzuführen (Rathinam et Namperumalsamy, 2007). Beim Menschen wird die Leptospirose als eine der wenigen Erkrankungen registriert, bei denen eine Katarakt reversibel sein kann. Während einer Uveitis wurden sehr schnelle Eintrübungen der Linse beobachtet, die nach Abheilung der Entzündung aber wieder absorbierten (Rathinam et al., 2000).

2.3.3 Pathogenese

Eine Leptospirose stellt zunächst immer eine systemische Infektion dar. Dies beweisen zahlreiche experimentelle Untersuchungen, nachdem als Standardmethode die konjunktivale Instillation von Leptospiren dazu führt, dass bereits ein paar Stunden später die Leptospiren im Blut und kurz darauf in sämtlichen Organsystemen nachweisbar sind (Alexander et al., 1952; Alt et Bolin, 1996; Bielanski et al., 1998; Branger et al., 2005; Greenlee et al., 2004; Inzana et Dawe,

1979; Masri et al., 1997; Rowen, 1957; Thiermann et Handsaker, 1985; Williams et al., 1971). Nun sind die Leptospiren in der Lage sich langfristig in den proximalen Tubuli der Nieren, dem Geschlechtstrakt, dem Gehirn oder dem Auge anzusiedeln (Sambasiva et al., 2003). Noch ist nicht bekannt, welche Einflüsse aus den Wirt-Bakterium Interaktionen eine Rolle in der Organbesiedelung spielen. Sicher ist in jedem Fall, dass die Anwesenheit von Leptospiren im Organismus nicht den Nachweis agglutinierender Antikörper gegen Leptospiren-LPS im Serum mittels MAT oder ELISA voraussetzt (Brown et al., 2003; Chu et al., 1998; Mérien et al., 1995). Die klimatischen Bedingungen im Auge sind für Leptospiren an sich sehr günstig. Die etwas niedrigere Temperatur kommt ihnen dabei besonders entgegen. Leptospiren verändern in Abhängigkeit ihrer Umwelt (Osmolarität, pH-Wert, Temperatur, Viskosität, Konkurrenz- oder Infektionsdruck) ihr Expressionsmuster (Haake, 2000; Lo et al., 2006; Matsunaga et al., 2005, 2007; Nally et al., 2001a, 2001b; Petrino et Doetsch, 1978; Qin et al., 2006; Trueba et al., 2004). So beschreiben Verma et al. (2005) die Identifizierung neuer immunogener Lipoproteine der inneren Membran, LruA und LruB, welche während einer ERU von pathogenen Leptospiren exprimiert werden. Gleichfalls werden die immunkompetenten „immunoglobulin-like“ Proteine LigA und LigB, potente Adhäsine, exprimiert (Choy et al., 2007; Koizumi et Watanabe, 2004; Lin et Chang, 2007; Matsunaga et al., 2003, 2005, 2007, Palaniappan et al., 2002, 2004; Silva et al., 2007). Als Folge der bakteriellen Invasion in das Auge, der Toxizität der Komponenten der äußeren Membran, der Bildung von Chemokinen, Zytokinen (z.B. IL-6, IL-8, TNF- α) sowie der zellulären Infiltration mit neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen in differenter Menge und Zusammensetzung entsteht eine Augenentzündung (Brandes et al., 2007; Kalsow et Dwyer, 1998; Witmer, 1954b). Aktivierte CD4⁺ T-Zellen (IL-2, IFN- γ) weisen auf die Bedeutung einer Th1 vermittelten Immunantwort hin (Gilger et al., 1999). Die „Anterior Chamber-Associated Immune Deviation“ (ACAID) ist beeinträchtigt, die Blut-Augen-Schranke wird geschädigt. Die Leptospirenuveitis wird als eine nichtgranulomatöse Form der Augenentzündung beschrieben (Rathinam et Namperumalsamy, 2007; Williams et al., 1971). Neben intraokular gebildeten IgG, IgM und/oder IgA gegen Leptospiren konnten bei Pferden mit einer ERU gleichfalls Immunglobuline (Autoantikörper) gegen Proteine der Linse, Retina (z.B. S-Antigen = S-Ag; Interphotorezeptor Retinoid bindendes Protein = IRBP; zelluläres Retinaldehyd bindendes Protein = cRALBP) und Kornea detektiert werden (Abrahamian et al., 1997; Deeg et al., 2001, 2006). LruA Antiseren reagieren gegen Linsen- und Ziliarkörperextrakte, während LruB Antiseren stark gegen ein Retinaextrakt reagieren (Verma et al., 2005). Kreuzreaktionen von Antikörpern gegen Leptospirenlysaten mit der Hornhaut oder Linse wurden auch in anderen Untersuchungen beschrieben (Lucchesi et Parma, 1999; Lucchesi et al., 2002; Parma et al., 1985, 1987, 1992a, 1992b, 1997a). Eine Katarakt ist eine häufig vermerkte Folge einer Leptospirenuveitis. Nach Abheilung derselben traten beim Menschen aber auch schon spontane Kataraktabsorptionen auf (Rathinam et al., 2000). Möglicherweise werden Autoantikörper nicht nur bei einer Leptospiren bedingten Augenerkrankung gebildet, sondern spielen auch bei der Neuroleptospirose eine Rolle. Erstmals beschrieben Lepur et al. (2007) den Nachweis von Anti-Gangliosid Antikörpern (anti-

Literatur

GM1 und anti-GD1a) bei einem Patienten, der seit drei Wochen an einer akuten und sehr schweren Leptospireninfektion mit Meningomyeloencephalopolyneuritis und unter Nierenversagen litt. Weitere Autoantikörper, die bereits im Zusammenhang mit einer Leptospireninfektion detektiert wurden, sind Antineutrophile zytoplasmatische Antikörper (ANCA), Anticardiolipin (ACL) Antikörper sowie anti-beta2 Glycoprotein1 (anti-β2 GP1) Antikörper (Constantin et al., 1996; de Francesco Daher et al., 2002; Roda, 2003; Rugman et al., 1991; Santiago et al., 2001, 2004, 2006; Tattevin et al., 2003). Pathogene Leptospiren aktivieren das Komplementsystem. Dementsprechend findet sich auch eine relativ hohe Konzentration an C3 in Augen von Pferden mit einer Leptospiren bedingten Uveitis. Über den C3 Rezeptor werden die Bakterien von aktivierten Makrophagen oder neutrophilen Granulozyten internalisiert. Solange noch keine spezifischen Antikörper gegen Leptospiren im Auge vorhanden sind, ist dieser Weg allerdings recht ineffizient und reicht nicht aus, die Leptospiren zu vernichten. Das liegt daran, dass besonders die Komplement-resistenten Leptospiren die Komplement-Inhibitoren Faktor H bzw. die Faktor H ähnlichen Proteine binden können. Faktor H inhibiert die C3-Konvertase und inaktiviert C3b zu iC3b (Brandes et al., 2007; Cinco et Banfi, 1983; Cinco et al., 1981, 1982, 2002, 2006; Deeg et al., 2007a; Meri et al., 2005; Nally et al., 2004; Verma et al., 2006; Wada et al., 2003). Torten et al. (1967) infizierten Hunde mit *L. Canicola* oder *L. Grippotyphosa*. Nach 120 Tagen injizierten sie den Hunden homologes Leptospirenantigen in das eine Auge und heterologes Leptospirenantigen in das andere Auge. Das Auge mit dem homologen Antigen entwickelte eine Uveitis, während das andere Auge mit dem heterologen Antigen reizfrei blieb. Proteine der äußeren Membran pathogener Leptospiren erhöhen die Expression von mRNA der Chemokine MCP-1 und „Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted“ (RANTES) in proximalen Tubuluszellen der Mausniere (Yang et al., 2002). Dies führt zu einer verstärkten Rekrutierung von Leukozyten. Zwar wurde der Bezug zu den Leptospiren von Gilger et al. (2002) nicht hergestellt, doch konnten bei Pferden mit einer rezidivierenden Uveitis eine erhöhte Expression von RANTES mRNA im Ziliarkörperepithel nachgewiesen werden.

2.3.4 Labordiagnose

Primär gilt es für eine zuverlässige Diagnostik, in Abhängigkeit der Lokalisation einer Erkrankung, die richtigen Proben auszuwählen. Demnach bietet sich die Untersuchung der Augenflüssigkeiten, wie Kammerwasser, Glaskörper und Tränenflüssigkeit, bei einer Augenentzündung an. Doch ist es viel einfacher und meist risikoärmer eine Blutuntersuchung durchzuführen. Sie eignet sich auch sehr gut für Bestandsuntersuchungen bzw. Screeningverfahren ganzer Tierpopulationen, um einen Überblick von der Seroprävalenz der Leptospirose zu gewinnen. Zahlreiche Untersuchungen an Pferden mit charakteristischer Augenentzündung (Mondblindheit, periodische Augenentzündung, ERU, ICCH, Panophthalmia equi) konnten belegen, dass die Wahrscheinlichkeit Antikörper im Blut gegen Leptospiren bei kranken Pferden zu detektieren viel höher ist, als bei augengesunden Pferden. Da die Leptospirose im Allgemeinen jedoch eine Erkrankung ist, die zum größten Teil

asymptomatisch verläuft, war es nicht verwunderlich, wenn man Antikörper gegen Leptospiren auch bei völlig gesund erscheinenden Pferden oder Pferden, die unter einer anderen Erkrankung litten, nachweisen konnte (Alexander et al., 1990; Dwyer et al., 1995; Hartwigk, 1953; Kalisch, 1952; Matthews et al., 1987; Park et al., 1992; Rimpau, 1947; Sova, 1965; Wollanke, 2002; Wood et Davis, 1950; Yager et al., 1950). Letztlich ist die Bestimmung der Seroprävalenz nur ein populationsdynamischer diagnostischer Marker, der, unabhängig ob Mensch oder Tier, einen Hinweis über die Durchseuchungsrate mit Leptospiren gibt. Für die Diagnose einer Leptospiren bedingten Augenentzündung ist die alleinige Blutuntersuchung genauso wenig geeignet, wie bei einer chronischen Besiedelung anderer immunprivilegierter Organe des Körpers, wie der Niere, dem Geschlechtstrakt oder dem Gehirn. In diesen Fällen ist auch klar, dass der Urin, Liquor oder etwa die Samenflüssigkeit zu untersuchen wäre. Dennoch, wenn zum Beispiel die Seroprävalenz 60% beträgt, kann genauso gut mit einer Häufigkeit einer Leptospiren bedingten Augenentzündung von mindestens 60% gerechnet werden (Fischer et al., 1955; Priya et al., 2003; Rathinam, 2005; Rathinamsivakumar et al., 1996).

Handelt es sich also um eine organlokalisierte Erkrankung, sind auch organspezifische Proben zu untersuchen. Doch niemals wird eine Entnahme von Kammerwasser- oder Glaskörperflüssigkeit zur gleichen Routine werden, wie eine Blutentnahme (Thurau, 2003). Hinzu kommt, dass in Abhängigkeit der Wirtspezies die Probenmenge sehr limitiert ist. Beim Pferd zum Beispiel besteht immerhin die Möglichkeit der Entnahme von bis zu 1 ml Kammerwasser, wohingegen sich beim Menschen das Probenvolumen bei einer Punktion der vorderen Augenkammer auf 200 µl beschränkt; häufig sind dann nicht, wie empfohlen zwei Untersuchungsmethoden, ein direktes und indirektes Nachweisverfahren, für die Diagnose einer Leptospirose möglich (de Groot-Mijnes et al., 2006; Mancel et al., 1999; Wollanke, 2002). Ein negatives Testergebnis mit derzeit durchführbaren Methoden schließt jedoch niemals eine Leptospiren bedingte Augenentzündung aus. Die Sensitivität der Verfahren nimmt mit der Untersuchung von Glaskörper zu Kammerwasser bis hin zur Tränenflüssigkeit ab, sofern es sich um eine chronische Entzündung handelt. In einem akuten Stadium, kommt es auf den hauptsächlich betroffenen Augenabschnitt an. Becker et al. (2003) empfehlen bei Verdacht einer malignen oder infektiösen Genese, einem atypischen Krankheitsverlauf oder einer therapieresistenten Augenveränderung, eine diagnostische Vitrektomie in Erwägung zu ziehen. Der Vorteil einer Vitrektomie gegenüber einer Parazentese liegt in der größeren Probenmenge für Laboruntersuchungen und dem therapeutischen Effekt. Selbst wenn die Ursache nicht gänzlich beseitigt werden konnte, so wird dem Patienten doch Linderung verschafft.

Die Augenflüssigkeiten eignen sich hervorragend zur Bestimmung einer intraokularen Antikörperproduktion gegen Leptospiren mittels MAT oder ELISA. Es wird davon ausgegangen, dass im Auge eine etwaige Gleichverteilung der Antikörper vorliegt und somit kein wesentlicher Unterschied bestehen sollte, ob Kammerwasser oder Glaskörperproben untersucht werden (Gsell et al., 1946; Sandmeyer et al., 2007; Thurau, 2003; Voß, 1952; Witmer, 1954a). Bedauerlicherweise schließt ein

Literatur

negatives Testergebnis eine intraokulare Leptospireninfektion nicht aus (Brandes et al., 2007; Gesell, 2004). Besteht der Verdacht der Diffusion serologischer Antikörper ins Auge, zum Beispiel bei einer Einblutung, so können über die Bestimmung des Goldmann-Witmer Koeffizienten der serologische und intraokulare Antikörpertiter verglichen werden (Becker et al., 2003; Davidson et al., 1987; Faber et al., 2000; de Groot-Mijnes et al., 2006; Gsell et al., 1946; Halliwell et Hines, 1985; Halliwell et al., 1985; Schwink, 1992; Thureau, 2003; Wollanke, 2002; Wollanke et al., 2000, 2001, 2004a).

Bereits seit 1990 wird die PCR zur Diagnose okularer Erkrankungen verwendet und noch nicht einmal drei Jahre später erfolgreich zum Nachweis von Leptospiren-DNA im Kammerwasser von Menschen eingesetzt (Crouse et al., 1990; Mérien et al., 1993). Doch auch bei dieser hoch sensitiven Methode gilt es zu berücksichtigen, dass pro ml zumindest 10 bis 100 Leptospiren vorhanden sein sollten, um nicht ein falsch negatives Testergebnis zu riskieren (Becker et al., 2003). Thureau (2003) empfiehlt für die Verarbeitung von intraokularem Material in der PCR, die vom Patienten entnommene Probe nicht umzufüllen, sondern direkt in dem original Sammelgefäß, selbst wenn es eine Spritze ist, zu belassen. Erstens fördert Umfüllen den Verlust an Leptospiren und zweitens die Kontaminationsmöglichkeit. Als Dringlichkeit der Weiterverarbeitung wird noch derselbe Tag angegeben; dann kann die Probe auch ungekühlt in das Labor verbracht werden. Ist dies nicht möglich, wird der Transport mit Kühlung empfohlen, bzw. das unmittelbare Verbringen der Probe auf Trockeneis oder schockgefrieren in flüssigem Stickstoff. Die Art und Weise hängt unter anderem auch von der Methodik der DNA-Extraktion ab, die das Labor anwendet. Wenn denn die Wahl besteht, ist für die PCR, als auch die Kultur, Glaskörpermaterial dem Kammerwasser vorzuziehen (Bodaghi et LeHoang, 2002; Lohmann et al., 2000; Rothova et al., 2007). Im Gegensatz zur Kultur und mit Einschränkungen auch für den Antikörpernachweis, ist die Verwendung von Glaskörperspülflüssigkeit für die PCR kein Problem, sofern die Verarbeitung vor dem Überwuchern der Probe mit Fremdkeimen durchgeführt wird (van Gelder, 2001b). Die PCR ist der Kultur weitaus überlegen, da sie einerseits viel schneller ein Ergebnis liefert und andererseits die Leptospiren nicht nach ihrer Vitalität beurteilt werden müssen. Faber et al. (2000) konnten immerhin bei 70% (21) von an ERU leidenden Pferden Leptospiren-DNA im Kammerwasser nachweisen; die kulturelle Isolierung gelang hingegen nur bei sechs dieser Pferde; dabei fanden über 1,0 ml Kammerwasser für die PCR Verwendung, während 0,3 ml Kammerwasser in ein Transportmedium überführt wurden und dieses im Labor weiter auf Kulturmedien verimpft. Da für die PCR keine Kontrolle möglicher Hemmstoffe durchgeführt wurde, sind falsch negative Ergebnisse nicht auszuschließen. Mancel et al. (1999) erhielten positive PCR-Resultate aus Kammerwasserproben von Menschen, die seit fünf Tagen oder bereits sieben Jahren mit bis zu acht Schüben an einer Augenentzündung litten. Schließlich erlaubt die Untersuchung eines Kulturansatzes mittels PCR eine Aussage darüber, ob sich eine zeitaufwändige kulturelle Erregerisolierung überhaupt lohnt (Mérien et al., 1995; Wollanke et al., 2004a). Nicht zu vernachlässigen ist, dass Kammerwasser- und Glaskörperproben reich an PCR-Inhibitoren sind; bei Proben von Menschen wird ein hitzestabiler Hemmstoff

vermutet, da selbst eine Kochzeit von 15 Minuten keinen klärenden Effekt brachte. Weiterhin berichten Wiedbrauk et al. (1995), dass die *Taq* (*Thermus aquaticus*) DNA-Polymerase gegen den Hemmstoff äußerst empfindlich ist, während die *Tth* (*Thermus thermophilus*) und die *Tfl* (*Thermus flavus*) DNA-Polymerasen kaum in ihrer Aktivität beeinflusst werden. Hodge et al. (1996) untersuchten nur die Seren von Menschen, die nach ein bis zwei Monaten, nach einer Leptospireninfektion eine Panuveitis entwickelten und konnten trotz detektierbarer Antikörpertiter in den Proben Leptospiren-DNA mittels PCR bei immerhin 41% nachweisen. Über die Dunkelfeldmikroskopie konnten diese Befunde nicht nur bestätigt werden, sondern die Empfindlichkeit war mit 74% sogar höher als mit der PCR. Ob es sich dabei um falsch negative PCR-Ergebnisse aufgrund einer Hemmung handelte oder um falsch positive Ergebnisse der Dunkelfeldmikroskopie, ist nicht klar; ebenso wenig, ob die Leptospiren wieder aus dem Auge in das Blut zurückgeschwemmt wurden oder ob die Phase der Leptospirämie tatsächlich so lange anhielt. Von Toxoplasmen bedingten Uveitiden kennt man das Phänomen der „Reaktivierung“ und dem möglichen direkten Erregernachweis im Blut bei einer Augenentzündung (Bou et al., 1999). Mérien et al. (1995) konnten ebenfalls Leptospiren-DNA im Blut bei Patienten nachweisen, die bereits behandelt wurden und auch Antikörper im Serum detektierbar waren. Auch diese Autoren halten es für möglich, dass die Leptospiren ab und zu aus ihren Rückzugsgebieten, wie Niere, Auge, Gehirn oder Genitaltrakt ins Blut übertreten und dafür sorgen, dass Antikörpertiter zum Teil Jahre lang auf dem selben Niveau gehalten werden (Adler et Faine, 1978; Blackmore et al., 1984; Pietruschka et Hergt, 1974; Priya et al., 2003; Roberts, 1958; Sova, 1964a; Swart et al., 1982).

Leptospiren können unabhängig von der Dauer und dem Stadium der Erkrankung aus dem Auge mittels Kultur isoliert werden. Selbst ein anhand der MAT ermittelter sehr hoher intraokularer Antikörpertiter schließt eine erfolgreiche Isolierung nicht aus. Besonders gut gelingt der Versuch einer kulturellen Isolierung aus Augenflüssigkeiten post mortem, sowohl bei Verdacht einer akut-systemischen als auch chronisch-organbezogenen Leptospirose. Da das Wachstum der Leptospiren allerdings langsam ist und die Bakterien sensibel sind, eignet sich eine kulturelle Isolierung weniger zur Diagnose als vielmehr für epidemiologische und experimentelle Untersuchungen. Zudem besteht in der Veterinärmedizin die Möglichkeit, sofern auf dem Markt kein Impfstoff erhältlich ist, in Ausnahmefällen für einen Tierbestand aus einem Isolat eine Vakzine herstellen zu lassen (Abrahamian et al., 1997; Alexander et al., 1952; Brandes et al., 2007; Brem et al., 1998, 1999; Brown et al., 2003; Ellis et al., 1982; Faber et al., 2000; Fischer et al., 1955; Green et Arean, 1964; Greenlee et al., 2004; Hartskeerl et al., 2004; Hoag et Bell, 1954; Ryan et al., 1977; Uzal et al., 2002; Wollanke, 2002; Wollanke et al., 2001, 2004b).

2.3.5 Therapie

Die Therapie richtet sich in erster Linie an dem Stadium der Erkrankung sowie dem Zustand und der Spezies des Patienten aus. Grundsätzlich wird, solange die Ursache einer Uveitis nicht bekannt ist, eine symptomatische Therapie eingeleitet.

Literatur

Doch spätestens wenn die Entzündung nicht abklingt, sich als therapieresistent erweist oder die Uveitis immer wiederkehrt, die Schäden am Auge und der Psyche des Patienten zunehmen, sollte eine Alternative zu der rein symptomatischen Therapie in Erwägung gezogen werden (Gerard et al., 2006; Gerhards et Wollanke, 2001; Gilger et Allen, 2001; Gilger et Michau, 2004; Gilger et al., 2000, 2001, 2006; Matthews, 1999; Praditpornsilpa et al., 2006; Schwink, 1992; Spiess, 1997).

Angeblich würden die meisten Leptospiren bedingten Augenentzündungen beim Menschen wieder von selber ausheilen. In diesem Zusammenhang ist es jedoch nicht klar, ob die Patienten aufgrund der Diagnose einer Leptospirose eine systemische Antibiose erhalten haben (Barkay et Garzosi, 1984; Chu et al., 1998; David et Barkay, 1976; Martins et al., 1998). In einem Fall, bei einem 16-jährigen jungen Mann, der unter einer bilateralen Uveitis anterior, Glaskörpertrübung, aseptischen Meningitis und einer tubulointerstitiellen Nephritis litt, erfolgte eine 14-tägige intravenöse Therapie mit Penicillin G und anschließend einen Monat lang die Gabe von Dexamethason Augentropfen (van den Berg et al., 2003). In einem anderen Fall litt ein 25-jähriger Mann an einer beidseitigen Keratouveitis, sowie Fieber, Myalgie und Muskelschwäche; er wurde zweimal am Tag, eine Woche lang mit 1 g Ceftriaxone intravenös behandelt und erhielt zusätzlich zwei Wochen topisch 0,3% Ciprofloxacin sowie 0,1% Dexamethason (Gupta et al., 2007). Mancel et al. (1999) empfehlen zur Behandlung einer intraokularen Leptospireninfektion eine dreiwöchige Einnahme von einer Kombination aus Amoxicillin und Clavulansäure (1,5 g pro Tag) sowie Pefloxacin (800 mg pro Tag) und zur Linderung der Augenentzündung topisch Kortikosteroide. Das ist deshalb interessant, als die systemische Gabe von Chinolonen zur Behandlung einer Leptospirose umstritten ist (Bal, 2005b; Faucher et al., 2004). Das Problem, Leptospiren alleine durch eine systemische oder topische Gabe von Antibiotika aus dem Auge zu entfernen, dürfte ähnlich veranlagt sein, wie bei einer infektiösen Arthritis, zum Beispiel bei der Lyme Borreliose. Ein Jack Russel mit beidseitig hochgradiger akuter Uveitis erhielt Doxycyclin per os, Prednisolon per os sowie topisch Atropin und Prednisolon. Außer mit Atropin erfolgte die Behandlung über beinahe sechs Wochen (Townsend et al., 2006). Die Augenentzündung war abgeheilt. Der zu Beginn mittels MAT gemessene Antikörpertiter im Serum lag bei 1:12800 für das Serovar Canicola und 1:200 für Icterohaemorrhagiae; dabei handelte es sich um einen gegen Leptospiren nicht geimpften Hund, der außer der beidseitigen Augenentzündung wenig Anzeichen für eine systemische Infektion zeigte. Eine Nachuntersuchung nach neun Monaten ergab im Serum einen Titer von 1:800 für Canicola, 1:800 für Hardjo und 1:200 für das Serovar Icterohaemorrhagiae. Den Autoren zur Folge ein deutlicher Hinweis für eine erfolgreiche Therapie; allerdings gilt es zu berücksichtigen, dass die Therapie Einfluss auf die Immunantwort nehmen kann und daher eine Interpretation der Serumtiter als schwierig gestaltet (Rathinam, 2002).

Pappachan et al. (2007) konnten bei 174 Patienten, welche aufgrund einer akuten Leptospirose stationär aufgenommen und antibiotisch behandelt wurden, eine Folgestudie von 30 Monaten durchführen. Bei allen Patienten wurde die Leptospirose aufgrund eines positiven Serum Antikörpertiters (IgM/IgG ELISA, MAT) diagnostiziert. Die Patienten wurden sieben Tage mit Benzylpenicillin (1,5 Millionen Einheiten alle 6

Stunden intra venös) bzw. bei Patienten (6) mit einer Penicillin-Allergie mit Doxycyclin (100 mg zweimal täglich per os) behandelt. 18,4% entwickelten eine Uveitis, im Median etwa nach vier Wochen. Es bestand kein Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der akuten Leptospirose und der Ausbildung einer Uveitis. Immerhin 18,8% der an Uveitis erkrankten Patienten hatten Visuseinschränkungen. Patienten mit einer Uveitis anterior (65,6%) erhielten Fluoromethalon (0,1%) und Homatropin (2%) Augentropfen; die Ausheilungszeit betrug etwa zwei Wochen. Patienten mit einer Uveitis posterior wurden nicht therapiert, in diesem Fall dauerte die Ausheilung bis zu zwei Monate. Letztlich vermuten die Autoren, dass Patienten nach einer antibiotischen Behandlung einer akuten Leptospirose eher eine milde Uveitis entwickeln. Ob die Gabe von Benzylpenicillin oder Doxycyclin beim Menschen einen Einfluss auf die Besiedelung des Auges mit Leptospiren hat oder nicht ist unbekannt. Mit Sicherheit spielt die Behandlungsdauer und auch die Dosis eine wichtige Rolle (Hanno et Cleveland, 1949). Beim Pferd gibt es eine Untersuchung, ob nach fünftägiger oraler Gabe von Doxycyclin (10 mg/kg zweimal täglich) im Auge ein antibiotischer Wirkspiegel nachweisbar ist. Die Untersuchung fand an gesunden Pferden statt; es wurde von einer intakten Blut-Augen-Schranke ausgegangen und keine angemessene Doxycyclin Konzentration im Glaskörper oder Kammerwasser erreicht (Gilmour et al., 2005).

Eine diagnostische Vitrektomie wird spätestens dann therapeutisch, wenn Glaskörpertrübungen und membranöse Einlagerungen eine potentiell vorhandene Sicht behindern (Becker et al., 2003). Doch jede diagnostische Vitrektomie im Zeichen einer Leptospirose ist gleichzeitig auch eine Therapie, da die Bakterien aus dem Glaskörperaum gespült, die okuläre „Clearance“ verbessert, das Auge antibiotisch abgedeckt und damit das Immunsystem in der restlichen Beseitigung vorhandener Bakterien unterstützt wird (Frühauf et al., 1998; Werry et Gerhards, 1992; Wollanke, 2002).

2.4 Labordiagnostik

Eine schnelle und sichere Diagnose im Falle einer akuten Leptospireninfektion ist unbedingt notwendig; bedenke man nur die schweren Komplikationen wie Pankreatitis, Vaskulitis, Blutungen in die Lunge oder in das Gehirn u.a., welche eine intensive Therapie fordern. Hinzu kommt, dass diese Erkrankung häufig nicht als jene erkannt wird; sei es weil in einigen Ländern, wie z.B. Deutschland, die Inzidenz recht niedrig ist und somit die Ärzte vielleicht nicht gleich daran denken, oder sei es in Ländern mit einer hohen Inzidenz, wie z.B. Brasilien, andere Erkrankungen insbesondere das Dengue Fieber u.a. kaum in der Symptomatik von einer akuten Leptospirose unterscheidbar sind (Ko et al., 1999; Laras et al., 2002).

Für einen verantwortungsvollen Umgang mit der Diagnose, bei Verdacht auf eine Leptospireninfektion, sind immer mindestens zwei verschiedene Testverfahren anzuwenden. Die Entscheidung, welche Analysen angebracht sind, hängt von der verfügbaren Probe und dem Stadium der Erkrankung ab. Der direkte Erregernachweis für die Diagnostik mittels Tierversuch ist heutzutage obsolet.

Literatur

Dennoch sind Meerschweinchen, Hamster, Ratte und Co für die klinische Forschung von Bedeutung und Versuche mit ihnen können wichtige Erkenntnisse zum Verstehen der Erkrankung liefern (Palaniappan et al., 2007; Pereira et al., 2005).

2.4.1 Mikroskopischer Agglutinationstest (MAT)

Vom Prinzip her ist der MAT eine einfache und leicht verständliche Methode. Die WHO schrieb ihn zur Referenzmethode („Goldstandard“) aus, nachdem lange Zeit keine Alternative für eine schnelle und spezifische Diagnostik der Leptospirose zur Verfügung stand (Bajani et al., 2003; WHO, 2003).

Der MAT wird in der Regel nach den allgemeinen Empfehlungen der WHO durchgeführt (OIE, 2004; WHO, 2003). Danach werden als Antigen eine möglichst umfassende Palette von Leptospirenreferenzstämmen genutzt, welche die häufigsten Serovare einer Region vertreten. Als Probe dient meist Serum, genauso gut können aber auch alle anderen Körperflüssigkeiten, welche Immunglobuline gegen Leptospiren-LPS enthalten, Verwendung finden. Heutzutage wird der MAT meist in Mikrotiterplatten durchgeführt (Cole et al., 1973). Dazu werden die Proben in Zwischenschritten verdünnt und die Verdünnungen im gleichen Volumenverhältnis mit den einzelnen Leptospirenkulturen vermischt. Nach einer Inkubationszeit wird der MAT unter dem Dunkelfeldmikroskop bei einer 100fachen Vergrößerung ausgewertet. Wenn die in einer Probe enthaltenen spezifischen Antikörper $\geq 50\%$ der Leptospiren agglutinieren, so gilt dies als eine positive Reaktion. Der Antikörpertiter einer Probe richtet sich, in Abhängigkeit des Leptospirenstammes, nach der Verdünnung, bei der die Reaktion gerade noch positiv ist. Dabei können Reaktionen gegen ein oder mehrere Serovare abgelesen werden.

Die MAT Positiv-/Negativgrenze, der „Cut-off“, hängt von der jeweiligen Situation ab und kann beliebig gesetzt werden. Bezieht sich die Untersuchung auf den Verdacht einer klinisch manifesten Leptospirose, wird meist ein Wert von 1:100 gewählt (Gulland et al., 1996). Für populationsdynamische Untersuchungen von Reserviertieren auf die Prävalenz bestimmter Serovare wäre dies allerdings schon viel zu hoch, da selten Titer von mehr als 1:50 erreicht werden; darum wird der „Cut-off“ möglichst niedrig gehalten und häufig bereits eine MAT-Reaktion ab 1:25 als positiv bewertet (Acevedo-Whitehouse et al., 2003; Aguirre et al., 2007; Caley et Ramsey, 2001; Godinez et al., 1999; Hathaway et al., 1978; Masri et al., 1997). Zu jedem Zeitpunkt einer Leptospireninfektion und unter jeder klinischen Erscheinung, aber auch nach bereits überstandener Infektion, können folgende MAT-Ergebnisse entstehen: Keine Antikörper nachweisbar, niedriger ($< 1:100$) bis sehr hoher MAT-Titer gegen nur ein oder aber Reaktionen gegen mehrere Serovare (Adler et Faine, 1978; Bajani et al., 2003; Blackmore et al., 1984; Cumberland et al., 2001; Kalisch, 1952; Lupidi et al., 1991; Luzzi et al., 1987; Mérien et al., 1995). Eindeutig sind lediglich ein mindestens vierfacher Titeranstieg gepaarter Serumproben bzw. bei entsprechender Symptomatik ein Titer $> 1:800$ (Russell et al., 2003; Segura et al., 2005). Ansonsten schließt ein noch so niedriger MAT-Titer eine Leptospirose niemals aus (Brown et al., 2003; Ellis et al., 1986a; Harkin et al., 2003b; Kmety et al., 1956; Silva et al., 2007). Das gilt insbesondere auch für Liquor-, Glaskörper- oder

Kammerwasserproben, sofern sie zur Untersuchung auf eine Leptospiren bedingte Mening(o)-, Enzephalitis bzw. Uveitis herangezogen werden.

Häufig kommt es vor, dass die Antikörper in einer Patientenprobe gegen mehrere Leptospirenservare reagieren. In den seltensten Fällen handelt es sich tatsächlich um eine Mischinfektion, sondern vielmehr um Kreuzreaktionen. Ein Vorteil davon ist, dass der MAT auch positiv ist, selbst wenn nicht das richtige Serovar als Antigen für den Test ausgewählt wurde. Ein Nachteil ist allerdings, dass nicht immer der höchste Titer tatsächlich das Serovar der Infektion anzeigt. Vergleicht man das Ergebnis der kulturellen Isolierung mit dem zuvor in dem MAT ermittelten Serovar, so kann zum Teil bei über 50% mit einer falschen Vorhersage gerechnet werden. Überlegt man sich, dass die meisten Untersuchungsergebnisse seit über 85 Jahren auf dem MAT beruhen, wird klar, wie schwierig ein Vergleich mit heutzutage gewonnenen Daten aus der molekularbiologischen Typisierung ist (Ahmad et al., 2005; Arimitsu et al., 1987; Barry et al., 2006; Bharti et al., 2003; Hathaway et al., 1981; Kmety, 1958; Levett, 2001, 2003; Mulla et al., 2006). Je länger eine Erkrankung dauert und insbesondere in chronischen Fällen, reagieren die Antikörper häufig nur noch einfach. Als ein Hinweis auf eine Leptospirose am Übergang vom subakuten in das chronische Stadium verbunden mit klinischen Symptomen, wird bei gepaarten Serumproben ein fallender MAT-Titer mit zunehmender Konzentration der Immunantwort auf nur noch ein Serovar angesehen (Bal, 2005a; Bal et al., 2002, 2003).

Ein großer Nachteil des MAT ist die Notwendigkeit frische Kulturen mehrerer Stämme von Leptospiren vorrätig zu halten, sprich eine gewissenhafte und dauerhafte Subkultivierung zu betreiben. Obwohl die Virulenz potentiell pathogener Leptospiren bei Laborstämmen als gering eingestuft wird, ist der tägliche Umgang mit den Bakterien doch mit einem gewissen Risiko verbunden (Biosicherheitsstufe II). Abgesehen davon, dass die Kulturpflege einen erheblichen zeitlichen Aufwand bedeutet und sich daher nur noch wenige Labore auf den MAT spezialisiert haben (Levett et al., 2005). Zur Vermeidung einer Kreuzkontamination ist unbedingt darauf zu achten, dass die Leptospirenstämme rein bleiben und nicht Mischkulturen entstehen. Eine regelmäßige Kontrolle der Stämme ist notwendig. Ein weiterer Nachteil, der nahezu jedem diagnostischen Verfahren für die Leptospirose anhaftet, ist die schwierige Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Jedes Labor in den verschiedenen Gegenden der Erde macht den Test mit verschiedenen Serovaren in unterschiedlicher Anzahl egal ob für Mensch oder Tier. Schließlich wird der MAT-Titer auch vom Kulturmedium, indem die Leptospiren wachsen, beeinflusst. Die Auswertung des Testes ist sehr subjektiv (Ahmad et al., 2005; Ellis et al., 1991). Bereits 1951 fand eine Diskussion zu diesem Thema statt und der Vorschlag aus den Reihen der Experten belief sich darauf, die Seren öfters und gleichzeitig in verschiedenen Laboren untersuchen zu lassen (Voß, 1952). Selbst zwei für den MAT erfahrene Diagnostiker unterscheiden sich schon einmal in einer Titerstufe. Genauso gut gibt es tatsächlich Proben, die an ein und dem anderen Tag völlig unterschiedlich reagieren. Einen interessanten Beitrag hierzu liefert die Auswertung eines internationalen Ringversuches (Chappel et al., 2004).

Der MAT eignet sich aufgrund seiner niedrigen Sensitivität (29% bis 69%) in einem frühen Krankheitsstadium (≤ 7 Tage), aber auch während der Konvaleszenz-Phase

Literatur

(≥ 15 Tage bis 93,8%) nicht allein zur Diagnose einer Leptospireninfektion. Angaben zur Spezifität bewegen sich um die 95% bis 98,4% (de Abreu Fonseca et al., 2006; Bajani et al., 2003; Bharadwaj et al., 2002; Levett et Branch, 2002; Palaniappan et al., 2007; Smits et al., 2000).

2.4.2 „Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay“ (ELISA)

Ein ELISA zum Nachweis spezifischer IgM, IgG oder IgA gegen Leptospirenantigene ist das zurzeit sensitivste indirekte Testverfahren in der Leptospirosediagnostik. Bis vor gar nicht allzu langer Zeit standen für den ELISA und auch andere serologische Testverfahren ausschließlich Antigene von Leptospiren zur Verfügung, welche durch die Präparation der kompletten Bakterienzelle gewonnen wurden. Dadurch bot sich zwar den Antikörpern ein breites Spektrum reaktiver Epitope an, jedoch sowohl pathogener, wie auch apathogener Leptospiren. Selbst ein ELISA mit einer Sensitivität von 100% musste damit in seiner Spezifität (89,1%) erheblich einbüßen. Angaben zur Sensitivität verschiedener ELISA reichen von 35% bis 100%. Dabei spielt es eine Rolle, in welcher geographischen Gegend der ELISA etabliert wird, zu welchem Zeitpunkt der Erkrankung die Probenentnahme statt findet und ob nur auf IgM oder auch auf IgG und IgA untersucht wird. Meist werden die Proteingemische von bis zu fünf verschiedenen Leptospirenserovaren, welche am häufigsten im MAT zu Reaktionen führen, zusammengemischt. Möchte man eine direkte Aussage über die Serovarspezifität der Probe erhalten, so werden die Proben gegen die Proteingemische einzelner Leptospirenstämme getestet. Kommerziell erhältliche ELISA Testkits beschränken sich in der Regel auf die Darbietung des apathogenen Stammes *L. biflexa* Patoc I als Antigen; das senkt die Spezifität. Angaben zur Spezifität verschiedener ELISA reichen von 89,1% bis 98%. Die Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen dem MAT und dem ELISA ($0,72 < \kappa < 0,87$) werden zumeist als gut bewertet (de Abreu Fonseca et al., 2006; Adler et al., 1980; Ahmad et al., 2005; Bajani et al., 2003; Blacksell et al., 2006; Brandão et al., 1998; McBride et al., 2005, 2007; Cinco et al., 1992; Cumberland et al., 1999; Effler et al., 2002; Fonseca et al., 2006; Gussenhoven et al., 1997; Levett et Whittington, 1998; Matsuo et al., 2000; Mendoza et Prescott, 1992; Mulla et al., 2006; Ooteman et al., 2006; Ribotta et al., 2000; Russell et al., 2003; Smits et al., 2000; Terpstra et al., 1980, 1985; Vijayachari et Sehgal, 2006; Winslow et al., 1997; Yersin et al., 1999; Zochowski et al., 2001).

Eine Variante, um die Spezifität des ELISA zu erhöhen, ist das Waschen der ELISA Platten nach Zugabe der Probe mit einer Harnstoff-haltigen Waschlösung. Harnstoff führt zur Lösung der Verbindung von Antikörpern mit einer weniger starken Affinität zu dem Antigen. Abdulkader et al. (2002) testeten 13 IgG positive Serumproben, von seit 14 Tagen an Leptospirose erkrankten Menschen mit einem ELISA und wuschen die Platten einmal mit und einmal ohne Harnstoff. Dabei stellten sie eine Übereinstimmung der Ergebnisse von 98% ($\pm 14\%$) fest. Die hohe Bindungsstärke der IgG wurde als ein möglicher Hinweis einer Reinfektion der Patienten gedeutet. Der hierfür verwendete ELISA hatte als Antigen ein Gemisch aus Ganzzellpräparationen von Leptospirenspezies fünf verschiedener Serovare, die

nicht den Serovaren der häufigsten Reaktionen in dem MAT entsprechen. Ein Nachteil hierbei ist, dass die Immunantwort des Patienten nicht auf ein spezifisches Serovar eingegrenzt werden kann. Neben IgG wurde auch der IgM und IgA Gehalt der Probe bestimmt.

Seit einiger Zeit besteht nun die Möglichkeit der Produktion rekombinanter Antigene der äußereren Membran ausschließlich pathogener Leptospiren und diese für serologische Testverfahren zu verwenden (Bharadwaj, 2004; Bomfim et al., 2005; Boonyod et al., 2005; Croda et al., 2007; Dey et al., 2004; Flannery et al., 2001a; Neves et al., 2007; Okuda et al., 2005; Srivastava et al., 2006; Surujballi et Mallory, 2004; Tahiliani et al., 2005). Hierfür war es notwendig Antigene zu finden, die immundominant sind und während einer Infektion ausreichend exprimiert werden. Die LipL32 und LipL41 (in Kombination mit OmpL1) scheinen hierfür geeignet zu sein (Amutha et al., 2007; Barnett et al., 1999; Haake et al., 2000, 2004; Matsunaga et al., 2003; Shang et al., 1996; Smits, 2005; Theodoridis et al., 2005). Mariya et al. (2006) verglichen den MAT mit einem indirekten IgG ELISA auf Basis von rekombinatem LipL41 Antigen und konnten bei einer Sensitivität von 100% eine Spezifität von 85,3%, bei einer Genauigkeit von 88,4%, erreichen. Damit steht dieser ELISA mit nur einem rekombinanten Antigen dem ELISA mit einem Pulk an Ganzzellantigenen in keinsten Weise mehr nach. Naito et al. (2007) beschreiben einen ELISA auf Basis von rekombinatem LipL32 Antigen zur Untersuchung von Serumproben des Schweines. Beim Vergleich mit dem MAT wurde eine Spezifität von nur 63% ermittelt. Mehr als 70% der im ELISA positiven Proben waren im MAT negativ. Sie führten dies darauf zurück, dass im MAT nur 12 verschiedene Serovare getestet wurden, während der LipL32 ELISA Serovar-unabhängig Antikörper gegen pathogene Leptospiren detektiert. Für die Validierung neuer ELISA-Systeme auf Basis rekombinanter Antigene könnte sich herausstellen, dass sich der MAT nicht als Vergleichsmethode eignet, wenn über die verwendeten Referenzstämme in ungenügender Weise die Immunantwort des Wirtes erkannt wird.

2.4.3 Mikroskopie

Ein Dunkelfeldmikroskop eignet sich hervorragend, um schnell und ohne jeden Aufwand Leptospiren nachzuweisen (Arzouni et al., 2002; Othman et al., 2007). Dazu einfach einen Tropfen der Flüssigprobe auf einen Objektträger geben und eine 100fache Vergrößerung reicht aus, um die Probe auf das Vorhandensein von Leptospiren zu prüfen. Nachteil: Es müssen mindestens 10^4 Leptospiren pro ml enthalten sein, um mit viel Mühe in dem Tropfen auf dem Objektträger pro Gesichtsfeld wenigstens eine Leptospire zu finden (Turner, 1970). Das ist manches Mal gar nicht so einfach, wenn die Leptospire sich nicht bewegt und Fibrin oder andere Beimengungen einer toten Leptospire (ein Strich) sehr ähnlich sind. Daraus folgt, dass nicht nur schon eine ganze Menge Leptospiren in der Probe enthalten sein müssen, sondern diese sich auch noch möglichst bewegen sollten. Hinzu kommt das Verhalten der Leptospiren, sich nicht homogen in einer Lösung zu verteilen, sondern Haufen bzw. Nester zu bilden. Dieses Phänomen kann man sehr schön bei einem halbflüssigem Nährmedium, in dem viele Leptospiren gewachsen

Literatur

sind, beobachten: Eine Wolkenbildung oder im Englischen auch als „dinger zone“ bezeichnet (Branger et al., 2005; LeFebvre et al., 1985; Levett, 2001; Sambasiva et al., 2003; Trueba et al., 2004). Würde man mit einer Impföse einen Tropfen Kultur neben der Wolke entnehmen, so finden sich unter dem Mikroskop vielleicht ein, zwei einzelne Leptospiren; fährt man dahingegen mitten in die Wolke oder hat die Flüssigkeit vorher homogenisiert, dann sieht man auf einmal Millionen Bakterien unter dem Mikroskop. Wie in der Kultur, so auch in der Probe. Ein Labor, welches die Dunkelfeldmikroskopie für die Diagnostik einsetzt wird daher vorher die Probe, sofern möglich, abzentrifugieren und das Sediment auf Leptospiren untersuchen. Damit hat man zwar mögliche Bakterien konzentriert, jedoch auch mehr Beimengungen im Blickfeld. Andersherum würde man mit einer nur geringen Zentrifugationsgeschwindigkeit den geklärten Überstand mit den Leptospiren erhalten. Für die alleinige Untersuchung klinischer Proben, wie Blut, Liquor, Milch, Kammerwasser, Glaskörper, Urin sowie Dialysaten reicht die Dunkelfeldmikroskopie aufgrund der geringen Sensitivität und Spezifität oft nicht aus (Ahmad et al., 2005; Bielansky et al., 1998; Chandrasekaran et Gomathi, 2004; Chandrasekaran et al., 1998; Effler et al., 2002; Hodge et al., 1996; Kumar et al., 2001; Ramadass et al., 1997; Vinetz, 2001). Unersetzlich wird sie jedoch immer für eine schnelle Beurteilung von Kulturen, sowie für die Durchführung des MAT bleiben. Für die Beurteilung der Bakterienmorphologie ist die einfache Dunkelfeldmikroskopie selbst bei stärkerer Vergrößerung weniger geeignet. Es ist nicht mehr zu erkennen, als die Beweglichkeit der Leptospiren und ob sie dünner oder länger sind. Doch tatsächlich variieren das Erscheinungsbild und die Motilität der Leptospiren in Abhängigkeit ihrer Umgebung (Bharti et al., 2003; Ellis et al., 1983). Schöne Detailaufnahmen erhält man mit Hilfe der Elektronenmikroskopie. Dabei wurden nicht nur Kulturoisolate untersucht, sondern auch Leptospiren in klinischen Proben. Erste Hinweise existieren, die vermuten lassen, dass immunologisch und molekularbiologisch nachweisbare Veränderungen der Oberfläche von Leptospiren während einer Infektion sogar morphologisch im Elektronenmikroskop sichtbar sind. So eignet sich diese Methode, um Leptospiren an verschiedenen Orten des Körpers, in Zellen (wie Makrophagen) und Geweben (wie Nierenparenchym) sowie Flüssigkeiten zu identifizieren und deren Veränderungen zu dokumentieren (Barocchi et al., 2002; Bharti et al., 2003; Brandes et al., 2007; de Brito et al., 1992; Czekalowski et Eaves, 1955; Li et al., 2007; Liu et al., 2007; Miller et Wilson, 1966; Niedermaier et al., 2006; Swain, 1955; Trueba et al., 1992).

2.4.3.1 Histologie

Spezifische immunhistochemische Untersuchungen, finden heutzutage eher aus wissenschaftlichem Interesse als für die Routinediagnostik statt; hierfür sind besser Screeningverfahren, wie die Silberfärbung bzw. die Versilberung nach Warthin und Starry geeignet. Zwar sind diese Färbungen weniger spezifisch, aber wesentlich preiswerter und einfacher in der Anwendung. Die Silberfärbung von Nieren eines Menschen, der an einer fieberhaften Gelbsucht litt, ermöglichte Stimson 1907 das erste Mal die Bakterien zu beschreiben (Ahmad et al., 2005; Barnett et al., 1999; Gsell, 1984; Kobayashi, 2001; Salkade et al., 2005; Szeredi et Haake, 2006).

2.4.4 Isolierung und Vermehrung in Kultur

L. interrogans Serovar Icterohaemorrhagiae Stamm Ictero No. I (ATCC 43782), früher als Stamm Yamasaki bezeichnet, konnte am 23. November 1914 von einem Patienten mit Weil'scher Krankheit isoliert werden. Dies gelang dem japanischen Professor Inada und seinen Kollegen, nachdem sie die Methode von Noguchi, einem japanischen Bakteriologen, zur Kultivierung von Spirochäten modifizierten. Dazu war eine entscheidende Erkenntnis notwendig: +37°C ist für die Anzucht von Leptospiren ungeeignet, viel besser sind Temperaturen zwischen +22°C bis +25°C (Kobayashi 2001; Smabasiva et al., 2003).

Doch auch 100 Jahre später bleibt die kulturelle Isolierung von Leptospiren eine Kunst für sich. Die Vermehrung der Bakterien ist zeitaufwändig und die Ansprüche an das Ausgangsmaterial sind hoch. Im günstigsten Fall werden die Proben gleich nach der Entnahme vom Patienten unverzüglich in ein Transportmedium überführt und bei Raumtemperatur dem Labor zugesandt (Ahmad et al., 2005). Steht kein Transportmedium zur Verfügung sollte auf jeden Fall ein Kulturansatz mit der Nativprobe innerhalb der ersten 24 Stunden erfolgen und die Probe bis dahin nur bei Raumtemperatur gelagert werden (Bharti et al., 2003). Um ein Überwuchern der Kultur mit schnell wachsenden Bakterien („bacterial overgrowth“) zu vermeiden, werden die Proben so steril wie möglich entnommen; d.h. aber auch, dass Proben, die von Natur aus schon gar nicht keimarm sein können, wie zum Beispiel Kotproben, sich wenig für eine Leptospirenisolierung eignen. Die Begleitflora wächst schneller als die Leptospiren und verdrängt diese schließlich ganz. Eine Möglichkeit unerwünschte Bakterien aus dem Kulturansatz zu entfernen, ist die Filtration durch sehr feine, 0,22 µm oder 0,45 µm, Filter und eine anschließende Subkultivierung in frischem Medium (Ahmad et al., 2005; Arzouni et al., 2002). Doch das ist sehr zeitaufwändig und häufig nur dann erfolgsversprechend, wenn bereits Leptospiren mikroskopisch sichtbar waren. 1977 kamen Ryan et al. auf die Idee von abortieren Ferkeln Glaskörper für eine Leptospirenkultur zu entnehmen. Der Erfolg gab ihnen recht; die Isolierung gelang viel häufiger und mit weniger Aufwand als sonst, weil die Augenflüssigkeiten nach dem Tod der Tiere noch viel länger keimarm blieben als die übrigen Organe des Fetus (Brown et al., 2003; Ellis et al., 1982; Uzal et al., 2002). Auch sonst gelingt die Isolierung von Leptospiren aus Glaskörperflüssigkeit recht gut (Brandes et al., 2007; Brem et al., 1999; Hartskeerl et al., 2004; Niedermaier et al., 2006; Wollanke, 2002). Besser zumindest als zum Beispiel aus Urinproben von Mensch und Hund. Das liegt an dem pH-neutralen Milieu. Leptospiren halten sich in dem sauren Urin vom Menschen nicht besonders lang und werden rasch vermehrungsunfähig; daher ist es auch nicht möglich eine Kultur mit viel Urin anzusetzen; da mag es allein schon aufgrund der Volumenverhältnisse einleuchtend sein, warum ein Kulturversuch von 100 µl Urin eines Menschen weniger erfolgsversprechend ist, als ein Versuch von 100 µl Glaskörperflüssigkeit eines Ferkels (Ahmad et al., 2005; Bharadwaj, 2004; Harkin et al., 2003a, 2003b; Wächtler et al., 1998). Während bei Blutproben auch eher das Volumenverhältnis (5 µl bis 500 µl) ein Problem darstellt, eignen sie sich ansonsten ganz gut für eine Isolierung, sofern die Probe tatsächlich in der Bakteriämiephase und steril gewonnen wurde.

Literatur

Zitratblut sollte jedoch nicht verwendet werden. Wie lange eine Bakteriämiephase anhält, kann wohl nicht pauschal festgelegt werden, nachdem Mérien et al. (1995) noch 56 Tage seit Beginn der Symptome Leptospiren aus dem Blut von Menschen isolieren konnten. Über die Sensitivität einer Leptospirenisolierung aus einer Blutkultur erhält man Angaben von 14,3% bis 62% (de Abreu Fonseca et al., 2006; Bal et al., 1994; Bharti et al., 2003; Brown et al., 2003; Gravekamp et al., 1993; Katz et al., 2003; Mino, 1942; Truccolo et al., 2001; Wuthiekanun et al., 2007). Neben Glaskörperproben wird der schnellste und beste Erfolg mit einer Isolierung aus Nierenproben erzielt. Insbesondere bei infizierten Kleinsäugetern, wie Ratten und Mäusen kann eine Sensitivität von nahezu 100% erreicht werden (Doungchawee et al., 2005; Kositanont et al., 2007b). Auch unter kontrollierten Bedingungen experimentell infizierter Hamster und Schweine mit *L. Pomona* war die Kultur aus Nierenproben in allen Fällen positiv (Alt et Bolin, 1996). Im Prinzip eignet sich, unter Berücksichtigung des Krankheitsstadiums, für eine Leptospirenisolierung jedes Organ; interessant sind die unterschiedlichen Angaben zur inokulierten Probenmenge; sie reichen von einer Feinnadelaspiration bis zu 2 g. Grundsätzlich steigert der Ansatz mehrerer Kulturen, z.B. mit unterschiedlichen Mengen an Probenmaterial und/oder verschiedener Zusammensetzung der Medien, die Erfolgsrate (Ahmad et al., 2005; Ellis et al., 1981, 1983).

Der Erfolg einer Kultur hängt im Wesentlichen davon ab, ob die Leptospiren in der Probe lebensfähig und vermehrungsfähig sind. Daher sollten die Kulturen möglichst vor dem Beginn einer antibiotischen Therapie angesetzt werden. Eine kulturelle Isolierung gelingt in den wenigsten Fällen, wenn eine Probe oder gar das Transportmedium irgendwann einmal gekühlt wurden; daher ist es immer schwierig wenn Proben von Leichen während der Sektion genommen werden, denn entweder sind die Körper schon einmal gekühlt gewesen, oder aber seit dem Tod ist soviel Zeit vergangen, dass Bakterien aus dem Darm in den Körper gestreut haben. Mit Einsetzen autolytischer Prozesse ändert sich das Milieu des Gewebes (pH-Wert, Sauerstoffangebot u.a.); sind bereits mehr als 24 Stunden vergangen, so wird jeder Versuch Leptospiren aus einem solchen Gewebe isolieren zu wollen, erfolglos bleiben (Brown et al., 2003; Ellis et al., 1982; Fairbrother, 1985; Scarcelli et al., 2003; Spermhake et Schulz, 2006; Straube, 2007).

Sind vermehrungsfähige Leptospiren in einer Probe vorhanden, so dauert die Kultur bis zum ersten mikroskopischen Nachweis wenigstens eine Woche (Arzouni et al., 2002); da es aber auch Monate dauern kann, wird eine Beobachtungszeit von mindestens vier Monaten, besser sechs Monaten empfohlen (Bharti et al., 2003; Bielanski et al., 1998; Bomfim et Koury, 2006; Brown et al., 1995, 2003; Morgan et al., 2002; OIE, 2004; Wuthiekanun et al., 2007). Die kulturelle Isolierung von Leptospiren ist sehr aufwändig und wird daher nur von wenigen Laboren routinemäßig durchgeführt. Als Grundnährmedium, auch kommerziell erhältlich, eignet sich das Ellinghausen McCullough Johnson Harris (EMJH), Korthof, Fletcher, Stuart, Schöffner, Vervoort, Noguchi, Cox, Shenberg oder das Vogel et Hunter Medium (Bielanski et al., 1998; Ellinghausen, 1968, 1973, 1975, 1983; Ellinghausen et McCullough, 1965a, 1965b; Fletcher, 1928; Johnson et Harris, 1967; Sambasiva et al., 2003; Scarcelli et al., 2003; Shenberg, 1967; Stuart, 1946; WHO, 2003). Eine

Anreicherung erfolgt unter anderem mit Kaninchenserum (bis 10%), fötalem Kälberserum (bis 4%), Lactalbuminhydrolysat (0,1%), zusätzlichem bovinem Serum-Albumin (BSA, 1%) und als Quelle langkettiger Fettsäuren Tween80/40 (Bal et al., 1994; Brem et al., 1998; Ellis et al. 1976, 1986a; Greenlee et al., 2004; Staneck et al., 1973; Turner, 1970; Wagenaar et al., 2000). Die Kulturen können mit Agar (bis 15%) versetzt werden. Die Kultivierung findet unter aeroben Bedingungen bei +20°C bis +30°C statt. Ein pH-Wert von pH 6,8 bis pH 7,6 ist einzuhalten. Mit einer Generationszeit der Leptospiren von 7 Stunden bis 12 Stunden ist zu rechnen. Möchte man einen Hemmstoff hinzufügen, so eignet sich 5-Fluorouracil (bis 200 µg/ml), Vancomycin (bis 100 µg/ml), Neomycin (bis 300 µg/ml), Amphotericin B (bis 2 µg/ml), Rifampicin (bis 10 µg/ml), Nalidixinsäure, Fosfomycin, Bacitracin, Actidion und/oder Polymyxin B (Adler et al., 1986; Johnson et Rogers, 1964a; Myers et Varela-Díaz, 1973; Oie et al., 1986; Ryu, 1963; Schönberg et al., 2005). Ist die Kultur nicht mit anderen Keimen kontaminiert, so wachsen die Leptospiren besser in einfachem, wie dem semi-solidem EMJH Medium, als unter Zusatz von Antibiotika (Brown et al., 2003; Tansuphasiri et al., 2006b). In konventionellen Blutkulturen überleben die Leptospiren einige Tage und in einem kommerziell erhältlichen System für Mykobakterien sogar bis zu zwei Wochen (Griffith et al., 2006; Palmer et Zochowski, 2000; Palmer et al., 1984). Eine Subkultivierung in spezielles Leptospirenmedium wird jedoch empfohlen (Bharti et al., 2003).

Die unterschiedlichen Proben, Probenmengen und Entnahmetechniken, Rezepturen und Dauer der Kultivierung bereiten Schwierigkeiten die Ergebnisse der Methodik „Kultur“ (z.B. hinsichtlich Sensitivität) untereinander zu vergleichen oder die Kultur als „Goldstandard“ für die Evaluierung anderer Methoden wie der PCR zu verwenden (Hoorfar et al., 2004). Manch einer mag die Kultur als sensitiver oder zumindest vergleichbar mit der PCR ansehen (Kik et al., 2006; Taylor et al., 1997; Wagenaar et al., 2000). Doch diese Einschätzung ist eine seltene Ausnahme. Viel eher liest man die Aussage, dass die PCR die Kultur an Empfindlichkeit weitaus übertrifft (de Abreu Fonseca et al., 2006; Ahmad et al., 2005; Awad-Masalmeh et al., 2004; Brown et al., 1995, 2003; van Eys et al., 1989; Gerritsen et al., 1991; Gravekamp et al., 1993; Heinemann et al., 1999; Hookey, 1992; Kee et al., 1994; Masri et al., 1997; Mérien et al., 1992; Murgia et al., 1997; Richtzenhain et al., 2002; Zuerner et Bolin, 1997). Dennoch wird die kulturelle Isolierung von Feldleptospiren immer wichtig bleiben; zwar wurde sie als reine Diagnostikmethode von DNA- und Antigennachweismethoden abgelöst, doch stellt sie ein wesentliches epidemiologisches Hilfsmittel dar; und solange keine geeigneten kommerziellen Vakzinen für einige Tiere vorhanden sind, wird die kulturelle Isolierung auch immer für die Entwicklung bestandsspezifischer Impfstoffe von Nöten sein. Daher ist es aber mit dem ersten mikroskopischen Nachweis von Leptospiren aus dem Kulturansatz nach vielleicht schon drei Wochen nicht getan, sondern die Leptospiren müssen gepflegt, subkultiviert und zu einer frohwüchsigen Kultur herangezogen werden.

Vor Einführung molekularbiologischer Techniken, mit deren Hilfe schnell und einfach ein unbekannter Leptospirenstamm einer Spezies zugeordnet werden kann, benutzt man zur Unterscheidung zwischen pathogenen und saprophytären Leptospiren

Literatur

neben dem Tierversuch phänotypische Testverfahren, die mindestens einen Monat dauern und zum Teil wenig befriedigende Ergebnisse liefern; hierzu gehören das kulturelle Wachstum bei +13°C bzw. +30°C oder das Wachstum unter Anwesenheit von 8-Azaguanin (225 µg/ml) (Brenner et al., 1999; Johnson et Harris, 1967; Johnson et Rogers, 1964b; Mgode et al., 2006; Nizamuddin et al., 2006; Noubade et al., 2002).

2.4.4.1 Typisierung von Isolaten

Bevor molekularbiologische Methoden zur Verfügung standen, fand die Typisierung von Feldleptospiren vornehmlich anhand serologischer Verfahren statt (Dikken et al., 1978). Auch heute ist dies noch Gang und Gäbe, weil sie von den Laboren schnell und einfach durchführbar ist. Das Prinzip ist das Gleiche wie beim MAT, nur sind in diesem Fall die Leptospiren der gesuchte Parameter und die Antikörper vorgegeben. Verwendung finden Kaninchenhyperimmunseren, die in der Regel gegen die in der Region üblicher Weise vorkommenden Leptospiren gerichtet sind. Damit kann eine Typisierung der Feldisolate bis auf Serovarebene erfolgen (Doungchawee et al., 2007; Mgode et al., 2006; Rossetti et al., 2005).

Je nachdem welcher Genabschnitt des Bakteriengenomes vervielfältigt wurde, bietet eine Sequenzanalyse von PCR-Produkten die Möglichkeit die Zugehörigkeit des Leptospirenstammes zu einer Genospezies zu bestimmen (Ahmed et al., 2006; Ganoza et al., 2006; Morey et al., 2006; Reitstetter, 2006; La Scola et al., 2006; Silva et al., 2007; Slack et al., 2006a; Wangroongsarb et al., 2007). Da bisher nur vier Leptospirenstämme vollsequenziert wurden, ist die Bestimmung bis auf Stammebene noch nicht möglich. Dazu sind andere mehr oder weniger aufwändige Techniken nötig, wie der Restriktionsendonuklease „Assay“ (REA), die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE), der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP), die „Random Amplified Polymorphic DNA PCR“ (RAPD-PCR), „Arbitrarily Primed PCR“ (AP-PCR), „Low Stringency Single Specific Primer PCR“ (LSSP-PCR), „Variable Number of Tandem Repeat“ Analyse (VNTR) oder der „Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism“ (FAFLP) (Bomfim et Koury, 2006; Brown et Levett, 1997; de Caballero et al., 1994a, 1994b; Corney et al., 1993; Ellis et al., 1988; Gebriel et al., 2006; Gerritsen et al., 1995; Heinemann et al., 2000; Herrmann et al., 1991, 1992; Kawabata et al., 2001; Letocart et al., 1997; Marshall et al., 1984; Oliveira et al., 2003; Ooteman et al., 2004; Pacciarini et al., 1992; Perolat et al., 1993, 1994; Ralph et al., 1993; Resch et al., 2007; Salaün et al., 2006; Savio et al., 1994; Slack et al., 2006b, 2007b; Tamai et al., 1988; Vijayachari et al., 2004; Woodward et Redstone, 1993; Zuerner et al., 1993). Die meisten dieser Verfahren haben jedoch einige Nachteile: Eine große Menge hoch reiner, qualitativ wertvoller DNA ist notwendig; damit setzt eine Stammtypisierung mit molekularbiologischen Methoden nach derzeitigem Standpunkt eine kulturelle Isolierung voraus. Der weltweite Datentransfer gestaltet sich als schwierig, die Ergebnisse weisen eine geringe Trennschärfe auf, ebenso ist die Reproduzierbarkeit niedrig und die Interpretation oft mehrdeutig. Damit stellen diese Methoden zur Stammdifferenzierung für ein Routinelabor noch keine echten Alternativen für die

serologischen Methoden zur Serovarbestimmung dar (Cachay et Vinetz, 2005; Kositanont et al., 2007b; Majed et al., 2005; Mgone et al., 2006; Trueba, 2006).

2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Vorteile der PCR liegen auf der Hand: Es handelt sich hierbei um eine hoch sensitive Methode; die DNA einer Leptospire in einem Reaktionsansatz ist nachweisbar. In ein, maximal zwei Tagen erhält man ein Ergebnis. Bereits einen Tag nach Infektion ist ein Erregernachweis möglich. Mit der richtigen Probenaufbereitung eignet sich jedes biologische Material für eine PCR-Untersuchung. Mittels einem „real-time“ Detektionsverfahren lässt sich schnell und einfach die Ausgangsmenge an Leptospiren in einer Probe bestimmen, damit können zum Beispiel Aussagen über einen Therapieverlauf getroffen werden.

Nachteil: Als hoch sensitive Methode ohne Grenzbereich, erlauben PCR-Ansätze keinerlei Kontamination. Um eine Aussage über falsch positive Ergebnisse machen zu können, sind zahlreiche Kontrollen notwendig. Ein gewisses Feingefühl für molekularbiologisches Arbeiten, sowie Disziplin sind unumgänglich. Ein negatives PCR-Ergebnis erlaubt keine Aussage über den Status quo einer Erkrankung; bei bestehendem Verdachtsmoment ist daher eine erneute Untersuchung von Proben angezeigt. Probenentnahme und -aufbereitung stellen die wesentlichen Variablen dar und beeinflussen in einem erheblichen Ausmaß das PCR-Ergebnis. Weltweit existiert eine große Anzahl verschiedener PCR-Protokolle für den Nachweis von Leptospiren. Dies macht den Vergleich von Ergebnissen schwierig. Für eine Evaluierung der PCR erweist sich die Kultur in den wenigsten Fällen als ein echter Goldstandard.

Vor Einführung der PCR in die Leptospirosediagnostik stellte der frühe Zeitpunkt der Erkrankung, in der Regel die erste Woche nach Einsetzen der Symptome, bis zum Nachweis spezifischer Antikörper meist eine diagnostische Lücke dar (Michna, 1970; Plank et Dean, 2000). Nun gelingt bei 32% bis 100% der Patienten der direkte Erreger-Genomnachweis (de Abreu Fonseca et al., 2006; Baburaj et al., 2006; Bal et al., 1994; Brown et al., 1995; Fonseca et al., 2006; Kee et al., 1994; Mérien et al., 1995; Nizamuddin et al., 2006; Ootemann et al., 2006). Grundsätzlich ist der Nachweis von DNA pathogener Leptospiren in einer biologischen Probe beweisend für eine Infektion des Organismus mit Leptospiren. Daher bedarf es einer sicheren PCR, die zwischen DNA pathogener und apathogener Leptospiren unterscheidet; apathogene Leptospiren wurden bereits aus Nieren von Pferden isoliert, fanden sich als Laborkontamination und selbst in kommerziell erhältlichem, für Zellkulturen geeignetem, deionisiertem, sterilem Wasser (Acevedo-Whitehouse et al., 2003; van Eys et al., 1989; Koizumi et al., 2003; Mérien et al., 1992; Myers, 1976; Nizamuddin et al., 2006; Noubade et al., 2002; Rubin et al., 1980; Tumilowicz et al., 1974).

2.5.1 Probenvorbereitung und DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion ist der erste und wichtigste Schritt in Richtung PCR (Espy et al., 2006). Im Allgemeinen wird die DNA aus dem Zellverband und ihrer Verpackung gelöst und für die PCR nutzbar gemacht. Da die PCR an sich aber ein sehr empfindliches System darstellt, gilt es gleichermaßen Störfaktoren, wie Inhibitoren weitestgehend zu beseitigen. Tabelle 7 gibt einen kleinen Überblick über einige PCR-Hemmstoffe (Ahokas et Erkkila, 1993; Beutler et al., 1990; Boom et al., 1991; Demeke et Adams, 1992; Holodniy et al., 1991; Mercier et al., 1990; Ruano et al., 1992; Sarkar et al., 1990; Wiedbrauk et al., 1995). Die Liste ist gewiss nicht vollständig, da es viele Faktoren gibt, denen bisher noch keine Namen gegeben wurden bzw. deren Hemmwirkung noch nicht eindeutig bewiesen wurde. Nichtsdestotrotz wird ersichtlich, dass es einen großen Unterschied macht, ob DNA von Kulturleptospiren oder z.B. aus einer Blut- oder Urinprobe gewonnen werden soll. Dementsprechend gilt, das richtige Verfahren auszuwählen bzw. gegebenenfalls ein Bestehendes zu modifizieren.

Tabelle 7. Eine Auswahl an PCR-Hemmstoffen, zum Teil unter Angabe einer Konzentration, bei welcher mit einer Hemmung der PCR zu rechnen ist

PCR-Inhibitoren	PCR-Inhibitoren
> 0,01% SDS (Natriumdodecylsulfat)	Ethanol
> 0,5 mM EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Häm (-Derivate)
> 5 Einheiten Heparin	Harnstoff
> 10% DMSO (Dimethylsulfoxid)*	Phenol
> 15% Glycerin*	Gallensalze
> 2,5% Tween 20*	Kreatinin
> 1% Triton X*	Polyamine
> 5% Formamid*	Pflanzenpolysaccharide
> 5% Nonidet*	Kalziumalginat
> 15% Polyethylenglycol*	saure Radikale

*können in geringerer Konzentration auch als PCR-Beschleuniger wirken

Es gibt verschiedene Möglichkeiten DNA zu extrahieren, wobei von vornherein wesentlich zu entscheiden ist, welche Art der Nucleinsäuren man eigentlich gewinnen möchte. Für eine PCR zum Nachweis von Leptospiren wird deren genomische DNA benötigt. Die vorhandene RNA stört nur und kann in einem Zwischenschritt, dem RNase Verdau, beseitigt werden (Veloso et al., 2000). Ziel der DNA-Extraktion ist es, die genomische DNA möglichst vollständig, im Ganzen, also wenig zerstückelt (degradiert) zu gewinnen und möglichst geringe Verluste zu haben. Selbst wenn in einer Probe nur 1 Leptospire enthalten ist, so möchte man deren DNA mit der PCR nachweisen können. Mit der Extraktion wird sämtliche in einer Probe enthaltene DNA isoliert, also auch vom Wirtsorganismus, wie z.B. von Nierenzellen oder von der Begleitflora, wie anderen Bakterien. Obwohl Leptospiren zu den

gramnegativen Bakterien gehören, gilt es doch deren speziellen Wandaufbau zu beachten (siehe Abschnitt 2.1.1 Morphologie).

Untrennbar von der DNA-Extraktion ist die Probenvorbereitung. Der Aufwand hierzu richtet sich nach der gewählten Extraktionsmethode. Zu der prä-Präparation gehört das Pelletieren der Probe und gegebenenfalls das Waschen des Pellets in PBS („Phosphate Buffered Saline“), Wasser oder TE (Tris EDTA, EDTA = EthylenDiaminTetraAcetat) Puffer. Eine interessante Frage hierbei ist, wie hoch die relative Zentrifugalbeschleunigung (r_{cf} = „relative centrifugation force“ bzw. g = „gravity“) zu wählen ist und welche Zeit nötig ist, um Leptospiren zu pelletieren. Die Angaben gehen weit auseinander und reichen von 1.000 g bis 17.000 g sowie von fünf Minuten bis zu einer Stunde (Bal et al., 1994; Branger et al., 2005; de Caballero et al., 1994b; Cai et al., 2002; Ganoza et al., 2006; Gebriel et al., 2006; Genelhu et al., 1998; Gerritsen et al., 1991, 1995; Heinemann et al., 1999; Jouglard et al., 2006; Kawabata et al., 2001; Kee et al., 1994; Masri et al., 1997; Mérien et al., 1992; Michel et al., 2001; Millar et al., 1987a; Murgia et al., 1997; Romero et Yasuda, 2006; Romero et al., 1998; Scarcelli et al., 2003; Segura et al., 2005; Slack et al., 2006a; Talpada et al., 2003; Tansuphasiri et al., 2006a; Taylor et al., 1997; Veloso et al., 2000; Wagenaar et al., 1994, 2000). Am Besten ist, die Zentrifugation bei +4°C durchzuführen; denn wird die Wärme im Zentrifugenröhrchen zu groß, können die Bakterien noch leichter platzen und somit die DNA in den Überstand verschwinden. Desweiteren wird der Versuch, eine bereits einmal eingefrorene Probe zu pelletieren, erfolglos bleiben (Brown et al., 2003; van Gelder, 2001b; Lucchesi et al., 2004). Jede Manipulation an der Probe, durch vielfaches Pipettieren, Zentrifugieren, Vortexen etc. bedeutet eine mechanische Einwirkung auf die DNA, sowie jedesmal die Möglichkeit DNA bzw. die Leptospiren zu verlieren, indem diese z.B. an der Pipettenspitze oder an der Wand des Reaktionsgefäßes haften bleiben. Da die meisten klinischen Proben recht wenige Leptospiren enthalten, gilt es daher derartige Schritte möglichst zu vermeiden oder auf ein Minimum zu reduzieren.

Möchte man Leptospiren-DNA aus Blutproben extrahieren, so eignet sich Vollblut, Serum, der „Buffy Coat“ und Plasma. Es sollte kein Blut verwendet werden, welchem als Antikoagulans Heparin und Lithium zugesetzt wurden (Levett et al., 2005; Smythe et al., 2002a). In Abhängigkeit der Spezies existieren folgende Mengenangaben: 200 μ l EDTA Blut, 100 μ l bis 2 ml Serumproben, „Buffy Coat“ von 5 ml EDTA Blutproben oder 200 μ l Plasma (Branger et al., 2005; Fonseca et al., 2006; Mérien et al., 2005; Ramadass et al., 1997; Segura et al., 2005; Slack et al., 2007a). Acevedo-Whitehouse et al. (2003) verwendeten 200 μ l Blut- oder Serumproben von Kalifornischen Seelöwenwelpen zum erfolgreichen Nachweis von DNA pathogener Leptospiren; allerdings war die Sensitivität bei den Blutproben besser. Oftmals wird auf die Verwendung von Vollblut verzichtet, da die Hämoglobinderivate als PCR-Inhibitoren gefürchtet sind; die meisten Extraktionsverfahren kommen jedoch mit 200 μ l Vollblut ganz gut zurecht. Der Nachteil am Serum ist die geringere Erregerdichte, da die Leptospiren zum großen Teil im Blutkuchen verbacken sind (Bal et al., 1994; Gravekamp et al., 1993; Wuthiekanun et al., 2007). Der Vorteil beim „Buffy Coat“ wird gegenüber Serum und Plasma darin gesehen, dass die phagozytierten Leptospiren

Literatur

mit erfasst werden und als Vorteil gegenüber Vollblut, dass mit weniger PCR-Inhibitoren zu rechnen ist (Kositanont et al., 2007a).

Urinproben sind je nach pH-Wert sehr heikel. In einem neutralen pH Bereich sind die Leptospiren relativ stabil. Kritisch sind aber davon abweichende Werte. Dann sterben die Leptospiren nicht nur rasch ab, sondern deren DNA wird wohl auch sehr schnell abgebaut. Daher gibt es die Empfehlung, den pH-Wert des Urins möglichst gleich nach Probengewinnung mit TE Puffer oder PBS zu neutralisieren und/oder den Urin mit Formaldehyd (bis 0,8%) zu konservieren (Ahmad et al., 2005; Awad-Masalmeh et al., 2004, Bal et al., 1994; Bomfim et Koury, 2006; Fairbrother, 1985; Gerritsen et al., 1991; Kumar et al., 2001; Lucchesi et al., 2004; Mérien et al., 1992; Noubade et al., 2002; Taylor et al., 1997). Weitere Angabe, wie „der Urin soll steril sein, frisch (≤ 1 Tag), am besten Mittelstrahlurin sowie gekühlt transportiert werden“, mögen gerade in der Tiermedizin nicht immer einfach zu verwirklichen sein. Daher gilt für ein Labor, jede Urinprobe noch am Tag des Probeneinganges rasch zu verarbeiten und zumindest in einen lagerungsfähigen Zustand zu versetzen. Über die Urinmengen gibt es in Abhängigkeit von der Spezies extrem divergierende Angaben: 100 μ l bis 50 ml (Acevedo-Whitehouse et al., 2003; Branger et al., 2005; Cai et al., 2002; Fonseca et al., 2006; Harkin et al., 2003a; Masri et al., 1997; Mérien et al., 2005; Smythe et al., 2002a; Talpada et al., 2003; Wagenaar et al., 1994). Urinproben sind stets sehr reich an PCR-Inhibitoren. Dabei scheint nicht nur der Harnstoff ein Problem darzustellen, sondern zahlreiche andere harnpflichtige Substanzen, deren Konzentration von der Stoffwechsellage des Organismus abhängt und damit sehr individuell ist (Wagenaar et al., 2000).

Grundsätzlich besteht die Möglichkeit aus jeder biologischen Probe DNA zu extrahieren. In Abhängigkeit von Menge und Beschaffenheit der Probe, gilt es das geeignete Extraktionsverfahren auszuwählen. Eine häufig erwähnte Methode Leptospiren-DNA aus Kultur, Urin, Samenflüssigkeit, Nierengewebe oder Blut zu gewinnen, ist die Proteinase K, Phenol-Chloroform, Ethanolpräzipitation (de Abreu Fonseca et al., 2006; de Caballero et al., 1994b; Fonseca et al., 2006; Heinemann et al., 1999; Kee et al., 1994; Liu et al., 2006; Masri et al., 1997; Millar et al., 1987a; Murgia et al., 1997; Parma et al., 1997b; Scarcelli et al., 2003; Schönberg et al., 2005; Vitale et al., 2005b). Als Prototyp wird meist das Protokoll nach Sambrook et al. (1989) verwendet. Modifikationen enthalten z.B. das Einfügen einer Behandlung mit Lysozym, Triton X, Nonidet oder Tris-EDTA-SDS (SDS = SodiumDodecylSulfat) vor dem Proteinase K Verdau. Veloso et al. (2000) verglichen die Anwendung von Proteinase K, einer Ca^{2+} abhängigen Serinproteinase des Pilzes *Tritirachium album*, und der Proteinase E6870, einer pflanzlichen Cysteinproteinase von *Carica candamarcensis*. Eine Agarosegel-Analyse zeigte intensivere Banden, weniger Hintergrundrauschen und qualitativ hochwertigere DNA durch weniger Degradation, nach einer Anwendung von Proteinase E6870. Außerdem war diese Proteinase gegenüber EDTA nicht empfindlich, wohingegen Proteinase K in ihrer Aktivität unter Anwesenheit von EDTA gehemmt wurde (Genelhu et al., 1998). Grundsätzlich ist die Phenol-Chloroform Extraktion recht mühsam, bedarf einiger Laborsicherheitsmaßnahmen und auch etwas Erfahrung (Tansuphasiri et al., 2006a). Die Ethanolpräzipitation kann unabhängig von der verwendeten Extraktionsmethode

immer als zusätzlicher Schritt der DNA-Reinigung und -Fällung angewandt werden, ist aber nur dann zu empfehlen wenn mit viel Leptospiren-DNA in der Probe zu rechnen ist (Kim et al., 2006).

Werden beispielsweise *E. coli*, als Prototyp der gramnegativen Bakterien, für rund zehn Minuten gekocht, platzen die Bakterien. Bei einer anschließenden Zentrifugation löst sich die DNA aus den denaturierten Zelltrümmern. Der Überstand kann direkt in die PCR eingesetzt werden. Für Kultur *E. coli* ist diese sogenannte Kochmethode hervorragend geeignet. Biologische Proben bedürfen einer gewissenhaften prä-Präparation, aber auch damit bleibt die Kochmethode eine sehr preiswerte und in der Regel schnelle Extraktionsart. Nun wird häufig versucht diese Methode auf die Leptospiren anzuwenden (Awad-Masalmeh et al., 2004; Bal et al., 1994; Bielansky et al., 1998; Corney et al., 1993; van Eys et al., 1989; Gebriel et al., 2006; Gerristen et al., 1991; Jouglard et al., 2006; Kumar et al., 2001; Faber et al., 2000; Lucchesi et al., 2004; Mérien et al., 1992; Murgia et al., 1997; Noubade et al., 2002; Ramadass et al., 1997; Romero et Yasuda, 2006; Romero et al., 1998; Slack et al., 2006a; Tansuphasiri et al., 2006a; Veloso et al., 2000; Wagenaar et al., 2000; Woo et al., 1997b). Zum Einsatz kam sie bisher für die Kultur, Wasser, feuchte Erde, Urin, Nieren, Blut, Serum, Milch, Liquor und Kammerwasserproben sowie bovine Oozyten bzw. Embryonen. Manches Mal funktioniert es und manches Mal nicht. Für einige Leptospirenstämme scheint es nicht auszureichen, diese 10 Minuten bei +90°C bis +100°C zu kochen. Dabei hat dies primär nichts mit einer möglichen Inhibition der PCR durch Probenhemmstoffe oder einer ungenügenden Probenvorbereitung zu tun. Veloso et al. (2000) gelang es nicht die Methode auf *L. interrogans* Serovar Hardjo, *L. interrogans* Serovar Pomona und *L. borgpetersenii* Serovar Szwajizak anzuwenden. Sie nehmen an, dass Unterschiede im Zellwandaufbau dafür verantwortlich sind. Woo et al. (1997b) fanden im Allgemeinen eine geringere Ausbeute an DNA verglichen mit vier anderen Methoden. Bal et al. (1994) entschieden sich frühzeitig für eine andere Extraktionsmethode, da die Ergebnisse nicht reproduzierbar und sich das Verfahren nicht für die Extraktion von Leptospiren-DNA aus Urinproben größeren Volumens eignete. Awad-Masalmeh et al. (2004) prüften 160 Referenzstämme und hatten mit der Kochmethode stets Erfolg; dabei betrug die Kochzeit 13 Minuten bei +98°C und jede Probe wurde anschließend vor dem Einsetzen in die PCR bei -20°C eingefroren. Wird die Kochmethode für verschiedene biologische Proben verwendet, so ist zum Teil ein erheblicher Aufwand an Vorbereitung notwendig, der dieser einfachen Methode an Zeitaufwand entgegensteht und mannigfaltige Handlungsschritte das Risiko beinhalten, geringe Ausgangsmengen an Leptospiren zu verlieren. Da Noubade et al. (2002) keine Kontrolle für eine etwaige Probenhemmung durchführten, ist nicht ermittelbar, ob die von ihnen untersuchten Milch, Nieren und Bodenproben falsch negative Ergebnisse lieferten, da im Gegenzug positive Ergebnisse aus den Wasser-, Serum- und Urinproben erhalten wurden.

Boom et al. beschreiben (1990, 1991) eine Methode zur DNA-Extraktion mit Hilfe des chaotropen Agens Guanidinium Isothiocyanat (GuSCN) und Silica Partikeln. Auch diese Methode eignet sich für die Isolierung von Leptospiren-DNA, z.B. aus der Kultur, Urinproben, Samenflüssigkeit, Serum, Leber, Pankreas, Liquor,

Literatur

Kammerwasser, Gehirn, Niere und Herz (Bomfim et Koury, 2006; Brown et al., 1995, 2003; Gravekamp et al., 1993; Mérien et al., 1993, 1995, 2005; Mgode et al., 2006; Ooteman et al., 2006; Taylor et al., 1997; Wagenaar et al., 1994; Woo et al., 1997b). De Abreu Fonseca et al. (2006; Fonseca et al., 2006) nutzen die Methode zur Extraktion der DNA aus Urinproben von Menschen. Alleine 21% (7/33) der extrahierten Proben-DNA enthielten noch PCR-Inhibitoren und waren somit für die PCR nicht zu verwenden. Bal et al. (1994) modifizierten etwas das Protokoll nach Boom für die Extraktion von Leptospiren-DNA aus Urin und Serum vom Menschen und hatten mit PCR-Inhibitoren keine Probleme; allerdings bemerkten sie, dass nicht mehr als 50 ml Urin bzw. 1 ml Serum als Ausgangsprobe verwendet werden sollte. Eine andere Modifikation benutzen Gravekamp et al. (1993) und später auch Brown et al. (2003) für zahlreiche biologische Proben. Brown und seine Kollegen konnten anhand einer internen PCR-Kontrolle nur in drei Proben (7,5%) eine Inhibition feststellen. Inzwischen gibt es kommerziell erhältliche DNA-Extraktionskits nach der „BOOM Technologie“.

Die CTAB (CetylTrimethylAmmoniumBromid) Methode nach Sambrook et Russel (2001) bzw. nach Ausubel et al. (1995) wurde für die Gewinnung von Leptospiren-DNA aus Blut, Serum, Sperma, Leber und Nierenproben oder aus der Kultur verwendet (Amutha et al., 2007; Cheema et al., 2007; Masri et al., 1997; Woo et al., 1997a, 1997b, 1999). Sie eignet sich besonders gut für den Nachweis von DNA mit einem hohen Molekulargewicht.

Immer häufiger werden kommerziell erhältliche Testkits zur DNA-Extraktion verwendet (Espy et al., 2006; Schneeweiß et al., 2007). Zum Teil gibt es Firmen, die vollautomatische Extraktionssysteme anbieten. Der Vorteil bei einem Testkit ist die Standardisierung. Der Nachteil ist, dass häufig die Probenmenge auf das Kitsystem angepasst werden muss. Tabelle 8 gibt eine Übersicht über bisher verwendete Testkits verschiedener Firmen, wie sie in der Literatur zur Extraktion von Leptospiren-DNA aus biologischen Proben beschrieben werden.

Tabelle 8. Verwendung von kommerziell erhältlichen Kits für die DNA-Extraktion von Leptospiren

Extraktionskit	Firma	Proben	Quelle
NucliSENS®	BioMérieux	Urin, Kultur	Bomfim et Koury, 2006
Instagene Kit	Biorad	Niere, Plazenta	Awad- Masalmeh et al., 2004
Chelex® 100 Resin	Bio-rad	Urin	Taylor et al., 1997
GeneReleaser®	BioVentures	Urin, Blut, Serum	Acevedo-Whitehouse et al., 2003
Genomic DNA Purification Kit	Fermentas	Kultur	Tansuphasiri et al., 2006b
QuickGene™	Fujifilm	Urin, Harnblase	Masuzawa et al., 2006
GFX Genomic Blood DNA Purification Kit	GE Healthcare	Kultur	Silva et al., 2007
DNAzol	Invitrogen	Kultur	Neves et al., 2007; Palaniappan et al., 2005
E.Z.N.A.® Cell and Tissue Kit	Peqlab	Urin, Cervixtupfer, Milz, Niere, Leber, Kultur	Theodoridis, 2004

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Extraktionskit	Firma	Proben	Quelle
FastDNA [®] Kit	QBiogene	Niere, Leber	Vitale et al., 2005a
DNeasy [®] Tissue Kit	Qiagen	Gehirn, Niere, Leber, Lunge, Nabel, Kultur; Bauchmuskel, Pankreas, Serum, Kammerwasser, Urin, Glaskörper, Plazenta	Lohmann et al., 2000; Renesto et al., 2000; Resch et al., 2007; Segura et al., 2005; Vemulapalli et al., 2005
Genomic-tip 100/G	Qiagen	Kultur	Woo et al., 1997a, 1997b
Genomic-tip 20/G	Qiagen	Kultur	Ciceroni et al., 2002
QIAamp [®] DNA Blood Kit	Qiagen	Blutkultur	Arzouni et al., 2002
QIAamp [®] DNA Mini Kit	Qiagen	Blut, Plasma, Serum, „Buffy Coat“, Urin, Fetus, Lunge, Leber, Niere, Milz, Gehirn, Myokard, Thymus, Kultur, Wasser, Sperma	Cox et al., 2005; Ganoza et al., 2006; Kik et al., 2006; Kim et al., 2006; Kositanont et al., 2007a; Léon et al., 2006; Levett et al., 2005; Mérien et al., 2005; Morey et al., 2006; Smythe et al., 2002a; Slack et al., 2006a; Talpada et al., 2003; Tansuphasiri et al., 2006b; Vitale et al., 2005a; Woo et al., 1997b
High Pure PCR Template Purification Kit	Roche	Kultur, Blut, Plasma, Serum, Urin	Kawabata et al., 2001; Slack et al., 2006a
UNIQ-10 Column Genome DNA Extraction Kit	Shanghai Sangon	Kultur, Wasser	Zou et al., 2007
Anansa [®] Fast ,n' Easy Genomic DNA Purification Kit	Tebu-bio	Kultur	Hartskeerl et al., 2004; Machang'u et al., 2004; Mgode et al., 2006; Rossetti et al., 2005

Die DNA-Menge und -Reinheit kann nach der Extraktion photometrisch (260 nm/280 nm) bestimmt werden (de Abreu Fonseca et al., 2006; Fonseca et al., 2006; Liu et al., 2006; Millar et al., 1987a; Parma et al., 1997b; Straube, 2007; Tansuphasiri et al., 2006a; Woo et al., 1997b). Eine andere Möglichkeit besteht in einem semiquantitativen Vergleich der Fluoreszenz des DNA-Extraktes, gegen einen DNA-Standard auf einem mit Ethidiumbromid gefärbtem Agarosegel (Cheema et al., 2007; Machang'u et al., 2004; Mgode et al., 2006; Scarcelli et al., 2003; Veloso et al., 2000; Woo et al., 1997b).

2.5.2 Konventionelle PCR

Eine konventionelle PCR dient lediglich der Vermehrung von DNA-Fragmenten, erlaubt für sich alleine genommen jedoch keine Ergebnisauswertung. Es schließt sich post PCR immer ein zweiter Schritt an, um das Produkt zu visualisieren und zu verifizieren (Powledge, 2004). Im Folgenden werden einige repräsentative Ergebnisse aus der Anwendung der PCR in der Leptospirosediagnostik dargestellt; diese Auflistung und auch die anschließende Darstellung in Tabelle 9 ist nicht

Literatur

vollständig, da inzwischen weltweit sehr viele verschiedene PCR-Protokolle sowohl für die Diagnostik, als auch für Fragestellungen in der Forschung, entwickelt worden sind.

Fonseca et al. (2006) verglichen die Anwendung der Primer G1/G2 sowie LP1/LP2 anhand von Blut- und Urinproben von 33 Patienten mit bestätigter Leptospirose mittels MAT und/oder der Blutkultur. Ihre Empfehlung aus dieser Untersuchung war stets beide Proben, Urin und Blut, der Patienten zu untersuchen und auch stets mit beiden Primerpaaren, jedoch in separaten Reaktionsansätzen, eine PCR durchzuführen. Mit dieser Methode erreichten sie immerhin eine Sensitivität von knapp 63,6%. Wurden dagegen nur Blut- oder nur Urinproben untersucht, so konnte lediglich bei 42% der Patienten Leptospiren-DNA nachgewiesen werden. Die PCR wurde so konzipiert, dass keines der beiden Primerpaare Leptospiren-DNA der Genospezies *L. kirschneri* erkennen konnte. Wurden beide Proben alleine mit den G1/G2 Primern untersucht, so waren 57,6% der Patienten positiv im Vergleich zu 33,3% wenn die Proben nur mit den LP1/LP2 Primern untersucht wurden. Dieser Unterschied ergibt sich aus der Tatsache, dass die LP1/LP2 Primer nur Leptospiren-DNA der Genospezies *L. interrogans* detektieren können.

Eine weitere Untersuchung dieser Arbeitsgruppe (de Abreu Fonseca et al., 2006) an Serum- und Urinproben von 60 an Leptospirose erkrankten Patienten vergleicht die Sensitivität und Spezifität von MAT, SAT („Slide Agglutination Test“, kommerziell erhältlicher Testkit), IgM ELISA und PCR (G1/G2 + LP1/LP2) zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Probennahme (3 - 8 Tage, 9 - 14 Tage und 15 - 42 Tage nach Auftreten der Symptome). Die höchste Sensitivität (79,3%; 100%; 88,9%), doch niedrigste Spezifität (89,1%) zeigt der IgM ELISA zu allen Zeitpunkten; umgekehrt verhält sich die PCR mit stets der geringsten Sensitivität (62%; 72,2%; 44,4%) aber einer unschlagbaren Spezifität (100%). Die Empfehlung aus dieser Studie: Stets ein indirektes Testverfahren (MAT oder ELISA) mit der PCR zu kombinieren, dann erreicht man die höchste Nachweisrate (93% bis 100%).

Bal et al. (1994) waren sehr zufrieden mit der Anwendung der G1/G2 Primer für die Untersuchung von Urin und Serum von Leptospirose erkrankten Menschen. Ihnen gelang bereits von Urinproben, welche innerhalb der ersten Erkrankungswoche gewonnen wurden, DNA pathogener Leptospiren nachzuweisen. Bei einem Patienten war die klinisch manifeste Leptospirose über ein Jahr her. Er wurde damals mit Doxycyclin, Amoxicillin und Penicillin behandelt. Nun konnte in seinem Urin trotzdem DNA pathogener Leptospiren mittels PCR detektiert werden. Da die G1/G2 Primer Leptospiren der Genospezies *L. kirschneri* nicht erkennen, wurde zur Sicherheit stets eine Kontroll-PCR mit den B64-I/B64-II Primern durchgeführt. Neben der PCR wurden von 15 Urinproben auch eine Kultur angelegt. Von zwölf mit der PCR positiven Proben wuchsen nur in fünf Ansätzen auch Leptospiren. Mérien et al. (1995) gelang es noch nach 56 Tagen seit Beginn der Symptome Leptospiren-DNA im Blut eines Patienten nachzuweisen, trotz Behandlung mit Ampicillin. Eine kulturelle Anzucht bestätigte im Nachhinein die Vitalität der Bakterien.

Bei einer post mortem Analyse Leptospirose erkrankter Patienten erwies sich die PCR (20%) weitaus sensitiver als die Kultur (3%) sowie die direkte Immunfluoreszenz (11%). Dabei konnte der Pathogenese einer Leptospirose sowie

dem Krankheitsbild folgend, tatsächlich in mehreren Organen Leptospiren-DNA detektiert werden. Die Notwendigkeit die G1/G2 Primer mit einem anderen Primerpaar zu kombinieren, zeigte sich bei einem Patienten, der für Gehirn, Pankreas, Niere und Herz positiv mit den B64-I/B64-II Primern war. Bei einem anderen Patienten gelang zu Lebzeiten, sowie post mortem kein Nachweis spezifischer Antikörper mit MAT oder ELISA (IgG/IgM), aber der direkte Erregernachweis mit Kultur, Immunfluoreszenz sowie PCR (G1/G2) in Kammerwasser, Liquor respektive Gehirn, Leber und Pankreas (Brown et al., 2003). Ob die G1/G2 Primer nur pathogene Leptospiren mit Ausnahme von *L. kirschneri* detektieren hängt vom PCR-Protokoll ab. Wird eine niedrige Annealingtemperatur von +51°C verwendet, so kann DNA selbst von *L. biflexa*, *L. meyeri* und natürlich von *L. kirschneri* amplifiziert werden. Obwohl die elektrophoretische Mobilität der PCR-Produkte suggeriert, dass sich die Fragmentgrößen zwischen 260 bp und 320 bp bewegen, zeigten Sequenzierungen für jedes Fragment eine Länge von 285 bp (Gravekamp et al., 1993; Oliveira et al., 1995, 2003; Ooteman et al., 2006).

Die PCR ist erstmals in der Lage aufzuzeigen, mit wie vielen Tieren der Mensch eigentlich Umgang hat, die symptomlos chronische Ausscheider von Leptospiren sind. Eine Urinuntersuchung von 500, scheinbar gesunden Hunden in der USA konnte bei 41 (8,2%) Hunden eine Leptospirurie detektieren. Nachforschungen brachten lediglich bei vier Hunden klinische Veränderungen im Sinne einer Leptospirose ans Tageslicht (Harkin et al., 2003b). Antikörperuntersuchungen erlauben meist keine Aussage über den aktuellen Status einer Infektion; zwar zeigen weltweit Untersuchungen an Schweinen und Rindern eine recht hohe Seroprävalenz, doch welche Tiere die eigentlichen Ausscheider sind, lässt sich nur mittels PCR schnell und sicher feststellen. Talpada et al. (2003) untersuchten auf einem Schlachthof von Texas den Urin von 300 Rindern aus verschiedenen Farmen mittels PCR unter Verwendung der G1/G2 Primer; Serumproben wurden in der MAT auf agglutinierende Antikörper geprüft. Alleine 35% der Urinproben waren positiv; von diesen 106 Tieren wiesen nur 44% (47) einen MAT-Titer von $\geq 1:100$ auf.

Acevedo-Whitehouse et al. (2003) beschrieben die praktische Anwendung der PCR für die Untersuchung von Blut-, Serum- und Urinproben Kalifornischer Seelöwenwelpen an der mexikanischen Küste. Sie konnten in sechs Urin-, zwei Blut- und einer Serumprobe DNA für *L. interrogans* nachweisen. Diese Tiere zeigten keine klinischen Erscheinungen. Mittels MAT konnten bei den Tieren mit Leptospirämie keine agglutinierenden Antikörper gefunden werden, obwohl die Seroprävalenz (1:25 bis 1:50) ansonsten bei 54% lag und zwar hauptsächlich für *L. interrogans* Serovar Cynopteri und Pomona. Da auch sonst in den untersuchten Seelöwenpopulationen keine klinischen Hinweise für eine Leptospirose bestanden, vermuteten die Autoren, dass die erhobenen Befunde dafür sprechen, dass diese Seelöwen für die Leptospiren als Reservoirwirte dienen (Heath et Johnson, 1994). Sie bedauerten die geringe Sensitivität der PCR (Wagenaar et al., 2000), nachdem nur mehr als 50 Leptospiren pro ml Urin nachweisbar wären.

Das Lipoprotein 32 kDa (LipL32, p32, Hap1 = „Hemolysis associated protein“ 1) ist das häufigste Lipoprotein der äußeren Membran pathogener Leptospiren. Es wird während einer Infektion exprimiert und löst eine Immunantwort gegen heterologe

Literatur

Serovare aus (Babu et al., 2006; Biswas et al., 2005; Branger et al., 2001; Fernandes et al., 2007; Flannery et al., 2001a; Haake et al., 2000, 2004; Lee et al., 2000; Lüdtke et al., 2003; Yang et al., 2002). Die Proteinsequenz ist hoch konserviert. Innerhalb der Nucleotidsequenz gibt es jedoch Unterschiede (bis 11,3%). Da zumeist die dritte Base eines Kodons variiert, wird während der Translation die gleiche Aminosäure synthetisiert (Amutha et al., 2007; Bomfim et Koury, 2006; Dey et al., 2007; Haake et Matsunaga, 2005). Für eine repräsentative Erstellung phylogenetischer Stammbäume innerhalb der Genospezies reichen die Unterschiede wahrscheinlich nicht aus. Es sei denn man kombiniert die Analyse als „Multi Lokus“ Sequenzierung mit mehreren Genabschnitten auf dem Bakteriengenom (Ahmed et al., 2006). Eine LipL32 PCR mit konventionellen Primern entwickelten Awad-Masalmeh et al. (2002, 2004). Es gelang ihnen aus Nieren (0,1 g) von Schweinen, Rotwild und Mäusen, Urin (10 ml) von Schweinen und der Plazenta (0,1 g) von Rindern und Schweinen, DNA pathogener Leptospiren nachzuweisen. Insgesamt waren so 50% der Proben (85/169) von meist verdächtigen Betrieben (Abort, MAT-Titer) mittels PCR positiv, im Gegensatz zu lediglich 4 erfolgreichen kulturellen Isolierungen aus Mausnieren. Inzwischen existieren zahlreiche Primerpaare für die LipL32 Sequenz für allerlei molekularbiologische Anwendungen (Bomfim et al., 2007; Cheema et al., 2007; Dey et al., 2007; Jouglard et al., 2006; Tansuphasiri et al., 2006a; Zhang et al., 2005). Die Firma Adiagene (Saint Briec, Frankreich) bietet für die veterinärmedizinische Diagnostik beim Schwein und Rind einen PCR Kit an (Branger et al., 2005; Léon et al., 2006).

Den Vorteil der LipL32 PCR, nämlich mit den Primern eine Gensequenz nachzuweisen, die ein Lipoprotein der äußeren Membran kodiert, das direkt in die Pathogenese und Immunantwort virulenter Leptospiren involviert ist, nutzen auch die LipL21 und die LipL41 PCR (Cheema et al., 2007; Cullen et al., 2003; Matsunaga et al., 2002). Virulenzfaktoren, deren Gensequenz ausschließlich bei pathogenen Leptospiren vorkommen, sind die „immunoglobulin-like“ Proteine LigA und LigB. Das aminoternale Ende ist über 1890 bp konserviert, während das carboxyterminale Ende variabel ist (Croda et al., 2007; Matsunaga et al., 2003; Palaniappan et al., 2002, 2004, 2005).

Die bis hier beschriebenen PCR-Anwendungen werden ausschließlich mit einem Primerpaar durchgeführt. Befinden sich in einem Reaktionsansatz aber mehrere Primerpaare zur gleichzeitigen Detektion verschiedener Zielsequenzen, so spricht man von einer multiplex PCR. Mit einer multiplex PCR lassen sich beispielsweise pathogene und saprophytäre Leptospiren direkt unterscheiden, eine interne Kontrolle mitamplifizieren und/oder ein vorhandener DNA-Pool gleich auf mehrere Zielsequenzen möglicher Krankheitserreger untersuchen. Die Vorteile einer multiplex PCR liegen demnach auf der Hand: Es wird Zeit, Geld, und Probenmaterial gespart. Doch liegt der Aufwand, eine solche PCR zu entwickeln, weitaus höher als bei einer simplex (ein-fachen) PCR. Die Kunst ist es, die Primer so aufeinander abzustimmen, dass weder die Spezifität noch die Sensitivität für jedes der multiplex DNA-Zielfragmente darunter leiden (Branger et al., 2005; Cai et al., 2002; Dabil et al., 2001; Dworkin et al., 2002; Léon et al., 2006; Parma et al., 1997b; Richtzenhain et al., 2002; Sugathan et Varghese, 2005; Tansuphasiri et al., 2006a).

Wählt man das PCR-Produkt als „Template“ (Probe) für eine zweite PCR und benutzt hierfür Primer, die innerhalb des PCR-Produktes binden können, so bezeichnet man dieses Verfahren als nested PCR. Es wird ein DNA-Fragment amplifiziert, welches prinzipiell kleiner ist, als die „Template“-DNA. Mit Hilfe der nested PCR lässt sich das DNA-Fragment aus der ersten PCR verifizieren. Zugleich wird die Sensitivität gesteigert (Bomfim et al., 2007; Chu et al., 1998; Faber et al., 2000; Ganoza et al., 2006; Jouglard et al., 2006; Masri et al., 1997; Mérien et al., 2005; Murgia et al., 1997). Zum Beispiel entwickelten Kim et al. (2006) eine duplex/nested PCR zum Nachweis von *Brucella* spp. (virB2 Gen) und *Leptospira* spp. (16S rRNA Gen) in Samenflüssigkeit von Hunden, die für die künstliche Befruchtung vorgesehen war. Kositanont et al. (2007a) beschreiben die Möglichkeit mit einer semi-nested/duplex PCR zwischen pathogenen und saprophytären Leptospiren zu unterscheiden; dazu wurde für die erste PCR ein Primerpaar gewählt, das für alle *Leptospira* spp. einen Sequenzabschnitt des 23S rRNA Genes amplifiziert. In einer zweiten PCR wurden der Rückwärtsprimer („reverse“ Primer) der Ersten und zwei neue Vorwärtsprimer („forward“ Primer) verwendet. Im Vergleich zum Kulturansatz aus Rattennieren erzielte die PCR eine Sensitivität von 98,6%, bei 100%iger Spezifität. Allerdings konnten mit den nested Primern für pathogene Leptospiren auch für *Staphylococcus aureus* ein PCR-Produkt passender Größe gebildet werden; einzig die Restriktionsanalyse mit *SacI* zeigte auf, dass es sich hierbei nicht um ein spezifisches Produkt handelte.

Tabelle 9. Übersicht einiger Primer, die Anwendung in der Untersuchung biologischer Proben finden

Zielsequenz	Bezeichnung	Primer 5' - 3'	PCR-Produkt bp	Anmerkung
Quelle				
flaB	L-flaB-F1	tctcaccgttctctaaagttcaac	793	pathogene
	L-flaB-R1	ctgaattcggttcatattggcc		<i>Leptospira</i> (L.)
Kawabata et al., 2001; Masuzawa et al., 2006				
gyrB	2For	tgagccaagaagaacaagctaca	502	pathogene L.
	504Rev	matggttccrctttccgaaga		
Slack et al., 2006a				
la1137 (LAG42)	La1137F	ctgactcgtcctaccgctcaa	573	pathogene L.
	La1137R	ttggaacatcgccctaacg		
Liu et al., 2006				
la1937	La1937F	gaccagtgaacgtgggaac	435	pathogene L. mit
	La1937R	cgtagtgggtatgggcattt		Einschränkung
Liu et al., 2006				
la3231	La3231F	caggatatatttgagcgagca	409	pathogene L. mit
	La3231R	tttcgatttctgtttttcca		Einschränkung
Liu et al., 2006				

Literatur

Zielsequenz Quelle	Bezeichnung	Primer 5' - 3'	PCR-Produkt bp	Anmerkung
la3825	La3825F La3825R	cgctttcgttcatgacaat cgaagaactgccagtgtga	490	pathogene <i>L.</i> mit Einschränkung
Liu et al., 2006				
la4130	La4130F La4130R	aagtttaaccttcgcatttga cgcaatgaattccaattacc	410	pathogene <i>L.</i> mit Einschränkung
Liu et al., 2006				
LigA und LigB	Lig1 Lig2	tcaatcaaaacaaggggct acttgcattggaaattgagag	468	pathogene <i>L.</i> mit Einschränkung
Palaniappan et al., 2005				
LigA und LigB	LigConF Sonde (FAM- TAMRA) LigConR	ccgaatattcctctcggaaa cgctaattcaaaacaacgg aaggctgctggagtaacgat	230	pathogene <i>L.</i> mit Einschränkung
Palaniappan et al., 2005				
LipL21		cgcggtcgacatgatcaatagacttatagctc cgcgctgcagttattgttgaaacctcttg	561	pathogene <i>L.</i>
Cheema et al., 2007				
LipL32	<i>lipL32</i> F <i>lipL32</i> R	cgcttggtgctttcggtggt ctcaccgatttcgcctgttggg	264	pathogene <i>L.</i>
	<i>lipL32</i> F1 <i>lipL32</i> R1	ttctgagcaggacacaatccc ctccatttcagcgattacgg	183	nested PCR
Jouglard et al., 2006				
LipL32		gtcgacatgaaaaacttgcattttg ctgcagtacttagtcgctcagaagc	756	pathogene <i>L.</i>
Cheema et al., 2007				
LipL32	Internal 1 Internal 2	gacggtttagtcgatggaaac gggaaaagcagaccaacaga	497	pathogene <i>L.</i>
Bomfim et Koury, 2006; Haake et al., 2000				
LipL32	Adia214 [®] Adia215 [®]	gcaagcattaccgcttgtgg tgttggggaaatcatacgaac	262	pathogene <i>L.</i>
Branger et al., 2005				
LipL32	Lep3 Lep4	aagaatgctgcccattatgc ccaacagatgcaacgaaaga	279	pathogene <i>L.</i>
Tansuphasiri et al., 2006a				

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zielsequenz	Bezeichnung	Primer 5' - 3'	PCR-Produkt bp	Anmerkung
Quelle				
LipL32		cgcgctgcagttacttagtcgctcagaag cgcggtcgacgctttcgggtgctgccaagc ctatgtttggattccttgc	756 574	pathogene <i>L.</i> semi-nested PCR zu Primer 1
Amutha et al., 2007				
LipL32	U377 D750	gcaaccccagaagaaaaatcaatg agcgggctcacacctggaata	374	pathogene <i>L.</i>
Awad-Masalmeh et al., 2002, 2004				
LipL32	LipL32-270F LipL32-692R	cgctgaaatgggagttcgtatgatt ccaacagatgcaacgaaagatccttt	423	pathogene <i>L.</i>
Levett et al., 2005				
23S rRNA	L737 L1218 AP1053 (FITC) AP1075 (Cy5)	gacccgaagcctgtcgag gccatgcttagtcccgattac ccagaccgtcgtttaaggccc aaagttcatgctaagtggcaaggatgt	482	alle <i>L.</i> Sonden spezifisch für pathogene <i>L.</i>
Harkin et al., 2003a; Léon et al., 2006; Woo et al., 1997b				
23S rRNA	L737 Sonde (FAM- TAMRA) L1218	gacccgaagcctgtcgag ccctatcaaactcgaataccgtaactcca gccatgcttagtcccgattac	482	alle <i>L.</i> Sonde spezifisch für pathogene <i>L.</i>
Woo et al., 1997a				
23S rRNA	LepF1 LepR1	gttaccaagcacaagattag tagtcccgattacattttc	874	alle <i>L.</i>
Kositanont et al., 2007a				
23S rRNA	PU1 LepR1	tatcagagccttttaatgg tagtcccgattacattttc	615	pathogene <i>L.</i>
Kositanont et al., 2007a				
23S rRNA	SU1 LepR1	ttagggtagcgtgta tagtcccgattacattttc	316	saprophytäre <i>L.</i>
Kositanont et al., 2007a				
16S rRNA	P1 P2	cgctggcggcgcgtcttaaa ttcaccgctacacctggaa	631	alle <i>L.</i> mit Einschränkung
Hookey, 1992; Nizamuddin et al., 2006				
16S rRNA	LP1 a1190	gatttttcgggtaagattcatt tgccttagacataaaggcca	1008	pathogene <i>L.</i>
Machang'u et al., 2004; Mgode et al., 2006; Perolat et al., 1998				

Literatur

Zielsequenz	Bezeichnung	Primer 5' - 3'	PCR-Produkt bp	Anmerkung
Quelle				
16S rRNA	LU	cggcgcgcttaaacatg	420	pathogene <i>L.</i>
	rLP	accatcatcacatygctgc		
Machang'u et al., 2004; Mgode et al., 2006; Perolat et al., 1998				
16S rRNA	Lepat 1	gagctctgggataacttt	330	pathogene <i>L.</i>
	Lepat 2	tcacatcgytgcttatfff		
Awad-Masalmeh et al., 2004; Machang'u et al., 2004; Mgode et al., 2006; Murgia et al., 1997				
16S rRNA	Lept16SF1	gtttgatcctggctcagaacta		alle <i>L.</i>
	Lept16SR1	ttcttaactgctgctcccgt		
Koizumi et al., 2003				
16S rRNA	Lep1	ggaactgagacacggtccat	430	alle <i>L.</i>
	Lep2	gcctcagcgtcagtttagg		
Tansuphasiri et al., 2006a				
16S rRNA	LeptoA	ggcggcgcgcttaaacatg	332	pathogene <i>L.</i>
	LeptoB	ttccccccattgagcaagatt		
Postic et al., 2000; Silva et al., 2007; Vemulapalli et al., 2005				
16S rRNA	Lepto E1	agggaaaaataagcagcagatg	571	pathogene <i>L.</i>
	Lepto E2	attccactccatgtcaagcc		
		gaaaactgctggctcaaac	370	nested PCR
		gctccaccgcttgtgc		
Faber et al., 2000; Vitale et al., 2005a				
16S rRNA	Lep1	tggaggaacaccagtgccgaaggc	243	pathogene <i>L.</i>
	Lep2	cacatgctccaccgcttgtgcgga		
	LepN-1	ctggcctaaaactgacgctga	170	nested PCR
	LepN-2	ctttcactcttgcgagcatag		
Kim et al., 2006				
16S rRNA	A	ggcggcgcgcttaaacatg	331	alle <i>L.</i> mit
	B	ttccccccattgagcaagatt		Einschränkung
	C	caagtcaagcggagtagcaa	289	nested PCR
	D	cttaactgctgctcccgtgta		
Brandes et al., 2007; Bovet et al., 1999; Heinemann et al., 1999, 2000; Kumar et al., 2001; Mérien et al., 1992, 1993, 1995, 2005; Noubade et al., 2002; Richtzenhain et al., 2002; Romero et al., 1998; Scarcelli et al., 2003; Schönberg et al., 2005; Suwimonteerabutr et al., 2005; Wagenaar et al., 2000				
16S rRNA	LFB1-F	cattcatgtttcgaatcatttcaaa	331	pathogene <i>L.</i>
	LFB1-R	ggcccaagttccttctaaaag		
Mérien et al., 2005				
16S rRNA	Sapro 1	agaaattgtgctaataccgaatgt	240	saprophytäre <i>L.</i>
	Sapro 2	ggcgtcgtgcttcagctttcg		

Zielsequenz	Bezeichnung	Primer 5' - 3'	PCR-Produkt bp	Anmerkung
Quelle				
Léon et al., 2006; Machang'u et al., 2004; Mgode et al., 2006; Murgia et al., 1997				
16S rRNA	B64I	actaactgagaaactctac	563	alle <i>L.</i> mit
	B64II	tccttaagtgcgaacctatga		Einschränkung
Bal et al., 1994; Brown et al., 1995, 2003; Fonseca et al., 2006; Gebriel et al., 2006; Gravekamp et al., 1993; Hartskeerl et al., 2004; Lucchesi et al., 2004; Machang'u et al., 2004; Mérien et al., 1995; Mgode et al., 2006; Morgan et al., 2002; Ooteman et al., 2006; Ramadass et al., 1992; Rossetti et al., 2005; Sugathan et Varghese, 2005; Vemulapalli et al., 2005				
16S rRNA	Lepto F	cccgcgtccgattag	87	pathogene <i>L.</i>
	Sonde(FAM-TAMRA/BHQ1)	ctcaccaaggcgacgatcggtagc		
	Lepto R	tccattgtggccgracac		
Cox et al., 2005; Ganoza et al., 2006; Kasper et Lunn, 2006; Slack et al., 2006a; Smythe et al., 2002a				
„Preprotein translocase SecY subunit“	G1	ctgaatcgctgtataaaagt	285	alle <i>L.</i> mit
	G2	ggaaaacaaatggtcggaag		Einschränkung
	LepF1	cgaataaaataacgcatgatacca	174	nested PCR
	LepB1	aaagtaaacggcgcgaac		
Bal et al., 1994; Bomfim et Koury, 2006; Brown et al., 1995, 2003; Cai et al., 2002; Cheema et al., 2007; Chu et al., 1998; Fonseca et al., 2006; Gebriel et al., 2006; Gravekamp et al., 1993; Hartskeerl et al., 2004; Kee et al., 1994; Kik et al., 2006; Lucchesi et al., 2004; Machang'u et al., 2004; Mgode et al., 2006; Morgan et al., 2002; Noubade et al., 2002; Oliveira, et al. 1995, 2003; Ooteman et al., 2006; Othman et al., 2007; Palaniappan et al., 2005; Rossetti et al., 2005; Sugathan et Varghese, 2005; Talpada et al., 2003; Vemulapalli et al., 2005				
„TPR-repeat-containing-protein“	LP1	atacaacttaggaagagc	274	pathogene <i>L.</i> mit
	LP2	gcttctttgatatatagca		Einschränkung
Fonseca et al., 2006; Geisen et al., 2007; Gravekamp et al., 1993; Kee et al., 1994; Palaniappan et al., 2005;				

2.5.3 „Real-time“ PCR

Die erste „real-time“ PCR zum Nachweis pathogener Leptospiren wurde 1997 durch Woo et al. beschrieben, und beruhte auf dem Prinzip des FRET™ („Fluorescence-Resonance-Energy-Transfer“) Systems. Zunächst entwickelten sie zwei Primer (L737/L1218), wie sie auch für die konventionelle PCR geeignet wären. Diese sind spezifisch für die 23S rDNA aller Leptospirenspezies und generieren ein PCR-Produkt von 482 bp. Schließlich wurden zwei Sonden (Oligonucleotide) entwickelt welche komplementär zum „sense“ Strang, in nächster Nähe zum „antisense“ Primer, ausschließlich die Sequenz pathogener Leptospiren detektieren sollten. Beide Sonden liegen in direkter Nachbarschaft zueinander, mit nur einer Base zwischen ihnen. Das 3' Ende der ersten Sonde trägt ein Fluorescein Isothiocyanat (FITC), das 5' Ende der zweiten Sonde war mit dem Fluorophor Cy5 (Carbocyanin 5) markiert und deren 3' Ende phosphoryliert, um eine Extension zu verhindern. Befindet sich die

Literatur

DNA pathogener Leptospiren in einem Reaktionsansatz, so können beide Sonden an die Zielsequenz binden. Die Energie des FITC (Donor) wird auf das Cy5 (Akzeptor) übertragen; darüber emittiert Cy5 Licht einer bestimmten Wellenlänge (670 nm). Mit zunehmender Amplifikation der Zielsequenz steigt pro Zyklus auch die Fluoreszenzemission von Cy5. Diese Fluoreszenzsignalzunahme wird in direkter Echtzeit („real-time“) gemessen (Cockerill et Smith, 2002; Espy et al., 2006). Woo et al. führten die PCR in einem LightCycler[®] aus; für 45 PCR-Zyklen brauchten sie nur 18 Minuten, bei einer Sensitivität von maximal 100 Leptospiren und einer Spezifität von 100%. Bei einem Nachweis der 23S rDNA von Leptospiren gilt es zu berücksichtigen, dass zwei Kopien im Leptospirengenom vertreten sind (Baburaj et al., 2006; Caplin et al., 1999; Cardullo et al., 1988; Fukunaga et Mifuchi, 1989; Ju et al., 1995; Wittwer et al., 1997; Woo et al., 1997b). Wurden die PCR-Produkte in einer Agarosegel-Elektrophorese überprüft, so fand sich eine deutliche Bande bei 482 bp; doch auch unspezifische Produkte mit einem sehr kleinen Molekulargewicht, als Hinweis auf Primerdimerformationen, sowie PCR-Produkte mit einem sehr hohen Molekulargewicht waren detektierbar. Je mehr Leptospiren-DNA und auch Fremd-DNA, wie zum Beispiel bei Blutproben, extrahiert wurde, desto deutlicher waren die unspezifischen Produkte im Agarosegel. Zwar konnten sie in der „real-time“ PCR nicht erkannt werden, doch bestand möglicherweise ein Zusammenhang zwischen der Sensitivität, die bei Blutproben nur bei 10.000 Leptospirenzellen lag, und der Bildung unspezifischer PCR-Produkte (Woo et al., 1997a, 1997b).

Slack et al. (2007a) beschrieben die Anwendung eines TaqMan[™] „Assay“, modifiziert nach Smythe et al. (2002a), zum Nachweis eines Abschnittes der 16S rRNA Sequenz pathogener Leptospiren. Im Vergleich zur Kultur wurde eine klinische Sensitivität von 96,4% bei einer Spezifität von 99,5% erreicht, nachdem bei einem negativen Kulturergebnis einmal die PCR positiv war und einmal die Kultur positiv bei einem negativem PCR-Ergebnis. Das TaqMan[™] System nutzt eine Sonde, die an ihrem 5' Ende mit einem Fluorophor (hier: FAM, 6-Carboxy-fluorescein) und am 3' Ende mit einem Quencher Molekül (Smythe: TAMRA, 6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin; Slack: BHQ1, Black Hole Quencher[®] 1) markiert ist. Die räumliche Nähe des Quencher zum Fluorophor sorgt dafür, dass bei Anregung des Fluorophores mit kurzwelligem Licht (FAM: 488 nm) ein Energietransfer auf das Quencher Molekül statt findet (Espy et al., 2006; Mackay, 2004). Die Black Hole Quencher[®] haben keine eigene Fluoreszenz, vielmehr wird die Energie als Wärme abgegeben; TAMRA hingegen führt die aufgenommene Energie bei einer Wellenlänge von 580 nm wieder ab. Der „real-time“ PCR Thermocycler wird jedoch so eingestellt, dass vornehmlich die Emission von FAM (518 nm) detektiert wird und deren Fluoreszenzintensität ausgewertet wird. Dafür muss das Fluorophor vom Quencher getrennt werden. In der Annealing- oder Hybridisierungsphase eines PCR-Zyklus lagert sich die TaqMan[™] Sonde an ihre Zielsequenz an. Die üblichen zwei Primer, wie sie in jeder konventionellen PCR Verwendung finden, binden spezifisch; die DNA-Polymerase erkennt das 3' Ende der Primer und beginnt mit der Elongation, sprich den komplementären Strang der Matrize zu synthetisieren. Irgendwann trifft die DNA-Polymerase auf das 5' Ende der Sonde und nun ist es von Bedeutung, dass die Polymerase eine 5' → 3' Exonukleaseaktivität, wie zum Beispiel die *Taq* DNA-

Polymerase, besitzt. Dadurch spaltet sie das Fluorophor von der Sonde ab. Die Fluoreszenzintensität steigt nun mit jedem Zyklus, da je mehr PCR-Produkte gebildet werden, umso mehr freies Fluorophor unabhängig vom Quencher seine Energie abstrahlen kann (Cockerill et Smith, 2002; Kreuzer et al., 2000; Woo et al., 1998).

Smythe et al. (2002a) untersuchten den Einfluss verschiedener Blutsammelsysteme auf die gemessenen Ct („threshold cycle“) Werte in der TaqMan™ PCR. Dazu nahmen sie Blut mit insgesamt neun verschiedenen Kollektoren von einem gesunden Menschen, extrahierten jeweils eine Menge von 200 µl mit dem QIAamp® Mini Kit (Qiagen) und gaben davon etwas in den PCR-Ansatz, der eine definierte Menge an Leptospiren-DNA mit einem bekannten Ct-Wert enthielt. Das Ergebnis war eindeutig: Lithium Heparin Blut ist für eine PCR mit der verwendeten Extraktionsmethode nicht geeignet. Der Ct-Wert war um bis zu fünf Punkte nach rechts verschoben.

Segura et al. (2005) untersuchten mit der quantitativen „real-time“ PCR nach Smythe et al. (2002a) sieben Patienten, die unter schwerster, akuter Leptospirose mit Beteiligung der Lunge litten. Die Diagnose einer Leptospireninfektion wurde anhand der PCR, Kultur, MAT und IgM ELISA ermittelt. Sobald die Diagnose stand wurden die Patienten mit β-Lactamantibiotika (Penicillin, Ceftriaxon oder Amoxicillin) sowie symptomatisch behandelt. Fünf Patienten starben. Bei drei von ihnen waren noch keine Antikörper nachweisbar, jedoch eine Bakterienlast im Organismus von 10^5 bis 10^7 Leptospiren pro ml Serum bzw. Urin oder pro g Gewebe (Bauchmuskel, Niere, Lunge). Bei den zwei überlebenden Patienten konnten trotz Rückgang des MAT-Titers noch 60 Tage bzw. 141 Tage nach Beginn der Erkrankung zwischen 100 und 1.000 Leptospiren pro ml Urin mit der quantitativen „real-time“ PCR nachgewiesen werden.

Ganoza et al. (2006; Ganoza et Vinetz, 2006) verwendeten die quantitative „real-time“ PCR nach Smythe et al. (2002a) zur Bestimmung des Keimgehaltes in Wasserproben (50 ml) von Pfützen, Gossen, Regenwasser, sowie Flusswasser u.a., in einem Stadtzentrum (Marktplatz) und am Stadtrand (Wohngebiet) eines typischen Slumgebietes sowie einer ländlichen Gegend am peruanischen Amazonas. Im Stadtzentrum waren über 67% der Wasserproben positiv mit einem durchschnittlichen Keimgehalt von etwa 1.000 Leptospiren pro ml, im Wohngebiet waren etwa 33,3% positiv mit durchschnittlich 1.300 Leptospiren pro ml. Auf dem Land hingegen wiesen nur 25,4% Wasserproben DNA pathogener Leptospiren auf und auch der Durchschnittsgehalt war mit etwa 50 Leptospiren pro ml bedeutend niedriger. Die höchste Belastung fand sich dabei jeweils in den Gossen gefolgt von dem Flusswasser. War eine qPCR positiv, wurde die 16S rDNA dieser Leptospiren teilweise sequenziert; dabei wurden einige neue Leptospiren entdeckt, die bisher nicht kultiviert wurden und deren Pathogenität noch unbekannt ist (Haake, 2006).

Palaniappan et al. (2005) entwickelten eine TaqMan™ „real-time“ PCR für die konservierte Region der LigA und LigB Sequenz pathogener Leptospiren. Der Vorteil bei dieser PCR ist, dass pro Leptospire zwei Zielsequenzen amplifiziert werden und damit die Sensitivität der PCR indirekt erhöht wird. Der Nachteil ist, dass die Primer und Sonde zwar sehr spezifisch sind, wahrscheinlich aber nicht alle pathogenen Genospezies detektiert werden können. Die Arbeitsgruppe untersuchte die Menge an Leptospiren in der Niere nach einer experimentellen, intraperitonealen Infektion

Literatur

Syrischer Goldhamster mit 10^6 *L. interrogans* Serovar Pomona. Bereits am Tag null der Infektion konnten im Schnitt 1.400 Leptospiren pro 10 mg Nierenprobe detektiert werden. Die Bakterienlast stieg kontinuierlich und erreichte am Tag 21 post infectionem bereits etwa 88.500 Leptospiren pro 10 mg Nierengewebe.

Die Firma Adiagene (Saint Briec, Frankreich) bietet auf Basis der LipL32 Sequenz pathogener Leptospiren einen TaqMan™ „real-time“ PCR Kit für die veterinärmedizinische Diagnostik bei Schwein und Rind an. Eine andere „real-time“ PCR zum Nachweis der LipL32 Sequenz, auf Basis der SYBRGreen™ Detektion, beschreiben Levett et al. (2005). SYBRGreen™ I ist ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff d.h. er wird zwischen die doppelsträngigen DNA-Moleküle eingebunden; nach Anregung mit kurzwelligem Licht (etwa 488 nm) wird die Energie in Form von länger welligem Licht (etwa 520 nm) wieder emittiert. Je mehr PCR-Produkte gebildet werden, desto mehr Farbstoffmoleküle werden gebunden und damit steigt die Fluoreszenzintensität linear an (Monis et al., 2005; Wittwer et al., 1997). In dem Moment ist es nicht möglich zwischen der Bildung eines spezifischen oder unspezifischen PCR-Produktes zu unterscheiden. Jedes PCR-Produkt ist für sich genommen aber charakteristisch und unterscheidet sich von den Anderen durch seine Länge (bp), seine Sequenzabfolge und Struktur. Dies beeinflusst das Schmelzverhalten eines Doppelstranges. Jedes PCR-Produkt besitzt eine Temperatur, bei der die beiden komplementären DNA-Sequenzen optimal hybridisieren. Wird die Temperatur überschritten, dann trennen sich die beiden Stränge wieder voneinander, sie denaturieren. Die Schmelztemperatur (T_m) kurzer Fragmente, wie zum Beispiel von Primerdimeren ist niedriger als die Schmelztemperatur längerer Fragmente. Ist der PCR-Lauf beendet, z.B. nach 40 bis 50 Zyklen, wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Spezifität der PCR-Produkte zu determinieren (Woo et al., 1999). Dazu wird zunächst das Reaktionsgefäß erhitzt, d.h. die PCR-Produkte denaturieren, SYBRGreen™ I wird frei und das Fluoreszenzsignal der Lösung bildet das Hintergrundrauschen. Nach einem raschen Abkühlen steigt die Temperatur langsam wieder an, und während jedem Temperaturschritt, wird die Fluoreszenz gemessen. Die komplementären DNA-Stränge lagern sich langsam zusammen, SYBRGreen™ I interkaliert, und das Fluoreszenzsignal steigt an; bis die spezifische Schmelztemperatur des PCR-Produktes erreicht ist, die PCR-Produkte mit nunmehr steigender Temperatur wieder zerfallen und SYBRGreen™ I demnach auch wieder frei wird. Für jedes PCR-Produkt ist eine typische Schmelzkurve entstanden. Nichtsdestotrotz ist für eine „real-time“ PCR, welche die SYBRGreen™ Technologie benutzt, die Spezifität der Primer das Allerwichtigste. Levett et al. (2005) entwickelten daher Primer für die LipL32 Sequenz mit dem Vorteil, ausschließlich ein spezifisches PCR-Produkt der Länge 423 bp für pathogene *Leptospira* spp. zu erhalten (Gavin et al., 2005; LaRocque et al., 2005). Kleinere Sequenzunterschiede zwischen den Leptospirenspezies zeigen sich in dem unterschiedlichen Schmelzverhalten, mit einer Schmelztemperatur der PCR-Produkte zwischen $+82^\circ\text{C}$ bis $+86^\circ\text{C}$. Vorteile der SYBRGreen™ Technologie gegenüber anderen „real-time“ PCR-Verfahren wird in der kostengünstigen Durchführung und bei Auswahl eines geeigneten „Templates“ in einer möglichen Speziesdifferenzierung anhand der Schmelzkurvenanalyse gesehen. Dazu überprüften Mérien et al. (2005)

die Anwendung einer SYBRGreen™ „real-time“ PCR zum Nachweis eines Sequenzabschnittes der 16S rDNA pathogener Leptospiren in klinischen Proben. Bei 49% von Patienten mit Verdacht auf Leptospirose konnten Leptospiren im Serum nachgewiesen werden. Dabei ergänzten sich die PCR und MAT ganz gut, entweder war der eine und/oder der andere Test positiv. Die Durchschnittsmenge an Leptospiren pro ml Blut wurden mit 1.000 angegeben. Ein positives PCR-Ergebnis konnte 1 bis 13 Tage nach Beginn der Symptome erzielt werden. Die Varianz der Schmelztemperaturen erlaubte eine Unterscheidung von *L. interrogans* bzw. *L. santarosai* (83,4°C) zu *L. kirschneri* bzw. *L. noguchii* (84,4°C) zu *L. weilii* (85,2°C) zu *L. borgpetersenii* bzw. *L. alexanderi* (86,4°C), sofern diese Genospezies in die Untersuchung miteinbezogen wurden.

2.5.4 LUX™ PCR

Das Wort „LUX“ leitet sich nicht von der physikalischen Größe für Beleuchtungsstärke ab und kommt auch nicht aus dem Lateinischen von lux, lucis (f.) = das Licht, sondern steht für „Light Upon eXtension“. Patentiert von der Firma Invitrogen (www.invitrogen.com/) verbirgt sich hinter diesem Begriff eine Technologie für die Anwendung in der quantitativen „real-time“ PCR. Ähnlich wie bei der konventionellen PCR werden lediglich zwei Primer benötigt. An einem Primer, dabei ist es unerheblich ob ihm die Funktion des „sense“ oder „antisense“ Primers zukommt, ist an seinem 3' Ende, an der vorletzten oder zweitletzten Base, ein Fluorophor gekoppelt. Bei diesem Fluoreszenzfarbstoff handelt es sich z.B. um FAM (5(6)-Carboxyfluorescein), JOE (6-Carboxy-4',5'-dichloro-2',7'-dimethoxyfluorescein), HEX (Hexachloro-6-carboxyfluorescein), TET (4,7,2',7'-Tetrachloro-6-carboxyfluorescein) oder Alexa Fluor® 546. An dem 5' Ende des Primers befinden sich komplementär zum 3' Ende zusätzliche vier bis sechs Basen. Dadurch erhält der Primer die Möglichkeit durch Hybridisierung seiner beiden Enden eine Haarnadelstruktur („hairpin“) zu bilden. Bei dieser Formation und der Präsenz eines Guanin und/oder Cytosin am 3' Ende wird das Signal, welches von dem Fluoreszenzfarbstoff ausgehen könnte, unterdrückt (Abbildung 3). Der zweite Primer bleibt unmarkiert (Kusser et al., 2003; Nazarenko et al. 2002a, 2002b). Invitrogen bietet für die Entwicklung der LUX™ Primer ein Software Programm an: D-LUX™ Designer. Außerdem stehen auch schon eine ganze Reihe an kommerziell erhältlichen Primersets für die unterschiedlichsten Einsatzgebiete zur Verfügung. Die Anwendung der LUX™ PCR ist mit jedem Thermocycler möglich, der die Wellenlängen der Emissionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe messen kann (Espy et al., 2006). Während eines „real-time“ PCR-Laufes öffnet sich bei der Denaturierung die Haarnadelstruktur des LUX™ Primer. Dadurch entfällt die Quencherfunktion des 5' Endes. Im nächsten PCR-Schritt, der Hybridisierung, sucht sich der Primer seine komplementäre Sequenz. Entweder findet er im Reaktionsansatz seine Zielsequenz und bindet an diese, oder aber er bildet wieder die Haarnadelstruktur aus. Im letzten Schritt, der Elongation, erkennt die Polymerase das freie 3' Ende des an die Zielsequenz gebundenen LUX™ Primers und fängt an, das doppelsträngige PCR-Produkt zu bilden. Damit ist der LUX™ Primer in das PCR-

Literatur

Produkt eingebaut und der Fluoreszenzfarbstoff erreicht die maximale Emission. Dies ist der Moment an dem das Fluoreszenzsignal, als Ausdruck der Amplifikation eines PCR-Fragmentes, gemessen wird. Da der Primer unabhängig davon, wo er eingebaut wird, ein Signal abgibt, ist es notwendig die PCR-Produkte am Ende des Laufes durch eine Analyse der Schmelzkurve zu spezifizieren. Die Möglichkeit die LUX™ Primer mit verschiedenen Farbstoffen zu markieren, erlaubt auch die Anwendung einer multiplex „real-time“ PCR.

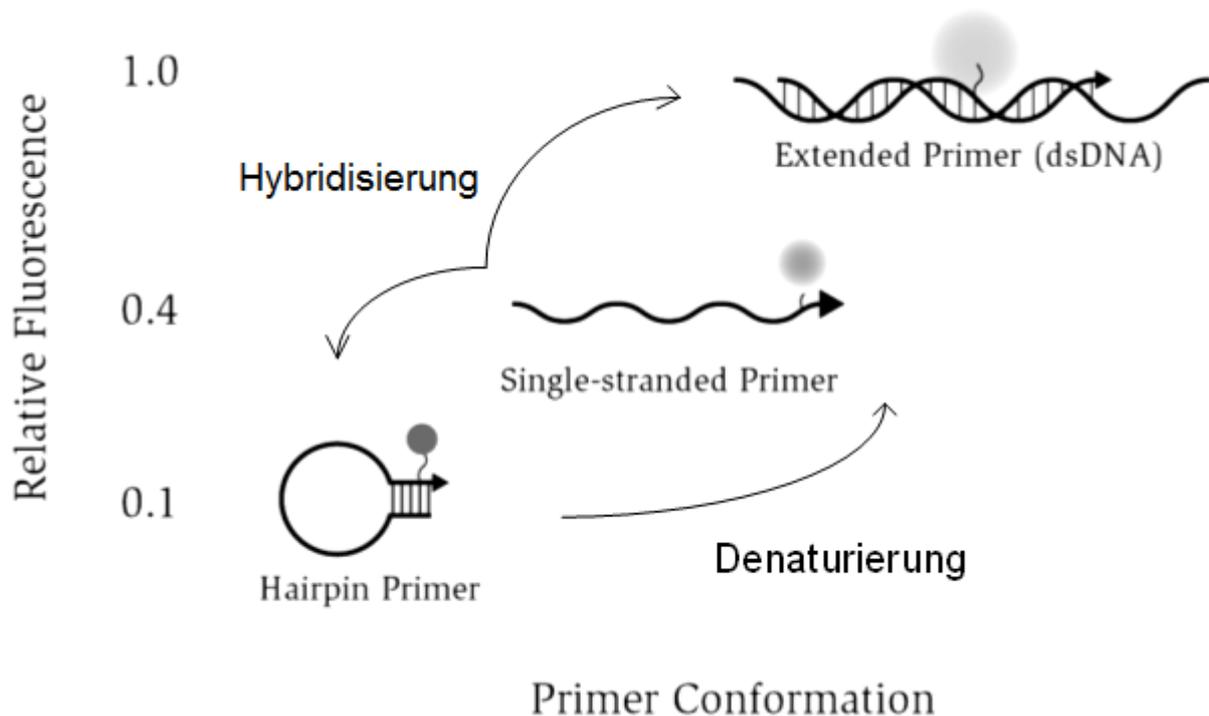


Abbildung 3. Mechanismus der LUX™ Primer, modifiziert nach einer Abbildung von Invitrogen

Die LUX™ Detektions Technologie findet zunehmend in der Forschung, zur Entwicklung von Medikamenten, für Genexpressionsanalysen, Biomarker Analysen, funktionellen Genomexperimenten (z.B. Bailey et al., 2005; Basile et al., 2005; Bernard, 2004; Blaney et al., 2005; Haltiner et al., 2004; Huitron-Resendiz et al., 2004; Jungebloud et al., 2007; Kovacs et al., 2004; Lowe et al., 2003; Ramirez et al., 2004; de Rozieres et al., 2004; Shinji et al., 2005) und molekularen Diagnostik Anwendung: beispielsweise zum Nachweis von aviären Influenzaviren (Kiss et al., 2006), Orthopoxviren (Aitichou et al., 2005), Newcastle Disease Viren (NDV, aviären Paramyxoviren 1, AMPV-1, Antal et al., 2007), Viren der transmissiblen Gastroenteritis (TGEV, Coronavirus, Chen et al., 2004), Humanen Immundefizienz Viren 1 (HIV-1, Rekhviashvili et al., 2006), *Vibrio* Spezies (Tracz et al., 2007), Genotypisierung von *Staphylococcus aureus* (Huygens et al., 2006), u.a.m. Der Vorteil gegenüber der Anwendung von interkalierenden Farbstoffen wie SYBRGreen™ I liegt in der höheren Spezifität. Der Vorteil gegenüber der Anwendung zweifach markierter Sonden liegt in dem günstigeren Preis der LUX™ Primer (McCrea et al., 2007). Doch auch ein Nachteil wurde bereits beschrieben (Li et Makrigiorgos, 2007): Damit die Funktion eines LUX™ Primers optimal

gewährleistet ist, benötigt er an seinem 3' Ende Guanin und/oder Cytosin Basen. Dies schränkt die Wahl des Primers ein.

2.5.5 Sensitivität

Die Sensitivität einer PCR wird vom Zeitpunkt der Probennahme an bis zur Visualisierung des PCR-Produktes von sämtlichen Teilschritten beeinflusst. Meist wird eine Empfindlichkeit der Methode von ≤ 10 Leptospiren angegeben (Awad-Masalmeh et al., 2004; Bal et al., 1994; Brown et al., 2003; Čermáková et al., 2005; van Eys et al., 1989; Gerritsen et al., 1991; Gravekamp et al., 1993; Hookey, 1992; Kositanont et al., 2007a; Levett et al., 2005; Mérien et al., 1992, 1995, 2005; Ooteman et al., 2006; Palaniappan et al., 2005; Slack et al., 2007a; Smythe et al., 2002a). Schwierig wird es, wenn in einer Veröffentlichung zwei Angaben gemacht werden, die nicht übereinstimmen können. So entspricht der Nachweis von 10^{-11} g DNA von extrahierten Leptospiren nicht dem Nachweis von 10 Leptospiren (Fonseca et al., 2006; Hookey, 1992). Rein rechnerisch entsprechen 10 pg vielmehr der DNA von etwa 2000 Leptospiren (Branger et al., 2005, Levett et al., 2005; Tansuphasiri et al., 2006a).

Die Sensitivität kann auf verschiedene Arten bestimmt werden. Beispielsweise kann man von einer bestimmten Menge an Kulturleptospiren ausgehen, diese in definierten Schritten verdünnen und dann die DNA der verschiedenen Verdünnungsstufen extrahieren (Bal et al., 1994; Branger et al., 2005; Ganoza et al., 2006; Gerritsen et al., 1991; Jouglard et al., 2006; Mérien et al., 2005; Ooteman et al., 2006; Palaniappan et al., 2005; Segura et al., 2005; Smythe et al., 2002a; Tansuphasiri et al., 2006a). Diese Methode birgt eine Gefahr der Unsicherheit. Leptospiren lagern sich gerne zusammen, daher kann eine Verdünnung ungenau sein. Hinzu kommt, dass bei der Extraktion wenige Leptospiren verloren gehen können. Die Sensitivität einer PCR wird in diesem Fall immer geringer sein, im Vergleich zu anderen Methoden (Kawabata et al., 2001; Kim et al., 2006; Levett et al., 2005). Schließlich kann man auch erst die DNA extrahieren und dann verdünnen. Meist wird dazu die Konzentration der DNA-Lösung vorher gemessen. Voraussetzung ist, dass die DNA nicht von biologischen Proben stammt, in die Kulturleptospiren hinein gemischt wurden (Branger et al., 2005; Gerritsen et al., 1991; Kositanont et al., 2007a; Levett et al., 2005; Ooteman et al., 2006; Tansuphasiri et al., 2006a; Woo et al., 1997b). Als dritte Methode kann das PCR-Produkt in einen Vektor ligiert und kloniert werden. So erhält man eine recht stabile Lösung an Plasmid-DNA. Über die Bestimmung der DNA-Konzentration kann auf die Anzahl an Plasmiden und damit Genomkopien in der Lösung rückgeschlossen werden (Palaniappan et al., 2005; Slack et al., 2007a).

Für die Bestimmung der Sensitivität ist es wichtig, die Zyklusbedingungen der PCR anzugeben. Es macht einen großen Unterschied, ob die Empfindlichkeit für 30 oder 40 PCR-Zyklen bestimmt wird. Veloso et al. (2000) beschreiben für ihre PCR nach nur 30 Zyklen eine Sensitivität von ca. 100 Zellen. Die einzelnen Zyklen sind aber ungewöhnlich lang. Dem gegenüber erreicht Woo et al. (1997b) mit 45 Zyklen

ebenfalls eine Sensitivität von 100 Zellen, allerdings bei einer Gesamt-Laufzeit von 18 Minuten.

2.5.6 Kontrollen

Positive Kontrollen sind wichtig um zu überprüfen, ob die Extraktion und PCR funktioniert hat. Die Präsenz von Positivkontroll-PCR-Produkten dient gleichzeitig als Gradmesser für positive Proben. Es gibt viele Möglichkeiten für die Platzierung und der Art einer positiven Kontrolle. Sie kann parallel zu den Proben geführt werden oder in jeder Probe enthalten sein. Dafür wird die Kontrolle entweder mit in die Reaktion hinein gemischt oder aber sie ist bereits über den natürlichen Weg in der Probe enthalten (Bal et al., 1994; Espy et al., 2006; Hoorfar et al., 2004; Gilsbach et al., 2006; Mackay, 2004; Nolte, 2004). Der Nachteil bei parallel laufenden Kontrollen ist, dass nur der Erfolg der Charge, aber nicht der Einzelerfolg bestimmt wird. Ein Beispiel für eine positive Extraktionskontrolle wäre das Mitführen einer Leptospirenkultur während der Extraktion. Der Vorteil ist, dass auch gleichzeitig eine positive PCR-Kontrolle vorliegt. Der Nachteil ist die Gefahr einer übertragbaren Kontamination auf die Proben, bereits während der Extraktion (Harkin et al., 2003a). Die Leptospiren, die in einer klinischen Probe enthalten sind, stellen im Vergleich zu anderen Zellen, wie den Wirtszellen oder kontaminierenden, schnell wachsenden Bakterien, eher den kleineren Anteil an extrahierter DNA dar. Untersucht man im Labor lediglich die Proben von einer Spezies zum Beispiel dem Menschen, so sind in jeder Probe auch Zellen vom menschlichen Organismus enthalten. Nach der Extraktion können mit universellen Primern für z.B. β -Aktin, einem „Housekeeping“ Gen, die Probe auf das Vorhandensein von DNA humaner Zellen in einer prä-PCR überprüft werden (de Abreu Fonseca et al., 2006; Čermáková et al., 2005; Fonseca et al., 2006). Der Vorteil bei dieser Methode ist, dass jede Probe auf eine erfolgreiche Extraktion und auf das Vorhandensein von PCR-Inhibitoren untersucht wird. Der Nachteil: Eine extra PCR ist notwendig und das kostet Zeit und die Methode ist eigentlich nur auf Proben anzuwenden, die viele Wirtszellen enthalten wie z.B. Vollblut oder Nierenproben und nur von einer Spezies stammen. Anstelle einer parallel geführten, positiven Extraktionskontrolle, besteht die Möglichkeit Referenz-DNA von Extern zu beziehen und diese als Positivkontrolle parallel in die PCR einzusetzen (Acevedo-Whitehouse et al., 2003). Bal et al. (1994) extrahierten unabhängig von der jeweiligen Probenextraktion Leptospiren-DNA und lagerten diese für positive PCR-Kontrollen ein (Bovet et al., 1999; Branger et al., 2005; Brown et al., 2003; Kim et al., 2006; Slack et al., 2007a; Straube, 2007; Tansuphasiri et al., 2006a). Schließlich besteht auch die Möglichkeit, die Zielsequenz zu klonieren und als Plasmidlösung für eine positive Kontrolle vorrätig zu halten (Brandes et al., 2007; Theodoridis, 2004). Branger et al. (2005) nutzten eine geringe Zahl von Genomkopien eines synthetischen DNA-Moleküls, um diese in jeden Reaktionsansatz der PCR einzumischen. Primer für die interne Kontrolle generierten ein 704 bp PCR-Produkt, welches von dem 262 bp PCR-Produkt der Leptospiren-Zielsequenz eindeutig unterscheidbar war. Die wenigen Genomkopien der internen Kontrolle behinderten nicht die Amplifizierung der Leptospiren-DNA; im Gegenteil,

war viel Leptospiren-DNA im Reaktionsgefäß enthalten, wurde die Bildung des PCR-Produktes der internen Kontrolle unterdrückt. Die PCR war demnach positiv, wenn das spezifische PCR-Produkt von 262 bp nachweisbar war; die PCR war negativ hat aber funktioniert, wenn kein 262 bp PCR-Produkt detektierbar war, aber das 704 bp PCR-Produkt der internen Kontrolle erschien. Wurde auch die Sequenz der internen Kontrolle nicht amplifiziert, dann war die PCR gehemmt (Léon et al., 2006). Brown et al. (2003) konstruierten ebenfalls eine Art interne Kontrolle, allerdings wurde diese nur verwendet, wenn die erste PCR negativ war. Dann wurde eine zweite PCR angesetzt; diesmal war in jedem Reaktionsgefäß das verdünnte PCR-Produkt der ersten Amplifikation, die interne Kontrolle und anstelle der Leptospiren spezifischen Primer, die Primer für die interne Kontrolle. Wurde in der zweiten PCR auch kein PCR-Produkt gebildet, dann befand sich im Probenextrakt ein Hemmstoff.

Das parallele Mitführen von Negativkontrollen ist absolut notwendig, um bei einer so sensitiven Methode wie der PCR falsch positive Ergebnisse möglichst auszuschließen und Kontaminationen von Puffern, Geräten oder dem Arbeitsplatz etc. frühzeitig zu erkennen. Optimal wäre, wenn man eine Kontamination einem bestimmten Prozess zuordnen könnte, wie z.B. der Extraktion oder einzelnen PCR-Reagenzien. Wichtig ist, die Position der Negativkontrollen intelligent zu wählen und sie der Probenanzahl wenn nötig anzupassen (Bal et al., 1994; Bovet et al., 1999; Brown et al., 2003; Espy et al., 2006; Smythe et al., 2002a). Es gibt mehrere Möglichkeiten, wie die Negativkontrollen gestaltet werden können. Beispielsweise wird anstelle der Probe während der Extraktion nur Puffer oder Wasser verwendet (Harkin et al., 2003a; Kositanont et al., 2007a; Slack et al., 2007a). Andererseits können auch biologische Proben von sicher negativen Probanden eingesetzt werden (Kim et al., 2006; Schönberg et al., 2005). Schließlich eignet sich für die PCR noch die Anwendung von Extern erhaltener, oder im Labor extrahierter Referenz-DNA. Handelt es sich z.B. um eine PCR mit Primern, die nur pathogene Leptospiren nachweisen, so kann als negative Kontrolle Referenz-DNA von *L. biflexa* Serovar Patoc Stamm Patoc I genutzt werden (Acevedo-Whitehouse et al., 2003; Slack et al., 2007a).

Jede Probe und Kontrolle in n-facher Zahl mitzuführen ist auch eine Art Kontrolle für sich. Denn in einem Dreifachansatz z.B. sollte theoretisch stets das Gleiche passieren. Um Kontaminationen insbesondere sogenannte „carry-over“ oder „schmier“ Kontaminationen zu vermeiden, werden üblicherweise gestopfte Pipettenspitzen bzw. Filterspitzen benutzt (Bomfim et al., 2007). Für die PCR-Reaktion hat sich der Einsatz von UDG, der Uracil-DNA-Glycosylase, bewährt (Gravekamp et al., 1993; Mothershed et Whitney, 2006). Während der PCR, wird in das PCR-Produkt manches Mal anstelle von einem T (Thymidin) ein U (Uracil) von der Polymerase in das amplifizierte DNA-Fragment eingebaut. Setzt der Laborant eine neue PCR an und kontaminiert ein Reaktionsgefäß mit einem solchen PCR-Produkt, so ist es die Aufgabe der UDG das Uracil herauszuschneiden. Dadurch zerfällt das kontaminierende Fragment in verschieden große Stückchen. Die optimale Arbeitstemperatur des Enzymes liegt bei +50°C. Daher wird vor dem ersten Denaturierungsschritt, bei dem das Enzym zerstört wird, die PCR für ein paar Minuten bei +50°C gestartet. Damit bei dieser Temperatur die Polymerase im

Literatur

Gegenzug nicht schon anfängt ungesteuert PCR-Produkte zu bilden, ist die Verwendung von UDG nur mit einer thermostabilen, sogenannten „Hot Start“ Polymerase sinnvoll. Eine solche Polymerase erreicht ihre volle Aktivität erst nach dem ersten Denaturierungsschritt und ist bis dahin blockiert. Die UDG-Reaktion bewirkt demnach, dass eine „carry-over“ Kontamination mit PCR-Produkten nicht (sofort) erkannt wird (Burkardt, 2000; Persing, 1991).

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchungsmaterial

3.1.1 Leptospirenkultur

Für die Entwicklung der PCR stand eine Sammlung von 18 Referenzstämmen (Royal Tropical Institute (KIT), Amsterdam, Niederlande bzw. Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin) zur Verfügung, die vom Leptospirelabor des Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) in Oberschleißheim subkultiviert werden (Tabelle 10). Verwendung fanden Stämme, die 4 bis 14 Tage alt und dicht (2×10^8 Leptospiren pro ml) gewachsen waren.

Tabelle 10. Leptospirenstammsammlung des LGL, Oberschleißheim (2006/2007)

<i>Leptospira</i> (L.)	Nr.	Serogruppe	Serovar	Stamm	Genospezies
Pathogen	1	Australis	Australis	Ballico	<i>L. interrogans</i>
	2	Australis	Bratislava	Jez Bratislava	<i>L. interrogans</i>
	3	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A	<i>L. interrogans</i>
	4	Ballum	Ballum	Mus 127	<i>L. borgpetersenii</i>
	5	Bataviae	Bataviae	Swart	<i>L. interrogans</i>
	6	Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV	<i>L. interrogans</i>
	7	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V	<i>L. kirschneri</i>
	8	Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis	<i>L. interrogans</i>
	9	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M 20	<i>L. interrogans</i>
	10	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	Ictero I	<i>L. interrogans</i>
	11	Javanica	Javanica	Veldrat Batavia 46	<i>L. borgpetersenii</i>
	12	Pomona	Pomona	Pomona	<i>L. interrogans</i>
	13	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem	<i>L. interrogans</i>
	14	Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitno	<i>L. interrogans</i>
	15	Sejroe	Sejroe	M84	<i>L. borgpetersenii</i>
	16	Sejroe	Saxkoebing	Mus 24	<i>L. interrogans</i>
	17	Tarassovi	Tarassovi	Perepelitsin	<i>L. borgpetersenii</i>
Saprophyt	18	Semaranga	Patoc	Patoc I	<i>L. biflexa</i>

3.1.2 Glaskörper- und Kammerwasserproben

Das LGL erhält von der Klinik für Pferde der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU), München, routinemäßig seit vielen Jahren Glaskörper- und Kammerwasserproben zur Untersuchung auf Antikörper gegen Leptospiren oder zur Isolierung dieser Bakterien. Ohne den täglichen Laborablauf weitestgehend zu stören, wurden sämtliche Proben, die nach den angeforderten Untersuchungen, wie MAT, ELISA

Material und Methoden

oder Kultur noch erhältlich waren, in der PCR untersucht; dies umfasste den Zeitraum von Juli 2006 bis Mai 2007. Da in der Regel nur dann eine kulturelle Isolierung erwünscht wird, wenn die Herstellung einer bestandsspezifischen Vakzine in Aussicht steht, wurde die Pferdeklunik gebeten in dem oben genannten Zeitraum unabhängig von einer Indikation vermehrt Glaskörper in Transportmedien mit einzusenden. Neben dieser prospektiven („frisch“) Untersuchung wurden zusätzlich retrospektiv („gefroren“) Glaskörper- und Kammerwasserproben der Pferdeklunik aus dem Zeitraum von Januar 2005 bis Mai 2006, die bei -20°C asserviert waren, in der PCR untersucht (Tabelle 11).

Tabelle 11. Anzahl der untersuchten Proben aus der Klinik für Pferde der LMU, München

	Gesamt	frisch	gefroren	
Proben	505	190	315	
GK	271	70	201	
GK li	158	36	122	
GK re	113	34	79	
KW	234	120	114	
KW li	113	60	53	
KW re	121	60	61	
Augen	444	175	269	
Augen li	236	89	147	
Augen re	208	86	122	
Pferde	338	139	199	frisch: Proben aus dem Zeitraum Juli 2006 bis Mai 2007
Kultur	66	47	19	gefroren: Proben aus dem Asservat von Januar 2005 bis Mai 2006
Kultur GK	64	46	18	GK: Glaskörper
Kultur KW	2	1	1	KW: Kammerwasser
				li: links
				re: rechts

Zunächst erhielt jede Glaskörper- oder Kammerwasserprobe eine Nummer und fand dann Eingang in die DNA-Extraktion und PCR. Das Ergebnis wurde notiert. Anschließend wurden retrospektiv zugängliche Daten erhoben: Rasse, Alter, Geschlecht und Standort des betroffenen Pferdes, sowie einige klinischen Parameter, sofern sie aus der Karteikarte zu entnehmen waren (Dauer, Art und Symptome der Erkrankung). Schließlich wurden die Ergebnisse aus der Routinediagnostik für MAT, ELISA und Kultur hinzugefügt.

3.1.3 Sonstiges

In der Zeit von Juli 2006 bis Mai 2007 konnten zahlreiche Proben unterschiedlicher Herkunft, größtenteils aus der Routinediagnostik, für die Entwicklung der DNA-Extraktion und PCR verwendet werden: Glaskörper, Glaskörperspülflüssigkeit, Kammerwasser, Tränenflüssigkeit, Blut/Serum, Plazenta, Urin und Lochialflüssigkeit vom Pferd, Urin und Niere vom Schwein, Niere, Leber, Lunge und Urin von der

Ratte, Urin und Blut/Serum vom Hund, Urin und Blut/Serum vom Menschen, Niere, Leber und Blut von einem Biber sowie Kammerwasser von einem Kakadu. Für die Überprüfung einer geeigneten DNA-Extraktion wurde Probenmaterial zum Teil mit frischer Leptospirenkultur vermischt; ebenso wurde mit Trockentupfern verfahren.

3.1.4 DNA für die Spezifitätsprüfung

Von den verschiedensten Laboren des LGL, die eigene molekularbiologische Untersuchungen durchführen, konnte Referenz-DNA folgender Bakterien erhalten werden: *Escherichia coli*, *Mycobakterium avium*, *Mycobakterium bovis*, *Mycobakterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* und *Campylobacter jejuni*.

Aus dem unterschiedlichen biologischen Probenmaterial (siehe Abschnitt 3.1.3 Sonstiges) wurde DNA aus Pferde-, Schweine-, Ratten-, Hunde-, Biber- und Menschenzellen gewonnen sowie sogar von einem Kakadu, als Vertreter wenigstens einer Vogelspezies. Das Leptospiroselabor stellte frische Kulturen von *Leptospira biflexa* Serovar Patoc, *Borrelia burgdorferi* und *Borrelia garinii* für eine DNA-Extraktion zur Verfügung. Einzelne extrem verkeimte (mit Pilzen, Hefen, Amöben und verschiedensten Bakterien) Kulturmedien wurden als Spezifitätskontrolle der PCR benutzt. Ob nach der Extraktion in der Probe DNA enthalten war, wurde mittels einem BioPhotometer der Firma Eppendorf (Hamburg) überprüft.

3.2 Das Leptospiroselabor

3.2.1 Allgemeines

Seit Jahrzehnten erhält das Labor für Leptospirose am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) in Oberschleißheim (<http://www.lgl.bayern.de/>) verschiedenste Proben von Mensch und Tier, vornehmlich aus Deutschland, Österreich und der Schweiz, um diese auf Antikörper mittels dem mikroskopischen Agglutinationstest (MAT) sowie einem indirektem ELISA zu untersuchen oder die Bakterien direkt mittels Kultur zu isolieren. Diese Arbeiten sind Routine und werden mit viel Sorgfalt und Erfahrung durchgeführt. Die Einsendungen erreichen das Labor bei Raumtemperatur und werden bis zum Abschluss der angeforderten Untersuchungen bei +4°C bis +8°C aufbewahrt. Alle acht Wochen werden die Bestände der Kühlung ausgeräumt und gegebenenfalls Proben für das Archiv bei -20°C asserviert. Für sämtliche Laborarbeiten werden die Kriterien nach DIN EN ISO/IEC 17025 angewandt. Seit 2005 ist der Fachbereich „Veterinärmedizinische Diagnostik“ in das akkreditierte Qualitätssicherungssystem eingegliedert (SAL-akkreditiertes Prüflaboratorium, Reg.-Nr.: SAL-BY-L20-04-03).

3.2.2 Mikroskopischer Agglutinationstest (MAT)

Der MAT wird täglich durchgeführt. Mindestens 100 µl Probenmaterial sind hierfür notwendig. In einem Vorversuch bei einer Endverdünnung von 1:40 wird zunächst getestet, ob überhaupt Leptospirenantikörper in der Probe enthalten sind. Fällt der Vorversuch positiv aus, erfolgt der Hauptversuch; in diesem Fall wird die Probe in Verdünnungsstufen von 1:25 bis 1:3200 getestet. Gegebenenfalls ist es notwendig, die Verdünnungsstufen zu erhöhen, bis der Test negativ ausfällt. Als Antigen dienen 4 bis 14 Tage alte Leptospirenstammkulturen, die ihre stationäre Wachstumsphase erreicht und eine Dichte von ca. 2×10^8 Bakterien pro ml Kulturmedium aufweisen. Dazu werden wöchentlich Subkulturen angelegt, die sich bei +29°C in flüssigem EMJH Medium, angereichert mit BSA-Tween80/40, im Brutschrank unter aeroben Bedingungen vermehren. Während Proben eines Menschen gegen alle 17 verfügbaren pathogenen Leptospirenstämmen getestet werden, laufen Proben vom Pferd lediglich gegen *L. Grippotyphosa*, *L. Canicola*, *L. Pomona*, *L. Copenhageni*, *L. Hardjo*, *L. Bratislava*, *L. Pyrogenes*, *L. Icterohaemorrhagiae*, *L. Tarassovi*, *L. Saxkoebing* und *L. Javanica*. Das hat nicht nur finanzielle Gründe, sondern auch einen ganz praktischen Hintergedanken: In dem MAT finden immer nur die Leptospirenservare als Antigen Verwendung, von denen anzunehmen ist, dass sie zu dem gegebenen Zeitpunkt in der Gegend am meisten vertreten sind und somit eine Reaktion der Probe am wahrscheinlichsten. Der MAT wird in 96 „well“ Mikrotiterplatten durchgeführt. Die Auswertung erfolgt unter einem Dunkelfeldmikroskop bei 100facher Vergrößerung. Erst wenn mindestens 50% der Leptospiren agglutiniert sind, liegt eine positive Reaktion vor. Als MAT-Titer einer Probe, im Bezug auf das jeweilige Serovar, wird die höchste positive Verdünnungsstufe angegeben.

Insgesamt wurden 271 Glaskörperproben und 234 Kammerwasserproben von 338 Pferden mittels des MAT auf das Vorhandensein von Leptospirenantikörpern im Auge untersucht. Mit einem MAT-Titer von $\geq 1:100$ galt die Probe als positiv.

3.2.3 „Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay“ (ELISA)

Bei diesem ELISA handelt es sich um eine sogenannte „In-House“ Methode. Nach dem Prinzip eines Sandwich-ELISAs ist eine 96 „well“ Mikrotiterplatte mit aufgereinigtem Antigen eines Leptospirenstammes beschichtet. Die Antigengewinnung erfolgte mittels TRIS/EDTA/SDS. Anschließend wird die Probe in einer Verdünnung von 1:50 auf die mit Antigen beschichtete Mikrotiterplatte gegeben. Pro getesteten Leptospirenstamm wird 25 µl Probe benötigt. Sind spezifische Antikörper in der Patientenprobe vorhanden, so binden diese an das ihnen präsentierte Leptospirenantigen eines Serovars auf der Platte. Nach einem ausgiebigem Waschschrift, bei dem alles, was nicht spezifisch gebunden hat aus den Kavitäten der Mikrotiterplatte entfernt wird, erfolgt die Zugabe des Konjugates. Das Konjugat sind spezifische Antikörper, die an die Antikörper der Patientenprobe binden und zwar je nachdem, ob es sich um Immunglobuline der Klasse M, G oder A handelt; gleichzeitig sind diese Antikörper mit einem Enzym, der Peroxidase

konjugiert. Nach einem weiteren Waschschrift, der überschüssiges Konjugat entfernt, wird dem Ansatz das Substrat, ein Chromogen, für das Enzym hinzugegeben. Nach einer halben Stunde Reaktionszeit wird eine weitere Aktivität des Enzymes durch eine Stopplösung unterbunden. Anschließend wird die Menge, des von der Peroxidase umgesetzten Substrates in jedem Reaktionsansatz mittels eines Photometers (ELISA Prozessor II, Behring, Schwalbach) bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Die spezifisch konjugierten Antikörper liegen nicht als Mix vor, sondern stellen einzelne Lösungen dar, getrennt nach ihrer Eigenschaft, IgM, IgG oder IgA zu erkennen. Damit handelt es sich bei diesem ELISA um ein Testverfahren, das nicht nur die Quantität sondern auch die Qualität der Immunantwort bewerten kann. Zur Kontrolle läuft für jede der drei Immunglobulinklassen ein Doppelansatz der Probe; außerdem wird stets eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt. Nur ein Test, bei dem die optische Dichte (OD) der Negativkontrolle einen Wert < 250 annimmt und der OD-Wert der Positivkontrolle > 500 ist, wird als gelungen bewertet. In Abhängigkeit von ihrem OD-Wert, kann eine Probe negativ -, grenzwertig (+), schwach positiv +, positiv ++, und stark positiv +++ reagieren (Tabelle 12). Für eine Probe, die nur gegen einen Leptospirenstamm aber für alle drei Immunglobulinklassen getestet wird, ergeben sich daher allein 125 mögliche Testergebnisse.

Tabelle 12. Möglichkeiten und Grenzen der ELISA Auswertung für eine Probe und einen Leptospirenstamm

OD-Wert	IgM	IgG	IgA	
< 250	-	-	-	OD: optische Dichte IgM: Immunglobuline der Klasse M IgG: Immunglobuline der Klasse G IgA: Immunglobuline der Klasse A
> 250 - 300	(+)	(+)	(+)	-: negativ
> 300 - 500	+	+	+	(+): grenzwertig
> 500 - 1000	++	++	++	+: schwach positiv
> 1000	+++	+++	+++	++: positiv
				+++ : stark positiv

In der Regel wird der ELISA nur als Ergänzung zum MAT und meist nur einmal wöchentlich durchgeführt. Wegen der Kosten und des Aufwandes werden die Kammerwasser- oder Glaskörperproben der Pferde im ELISA nur gegen das Antigen eines Leptospirenstammes, manchmal zwei, selten drei getestet. Die Auswahl der geeigneten Serovare richtet sich nach Erfahrung, der Gegend aus welcher das Pferd stammt, sowie ob möglicherweise eine Probe des Partnerauges im MAT reagiert hat. Zur Anwendung kamen die Serovare *L. Grippotyphosa*, *L. Bratislava*, *L. Copenhageni*, *L. Javanica*, *L. Canicola* und *L. Pomona*. Die tierartspezifischen Antikörper-Konjugate anti-Horse IgM, IgG und IgA wurden von der Dunn Labortechnik GmbH, Asbach, bzw. AbD Serotec, Düsseldorf, bezogen. Von den 505 Proben, die mittels MAT untersucht wurden, kamen nur diejenigen in den ELISA, die im MAT negativ waren und auch nur dann auf Wunsch des Einsenders. Waren von einem Pferd mehrere Proben vorhanden, z.B. Kammerwasser links und Kammerwasser rechts, so wurden zum Vergleich immer alle Proben eines Pferdes im ELISA untersucht, auch wenn eine Probe positiv im MAT reagiert hatte.

Material und Methoden

Insgesamt wurden 157 Glaskörperproben und 204 Kammerwasserproben von 231 Pferden mittels ELISA auf das Vorhandensein Serovar-spezifischer Leptospirenantikörper im Auge untersucht. Ab einem OD-Wert > 250 für mindestens einen der drei Immunglobulinklassen wurde die Probe als positiv bewertet.

3.2.4 Kulturelle Isolierung

Jeder Einsender, der aus einer Probe die kulturelle Isolierung von Leptospiren wünscht, erhält vom Labor ein spezielles Transportmedium: 8 ml semisoliden Ellinghausen McCullough Johnson Harris Grundnährmedium (Difco™ *Leptospira* Medium Base EMJH, BD Bioscience, Heidelberg) mit bovinem Serum-Albumin (BSA) Tween80/40 „Enrichment“ sowie 100 µg/ml 5-Fluorouracil sind in sterile 10 ml Braunglas Injektionsfläschchen abgefüllt. In der Pferdeklunik (LMU) wurden direkt nach Entnahme von Glaskörper- oder Kammerwasserproben 0,5 ml bis 1,0 ml der Probe unter möglichst sterilen Bedingungen in das Transportmedium überführt. Das Transportmedium erreichte das Labor bei Raumtemperatur. Aus dem Transportmedium wurden anschließend drei verschiedene Isolierungsmedien beschickt: 6 ml semisoliden EMJH Grundnährmedium mit BSA-Tween80/40 „Enrichment“ und 1% Kaninchenserum sowie 0,1% Lactalbuminhydrolysat enthalten entweder a) keinen Hemmstoff oder b) 100 µg/ml 5-Fluorouracil oder c) 10 µg/ml 5-Fluorouracil und 10 µg/ml Vancomycin. Insgesamt werden aus dem Transportmedium nach einem bestimmten Schema, das sich nach der inokulierten Menge der Ausgangsprobe richtet, acht Schraubkappenröhrchen mit Isolierungsmedium beimpft, die sich dann entweder in ihrer Zusammensetzung oder nach der inokulierten Menge des Transportmediums unterscheiden. Das Transportmedium, sowie die acht Isolierungsmedien werden bei +29°C im Brutschrank aufbewahrt und zunächst alle zwei Wochen, später im Abstand von vier Wochen über sechs Monate unter dem Dunkelfeldmikroskop (Standard 14, System Mikroskop, 470914 02/48, 10er Okular, 16er Objektiv, Zeiß, Jena) auf das Wachstum von Leptospiren überprüft. War eine Kultur positiv, wurde diese subkultiviert, um eine frische Kultur mit einer Dichte von etwa 2×10^8 lebenden Leptospiren pro ml Kulturmedium zu erhalten. Die Typisierung der Isolate erfolgte bis auf Serovarebene mittels des MAT. Dazu wurden, passend zu der laboreigenen Leptospirenstammsammlung (Tabelle 10), Kaninchenhyperimmunseren (BfR, Berlin) verwendet.

Von den 338 Pferden, deren Glaskörper- und/oder Kammerwasserproben mittels MAT untersucht wurden, fanden von 62 Pferden, 64 Glaskörperproben und 2 Kammerwasserproben Eingang in die Kultur.

3.2.5 Die mikroskopische Untersuchung

Jede flüssige Probe, egal ob Glaskörper, Kammerwasser, Urin, Kultur oder Transportmedium, wurde vor dem Eingang in die DNA-Extraktion, sofern es sich nicht um eingefrorene Proben handelte, mit dem Dunkelfeldmikroskop untersucht. Dazu wurde ein Tropfen von der Probe mit einer Impföse auf einen Objektträger

gegeben und bei einer 160fachen Vergrößerung auf das Vorhandensein von Leptospiren hin beurteilt; anbei wurden eventuelle Beimengungen, wie Fibrin, Kristalle, Zellen, Bakterien, Pilze, Amöben, Spermien u. a. registriert.

3.3 LipL32 PCR

3.3.1 DNA-Extraktion

3.3.1.1 Probenvorbereitung

Für die DNA-Extraktion wurde der DNeasy[®] Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Unter Berücksichtigung der Herstellerangaben, nachdem der Gesamt-DNA-Gehalt der Probe die einzusetzende Menge bestimmt, wurde folgende Vorgehensweise gewählt: Für Glaskörper, Kammerwasser, Transportmedium, sowie Vollblut betrug die optimale und maximale Probenmenge 1 ml und für Serum sowie Sperma 2 ml. Frischer und steril entnommener Urin, ohne Fremd Beimengungen wie Blut oder Spermien und Kontaminationen wie schnell wachsenden Bakterien (‚bacterial overgrowth‘) wurde optimaler Weise in einer Menge von 10 ml extrahiert. Um jedoch sicher zu gehen, wurde jede Probe bei einer 160fachen Vergrößerung unter dem Dunkelfeldmikroskop auf ihren Keimgehalt hin beurteilt. Je höher der DNA-Gehalt einer Urinprobe angenommen werden konnte, desto weniger der Probe wurde für die DNA-Extraktion verwendet, mindestens jedoch 2 ml. Das gleiche Prozedere galt auch für Glaskörperspülflüssigkeiten und Wasser. Es kam vor, dass in Abhängigkeit von der Tierart oder dem Zielgewebe für die DNA-Extraktion nur ein paar Tropfen Urin einer Ratte oder weniger als 50 µl unverdünnter Tränenflüssigkeit eines Pferdes zur Verfügung standen. Schließlich war die Probenmenge von dem Einsender auf die angeforderten Routineuntersuchungen beschränkt. Daher wurden für die DNA-Extraktion von Glaskörper- und Kammerwasserproben Volumina von einem Tropfen bis 1 ml verwendet. Sofern die Proben vorher nicht bereits einmal eingefroren waren, wurden diese zentrifugiert. Handelte es sich um flüssige Proben mit einem Volumen über 2 ml, wurden diese in ein 12 ml PP Natur Rundbodenröhrchen (16,8 x 100 mm) mit Schraubverschluss (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) überführt und anschließend 10 Minuten bei 20.000 g und +4°C in einer Hermle Kühlzentrifuge (ZK401) und dem AS4.13 Ausschwingrotor (mit passendem Adapter) zentrifugiert. Sofort im Anschluss wurde der Überstand abpipettiert und verworfen. Flüssige Proben mit einem Volumen unter 2 ml, wurden in farblose 2 ml Safe-Lock PCR clean Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) pipettiert oder, sofern dafür geeignet, in dem Gefäß des Probeneinganges belassen. Auch diese wurden 10 Minuten bei 20.000 g und Raumtemperatur in einer Tischzentrifuge (5417C) mit dem Festwinkelrotor F-45-30-11 (Eppendorf) zentrifugiert und danach unverzüglich der Überstand abpipettiert. Standen Gewebeproben zur Verfügung wurde ein etwa reiskorngroßes Stück in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben. So vorbereitet konnten die Proben bis zum weiteren Vorgehen bei -20°C eingefroren werden.

3.3.1.2 DNeasy® Blood & Tissue Kit

Je nach Probenvorbereitung wurden entweder pelletierte Flüssigkeiten, reiskorngroße Gewebeproben oder aber aus dem Asservat des Leptospiroselabores bis zu 1 ml eingefrorene Kammerwasser- oder Glaskörperproben für die DNA-Extraktion verwendet; dementsprechend wurden, wie im Folgenden erörtert, bei einzelnen Schritten der Extraktion Modifikationen eingebaut:

- Die Proben wurden, sofern sie vorher eingefroren waren aufgetaut und gegebenenfalls in 2 ml Reaktionsgefäße umgefüllt.
- 200 µl ATL Puffer auf die Probe gegeben.
- 20 µl Proteinase K bzw. 40 µl bei Gewebeproben hinzugefügt.
- Im Thermomixer comfort im 2 ml Wechselblock (Eppendorf, Hamburg) 30 Minuten bei +56°C inkubiert bzw. mindestens bis Gewebeprobe weitestgehend zersetzt (ca. 1 - 3 Stunden), dabei sanft im 10 Sekunden-Intervall geschüttelt; Proben in den 12 ml PP Röhrchen wurden im Badthermostat Haake DC10-P14 (Thermo Electron GmbH, Karlsruhe) inkubiert.
- Gewebeproben 3 Sekunden bei höchster Stufe auf dem Vortex Genie® 2 (Carl Roth, Karlsruhe) gemixt.
- Kondensstropfen am Deckel der Reaktionsgefäße wurden in der Tischzentrifuge abzentrifugiert (3 Sekunden).
- 200 µl AL Puffer auf die Probe gegeben.
- Im Thermomixer 10 Minuten bei +70°C inkubiert, dabei sanft im 10 Sekunden-Intervall geschüttelt; Proben in den 12 ml PP Röhrchen wurden im Badthermostat inkubiert.
- Gewebeproben 3 Sekunden bei höchster Stufe auf dem Vortex Genie® 2 gemixt.
- Kondensstropfen am Deckel der Reaktionsgefäße wurden in der Tischzentrifuge abzentrifugiert (3 Sekunden).
- 200 µl Ethanol (100%, VWR International GmbH, Darmstadt) bzw. 400 µl bei bis zu 1 ml eingefrorenen Flüssigkeiten hinzugefügt.
- Proben 1 Minute in der Tischzentrifuge bei 6.000 g zentrifugiert, bzw. Inhalt der Proben in den 12 ml PP Röhrchen durch sanftes Schütteln der Röhrchen durchmischt.
- Maximal 700 µl der Probe auf das Säulchen überführt.
- Proben 1 Minute in der Tischzentrifuge bei 6.000 g zentrifugiert.
- Säule auf ein neues Sammelgefäß gesteckt und mit Zentrifugat gefülltes Sammelgefäß verworfen.
- Falls notwendig die letzten drei Teilschritte wiederholt, bis gesamte Probe auf die Säule aufgetragen war.
- 500 µl AW1 Puffer auf die Probensäulchen aufgetragen.
- Proben 1 Minute in der Tischzentrifuge bei 6.000 g zentrifugiert.
- Säule auf ein neues Sammelgefäß gesteckt und mit Zentrifugat gefülltes Sammelgefäß verworfen.
- 500 µl AW2 Puffer auf die Probensäulchen aufgetragen.
- Proben 1 Minute in der Tischzentrifuge bei 6.000 g zentrifugiert.

- Säule auf ein neues Sammelgefäß gesteckt und mit Zentrifugat gefülltes Sammelgefäß verworfen.
- Proben 3 Minuten in der Tischzentrifuge bei 20.000 g zentrifugiert.
- Säule auf ein neues Sammelgefäß gesteckt und mit Zentrifugat gefülltes Sammelgefäß verworfen.
- 100 µl AE Puffer bzw. 200 µl bei Gewebeproben auf die Probensäulchen aufgetragen.
- 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren lassen.
- Proben 1 Minute in der Tischzentrifuge bei 6.000 g zentrifugiert.
- Säulchen verworfen und Inhalt des Probensammelgefäßes (Zentrifugat) in ein farbloses 1,5 ml Safe-Lock PCR clean Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) pipettiert.

Die Proben wurden bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

3.3.1.3 Extraktionskontrollen

Zu jeder Extraktion wurde eine Positivkontrolle mitgeführt; dazu wurden ein Tropfen bzw. 10 µl einer 7 bis 14 Tagen alten Kultur von *L. borgpetersenii* Serovar Ballum Stamm Mus 127 in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und anstelle einer Probe extrahiert. Eine komplette Extraktion wurde ebenfalls für die Negativkontrolle durchgeführt, allerdings ausschließlich mit den verwendeten Puffern und Lösungen. Es wurde streng darauf geachtet, die Negativkontrolle stets neben der Positiven zu führen und die Positivkontrolle in jedem Schritt zuletzt zu behandeln. Schien es notwendig, so wurden gegebenenfalls mehrere Negativkontrollen verwendet und diese in ihrer Position zwischen den Proben verteilt.

3.3.1.4 Reinigung und Dekontamination

Sämtliche Gerätschaften sowie der Arbeitsplatz wurden mit RNase Away™ (Carl Roth, Karlsruhe) nach Empfehlung des Herstellers dekontaminiert und anschließend unter dem Wasserhahn mit Wasser gereinigt oder mit 96% vergälltem Ethanol eingesprüht und danach abgewischt. Mindestens einmal im Monat wurden zusätzlich alle leicht beweglichen bzw. ausbaubaren Gegenstände einer UV-Dekontamination unterzogen. Selbstverständlich wurde darauf geachtet, dass die beschriebenen Methoden für die Geräte und Oberflächen geeignet sind.

3.3.2 Primerdesign

Die idealen Primer, weisen ausschließlich DNA pathogener Leptospiren nach, haben eine hohe Bindungsspezifität, bilden keine Primerdimere, lassen ein kurzes PCR-Produkt entstehen und sind untereinander ausgewogen in ihrer Länge (bp), ihrem GC-Gehalt (%) und der Schmelztemperatur (T_m). Zunächst sollte ein Primerpaar für die Zielsequenz, das Lipoprotein32 pathogener Leptospiren (LipL32), gefunden werden, das sich einerseits für die konventionelle PCR eignet, andererseits erlaubt einen der beiden Primer auch an seinem 3' Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff zu markieren und somit in der LUX™ qPCR einsetzbar ist. Schließlich war für die semi-nested PCR noch ein dritter Primer nötig. Mit diesem Ziel vor Augen, wurden sämtliche in der Genbank auf der „National Center of Biotechnology Information (NCBI) Website“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) verfügbaren Sequenzen von Leptospiren zu LipL32 mit Hilfe des „Basic Local Alignment Search Tool“ (BLAST) Programmes gegeneinander verglichen. Nucleotidbasen, die sich an gleicher Stelle unterschieden, wurden durch Basen des „International Union of Biochemistry (IUB) Codes“, sogenannten „mixed“ oder „wobbel“ Basen, ersetzt. Auf Grundlage dieser Sequenz wurden unter zur Hilfenahme der Primer 3 (<http://primer3.sourceforge.net/>) sowie der D-LUX™ Designer (<http://www.invitrogen.com/>) Software verschiedene Primer entwickelt. Schließlich wurde jeder Primer einzeln in der Gendatenbank (NCBI) auf seine Eignung hin überprüft, einzig pathogene Leptospiren-DNA zu detektieren und in Kombination mit seinem Partner sowohl alle pathogenen Leptospiren nachzuweisen als auch stets ein gleich großes PCR-Fragment zu erzeugen, sofern die bis dahin verfügbaren Informationen (August 2006) eine derartige Aussage zuließen. Tabelle 13 zeigt alle entwickelten Primer, sowohl die später ausgemusterten, als auch die favorisierten Primer. Die unmarkierten Primer wurden online bei der Thermo Electron GmbH (<http://www.thermo.com/>) oder der Operon Biotechnologies GmbH (<https://www.operon.com/>) bestellt. Die Lieferung dauerte in der Regel nur wenige Tage. Wohingegen bei Bestellung der mit einem Farbstoff markierten LUX™ Primer bei der Firma Invitrogen (<http://www.invitrogen.com/>) wegen Lieferung aus Übersee mit 10 bis 14 Tagen zu rechnen war. Die Primer, in getrocknetem Zustand versandt, wurden mit TE Puffer (pH 8,0) (AppliChem, Darmstadt) auf eine Konzentration von 10 μM eingestellt, à 50 μl aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

Tabelle 13. Primerübersicht I

Bezeichnung	5' - 3' Sequenz	Länge bp	PCR-Produkt bp	GC %	Tm °C	Funktion
LipL32-287 FAM	<u>cgaact</u> taatcgctgaaatgggagttc <u>g</u>	28	433	46	70	„forward“ LUX™ Primer
LipL32-287	taatcgctgaaatgggagttc	22	433	45	63	„forward“ Primer
LipL32-678	agcagaccaacagatgcaacg	21	433	52	63	„reverse“ Primer
LipL32-355	gcggcwaccccrgaagaaaaat	22	344	50	64	„forward“ semi- nested Primer
LipL32-283	gttcgatgattccccaac	20		45	56	ausgemustert
LipL32-691	caacagatgcaacgaaagat	20		40	56	ausgemustert
LipL32-386	tgtggcattgattttcttc	20		35	56	ausgemustert
LipL32-267	aatcgctgaaatgggagttc	20		45	59	ausgemustert
LipL32-699	aagcagaccaacagatgcaa	20		45	59	ausgemustert
LipL32-283 FAM	<u>cggttc</u> gatgattcccc <u>aaccg</u>	24		50	69	ausgemustert
LipL32-694	gaccaacagatgcaacgaaagatc	24		46	64	ausgemustert
LipL32-262 FAM	<u>cgaaca</u> atcgctgaaatgggagttc <u>g</u>	26		50	70	ausgemustert

„International Union of Biochemistry (IUB) Code“: w kodiert für t und a, r kodiert für g und a
komplementäre Basen zwischen dem 3' und dem 5' Ende der LUX™ Primer sind unterstrichen

c bezeichnet die Position für den Farbstoff (FAM)

GC %: prozentualer Gehalt an Guanin (g) und Cytosin (c) Basen

Tm: Schmelztemperatur; bp: Basenpaare

Nachdem die Primer und die Konditionen für die PCR der Zielsequenz (LipL32) sowie für die semi-nested PCR festgelegt und optimiert waren, wurde ein weiteres Primerpaar für eine Inhibitionskontrolle der qPCR entwickelt. In diesem Fall sollten die idealen Primer folgende Kriterien erfüllen: Die Primer binden nicht an Sequenzen aus Chromosom I pathogener Leptospiren und bilden keine Primerdimere. Sie weisen eine hohe Bindungsspezifität auf und sind einzigartig für ihre Sequenz; zudem sind sie gut mit den LipL32 Primern hinsichtlich ihrer Länge (bp), der Schmelztemperatur (Tm) sowie dem GC-Gehalt (%) kompatibel. Das PCR-Produkt ist größer als 483 bp aber kleiner als 533 bp. Ein Primer kann an seinem 3' Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und damit für die LUX™ qPCR verfügbar gemacht werden, unmarkiert aber auch in einer konventionellen PCR Einsatz finden. Mit diesen Hintergedanken wurde auf Chromosom II der Leptospiren nach einer geeigneten Sequenz für die Inhibitionskontrolle gesucht. Es wurde sich auf eine Adenylatcyclase geeinigt, für die zu dem gegebenen Zeitpunkt (September 2006) ausschließlich zwei Sequenzen in der Gendatenbank (NCBI) zur Verfügung standen: Einmal von *L. interrogans* Serovar Lai Stamm 56601 (AE010301) das *cyaA17* Gen, sowie von *L. interrogans* Serovar Copenhageni Stamm Fiocruz L1-130 (AE016824) das *LIC_20075* Gen. Auf Grundlage dieser beiden Sequenzen und unter Berücksichtigung der bestehenden Kriterien wurde ein Primerpaar entwickelt (Tabelle 14). Die Vorgehensweise entspricht der für die LipL32 Primerselektion.

Material und Methoden

Tabelle 14. Primerübersicht II

Bezeichnung	5' - 3' Sequenz	Länge bp	PCR-Produkt bp	GC %	Tm °C	Funktion
Acl1 JOE	<u>cg</u> cagtaacacctctcgtaatctg <u>cg</u>	26	515	54	68	„reverse“ LUX™ Primer
Acl1	taacacctctcgtaatctgcg	21	515	48	58	„reverse“ Primer
Acl3	cgtggaagtgatgagcactgt	22	515	54	64	„forward“ Primer
Acl2 JOE	<u>cg</u> gcttcagtcaaaaggattg <u>cg</u>	24		54	71	ausgemustert

komplementäre Basen zwischen dem 3' und dem 5' Ende der LUX™ Primer sind unterstrichen

c bezeichnet die Position für den Farbstoff (JOE)

GC %: prozentualer Gehalt an Guanin (g) und Cytosin (c) Basen

Tm: Schmelztemperatur; bp: Basenpaare

3.3.3 LUX™ qPCR

Als Reaktionsgefäße für die quantitative PCR wurden farblose, High Profile, 0,2 ml 8er SoftStrips® mit Single Optically Clear Flat Caps (Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf) verwendet. Die Komponenten für einen qPCR-Ansatz sind Tabelle 15 zu entnehmen. SuperMix, Magnesiumchlorid (MgCl₂), ROX-Referenz (6-carboxy-X-Rhodamin) und das Wasser (H₂O) wurden von der Firma Invitrogen, Karlsruhe bezogen (Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG; UltraPure™ DEPC-treated Water). Das Einpipettieren von MasterMix und der Proben bzw. von dem Standard in die vorgelegten Reaktionsgefäße erfolgte bei Raumtemperatur und nach einem streng kontrollierten Schema. Ein Beispiel für eine „Platten“-Belegung für einen qPCR-Lauf zeigt Abbildung 4. Für jede Probe und Kontrolle wurde ein Dreifachansatz gewählt, nur für die Standardkurve, von 1×10² bis 1×10⁷ Genomkopien pro Reaktion, reichte ein Doppelansatz aus. Neben der positiven Extraktionskontrolle und der negativen Extraktionskontrolle gab es mindestens immer noch eine negative PCR-Kontrolle, die anstelle einer Probe 5 µl DEPC-treated H₂O enthielt. Die qPCR wurde in einem MX3005P Thermocycler (Software Version 3.20/2006), der Firma Stratagene, Amsterdam, Niederlande durchgeführt. Als Voreinstellung war es notwendig den Experimenttyp „SYBR® Green (with Dissociation curve)“ zu wählen und für eine korrekte Fluoreszenzdetektion unter dem Punkt „Filter Set Gain Settings“ FAM ×4, JOE ×8 und ROX ×1 einzustellen (Abbildung 5). Das Temperaturprofil zu einem Lauf findet sich in Tabelle 16.

Tabelle 15. Komponenten für einen qPCR-Ansatz

Komponenten	Volumen µl	Endkonzentration
„Template“	5	
Platinum [®] qPCR SuperMix-UDG (2 X)	25	1 X
MgCl ₂ (50 mM)	3	3 mM
ROX-Referenz Farbstoff (25 µM)	0,1	50 nM
Plasmid 515 (1 fg/µl)	1	1 fg
LipL32-287 FAM (10 µM)	0,4	80 nM
LipL32-678 (10 µM)	0,4	80 nM
Acl1 JOE (10 µM)	0,2	40 nM
Acl3 (10 µM)	0,2	40 nM
DEPC- treated H ₂ O	ad 50	

All	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	FAM Standard	- Extrakt NTC	- Extrakt NTC	- Extrakt NTC	+ Extrakt Unknown	+ Extrakt Unknown	+ Extrakt Unknown					
	REF 0.00e+000 1.00e+007	REF 0.00e+000 1.00e+006	REF 0.00e+000 1.00e+005	REF 0.00e+000 1.00e+004	REF 0.00e+000 1.00e+003	REF 0.00e+000 1.00e+002	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM
B	FAM Standard	- Extrakt NTC	- Extrakt NTC	- Extrakt NTC	- PCR NTC	- PCR NTC	- PCR NTC					
	REF 0.00e+000 1.00e+007	REF 0.00e+000 1.00e+006	REF 0.00e+000 1.00e+005	REF 0.00e+000 1.00e+004	REF 0.00e+000 1.00e+003	REF 0.00e+000 1.00e+002	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM
C	2185 Unknown	2185 Unknown	2185 Unknown	3012 Unknown	3012 Unknown	3012 Unknown	2670 Unknown	2670 Unknown	2670 Unknown	2034 Unknown	2034 Unknown	2034 Unknown
	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM
D	3111 Unknown	3111 Unknown	3111 Unknown	3166 Unknown	3166 Unknown	3166 Unknown	15181 Unknown	15181 Unknown	15181 Unknown	- PCR NTC	- PCR NTC	- PCR NTC
	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM
E	22 KW Unknown	22 KW Unknown	22 KW Unknown	22 GK Unknown	22 GK Unknown	22 GK Unknown	13 Unknown	13 Unknown	13 Unknown	21 KW Unknown	21 KW Unknown	21 KW Unknown
	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM
F	21 GK Unknown	21 GK Unknown	21 GK Unknown	20 KW 1 Unknown	20 KW 1 Unknown	20 KW 1 Unknown	20 KW 2 Unknown	20 KW 2 Unknown	20 KW 2 Unknown	14 GK Unknown	14 GK Unknown	14 GK Unknown
	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM
G	9 KW li Unknown	9 KW li Unknown	9 KW li Unknown	9 KW re Unknown	9 KW re Unknown	9 KW re Unknown	4 GK Unknown	4 GK Unknown	4 GK Unknown	4 KW Unknown	4 KW Unknown	4 KW Unknown
	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM
H	24 GK Unknown	24 GK Unknown	24 GK Unknown	25 GK Unknown	25 GK Unknown	25 GK Unknown	23 GK Unknown	23 GK Unknown	23 GK Unknown	11 KW Unknown	11 KW Unknown	11 KW Unknown
	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM	REF JOE FAM

Abbildung 4. Beispiel für eine „Platten“-Belegung für eine qPCR im MX3005P Thermocycler von Stratagene
REF: Farbkanal für die ROX-Referenz; NTC: "No template control"; GK: Glaskörper; KW: Kammerwasser

Material und Methoden

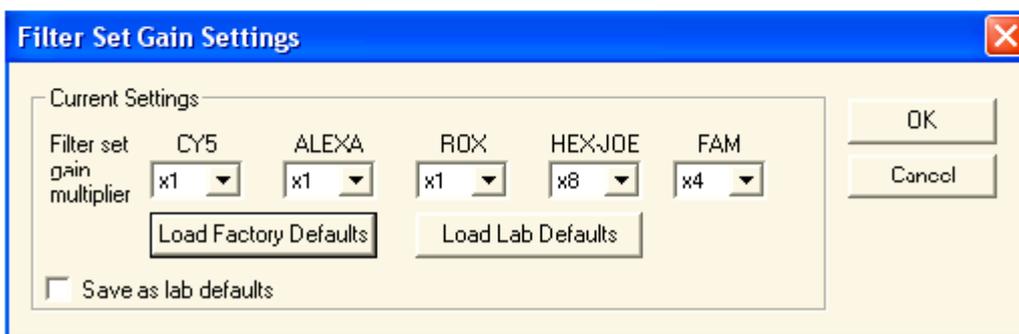
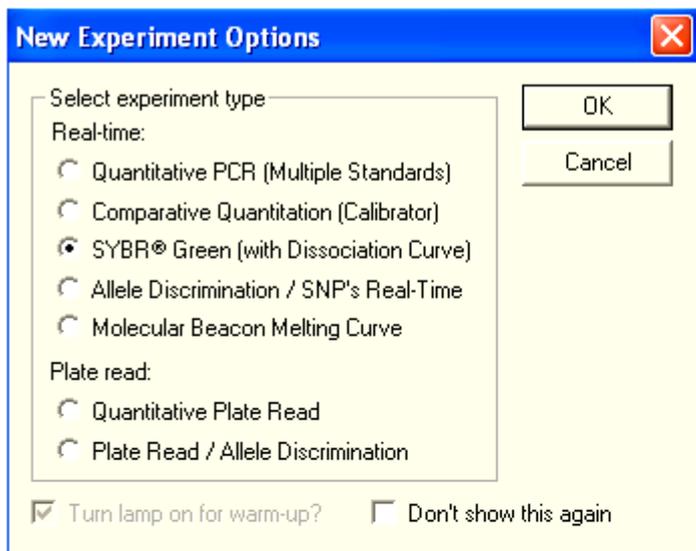


Abbildung 5. Notwendige Voreinstellungen des MX3005P Thermocycler (Stratagene) für eine LUX™ qPCR

Tabelle 16. Programm für den MX3005P Thermocycler der Firma Stratagene

Funktion	Zyklen	Temp. °C	Zeit s	Fluoreszenzmessung
Denaturierung	1	95	120	
Denaturierung	50	95	30	
Annealing		60	30	am Ende
Elongation		72	60	
Denaturierung	1	95	60	
Schmelzkurve		55 -	30	jeder Temperaturschritt
		95	30	
Kühlung	1	25	~	

3.3.4 Semi-nested PCR

Für die semi-nested PCR wurde 1 µl des qPCR-Produktes als Probe („Template“) verwendet. Als Positivkontrolle diente der Doppelansatz der höchsten Verdünnungsstufe (1×10^2 Genomkopien pro Reaktion). Jeder qPCR-Ansatz der negativen Extraktionskontrolle und der negativen PCR-Kontrolle wurden überprüft. Schließlich erhielt die semi-nested PCR, mindestens im Dreifachansatz, auch ihre eigene negative PCR-2-Kontrolle zur Überprüfung des MasterMixes. Die Komponenten für einen 50 µl Ansatz können Tabelle 17 entnommen werden. PCR-Puffer, $MgCl_2$ und *Taq* DNA-Polymerase, dNTPs (deoxyNucleosid-5'-TriPhosphate) und das H_2O wurden von der Firma Invitrogen, Karlsruhe bezogen (*Taq* Polymerase, Recombinant; 100 mM dNTP Set, PCR Grade; UltraPure™ DEPC-treated Water). Als Reaktionsgefäße dienten farblich gemischte 0,2 ml 8er SoftStrips® mit Single Caps (Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf), die während des Einpipettierens von MasterMix und Probe in PCR Coolern (Eppendorf, Hamburg) platziert waren. Die PCR wurde in einem Thermocycler T3000 (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Das Temperaturprofil findet sich in Tabelle 18.

Tabelle 17. Komponenten für einen semi-nested PCR-Ansatz

Komponenten	Volumen µl	Endkonzentration
„Template“	1	
PCR-Puffer (10 X)	5	1 X
dNTP Mix (40 mM)	1	0,8 mM
$MgCl_2$ (50 mM)	1,5	1,5 mM
LipL32-355 (10 µM)	0,5	100 nM
LipL32-678 (10 µM)	0,5	100 nM
<i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,3	1,5 U
DEPC-treated H_2O	ad 50	

Tabelle 18. Programm I für den Thermocycler von Biometra T3000

Funktion	Zyklen	Temp. °C	Zeit s
Denaturierung	1	95	120
Denaturierung	35	94	30
Annealing		65	40
Elongation		72	50
Elongation	1	72	300
Kühlen	1	4	~

3.3.5 Agarosegel-Elektrophorese

Für die Herstellung eines analytischen Geles wurden 3% peqGOLD Universal Agarose (Peqlab, Erlangen) verwendet. Als Elektrophoresepuffer diente 1 X Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer (UltraPure™ DNA Typing Grade® 50 X TAE Buffer, Invitrogen, Karlsruhe). Agarose und TAE Puffer wurden in ein großes Becherglas (1000 ml für 300 ml Gel) oder einen großen Weithals-Erlenmeyerkolben (300 ml für 100 ml Gel) gegeben und bei voller Leistung einer handelsüblichen Mikrowelle (Bartscher) gekocht, bis sich die Agarose im TAE Puffer vollständig gelöst hatte. In der Zwischenzeit, wurden die Gelkammern hergerichtet. Verwendung fanden je nach Probenumfang die Kammern: Horizon® 11.14, Agagel Midi-Wide und Agagel Maxi, alle drei von der Firma Biometra, Göttingen. Nachdem eine homogene Agarosegellösung gefertigt wurde, wurden 0,5 µg Ethidiumbromid (10 mg/ml, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) pro ml Gel zum Anfärben der DNA hinzugefügt. Anschließend wurde das Gel gegossen. Nach der Aushärtung des Gels, wurden die Kämmen entfernt und die Gelkammern mit TAE Puffer aufgefüllt. Für die Herstellung eines präparativen Geles wurden nur 2% Agarose verwendet und das Gel mit 0,3 µg Ethidiumbromid pro ml Gel angefärbt. Vor dem Einpipettieren der Proben aus der quantitativen PCR bzw. der semi-nested PCR, wurden in die Vertiefungen einer 96 „well“ Mikrotiterplatte in Abhängigkeit der Probenanzahl 1 µl Ladepuffer (Roti®-Load DNA mit Glycerin, Carl Roth, Karlsruhe) vorgelegt. Nun wurden 10 µl der PCR-Probe mit dem Ladepuffer sanft durchmischt und dann in eine Geltasche eingefüllt. Als Marker diente vornehmlich der 50 bp DNA Ladder von Invitrogen (seltener der 100 bp DNA Ladder). Dazu wurde eine Stocklösung gefertigt mit 50 µl (50 µg) des DNA-Markers, 100 µl Ladepuffer und 850 µl H₂O (UltraPure™ DEPC-treated Water, Invitrogen); diese wurde à 100 µl aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Für einen Elektrophoreselauf wurden die Marker sinnvoll auf dem Gel platziert und pro Geltasche fanden 0,5 µg DNA Ladder (10 µl der Stocklösung) Verwendung. Schließlich wurden die Gelkammern an die Stromeinheit angeschlossen (Standard Power Pack P25T, Biometra); bei konstanten 120 Volt dauerte ein Lauf ca. 45 Minuten. Nach Beenden der Agarosegel-Elektrophorese wurde ein analytisches Gel mit dem Bio Doc Analyze (BDA) liveH system von Biometra (Software Version 2.46.8.1) ausgewertet. Ein präparatives Gel jedoch wurde auf einem UV-Transilluminator von Bachhofer, Reutlingen (IL-200-M, 312 nm, 200 x 200 mm, 6 x 16 W) unter Berücksichtigung der Arbeitsschutzvorschriften betrachtet.

3.4 Klonierung von PCR-Produkten

3.4.1 PCR

Für die Erstellung einer Standardkurve zur Quantifizierung der Leptospiren in einer Probe, wurde ein 433 bp PCR-Produkt, generiert von den Primern LipL32-287 und LipL32-678, kloniert. Die Primer Acl3 und Acl1 bildeten ein PCR-Produkt von 515 bp, welches für die Inhibitionskontrolle kloniert wurde. Um eine Kontamination von vornherein zu vermeiden, wurde die Herstellung der Plasmide 515 und der Plasmide 433 zeitlich streng voneinander getrennt. Die Vorgehensweise unterschied sich jedoch nur in wenigen Punkten. Zunächst wurde das PCR-Produkt gebildet. Dazu wurde die genomische DNA aus 1 ml einer 10 Tage alten Leptospirenkultur mittels des DNeasy[®] Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden) extrahiert. Für das Plasmid 433 fand *L. borgpetersenii* Serovar Tarassovi Stamm Perepelitsin, für das Plasmid 515 *L. interrogans* Serovar Hardjo Stamm Hardjoprajitno Anwendung. Die PCR wurde in dem Thermocycler T3000 (Biometra, Göttingen) durchgeführt, das Thermoprofil ist Tabelle 18 zu entnehmen. Die Komponenten für einen 50 µl Ansatz finden sich in Tabelle 19. Exemplarisch sind die Primer für das 433 bp PCR-Produkt aufgeführt; für das 515 bp PCR-Produkt wären lediglich die Primer durch Acl3 und Acl1 zu ersetzen. PCR-Puffer, MgCl₂ und *Taq* DNA-Polymerase, dNTPs und das H₂O wurden von der Firma Invitrogen, Karlsruhe bezogen (*Taq* Polymerase, Recombinant; 100 mM dNTP Set, PCR Grade; UltraPure[™] DEPC-treated Water). Als Reaktionsgefäße dienten farblich gemischte 0,2 ml 8er SoftStrips[®] mit Single Caps (Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf), die während des Einpipettierens von MasterMix und Probe in PCR Coolern (Eppendorf, Hamburg) platziert waren.

Tabelle 19. Komponenten für einen PCR-Ansatz (Produkt: 433 bp)

Komponenten	Volumen µl	Endkonzentration
„Template“	10	
PCR-Puffer (10 X)	5	1 X
dNTP Mix (40 mM)	1	0,8 mM
MgCl ₂ (50 mM)	1,5	1,5 mM
LipL32-287 (10 µM)	1	200 nM
LipL32-678 (10 µM)	1	200 nM
<i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,3	1,5 U
DEPC-treated H ₂ O	ad 50	

3.4.2 Gelextraktion

Nach der PCR wurde das PCR-Produkt auf ein präparatives Gel aufgetragen (siehe Abschnitt 3.3.5 Agarosegel-Elektrophorese). Gleich im Anschluss erfolgte die Extraktion der Amplifikate aus dem Gel. Dazu wurden die 433 bp bzw. 515 bp Banden mittels dem X-tracta (Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf)

Material und Methoden

ausgestochen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Gewicht der einzelnen Gelstückchen wurde auf einer Kern EG 300-3M Präzisionswaage (Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern) bestimmt und bewegte sich zwischen 50 mg bis 60 mg. Für die Gelextraktion wurde der MinElute[®] Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Einzig die Zugabe von Ammoniumacetat war nicht notwendig, und anstelle dem Isopropanol wurde 100% Ethanol (VWR International GmbH, Darmstadt) hinzugefügt. Am Ende wurde der DNA-Gehalt in der Extraktion mit dem BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) überprüft.

3.4.3 Ligation und Transformation

Ein TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen, Karlsruhe) wurde nach Angaben des Herstellers für die Ligation und Transformation verwendet. Das aufgereinigte PCR-Produkt (433 bp bzw. 515 bp) wurde in einen pCR[®]2.1-TOPO[®] Vektor ligiert (Abbildung 6). Für die Transformation standen One Shot[®] chemisch kompetente TOP10 *E. coli* zur Verfügung. Für die Vermehrung dieser Zellen wurden in der hauseigenen Nährbodenküche des LGL Luria Bertani (LB) Agarplatten bzw. flüssiges LB Medium hergestellt, welche jeweils mit 50 µg/ml Ampicillin (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) supplementiert waren.

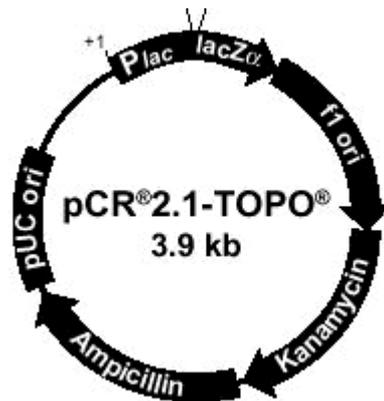


Abbildung 6. Eigenschaften des Vektors pCR[®]2.1-TOPO[®] (<http://www.bvl.bund.de/>)

3.4.4 Überprüfen der Transformation

Nachdem über Nacht die transformierten *E. coli* auf LB Agarplatten bei +37°C gewachsen waren, konnten mit Hilfe der blau/weiß Selektion brauchbare Kolonien detektiert werden. Jeweils eine weiße Verdachtskolonie wurde mit einer Impföse von der Platte abgenommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß, gefüllt mit 1 ml LB Medium, überführt und der Rest von an der Impföse befindlichen Zellen in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß, gefüllt mit 100 µl TE Puffer (pH 8,0) (AppliChem, Darmstadt), ausgeschüttelt. Die *E. coli* im LB Medium wurden in einem Thermomixer comfort im 1,5 ml Wechselblock (Eppendorf, Hamburg) bei +37°C und sanftem 10 Sekunden-Intervallschütteln inkubiert. In einem zweiten Thermomixer wurden die Reaktionsgefäße mit den *E. coli* in TE Puffer 10 Minuten bei +95°C, ebenfalls bei sanftem 10 Sekunden-Intervallschütteln, gekocht. Anschließend wurden jene auf Eis rasch abgekühlt und danach 5 Minuten bei 20.000 g und Raumtemperatur in einer 5417 C Centrifuge (Festwinkelrotor F-45-30-11, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. 1 µl von dem Überstand wurde als Probe („Template“) in eine PCR eingesetzt. Um sicher zu gehen, wurde jeweils ein Doppelansatz durchgeführt. Pro vier Verdachtskolonien lief außerdem eine Negativkontrolle mit. Ansonsten waren die Bedingungen der PCR hinsichtlich der verwendeten Komponenten und dem Thermoprofil die Gleichen, wie für die PCR unter Abschnitt 3.4.1 PCR. Die PCR-

Produkte wurden auf ein analytisches Gel aufgetragen (siehe Abschnitt 3.3.5 Agarosegel-Elektrophorese). In der Auswertung konnte nun genau definiert werden, welche der Verdachtskolonien tatsächlich das gewünschte Insert enthielten. Von den positiv getesteten Kulturen wurden die *E. coli* im LB Medium weiter über Nacht bei +37°C im Thermomixer inkubiert, die negativ getesteten Kulturen wurden entsorgt.

3.4.5 Plasmidpräparation

Am dritten Tag erfolgte die Plasmidpräparation. Dafür wurde der PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers verwendet. Am Ende wurden sämtliche Eluate in ein 2 ml Reaktionsgefäß zusammengefüllt und die Konzentration der Plasmid-Lösung mit dem BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) ermittelt. Mit dem Elutionspuffer aus dem Kit (TE Puffer, pH 8) wurde die Konzentration auf 1 ng/µl (Stammlösung) eingestellt. Die Stammlösung vom Plasmid 433 für die Standardkurve wurde à 100 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Bei Bedarf wurde ein Aliquot aufgetaut und eine log10 Verdünnungsreihe bis 1 ag/µl hergestellt. Diese Gebrauchslösungen wurden im Kühlschrank aufbewahrt. Die Stammlösung von Plasmid 515 für die Inhibitionskontrolle wurde à 200 µl in 2 ml Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Bei Bedarf wurde ein Aliquot aufgetaut und eine Gebrauchslösung von 1 fg/µl hergestellt; diese wurde wiederum aliquotiert, diesmal à 2 ml; ein Teil wurde im Kühlschrank aufbewahrt, der Rest wiederum bei -20°C eingefroren.

3.4.6 Berechnung der Genomkopien

In dem Plasmid 433 für die Standardkurve ist eine Kopie eines 433 bp langen Fragmentes der LipL32 Sequenz der Leptospiren enthalten. Damit würde der Nachweis eines Plasmides dem Nachweis einer Leptospire entsprechen. Für die Erstellung einer Standardkurve wurde eine Verdünnungsreihe des Plasmides hergestellt, ausgehend von 1 ng/µl Konzentration. Die Frage war also, wie viele Genomkopien bzw. Plasmide sind in den Verdünnungsstufen, bzw. der Stammlösung enthalten, um später mit Hilfe der qPCR auf den Mindestgehalt an Leptospiren in der extrahierten Probe rückschließen zu können. Dazu wurde folgendermaßen vorgegangen:

- gegeben: mittlere Molekulargewicht für ein DNA-Basenpaar: 660 g/mol
- Größe des Plasmid 433: 3931 bp (Vektor) + 433 bp (PCR-Produkt) = 4364 bp
- Avogadro-Konstante: 1 mol = $6,023 \times 10^{23}$ Teilchen (hier: Genomkopien)

Berechnung der Stoffmenge (mol) für 1 ng von Plasmid 433:

$$1 \text{ ng} \times 1 \text{ mol} / (660 \times 10^9 \text{ ng} \times 4364) = 3,472 \times 10^{-16} \text{ mol}$$

1 ng/µl Plasmid 433 Stammlösung enthält somit etwa $2,091 \times 10^8$ Genomkopien.

Für das Plasmid 515 der Inhibitionskontrolle gilt entsprechend:

1 ng/µl Plasmid 515 Stammlösung enthält etwa $2,053 \times 10^8$ Genomkopien.

3.5 Sequenzierung von PCR-Produkten

3.5.1 PCR

Anhand eines klinischen Fallbeispiels wurden die PCR-Produkte, welche durch die LipL32 Primer (433 bp) bzw. die Acl Primer (515 bp) generiert werden, mittels Sequenzierung bestätigt. Dazu wurde das Protokoll der LUX™ qPCR weitestgehend für die konventionelle PCR übernommen. Als Proben dienen die DNA-Extrakte von drei Rattennieren, die zuvor positiv getestet wurden. Tabelle 20 enthält die Komponenten für einen PCR-Ansatz für ein Primerpaar (LipL32), entsprechendes gilt jedoch auch für das andere Primerpaar (Acl). Für jedes Primerpaar wurde pro Probe ein Doppelansatz gewählt. SuperMix, MgCl₂, und das H₂O wurden von der Firma Invitrogen, Karlsruhe bezogen (Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG, UltraPure™ DEPC-treated Water). Das Einpipettieren von MasterMix und der Proben in die vorgelegten Reaktionsgefäße (farblich gemischte 0,2 ml 8er SoftStrips® mit Single Caps, Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf) erfolgte bei Raumtemperatur. Die PCR wurde im Thermocycler T3000 (Biometra, Göttingen) durchgeführt; das Thermoprofil hierzu ist Tabelle 21 zu entnehmen.

Tabelle 20. Komponenten für einen PCR-Ansatz (Produkt: 433 bp)

Komponenten	Volumen µl	Endkonzentration
„Template“	5	
Platinum®qPCR SuperMix-UDG (2 X)	25	1 X
MgCl ₂ (50 mM)	1,5	1,5 mM
LipL32-287 (10 µM)	0,5	100 nM
LipL32-678 (10 µM)	0,5	100 nM
DEPC-treated H ₂ O	ad 50	

Tabelle 21. Programm II für den Thermocycler von Biometra T3000

Funktion	Zyklen	Temp .°C	Zeit s
Denaturierung	1	95	120
Denaturierung	50	94	30
Annealing		60	30
Elongation		72	60
Elongation	1	72	300
Kühlen	1	4	~

3.5.2 Gelextraktion

Nach der PCR wurde das PCR-Produkt auf ein präparatives Gel aufgetragen (siehe Abschnitt 3.3.5 Agarosegel-Elektrophorese). Dabei wurden aus jedem Reaktionsgefäß zwei Geltaschen befüllt. Gleich im Anschluss erfolgte die Extraktion der Amplifikate aus dem Gel. Dazu wurden die 433 bp bzw. 515 bp Banden mittels dem X-tracta (Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf) ausgestochen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Gewicht der einzelnen Gelstückchen wurde auf einer Kern EG 300-3M Präzisionswaage (Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern) bestimmt und bewegte sich um die 70 mg. Für die Gelextraktion wurde der MinElute[®] Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Einzig die Zugabe von Ammoniumacetat war nicht notwendig, und anstelle von Isopropanol wurde 100% Ethanol (VWR International GmbH, Darmstadt) hinzugefügt. Die so aufgereinigten PCR-Produkte wurden zum Schluss in 50 µl Elutionspuffer (in 1,5 ml Reaktionsgefäßen) gelöst.

3.5.3 Ethanolpräzipitation

Für das Fällen der DNA wurde folgendermaßen vorgegangen:

- zu jeder Probe wurden 12,5 µl 10 M Ammoniumacetat hinzugefügt.
- 200 µl eiskaltes 100% Ethanol (VWR International GmbH, Darmstadt) einpipettiert und sanft durchmischt.
- DNA über Nacht bei -20°C gefällt.
- Proben 10 Minuten bei 20.000 g und Raumtemperatur in einer Tischzentrifuge (5417C, Festwinkelrotor F-45-30-11, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert.
- 250 µl vom Überstand abpipettiert und verworfen.
- Auf den Rest 400 µl 70% Ethanol (7 ml 100% Ethanol + 3 ml Aqua destillata) gegeben.
- Proben 5 Minuten in der Tischzentrifuge bei 20.000 g und Raumtemperatur zentrifugiert.
- 400 µl vom Überstand abpipettiert und verworfen.
- Die Pellets wurden luftgetrocknet.

3.5.4 Sequenzierung

Zu jeder Probe (Rattenniere) lag nach der Ethanolpräzipitation je viermal das 433 bp und das 515 bp PCR-Fragment in getrocknetem Zustand vor. Das heißt, für jeden verwendeten Primer standen für die Sequenzierung jeweils ein Doppelansatz seines Produktes einer Probe zur Verfügung. Für die Sequenzierung wurden die Proben und die Primer (LipL32-287, LipL32-678, Acl1, Acl3) an die MWG Biotech AG, Martinsried (<http://www.medigenomix.de/en/index.html>), versandt. Die sich ergebenden Sequenzen wurden mit der Software DNAMAN (Version 5.2.9, Lynnon Biosoft, Vaudreuil-Dorion, Kanada) analysiert und untereinander verglichen. Anschließend erfolgte eine Überprüfung der Sequenzen der PCR-Produkte aus den Rattennieren mit Hilfe des „Basic Local Alignment Search Tool“ (BLAST)

Programmes auf der „National Center of Biotechnology Information (NCBI) Website“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3.6 Experimentalphase

Unter Experimentalphase ist die Zeit zu verstehen, in der die oben beschriebenen Techniken erlernt, entwickelt und optimiert worden sind. Dabei wurde Einiges ausprobiert. Für die DNA-Extraktion waren dies die Kochmethode, der Geno/mini DNA Isolation Spin Kit (AppliChem, Darmstadt), der High Pure PCR Template Preparation Kit und das S.E.T.S. Swab Extraction Tube System von der Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), der RTP[®] Spin Bacteria DNA Mini Kit (Invitex GmbH, Berlin), sowie der Gentra[®] Puregene[®] Yeast/Bact. Kit, der Generation[™] Capture Column Kit und der DNeasy[®] Blood & Tissue Kit, alle drei zuletzt genannten von der Firma Qiagen (Hilden). Zunächst wurde streng nach Herstellerangaben vorgegangen, dann jedoch das ein oder andere verändert, um spezielle Effekte auszutesten, z.B. die Inkubationszeit, Menge an Puffern etc. Die Extraktionskits wurden nach folgenden Kriterien beurteilt: leichte Handhabung und Anwendbarkeit für alle möglichen klinischen Proben, gute Reproduzierbarkeit und eine ausreichende Sensitivität, alles im Hinblick auf deren möglichen, späteren Einsatz im Routinediagnostiklabor.

Für die Entwicklung und Optimierung der LUX[™] qPCR und semi-nested PCR wurden verschiedene *Taq* DNA-Polymerasen und die dazugehörigen Komponenten in ihrem Einsatz und der Wirkung untersucht: Die HotStarTaq[®] DNA-Polymerase (Qiagen, Hilden), die Platinum[®] *Taq* DNA-Polymerase, die *Taq* DNA-Polymerase, Recombinant und den Platinum[®] Quantitative PCR SuperMix-UDG, alle drei von der Firma Invitrogen (Karlsruhe). Die Optimierung der PCR-Protokolle ging einher mit Veränderungen in der Konzentration von Primern, Polymerase, MgCl₂, dNTPs und für die LUX[™] qPCR auch dem ROX-Referenz Farbstoff. An dem Einsatz von PCR-Hilfsstoffen, wie DMSO (PCR Optimization Kit, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) wurde sich kurzfristig versucht. Schließlich wurde noch der Einfluss des Temperaturprofiles einer LUX[™] PCR auf die Fluoreszenzdetektion und das Endprodukt eruiert. Dazu wurde die Annealingtemperatur verändert sowie die Zeiten der Denaturierung, Annealing und Elongation in Abhängigkeit von der Zyklenzahl.

Da es verschiedene Möglichkeiten gibt, die Sensitivität einer PCR zu bestimmen wurden auch mehrere ausprobiert. Sieben Tage alte Leptospirenkulturen wurden in log₁₀ Stufen verdünnt und deren DNA anschließend extrahiert. Dazu wurde die Kochmethode, der Geno/mini DNA Isolation Spin Kit (AppliChem, Darmstadt), der Generation[™] Capture Column Kit und der DNeasy[®] Blood & Tissue Kit beide von der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Einmal wurde das vollständige DNA-Extrakt in die qPCR eingesetzt, das andere Mal wurde die Menge an DNA vorher gemessen und dann ein Teil der Extraktlösung in die PCR eingesetzt. Eine andere Variante bestand darin, die DNA aus 1 ml einer sieben Tage alten Leptospirenkultur zu extrahieren, diese DNA-Menge mit dem Biophotometer (Eppendorf, Hamburg) zu bestimmen und die äquivalenten Genomkopien zu berechnen, bevor das DNA-Extrakt in log₁₀ Schritten verdünnt wurde. Drittens wurden gleichfalls wieder DNA aus 1 ml einer

sieben Tage alten Leptospirenkultur extrahiert, das Extrakt in eine konventionelle PCR eingesetzt, das PCR-Produkt auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen und schließlich die erwartete Fragmentbande für das LipL32 PCR-Produkt ausgeschnitten und extrahiert. Danach wurde die Menge an DNA bestimmt und die Genomäquivalenten berechnet. Nach einer \log_{10} Verdünnung bis zur errechneten Menge von 1×10^{-2} Genomkopien pro μl , wurden Aliquots der Verdünnungsstufen in die PCR eingesetzt. Alle drei Methoden wurden untereinander und mit der Standardkurve (Plasmid) verglichen. Die Ergebnisse aus dieser Experimentalphase stellen lediglich Erfahrungswerte dar; manche davon finden sich in der Literatur wissenschaftlich belegt, andere wiederum noch nicht; diese sind dann lediglich als Hinweise im Teil ‚Ergebnisse‘ und ‚Diskussion‘ zu verstehen.

3.7 Statistische Auswertung

Die Software zum Stratagene Thermocycler MX3005P (Version 3.20/2006) errechnet automatisch für jeden qPCR-Lauf die Regressionsgerade durch die Standardkurvenpunkte, bestimmt die Effizienz der qPCR und übernimmt die Quantifizierung der Proben-DNA.

Der GraphPad Software-Online Calculator (<http://www.graphpad.com/>) wurde für den Student's t Test, Cohen's Kappa Test und Fisher's Exact Test verwendet.

Excel 2007 diente der Erstellung von Tabellen und Abbildungen, der Berechnung von Mittelwert, Standardabweichung und Median sowie der Durchführung von Regressionsanalysen.

Der Levene's Test, das heteroskedastische und homoskedastische Varianzmodell sowie der Likelihood Quotienten (LQ) Test wurde mit dem R Statistik Programm (Version 2.5.1; <http://www.r-project.org/>) in Zusammenarbeit mit dem statistischen Beratungslabor (Leitung: Herr Prof. Dr. Helmut Küchenhoff) am Institut für Statistik der LMU, München, durch Herrn Michael Höhle, Ph.D., durchgeführt (Burdick et al., 2005; DIN ISO 5725-2, 2002; Fahrmeir et al., 2007).

In jedem Fall wurde ein Signifikanzniveau von 5% ($p = 0,05$) angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Entwicklung und Auswertung

4.1.1 Probenvorbereitung und DNA-Extraktion

Leptospiren verhalten sich nicht wie typische gramnegative Bakterien. Die meisten DNA-Extraktionskits enthalten Protokolle für die Isolierung genomischer DNA aus gramnegativen Bakterien. Hielt man sich strikt an die Herstellerangaben, so waren die Ergebnisse unbefriedigend und kaum reproduzierbar. Um das Problem zu umgehen, war es stets notwendig die empfohlenen Inkubationszeiten (meist 10 Minuten) für den Proteinase K Verdau oder sonstige Vorgehensweisen zur Zerstörung der Bakterienwand zu erhöhen. Als Minimum wurden 30 Minuten angesetzt.

Sofern es möglich war, wurden Flüssigkeiten pelletiert, um lösliche PCR-Hemmstoffe mit dem Überstand entfernen zu können. Selbst bei kleinsten Probenmengen (< 200 µl) war dies noch als positiver Effekt sehr deutlich. Es wurde der Eindruck gewonnen, dass insbesondere Kammerwasser, mehr noch als Glaskörper reich an PCR-Hemmstoffen sind. Unabhängig von der Wahl der Extraktionsmethode, wirkte sich der Einbau eines Kochschrittes ($\geq +70^{\circ}\text{C}$) und Einfrierschrittes positiv auf die Zerstörung von potentiellen PCR-Inhibitoren aus. Das Mischen der Probe während der Extraktion wurde stets sanft durchgeführt. Die Ausbeute an DNA konnte dadurch erhöht werden. Entgegen üblichen Herstellerangaben wurde das Vortexen nur für Gewebeproben angewandt, um diese besser aufzuschließen.

Bei der Verwendung von Extraktionsmethoden, bei denen DNA zunächst konzentriert und dann in einem Puffer eluiert wurde, konnte festgestellt werden, dass eine Beurteilung des DNA-Gehaltes der Extrakt-Lösung mittels dem BioPhotometer von der Firma Eppendorf (Hamburg), das Erstellen einer Verdünnungsreihe oder aber das Einsetzen eines Aliquots der extrahierten DNA als „Template“ in eine PCR noch am selben Tag der Extraktion ungünstig war. Daher wurde die DNA unmittelbar nach der Extraktion bei -20°C eingefroren bzw. bei $+4^{\circ}\text{C}$ im Kühlschrank aufbewahrt und weitere Schritte erst am nächsten Tag durchgeführt.

Biologische Flüssigkeiten, die ohne Probenvorbereitung direkt eingefroren wurden, konnten nach dem Auftauen nicht mehr abzentrifugiert werden; für die retrospektive Untersuchung aus dem Probenasservat von Januar 2005 bis Mai 2006 musste demnach eine Extraktionsmethode gefunden werden, mit der aus Flüssigkeiten bis zu 1 ml Volumen, Leptospiren-DNA gewonnen werden konnte, gleichzeitig aber auch PCR-Hemmstoffe der biologischen Probe zerstört bzw. herausgefiltert wurden. Ungeeignet waren daher die Kochmethode und der Gentra[®] Puregene[®] Yeast/Bact. Kit von der Firma Qiagen (Hilden). Obwohl der Geno/mini DNA Isolation Spin Kit (AppliChem, Darmstadt) an sich sehr gute Extraktionsergebnisse lieferte, erwies sich das „Handling“ der Extraktionsgefäße, insbesondere das Öffnen und Schließen der Deckel, als ungünstig. Mehr umständlich stellte sich auch die Anwendung des High Pure PCR Template Preparation Kit von Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) dar. Mit dem RTP[®] Spin Bacteria DNA Mini Kit (Invitek GmbH, Berlin) wurden zu 90% gar

Ergebnisse

keine Ergebnisse erzielt, der Grund hierfür konnte allerdings nicht ermittelt werden. Übrig blieben nur noch der Generation™ Capture Column Kit und der DNeasy® Blood & Tissue Kit beide von der Firma Qiagen (Hilden). Der Generation™ Capture Column Kit ist einfach in der Anwendung, geht sehr schnell und liefert meist auch sehr gute Ergebnisse; im Bereich geringer Ausgangsmengen an Leptospiren-DNA erwies er sich regelmäßig als unzuverlässig und insbesondere nach der Extraktion von Kammerwasser- oder Blutproben war die PCR-Effizienz geringer und manches mal wurde die Amplifikation vollständig gehemmt. Schließlich wurde am Ende der Experimentalphase entschieden, den DNeasy® Blood & Tissue Kit für die Extraktion sämtlicher Proben zu verwenden. Der Vorteil bei dem Kit ist die Anwendbarkeit für das unterschiedlichste Ausgangsmaterial; die Ergebnisse sind reproduzierbar; in das Protokoll lassen sich einfach Modifikationen einbauen; die meisten Reagenzien sind in dem Kit enthalten; in der Regel bedarf es nur der Supplementierung von 100% Ethanol. Die Extraktion erfordert ein hohes Maß an Konzentration, Flexibilität und Selbsteinschätzung. Die größte Gefahr liegt in der Überladung der Extraktionssäulchen mit zu viel DNA und einer unzureichenden Entfernung von PCR-Inhibitoren. Wird ein großer Kit bestellt, z.B. für 500 Extraktionen, so sind die Puffer und Lösungen nicht aliquotiert, sondern befinden sich jeweils in einem großen Behältnis. Für die Lösung von Leptospiren-DNA aus Trockentupfern kam vor der Extraktion mit dem Qiagen Kit das S.E.T.S. Swab Extraction Tube System von Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) zum Einsatz.

4.1.2 Primer

4.1.2.1 Design

Es war nicht ausreichend für das Entwickeln der LUX™ Primer, die Leptospirensequenzen nur mit dem D-LUX™ Designer Programm zu analysieren. Es war mindestens noch der Gebrauch eines zweiten Programmes (Primer 3) nötig, sowie viel Eigeninitiative, um die geeigneten Primer herauszufinden. Es zeigte sich, dass es für die LipL32 Sequenz sehr schwierig war, LUX™ Primer und den dazu passenden unmarkierten Primer sowie zusätzlich einen semi-nested Primer zu selektieren. Die Sequenz enthielt wenig umgrenzte Bereiche für die Auswahl von LUX™ Primern. Hinzu kam, dass es zum Teil weder aus der Sequenz ersichtlich, noch mittels konventioneller PCR und der Agarosegel-Elektrophorese zu erkennen war, in wie weit der LUX™ Primer zur Bildung von Primerartefakten neigte. Dazu war die experimentelle Überprüfung in der „real-time“ PCR nötig. Manches mal mag man erstaunt gewesen sein, wie ein scheinbar perfekt designer Primer in der „real-time“ PCR versagte. Die Sequenz der Adenylatcyclase auf Chromosom II eignete sich viel besser, um LUX™ Primer zu entwickeln. Es war nicht schwer, passend zu den bereits existierenden Primern der LipL32 Zielsequenz, Primer für die Inhibitionskontrolle zu finden. Letztlich wurden für die LipL32 Sequenz ein FAM markierter LUX™ Primer („forward“, LipL32-287 FAM) und dazu ein unmarkierter „reverse“ Primer (LipL32-678) ausgewählt, die ein PCR-Produkt von 433 bp Länge bilden. Das PCR-Produkt für die semi-nested PCR ist nur 344 bp lang und wird von einem unmarkierten „forward“ Primer (LipL32-355) und dem LipL32-678 Primer („reverse“) aus der ersten PCR eingegrenzt. Der LipL32 LUX™ Primer ist suboptimal, da die Ausbildung von Primerartefakten nicht gänzlich vermieden werden konnte. Für die Adenylatcyclase Sequenz wurde ein mit JOE markierter LUX™ Primer („reverse“, Acl1 JOE) und ein unmarkierter „forward“ Primer (Acl3) entwickelt, die ein 515 bp PCR-Produkt generieren. Wie sich herausstellen sollte, binden die Acl Primer nur an das Chromosom II von *L. interrogans* Spezies, sofern dies mit den Laborstämmen und den aus klinischen Proben isolierten Feldstämmen überprüft werden konnte. Selbst bei einer Annealingtemperatur von nur +40°C wurden weder ein spezifisches noch unspezifisches PCR-Produkt mit der DNA von Anderen, außer *L. interrogans* spp., gebildet. Inzwischen finden sich in der Gendatenbank (NCBI) auch zwei Sequenzen der Adenylatcyclase von *L. borgpetersenii* Serovar Hardjo-ovis Stämmen und es wird deutlich, warum die Primer dort nicht binden können: Die Homologie zu den zwei Sequenzen von *L. interrogans* beträgt nur 79%. Somit wurden per Zufall nicht nur zwei hoch spezifische Primer für eine Inhibitionskontrolle entwickelt, sondern sie bieten auch noch einen zusätzlichen diagnostischen Wert. Mit einem Blick auf die Amplifikationskurven, erhält man einen Hinweis, ob es sich bei der extrahierten Leptospiren-DNA möglicherweise um *L. interrogans* handeln könnte (Abbildung 7).

Ergebnisse

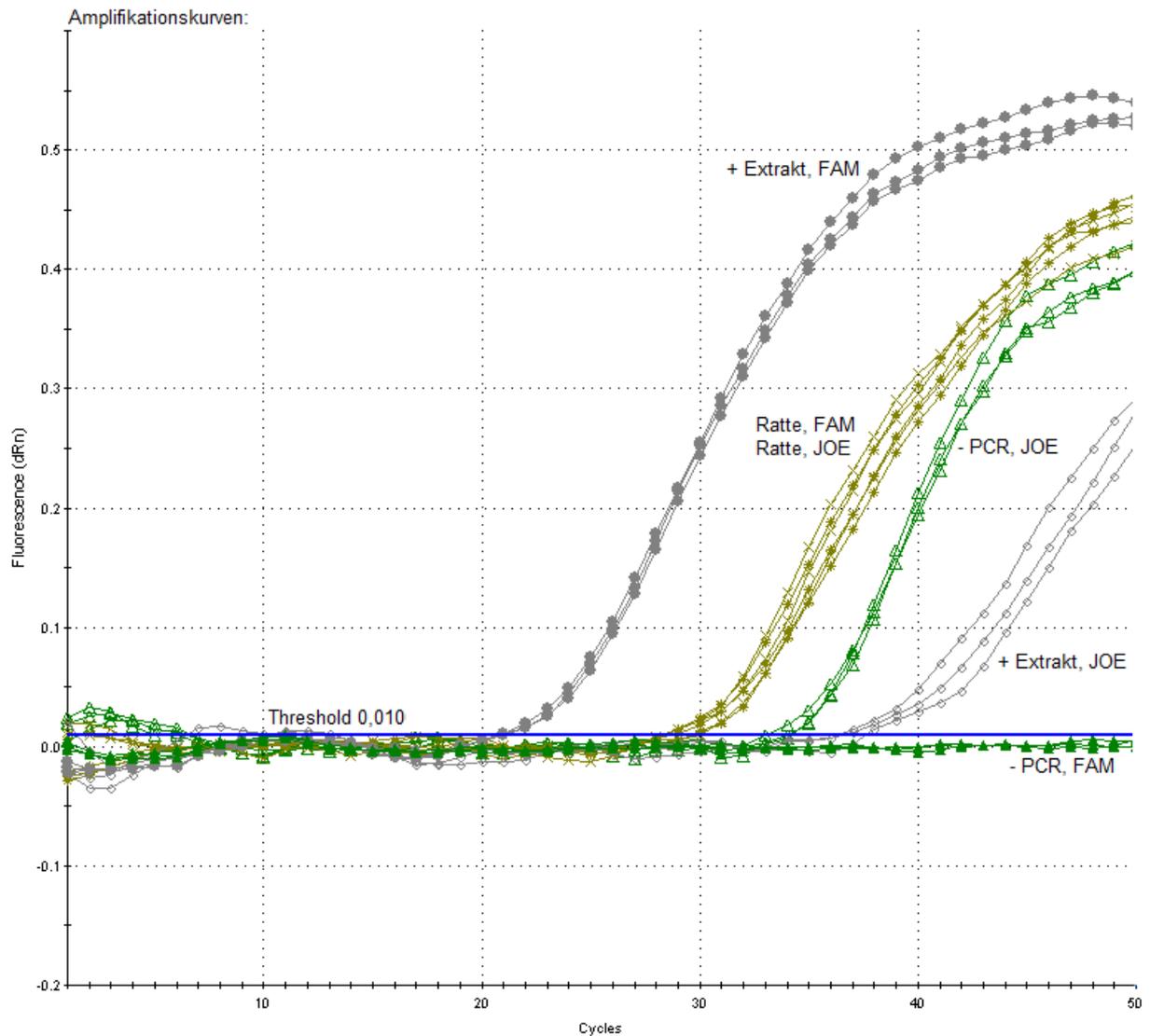


Abbildung 7. Vergleich der Fluoreszenzsignale für FAM und JOE in unterschiedlichen Reaktionsansätzen: Die positive Extraktionskontrolle (+ Extrakt) zeigt ein frühes Signal für FAM (LipL32, *L. borgpetersenii* Serovar Ballum) sowie ein spätes Signal für JOE (Inhibitionskontrolle). Die Probe von einer Rattenniere (Ratte) zeigt gleichermaßen ein Signal für FAM (LipL32) und JOE (*Acl*); die Typisierung nach der kulturellen Isolierung ergab *L. interrogans* Serovar Icterohaemorrhagiae. Schließlich zeigt die negative PCR-Kontrolle (- PCR) ausschließlich ein Signal für JOE (Inhibitionskontrolle). Jede Probe lief im Dreifachansatz. (Einstellung der Software zum MX3005P Thermocycler von Stratagene: „Treat individually“, „Amplification plots“, FAM, JOE, NTC, Unknown, „Threshold“: 0,010)

Durch die unterschiedliche Produktgröße sind die beiden PCR-Fragmente analog der LipL32 Sequenz und der Adenylatcyclase Sequenz sowohl in der Agarosegel-Elektrophorese (Abbildung 16) als auch über die Schmelzkurve (Abbildung 8) in der qPCR voneinander unterscheidbar. Die Schmelzkurven des *Acl* Produktes sind schmaler und die Schmelztemperatur (T_m) liegt im Mittel bei $\bar{x}_{T_m} = 81,145^\circ\text{C}$ mit einer Standardabweichung von $s = \pm 0,436^\circ\text{C}$, während die Schmelzkurven des LipL32 Produktes breiter sind und der $\bar{x}_{T_m} = 82,196^\circ\text{C}$ ($s = \pm 0,347^\circ\text{C}$) beträgt (Abbildung 9).

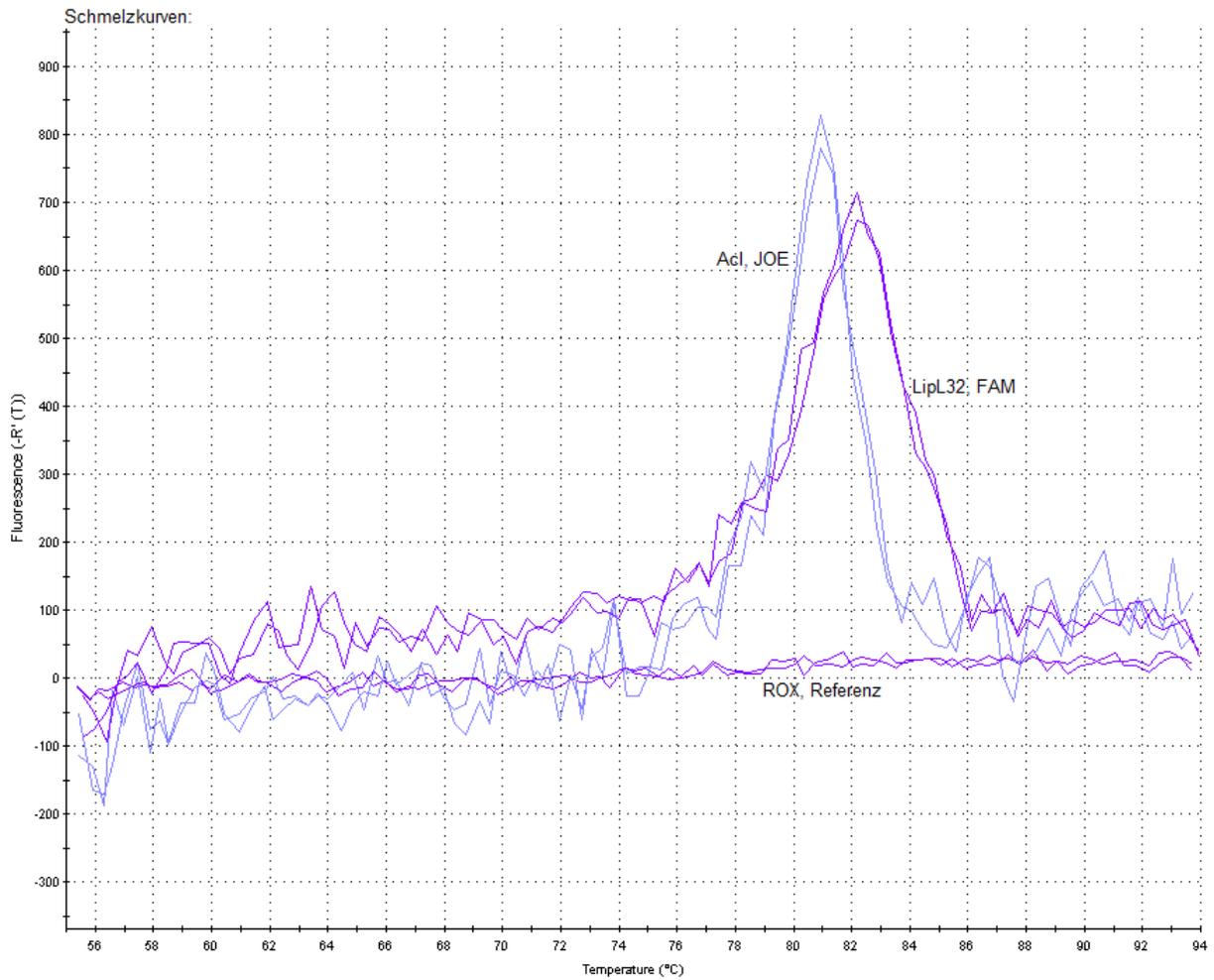


Abbildung 8. Vergleich der Schmelzkurven, spezifisch für das LipL32 PCR-Produkt im FAM Farbkanal, das Acl PCR-Produkt im JOE Farbkanal und dazu der ROX-Referenz Farbstoff ohne Bildung eines PCR-Produktes (Einstellung der Software zum MX3005P Thermocycler von Stratagene: „Treat individually“, „Dissociation curve“, FAM, JOE, ROX)

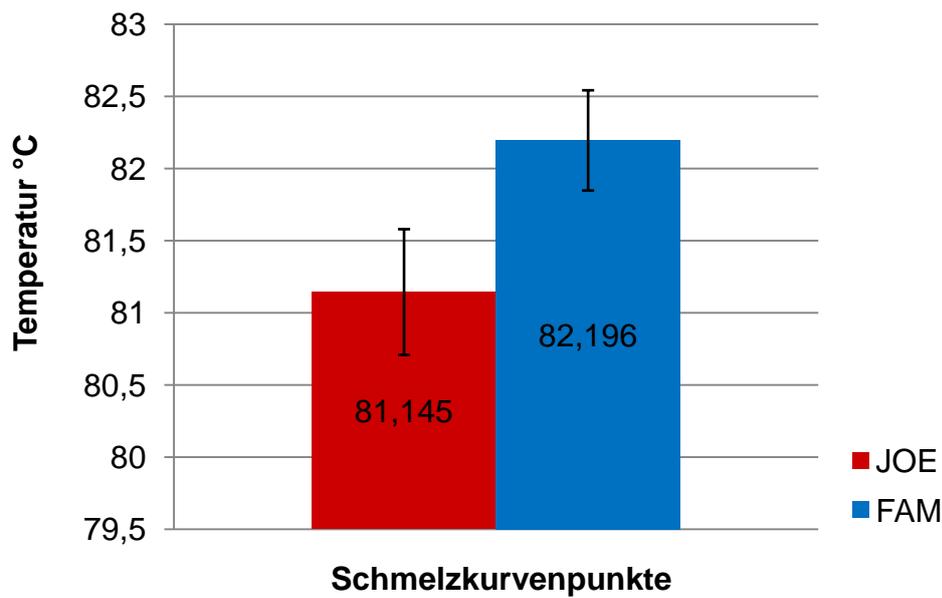


Abbildung 9. Auswertung von 1532 (LipL32, FAM) bzw. 3691 (Acl, JOE) Schmelzkurven. Vergleich der mittleren Schmelztemperatur \bar{x}_{Tm} (°C) sowie Darstellung der Minimal- und Maximalwerte

Ergebnisse

4.1.2.2 Spezifität

Jeder Primer wurde während seiner Entwicklung, einzeln und in Kombination mit den anderen Primern, virtuell anhand der verfügbaren Sequenzen in der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) auf seine Spezifität hin überprüft. Demnach waren alle Primer hoch spezifisch. In praxi konnten auch in der LUX™ qPCR außer gelegentlichen Primerartefakten (meist durch den LipL32-287 FAM Primer), welche über die Schmelzkurve determiniert wurden, zu keiner Zeit die Bildung von unspezifischen PCR-Produkten nachgewiesen werden. Primerartefakte sind sehr kurze und in geringer Zahl amplifizierte Fragmente, die immer unterschiedlich sind; Einzelfälle, deren Bildung niemals reproduzierbar war und die mittels Agarosegel-Elektrophorese in keinem Fall visualisiert werden konnten. Daneben wurde von den LUX™ Primern in der qPCR immer nur die Bildung der gesuchten, spezifischen Produkte (LipL32, Acl) über die Amplifikationskurven bzw. Schmelzkurven angezeigt. War in einer Probe Leptospiren-DNA enthalten, so wurde ausschließlich das gesuchte DNA-Fragment in der PCR vervielfältigt, selbst wenn die Ausgangsmenge an Ziel-DNA gegenüber Fremd-DNA sehr gering war und verschiedene Annealingtemperaturen von +40°C bis +65°C ausprobiert wurden. Auf dem Agarosegel war immer nur die eine amplifizierte Bande der richtigen Größe sichtbar, selbst nach der semi-nested PCR (85 Zyklen). Anders verhielt es sich, wenn im Reaktionsansatz keine Leptospiren-DNA enthalten war, aber so viel Fremd-DNA, dass manches Mal die LUX™ qPCR sogar gehemmt wurde. Dann konnten auf dem Agarosegel, seltener bereits nach der qPCR oftmals aber nach der semi-nested PCR, unspezifische Produkte, als deutliche Banden nachgewiesen werden. Interessanter Weise waren diese Produktbildungen nicht reproduzierbar, die amplifizierten Fragmente unterschiedlich lang und selbst in einem Dreifachansatz nie gleich. Dieses Phänomen trat nur bei klinischem Probenmaterial auf, wenn der Gesamt-DNA-Gehalt der Probe sehr hoch war, wie zum Beispiel bei Nierenproben oder stark verkeimten Urinproben und letztlich zu viel DNA in die PCR eingesetzt wurde. Es reichte aus, das Eluat des DNA-Extraktes auf 500 µl aufzufüllen und keine unspezifischen Produkte wurden mehr gebildet.

4.1.3 LUX™ qPCR

4.1.3.1 Standardkurve

Ein 433 bp großes PCR-Fragment der LipL32 Sequenz, generiert mit den Primern LipL32-287 und LipL32-678 wurde in einen Vektor ligiert und dieser kloniert. Für die Erstellung einer Standardkurve wurde die erhaltene Plasmidlösung auf 1 ng/µl eingestellt ($\approx 2 \times 10^8$ Genomkopien) und eine log₁₀ Verdünnungsreihe bis zur Minimalkonzentration von 1 ag/µl angefertigt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden in einem Dreifachansatz 5 µl als „Template“ in die LUX™ qPCR eingesetzt, um die analytische Sensitivität der PCR zu überprüfen. In den identischen PCR-Protokollen konnten mit Matrizen-DNA aus jeder Verdünnungsstufe Leptospiren-DNA-Kopien nachgewiesen werden. Doch zeigte sich bereits beim ersten Versuch, dass 1 Genomkopie nicht immer nachweisbar war. Wiederholungen konnten dies

bestätigen, so dass für die LUX™ qPCR eine Empfindlichkeit von 10 Genomkopien pro Reaktionsansatz festgelegt wurde. Die in der Experimentalphase ausprobierten Methoden zur Ermittlung der Sensitivität, über die Verdünnung der Reinkultur, des DNA-Extraktes oder des extrahierten PCR-Produktes, erbrachten das gleiche Ergebnis; allerdings war die mit dem Plasmid generierte Standardkurve den anderen Verfahren an Stabilität, Kontinuität, Linearität und Wiederholbarkeit weitaus überlegen. Zukünftig wurden in jeder LUX™ qPCR, a) um die Aussagekraft („Performance“) zu beurteilen und b) um über die Standardkurve die Leptospiren in einer Probe zu quantifizieren, ein Doppelansatz von 1×10^7 bis 1×10^2 Genomkopien pro Reaktion mitgeführt. Die Standardkurve war stets das erste Kriterium, welches herangezogen wurde, um zu überprüfen, ob die PCR überhaupt auswertbar ist. Dazu wurden zuerst die Amplifikationskurven beurteilt (Einstellung der Software zum MX3005P Thermocycler von Stratagene: „Treat individually“, FAM, Standard) (Abbildung 10), anschließend das Grundrauschen („Threshold“) auf 0,010 eingestellt und in die Ansicht „Standard curve“ gewechselt (Abbildung 11). Die Effizienz (Eff.: $\bar{x} = 91\%$) und das Bestimmtheitsmaß (RSq: $\bar{x} = 0,99$) wurden notiert.

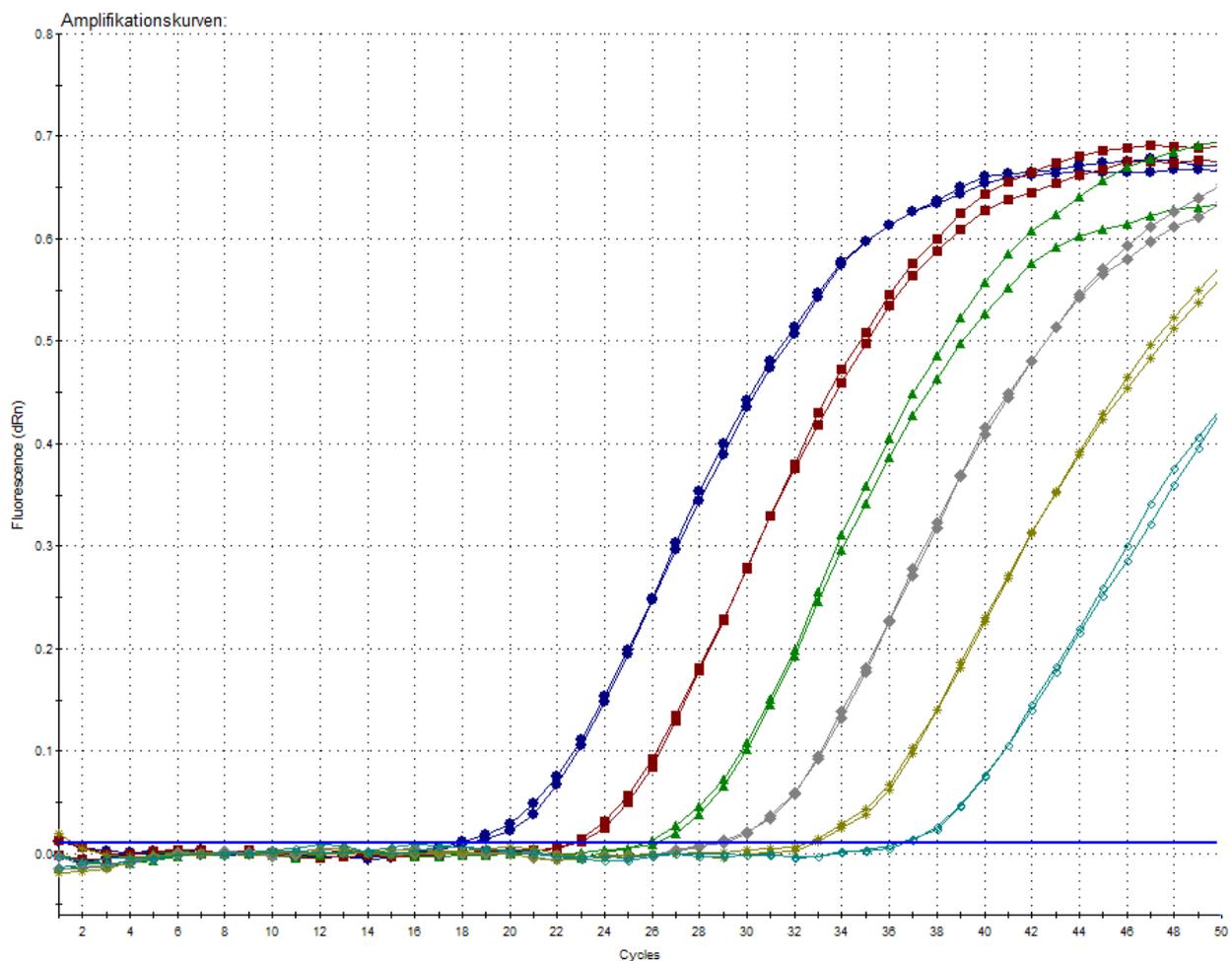


Abbildung 10. Amplifikationskurven der Verdünnungsreihe einer Standardkurve von 1×10^7 bis 1×10^2 Genomkopien pro Reaktion im Doppelansatz (Einstellung der Software zum MX3005P Thermocycler von Stratagene: „Treat individually“, FAM, Standard, „Amplification plots“, „Threshold“: 0,010)

Ergebnisse

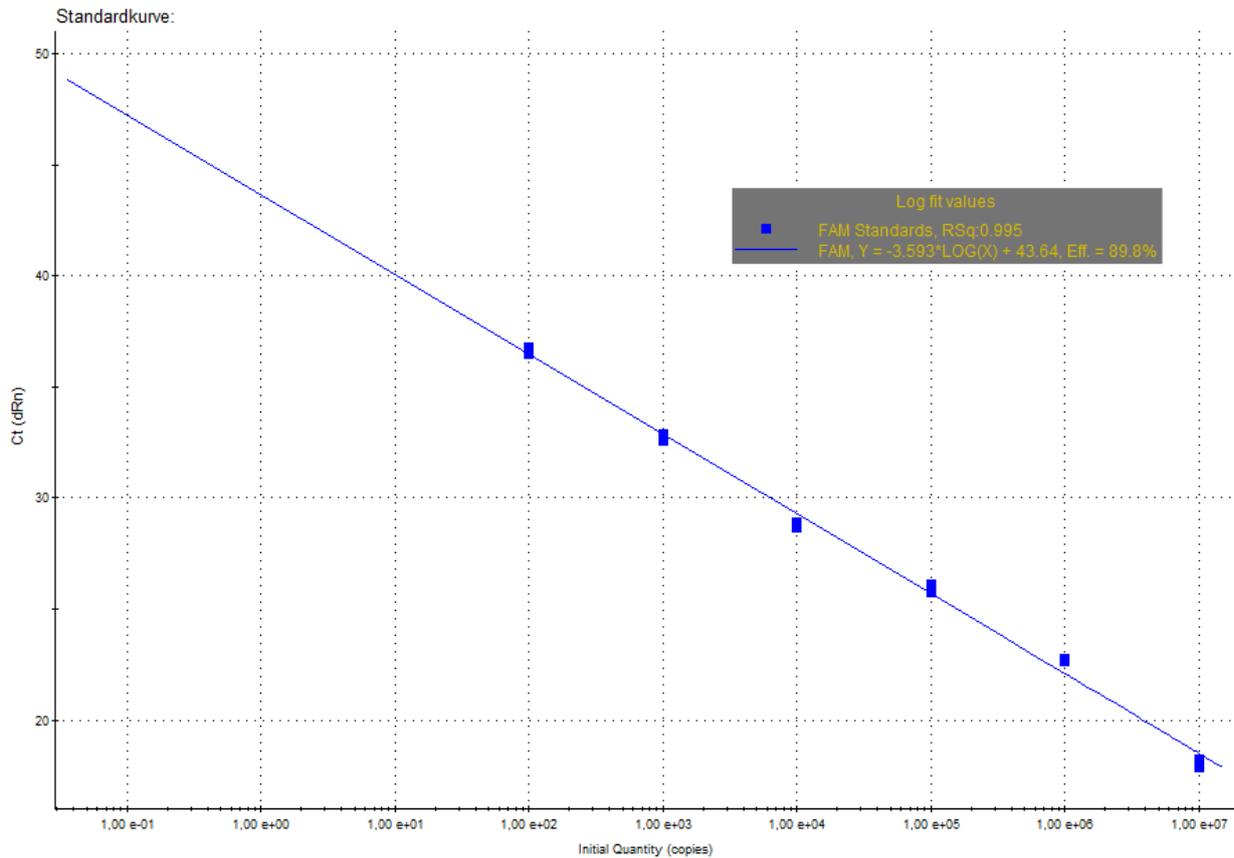


Abbildung 11. Regressionsgerade durch die Standardkurvenpunkte (vergleiche Abbildung 10) (Einstellung der Software zum MX3005P Thermocycler von Stratagene: „Treat individually“, FAM, Standard, „Standard curve“, „Threshold“: 0,010); RSq: Bestimmtheitsmaß; Eff.: Effizienz

Die Ct-Werte (Y_{ijk}) aus dem Doppelansatz (Messwiederholung $k = 1, 2$) der Standardkurven von 43 LUX™ qPCR-Experimenten (Wiederholung $i = 1, \dots, 43$) zu jeder Verdünnungsstufe (1×10^j , $j = 7, \dots, 2$) wurden ausgewertet. Zunächst wurde in Abhängigkeit der Genomkopien in einem Reaktionsansatz das arithmetische Mittel (\bar{x}) für die Ct-Werte und die dazugehörige empirische Varianz (s^2) bestimmt (Tabelle 22, Abbildung 12).

Tabelle 22. Mittlere Ct-Werte (\bar{x}) der Standardkurve; „Threshold“: 0,010

Genomkopien pro Reaktion	Ct-Wert (\bar{x})	empirische Varianz (s^2)
10.000.000	18,14	0,405
1.000.000	21,64	0,704
100.000	25,21	0,689
10.000	28,49	0,525
1.000	32,12	0,770
100	36,15	0,904

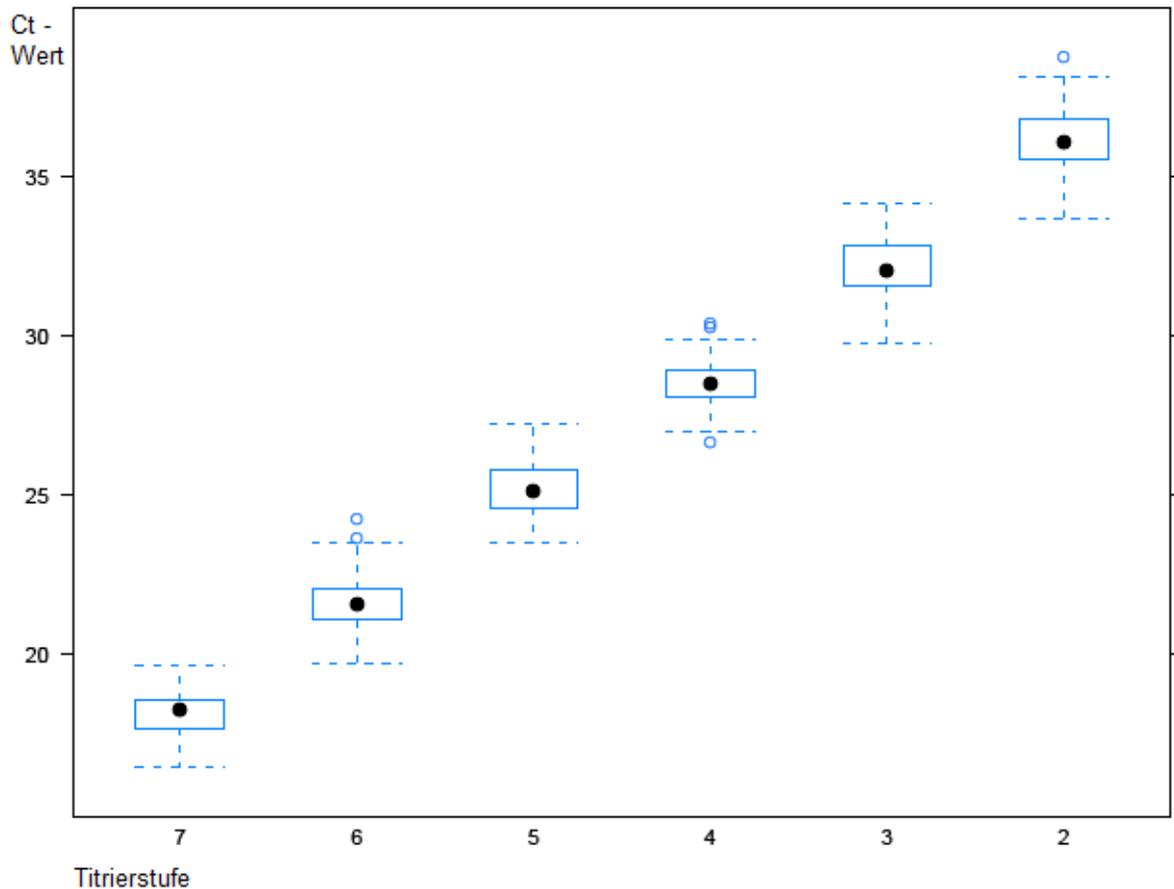


Abbildung 12. Boxplot der gemessenen Ct-Werte (Y_{ijk}) von 43 qPCR-Ansätzen ($i = 1$ bis 43) für jede Titrierstufe j (1×10^j , $j = 7$ bis 2) im Doppelansatz ($k = 1$ bzw. 2) (Michael Höhle, Institut für Statistik der LMU, München)

Während der Entwicklungsphase der LUX™ qPCR konnte festgestellt werden, dass je höher die Verdünnung, desto größer die Differenz der Ct-Werte. Daher wurde für die Erstellung der Standardkurve, zur Quantifizierung von Leptospiren-DNA in einer klinischen Probe, erst bei einer Titrierstufe, die 1×10^2 Genomkopien pro Reaktion enthielt, angefangen, um ein deutliches Driften der Regressionsgerade zu vermeiden. Dennoch konnte bei der Berechnung der mittleren Differenz und empirischen Varianz von den Messwerten für die einzelnen Verdünnungsstufen aus den 43 qPCR-Experimenten, für die höchste Titration auch die größte Abweichung nachgewiesen werden (Tabelle 23).

Tabelle 23. Mittlere Differenz der Ct-Werte ($Y_{ij1} - Y_{ij2}$) in Abhängigkeit der Verdünnungsstufe (1×10^j)

Titrierstufe j (1×10^j)	$Y_{ij1} - Y_{ij2}$	empirische Varianz der Differenzen
7	0,127	0,342
6	0,125	0,423
5	0,061	0,570
4	-0,009	0,380
3	-0,195	0,480
2	0,202	0,714

Ergebnisse

Für die Standardkurve der 43 LUX™ qPCR-Ansätze wurden stets dieselben Gebrauchslösungen der sechs Titerstufen (10 pg/μl bis 100 ag/μl) verwendet. Die Aufbewahrung erfolgte im Kühlschrank. Die Anwendung erstreckte sich über einen Zeitraum von fünf Monaten. Es wurde untersucht, ob die Zeit einen Einfluss auf die Ct-Werte der Verdünnungsstufen hatte, um die Stabilität der Gebrauchslösung zu beurteilen. Der Erwartung nach, könnte man mit einer Degradation der Plasmid-DNA und damit einer Abnahme der Messwerte rechnen. Für die Titerstufen 1×10^2 sowie 1×10^7 traf dies wohl auch zu, in keinsten Weise jedoch für die anderen Verdünnungen. Insgesamt ließ sich daraus kein eindeutiger Trend ablesen (Abbildung 13).

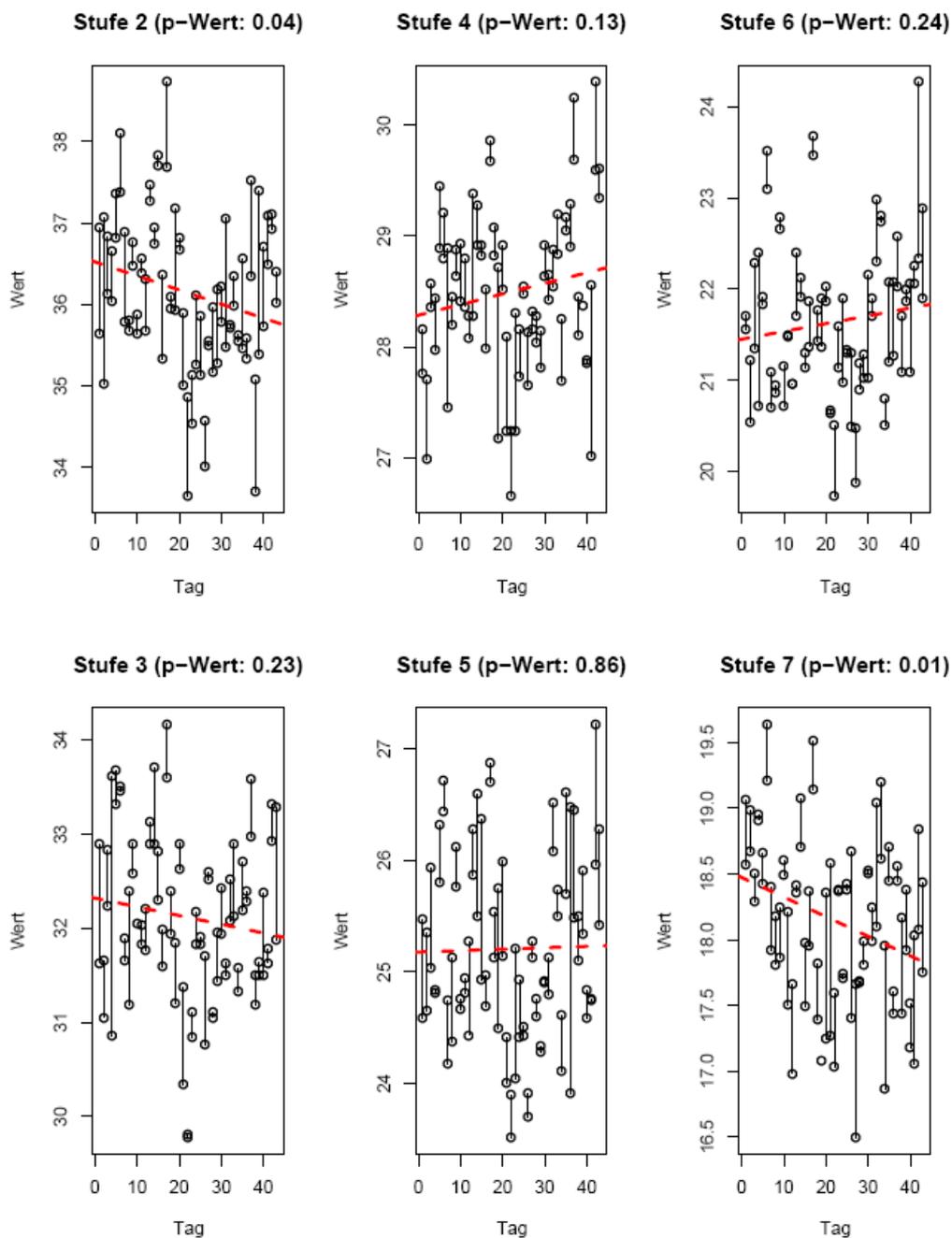


Abbildung 13. Dargestellt sind die beobachteten Ct-Werte (Y_{ij1} , Y_{ij2}) jeder Titerstufe j (1×10^j , $j = 7$ bis 2) pro qPCR-Ansatz i ($i = 1$ bis 43) und die sich ergebende Trendlinie nach der Regressionsanalyse mit dem zugehörigen p-Wert für den Steigungskoeffizienten („slope“) (Michael Höhle, Institut für Statistik der LMU, München)

Die Leistungsfähigkeit der LUX™ qPCR wurde hinsichtlich der Wiederholpräzision innerhalb eines qPCR-Ansatzes und der Vergleichbarkeit der Ergebnisse von verschiedenen qPCR-Experimenten in Abhängigkeit der DNA-Menge im Reaktionsansatz geprüft. Betrachtet man Abbildung 14 so scheint rein deskriptiv die Varianz der Differenzen für die einzelnen Titrierstufen minimal, ja nahezu gleich zu sein. Führt man den Levene's Test auf Varianzgleichheit durch, so findet sich diese Nullhypothese bestätigt ($p = 0,366$; $F = 1,091$). Doch wird hier ein ganz entscheidender Faktor ignoriert, nämlich dass die Messungen der Verdünnungsstufen gleichzeitig in einem qPCR-Ansatz durchgeführt wurden und somit nicht unabhängig voneinander sind.

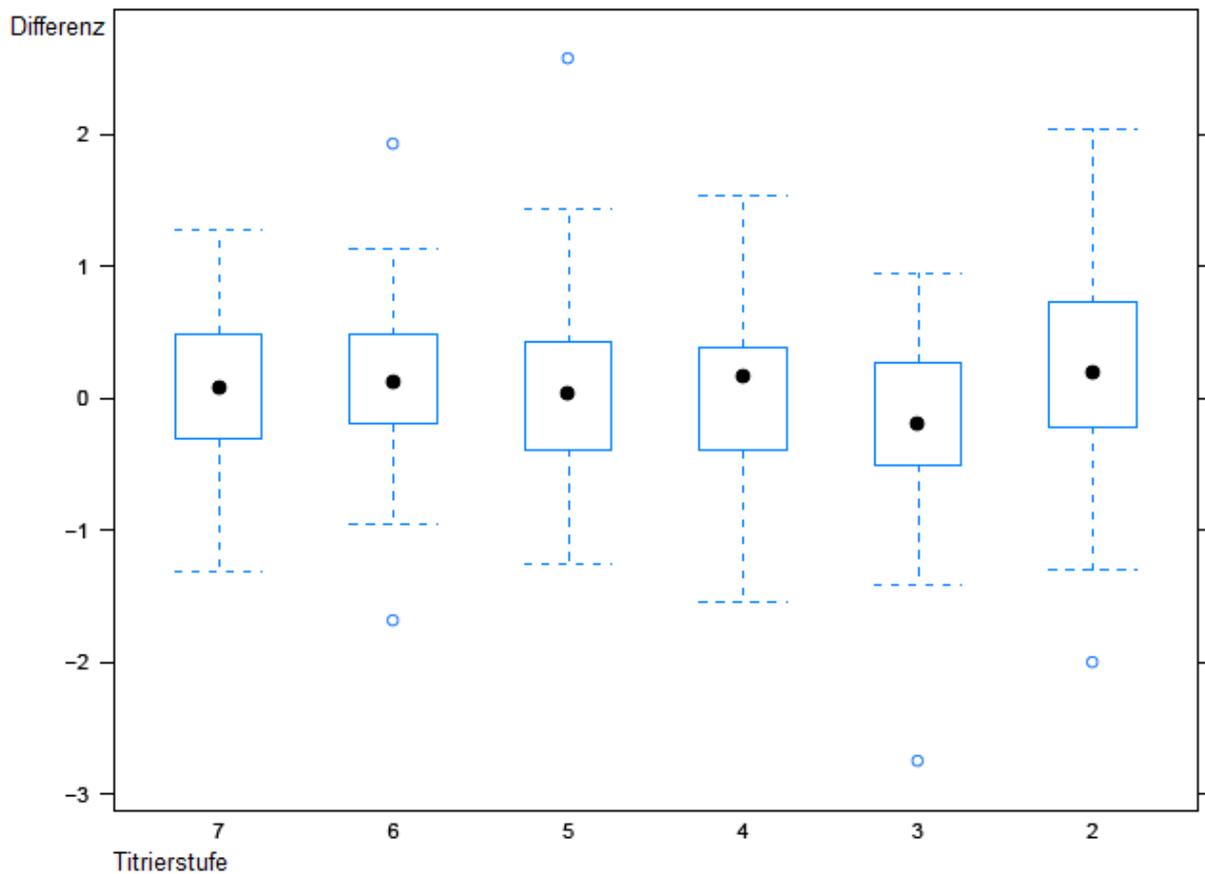


Abbildung 14. Boxplot der Differenzen der Ct-Werte ($Y_{i1} - Y_{i2}$) für jede Titrierstufe j (1×10^j , $j = 7, \dots, 2$) von 43 qPCR-Experimenten ($i = 1, \dots, 43$) (Michael Höhle, Institut für Statistik der LMU, München)

Obwohl das Bestreben da ist, möglichst alle Quellen der Variabilität einer PCR und damit der Ergebnisse zu beseitigen, wird dies nie gänzlich gelingen. Daher wurde ein anderes, flexibles, sogenanntes gemischtes, lineares Modell gewählt, um den Einfluss der zufälligen Effekte auf das LUX™ qPCR-Ergebnis gerecht zu werden (Formel 1).

Ergebnisse

$$\begin{aligned}
 Y_{ijk} &= \beta_j + a_i + (ab)_{ij} + \epsilon_{ijk}, \\
 a_i &\sim N(0, \tau_a^2), \\
 (ab)_{ij} &\sim N(0, \tau_{ab}^2), \\
 \epsilon_{ijk} &\sim N(0, \delta_j^2 \sigma^2) \\
 Y_{ijk} &\sim N(\beta_j, \tau_a^2 + \tau_{ab}^2 + \delta_j^2 \sigma^2)
 \end{aligned}$$

Formel 1. Modell mit heteroskedastischer Varianz; Erklärung im Text darunter (Michael Höhle, Institut für Statistik der LMU, München)

Jeder Ct-Wert (Y_{ijk}) wird zunächst einmal von der vorgelegten DNA-Menge in einem Reaktionsgefäß bestimmt; daraus ergibt sich ein fester Effekt, das Niveau der Titrierstufen β_j (Tabelle 24). Schließlich werden verschiedene zufällige Effekte a_i (Variation im i 'ten qPCR-Experiment) und $(ab)_{ij}$ (Wechselwirkung zwischen i 'tem qPCR-Ansatz und j 'ter Verdünnungsstufe respektive DNA-Menge) sowie ein Messfehler ϵ_{ijk} berücksichtigt. Es wird angenommen, dass die zufälligen Effekte sowie Messfehler normalverteilt sind mit Erwartungswert Null und respektiven Varianzen τ_a^2 , τ_{ab}^2 und $\delta_j^2 \sigma^2$. Es wird auch angenommen, dass die zufälligen Effekte und der Messfehler unabhängig sind. Insgesamt sind die Parameter β_j , τ_a^2 , τ_{ab}^2 , δ_j^2 und σ^2 zu schätzen. δ_j widerspiegelt ein Modell mit heteroskedastischer Varianz, nachdem davon ausgegangen wurde, dass die Varianz des Messfehlers auch von der Verdünnungsstufe abhängt. Um die Identifizierbarkeit zu gewährleisten wird $\delta_7 = 1$ festgelegt, die restlichen δ_2 bis δ_6 werden geschätzt (Tabelle 25).

Tabelle 24. Mittlere Niveau der Titrierstufen $\hat{\beta}_j$ und der Vertrauensbereich (95%-KI)

Titerstufe j (1×10^j)	Untergrenze	geschätzter Wert β_j	Obergrenze
7	17,919	18,140	18,361
6	21,423	21,640	21,857
5	24,988	25,206	25,424
4	28,282	28,495	28,707
3	31,895	32,114	32,332
2	35,909	36,145	36,382

KI: Konfidenzintervall

Tabelle 25. Schätzer für δ_j im heteroskedastischen Modell

Titerstufe j (1×10^j)	2	3	4	5	6	7
Schätzer für δ_j	1.000	0.749	0.651	0.746	0.732	0.792

Ein homoskedastisches Modell würde von einer Nullhypothese (H_0) ausgehen, nach der $\bar{\delta}_2 = \dots, \bar{\delta}_7 = 1$ wären. Ein Modellvergleich mit dem Likelihood Quotienten (LQ) Test zeigte deutlich, dass das Modell mit heteroskedastischer Varianz zu bevorzugen war. Es besteht ein signifikanter Unterschied der Varianzen zwischen den Messfehlern der einzelnen Verdünnungsstufen ($p = 0,033$), d.h. H_0 wird abgelehnt. Die Wiederholvarianz innerhalb eines qPCR-Ansatzes in Abhängigkeit der Ziel-DNA-Menge ist demnach im heteroskedastischen Modell als $\bar{\delta}_j^2 \sigma^2$ zu finden (Tabelle 26).

Tabelle 26. Geschätzte intra-Test Wiederholvarianz ($\hat{\sigma} \approx 0,643$)

Titerstufe j (1×10^j)	2	3	4	5	6	7
Schätzer für $\bar{\delta}_j^2 \sigma^2$	0,413	0,232	0,175	0,230	0,222	0,259

Daraus lässt sich der kritische Wiederholgrenzbetrag (die Repeatability $r_j \approx 2,83 \times \sqrt{\bar{\delta}_j^2 \sigma^2}$) für eine vorgegebene Wahrscheinlichkeit von 95% bestimmen (Tabelle 27).

Tabelle 27. Geschätzte Wiederholbarkeit r für jede Titrierstufe j

Titerstufe j (1×10^j)	2	3	4	5	6	7
Schätzer für r_j	1,82	1,36	1,18	1,36	1,33	1,44

Ziel einer diagnostischen qPCR ist, eine hohe Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener qPCR-Experimente zu erreichen. Unter Einbeziehung der intra-Test Wiederholvarianz lässt sich nach dem heteroskedastischen Modell die Varianz der Reproduzierbarkeit ($T_a^2 + T_{ab}^2 + \bar{\delta}_j^2 \sigma^2$) schätzen (Tabelle 28).

Tabelle 28. Geschätzte inter-Test Varianz ($\hat{\tau}_a \approx 0,602$; $\hat{\tau}_{ab} \approx 0,219$)

Titerstufe j (1×10^j)	2	3	4	5	6	7
Schätzer für $T_a^2 + T_{ab}^2 + \bar{\delta}_j^2 \sigma^2$	0,824	0,643	0,586	0,641	0,632	0,670

Schließlich konnte ein Wert für die Vergleichbarkeit (Reproducibility $R_j \approx 2,83 \times \sqrt{T_a^2 + T_{ab}^2 + \bar{\delta}_j^2 \sigma^2}$) der Ergebnisse verschiedener LUX™ qPCR-Ansätze in Abhängigkeit der Menge an Ziel-DNA in einem Reaktionsgefäß für eine vorgegebene Wahrscheinlichkeit von 95% bestimmt werden (Tabelle 29).

Tabelle 29. Geschätzte Vergleichbarkeit R für jede Titrierstufe j

Titerstufe j (1×10^j)	2	3	4	5	6	7
Schätzer für R_j	2,57	2,27	2,17	2,27	2,25	2,32

Ergebnisse

4.1.3.2 Kontrollen

Eine qPCR dauert 2 Stunden und 50 Minuten. Nach 1 Stunde lässt sich mit einer Zwischenanalyse prüfen, ob die LUX™ qPCR überhaupt funktioniert und die DNA-Extraktion geklappt hat. Denn zu diesem Zeitpunkt erscheint bereits das Fluoreszenzsignal für die positive Extraktionskontrolle und die ersten Verdünnungsstufen der Standardkurve. Sobald die qPCR beendet ist und die Standardkurve ausgewertet, erfolgt die Beurteilung der Negativkontrollen („Treat individually“, FAM, NTC), sowohl der negativen Extraktionskontrollen als auch der negativen PCR (MasterMix) Kontrolle. Eine echte Kontamination würde sich in einem Dreifachansatz gleichermaßen darstellen, wobei zwischen einer Kontamination während der Extraktion und einer Kontamination des MasterMixes unterschieden werden kann. Ist von sämtlichen negativen Ansätzen nur eine positiv, so spricht dies eher für eine „carry-over“ Kontamination. Gleich kein Signal einer Amplifikationskurve der Anderen, so weist dies auf unspezifische Primerproduktbildung hin; zur Überprüfung wird in die Ansicht „Dissociation curve“ gewechselt. Ein Vergleich der Schmelzkurven der positiven Extraktionskontrolle bzw. der Standardkurve mit denen der Negativen bringt Klarheit (Abbildung 15). Weisen die negativen Kontrollen im FAM Farbkanal keine Amplifikationskurven auf, so ist zu überprüfen, ob es sich dabei nicht um falsch negative Signale aufgrund einer PCR-Hemmung handelt.

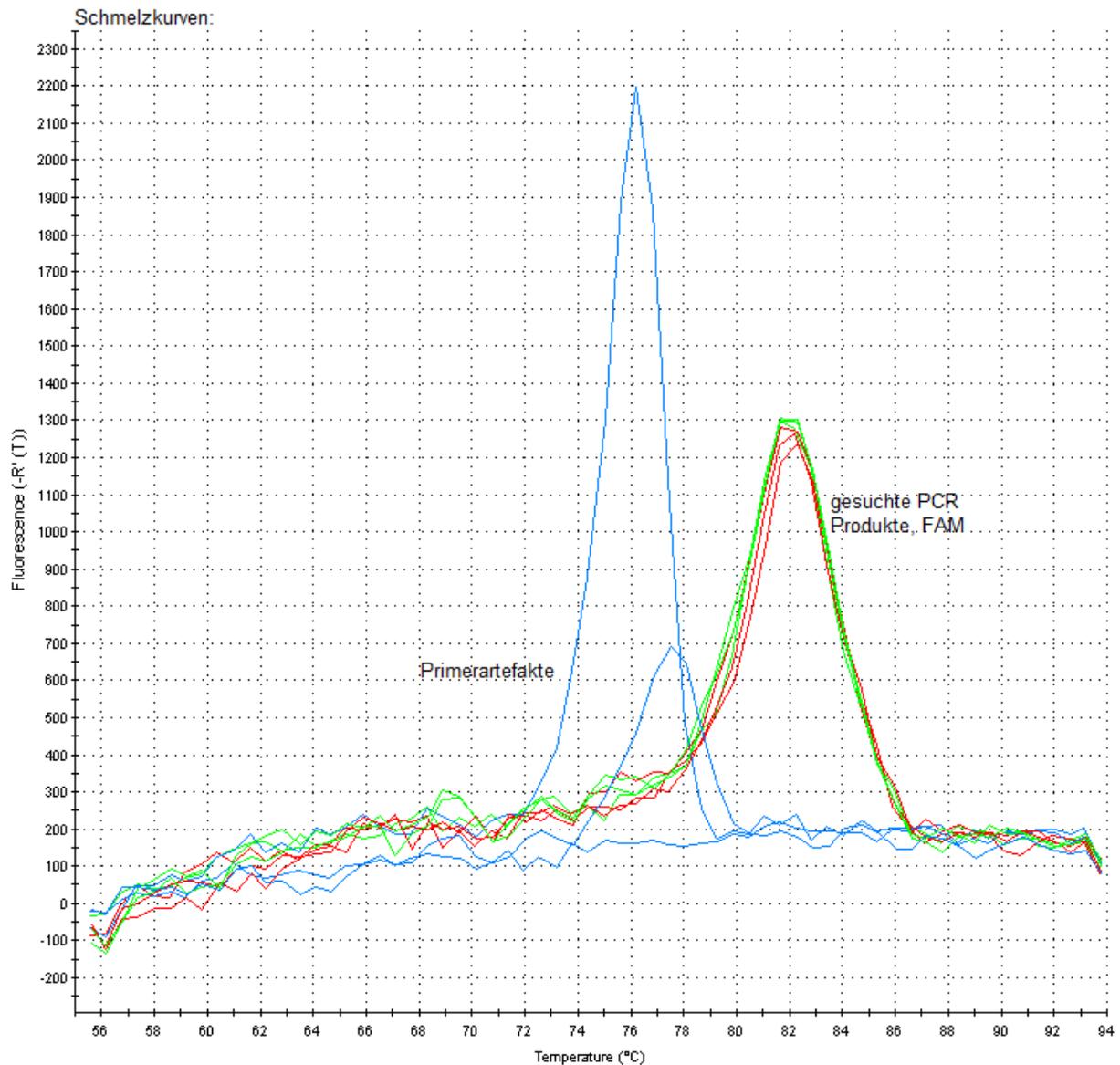


Abbildung 15. Eine Schmelzkurvenanalyse beweist, ob es sich um Fluoreszenzsignale spezifischer oder unspezifischer PCR-Produkte, wie hier den kurzen Primerartefakten, handelt (Einstellung der Software zum MX3005P Thermocycler von Stratagene: „Treat individually“, „Dissociation curve“, FAM)

4.1.3.3 Inhibitionskontrolle

Für die Inhibitionskontrolle wurde ein Plasmid konstruiert, welches ein 515 bp Fragment aus der Sequenz einer Adenylatcyclase auf Chromosom II von *L. interrogans* Serovar Hardjo Stamm Perepelitsin, generiert mit den Primern Acl3 und Acl1, enthält. Die Plasmidlösung wurde in einer Standardkonzentration von 1 fg/ μ l ($\approx 2 \times 10^2$ Genomkopien pro μ l) zu jedem qPCR-Ansatz gegeben. Nach der Überprüfung der Negativkontrollen im FAM Modus, erfolgte die Auswertung der Inhibitionskontrolle („Treat individually“, JOE, NTC). Für jede Negativkontrolle wird ein gleichstarkes, positives Fluoreszenzsignal erwartet (Ct-Wert zwischen 38 und 42). Sind weder im FAM Modus, noch im JOE Modus Amplifikationskurven detektierbar, so würde eine Hemmung der PCR-Reaktion in den betroffenen Ansätzen vorliegen.

Ergebnisse

4.1.3.4 Proben

Nach der Überprüfung der Standardkurve, der positiven Extraktionskontrolle, sowie den negativen Kontrollen, erfolgt nun die Auswertung der Ergebnisse für die Proben. Dazu wird immer der Dreifachansatz gemeinsam beurteilt und für jede Probe werden die Inhibitionskontrolle („Treat individually“, JOE, Unknown), die Amplifikationskurven („Treat individually“, FAM, Unknown) und die Schmelzkurve analysiert. Falls nötig eignen sich zum Vergleich die Standardkurve und die Negativkontrollen.

Neben den Glaskörper- und Kammerwasserproben aus der Pferdeklinik der LMU, München, wurden ab und an auch andere Proben, die für die Routinediagnostik an das Leptospirelabor des LGL, Oberschleißheim, gesandt wurden, in der LUX™ qPCR überprüft; dabei fanden sich positive Kammerwasser- und Glaskörperproben respektive Glaskörperspülflüssigkeiten von anderen Pferdekliniken aus Deutschland und der Schweiz, eine positive Urinprobe von einem Hund, sowie eine positive Serumprobe von einem Menschen und eine positive Urinprobe von einem anderen Patienten; desweiteren wurden im Zusammenhang mit einem Zoonosefall, in Nieren von drei Hausratten, DNA pathogener Leptospiren detektiert.

4.1.3.5 Quantifizierung

Anhand der Standardkurve, die in jedem qPCR-Experiment erneut mitgeführt wird, errechnet die Software des Thermocyclers (MX3005P, Stratagene) die Ausgangsmenge an Ziel-DNA (in Genomkopien) für das 433 bp PCR-Produkt der LipL32 Sequenz auf Chromosom I pathogener Leptospiren. Der letzte Vorgang für die Auswertung einer LUX™ qPCR besteht in der Quantifizierung der Menge an Leptospiren in einer positiven Probe. Dazu wird in die Ansicht „Initial template quantity“ gewechselt („Treat collectively“). Aus dem Mittelwert des Dreifachansatzes einer Probe, dem Wissen wie viel „Template“ in die PCR eingesetzt wurde (5 µl) und dem Volumen an Gesamteluat der extrahierten DNA (z.B. Glaskörperprobe 100 µl), kann auf die Ausgangsmenge an Leptospiren in der Probe geschlossen werden. Dabei handelt es sich bei diesem Wert um eine Mindestangabe. So waren in den Glaskörper- und Kammerwasserproben aus der Klinik für Pferde (LMU, München), von mindestens 20 bis 8.552.000 (Median \tilde{x} = 860; Mittelwert \bar{x} = 97.638) Leptospiren, DNA nachweisbar. Im Vergleich dazu konnten aus Nierenproben von drei infizierten Ratten, DNA von mindestens 60.200 bis 788.000 (\tilde{x} = 209.050; \bar{x} = 316.575) Leptospiren nachgewiesen werden.

4.1.3.6 Fehlersuche

Die LUX™ qPCR ist sehr empfindlich gegenüber dem Einsatz einer zu hohen Konzentration an LUX™ Primern. Dann erscheinen die Amplifikationskurven zunächst in Achterbahnform und wenn noch mehr Primer eingesetzt werden, ergibt sich eine Nulllinie als Zeichen einer scheinbaren Hemmung; in jedem Fall wird jedoch ein PCR-Produkt gebildet, welches mittels der Agarosegel-Elektrophorese darstellbar ist. Ein ähnliches Bild kann vorliegen, wenn zwar die Primerkonzentration stimmt, aber zu viel Fremd-DNA oder auch Ziel-DNA enthalten ist. Daher ist zu

empfehlen, bei Vorliegen einer qPCR-Hemmung nicht nur das Produkt der semi-nested PCR, sondern auch das qPCR-Produkt vergleichend auf einem Agarosegel darzustellen. Etwas weniger LUX™ Primer übt ausschließlich Einfluss auf die Sensitivität aus; die Amplifikationskurve würde in ihrer Fluoreszenzintensität geringer und der Ct-Wert weiter nach rechts verschoben. Wird in einer negativen Kontrolle ständig die Bildung eines PCR-Produktes durch ein Amplifikationssignal angezeigt, wird die Amplifikation geringer Mengen an Ziel-DNA verhindert, ist dieses PCR-Produkt aber niemals auf einem Agarosegel sichtbar, so handelt es sich um Primerdimerformationen; in diesem Fall ist der LUX™ Primer durch einen Neuen, besser Geeigneten zu ersetzen.

Wurde in der LUX™ qPCR mit Einsatz der HotStarTaq® DNA-Polymerase (Qiagen, Hilden) die erste Denaturierungsphase 10 Minuten lang gewählt, so wurde in den ersten Fluoreszenzmessungen, unabhängig ob Ziel-DNA im Reaktionsansatz enthalten war oder nicht, eine sehr hohe Fluoreszenzintensität detektiert, die dann langsam wieder auf Null abfiel. Da dieses Phänomen als schädlich für die LUX™ Primer angesehen wurde, fand diese DNA-Polymerase keine weitere Verwendung. Schließlich wurde sich für den Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Karlsruhe) entschieden, weil im Vergleich zur Platinum® Taq DNA-Polymerase und der Taq DNA-Polymerase, Recombinant (Invitrogen), die größte Kontinuität und Präzision erreicht wurde.

Zu viel Magnesiumchlorid oder dNTPs, eine zu niedrige Annealingtemperatur, aber auch eine zu kurze Annealingzeit, führen zu unregelmäßiger und unruhiger Darstellung der Amplifikationskurven. Im umgekehrten Verhältnis sind die Amplifikationskurven zwar sehr stabil, aber die Ct-Werte werden nach rechts verschoben, die Sensitivität der LUX™ qPCR ist reduziert. Die Verwendung der ROX-Referenz hat keinen Einfluss auf das Erscheinungsbild der LUX™ qPCR. Die Darstellung der Schmelzkurve hängt nicht nur von dem PCR-Produkt selbst, sondern auch von den Primern, der DNA-Menge und der Magnesiumchloridkonzentration im Reaktionsansatz ab. Dementsprechend kann die Breite, Höhe und der Schmelzpunkt von qPCR zu qPCR etwas variieren; daher ist stets der Vergleich des Triplets der Probe mit der Schmelzkurve einer positiven Kontrolle indiziert.

4.1.4 Agarosegel-Elektrophorese

Während der Phase der Entwicklung, dem Erlernen der Auswertung und Interpretation der LUX™ qPCR, wurde stets nach der qPCR der komplette Ansatz auf ein Agarosegel aufgetragen. Dabei konnte Folgendes festgestellt werden: Bis zum Zyklus 45 der qPCR, entsprach das Ergebnis der Gelelektrophorese dem der qPCR. Dagegen konnten Amplifikationssignale der qPCR ab Zyklus 45 auf dem Gel oftmals nur als ein zarter Hauch einer Bande visualisiert werden oder das qPCR-Produkt stellte sich gar nicht mehr dar. Die Überprüfung des Ergebnisses der qPCR mittels semi-nested PCR brachte aber dann die Bestätigung, dass es sich auch bei den eindeutigen Amplifikationskurven nach mehr als 45 Zyklen in der LUX™ qPCR um „wahre“ PCR-Produkte handelte. Damit wies die LUX™ qPCR die gleiche Sensitivität auf, wie die Agarosegel-Elektrophorese nach der semi-nested PCR; das

Ergebnisse

galt aber nur, wenn die Reaktion der qPCR ungestört ablief. Zwei Ergebnisse konnten nach einer Hemmung jeglicher Amplifikations-signale in der LUX™ qPCR festgestellt werden, obwohl wissentlich Leptospiren-DNA im Ansatz enthalten sein musste. Einmal konnten auf dem Agarosegel, welches direkt nach der LUX™ qPCR angefertigt wurde, deutliche spezifische Banden detektiert werden. Die Untersuchung ergab, dass dies der Fall sein kann, wenn die Primerkonzentration im LUX™ qPCR-Ansatz zu hoch ist oder aber zu viel Fremd-DNA enthalten war. Das andere Mal konnten auf dem Agarosegel direkt nach der LUX™ qPCR keine Banden dargestellt werden, erst auf einem Agarosegel nach der semi-nested PCR. Als Grund hierfür wurden Stoffe angesehen, wie z.B. Harnstoff, welche die qPCR hemmten, aufgrund der Verdünnung in der semi-nested PCR aber keinen Einfluss auf die PCR-Reaktion mehr hatten. Für die Analyse von PCR-Produkten wurde ein 3%iges Gel verwendet. Damit konnten die Banden schnell und sauber voneinander getrennt werden (Abbildung 16). Um die DNA zu schonen, wurde bei einem präparativem Gel weniger Agarose (2%) und auch weniger Ethidiumbromid (3 µg/ml) verwendet.

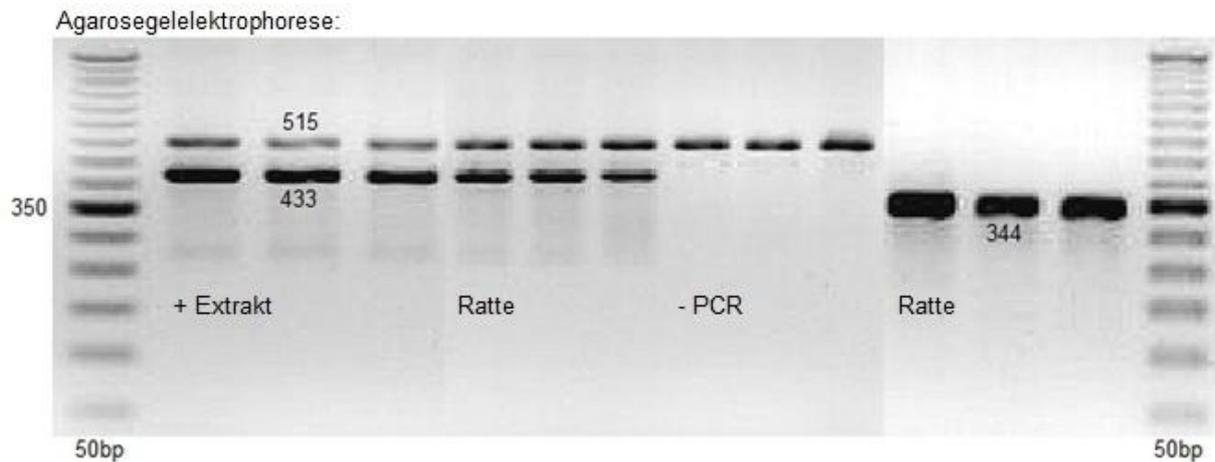


Abbildung 16. Darstellung der Ergebnisse aus der LUX™ qPCR und semi-nested PCR mittels Agarosegel-Elektrophorese: Das erste Triplet (positive Extraktionskontrolle) zeigt eine 433 bp Bande für das LipL32 PCR-Produkt (*L. borgpetersenii* Serovar Ballum) sowie eine 515 bp Bande als Ausdruck der Amplifizierung der Inhibitionskontrolle. Das zweite Triplet (Nierenprobe einer Ratte) zeigt eine 433 bp Bande für das LipL32 PCR-Produkt (*L. interrogans* Serovar Icterohaemorrhagiae) und eine 515 bp Bande für das Acl PCR-Produkt (*L. interrogans* Serovar Icterohaemorrhagiae). Das letzte Triplet der qPCR (negative PCR-Kontrolle) zeigt nur eine 515 bp Bande für die Inhibitionskontrolle an. Ausschließlich von dem 433 bp PCR-Produkt des LipL32 in der qPCR, wird in der semi-nested PCR ein 344 bp Fragment generiert. Dabei würde die positive Extraktionskontrolle dem Bild der Nierenprobe der Ratte entsprechen (vergleiche Abbildung 7).

4.1.5 Semi-nested PCR

Die semi-nested PCR war während der Entwicklungsphase der LUX™ qPCR ein wichtiges Instrument, um das PCR-Produkt aus der LUX™ qPCR zu überprüfen. Sie wurde anschließend immer seltener eingesetzt, nachdem man mit der Auswertung der qPCR-Ergebnisse vertraut war. Die Amplifikation mit 35 Zyklen und anschließender Agarosegel-Elektrophorese und Auswertung dauerte im Schnitt maximal drei Stunden. Damit war es möglich ein unsicheres LUX™ qPCR-Ergebnis noch am selbigen Tag zu überprüfen. War die LUX™ qPCR zum Beispiel gehemmt (FAM negativ, JOE negativ) so wurde durch die Entnahme von 1 µl des qPCR-

Ansatzes als „Template“ für die semi-nested PCR ein Verdünnungseffekt erreicht. Reichte die Verdünnung aus, um die Hemmung zu eliminieren und war Leptospiren-DNA im LUX™ qPCR-Ansatz enthalten, so konnte auf dem Agarosegel nach der semi-nested PCR die erfolgreiche Amplifikation des LipL32 PCR-Produktes nachgewiesen werden. War hingegen keine Leptospiren-DNA im LUX™ qPCR-Ansatz enthalten, rührte die Hemmung aber auf einer DNA-Überlast, so waren nach 85 PCR-Zyklen auf dem Agarosegel feine Banden unspezifischer und ungleichmäßiger PCR-Produkte zu erkennen. Keine Aussage ließ sich jedoch treffen, wenn auch nach der semi-nested PCR auf dem Agarosegel keinerlei Banden sichtbar waren, es konnte immer noch eine Hemmung vorliegen, trotz dem Gehalt an Leptospiren-DNA, oder die Probe war schlichtweg negativ. Dieses Dilemma, trat glücklicherweise nur dreimal während der Experimentalphase auf, bei zwei Kammerwasserproben und bei einer Serumprobe. Weitere Untersuchungen bestätigten eine Vollhemmung. Die Entstehung dafür lag jedesmal beim Laboranten selber. Die semi-nested PCR bietet aber noch einen ganz entscheidenden Vorteil; sie kann zur Qualitätssicherung herangezogen werden. Da strikt während der gesamten PCR-Durchführung von der DNA-Extraktion bis zur Agarosegel-Elektrophorese ein Einwegsystem eingehalten wurde, war weniger eine Kontamination mit PCR-Produkten zu fürchten. Das Problem stellte die DNA-Extraktion dar und die mögliche Verunreinigung der Extraktionsreagenzien. Da gerade klinische Proben eventuell auch sehr wenig Leptospiren-DNA enthalten, war es unbedingt notwendig falsch positive Ergebnisse frühzeitig zu erkennen. Über die negativen Extraktionskontrollen, negativen qPCR und negativen semi-nested PCR Kontrollen ließen sich Kontaminationen nicht nur sicher erkennen, sondern auch einer Prozessstufe zuordnen.

4.1.6 Klonierung von PCR-Produkten

Eine TA Klonierung von PCR-Produkten kann nicht funktionieren, wenn ein UDG-MasterMix für die PCR-Reaktion verwendet wird, da dann anstelle der Base T (Thymin) auch mal U (Uracil) in das Amplifikat eingebaut wurde. Die Verwendung von LUX™ Primern zur Herstellung des PCR-Produktes ist ebenfalls nicht zu empfehlen; die anschließende Ligation war nicht besonders effizient. Daher empfiehlt sich für eine Klonierung von PCR-Produkten eine konventionelle PCR mit unmarkierten Primern vorrauszuschicken. Ansonsten war das beschriebene Verfahren sehr einfach in der Durchführung und zeigte eine gute Ausbeute. Die erhaltenen Plasmidlösungen waren über 5 Monate im Kühlschrank sehr stabil (Abbildung 13).

4.1.7 Sequenzierung von PCR-Produkten

Mit Bezug zu einer klinischen Leptospirose beim Menschen wurden auch die Nieren von Hausratten in der LUX™ qPCR untersucht. Dabei fanden sich bei drei Ratten DNA pathogener Leptospiren. Da sowohl die LipL32 Primer, als auch die Acl Primer gleichermaßen ein PCR-Produkt generierten, lag der Verdacht nahe, dass

Ergebnisse

Leptospiren-DNA der Genospezies *L. interrogans* nachgewiesen wurde. Zur Verifizierung wurden die sechs PCR-Produkte der drei Ratten jeweils sequenziert. Dabei stellte sich heraus, dass die LipL32 Sequenz bzw. die Acl Sequenz aller drei Ratten zu 100% übereinstimmten (Abbildung 17 und Abbildung 18). Von Urin und Niere einer Ratte wurde eine Kultur angesetzt, die bereits nach 14 Tagen gut vermehrungsfähige Leptospiren hervorbrachte; eine spätere Typisierung des Isolates sollte den Verdacht der LUX™ qPCR und die Sequenziererergebnisse bestätigen. Es handelte sich um *Leptospira interrogans* Serovar Icterohaemorrhagiae.

```
cgtggaagtggatgagcadgattaaggcggcgctgctgcagttgagatgattgaaacccttgaagactcagac  
aggaatggaagcaaaaaagggttatattgtagaagcccaagaaatgcagatcagaatcggacttaacacgggtctt  
gcaaaagtgggtttatgggaaccgattcaattcggcttatacggatgatgggagatatggtgaatcttgcggcaagactt  
gaagccgcggttaaagattatggggttagtatttagtgagtgaatccgtcaacgtgaaatcaaggaagaattttact  
aggctttagatggttcgagtc aaaggaaaaaacgaatcgggtcaactttatgaactcattggaagagcggataacg  
tatctgaaagactagagcctctgattagagtttctaagggtttgaaagcatatctcaaccgagaatggtctttggccca  
ggaattattgaaagttcgcagattacgagaggtgta
```

Abbildung 17. Sequenz (5' - 3') des Acl PCR-Fragmentes (515 bp) von *Leptospira interrogans* Serovar Icterohaemorrhagiae aus einer Rattenniere und den dazugehörigen Primerbindungsstellen; 100% identisch zum Zugangscode („Accession number“) der NCBI-Gendatenbank: AE016824

```
taatcgctgaaatgggagttcgtatgattccccaacaggcgaatcggtagccaggcgacggagacttagtaagc  
gacgcttcaaaagcggctacccagaagaaaaatcaatgccacattggttgatacttggatccgtgtagaagaatgt  
cggcgattatgcctgaccaaatcgccaaagctcgaaagcaaaaaccagttcaaaaattggacgatgatgatggt  
gacgatactataaagaagagagacacaacaagtacaactctctactagaatcaagatccctaatcctccaaaatct  
tttgacgatctgaaaaacatcgacactaaaaacttttagtaagaggtctttacagaattctttcactacctacaaacca  
ggtgaagtgaaggatcttcgttgcactctgttgtctgct
```

Abbildung 18. Sequenz (5' - 3') des LipL32 PCR-Fragmentes (433 bp) von *Leptospira interrogans* Serovar Icterohaemorrhagiae aus einer Rattenniere und den dazugehörigen Primerbindungsstellen (433 bp); 100% identisch zu den Zugangsnummern („Accession numbers“) der NCBI-Gendatenbank: AE016823; AB094433; AB094435; AB094436; AF245281; AF366366; AY568679; AY461902; AY461903; AY461907; AY461909; AY609321; AY609324; AY609325; AY609327; AY609329

4.2 Glaskörper- und Kammerwasserproben

4.2.1 Übersicht

505 Proben von 338 Pferden im Alter von 1 bis 26 Jahren ($\bar{x} = 8,7 \pm 4,5$ Jahre) wurden untersucht. Zehn Prozent (32) waren Hengste im Alter von 1 bis 15 Jahren ($\bar{x} = 5,2 \pm 2,7$ Jahre), 39% (133) Stuten im Alter von 1 bis 24 Jahren ($\bar{x} = 8,5 \pm 4,6$ Jahre) und schließlich waren mit 51% (173) die meisten Pferde Wallache ab einem Alter von 2 bis 26 Jahren ($\bar{x} = 9,5 \pm 4,5$ Jahre). Letztendlich zählt ein Wallach doch immer noch als männliches Pferd, so dass insgesamt von 61% (205) männlicher Tiere mit einem Alter von 1 bis 26 Jahren ($\bar{x} = 8,8 \pm 4,5$ Jahre) Glaskörper- und/oder Kammerwasserproben untersucht wurden (Abbildung 19, Tabelle 30). Das Geschlecht der Tiere hatte keinen Einfluss auf ein positives oder negatives

Testergebnis in der Leptospirendiagnostik (Fisher's Exact Test, $p = 0,56$). Ein signifikanter Unterschied besteht allerdings zwischen dem Alter aller Pferde bzw. der Reaktionspositiven gegenüber den Reaktionsnegativen (Student's t Test, $p < 0,001$).

Tabelle 30. Übersicht über die Verteilung von Geschlecht und Alter der positiv und negativ getesteten Pferde

Zuordnung	pos/216	pos/Geschlecht	Alter Jahre	$\bar{x} \pm s$ Jahre	neg/122	Alter Jahre	$\bar{x} \pm s$ Jahre
Hengste	21 (10%)	21/32 (66%)	1 bis 9	4,9 \pm 2,1	11 (9%)	3 bis 15	5,7 \pm 3,5
Wallache	107 (49%)	107/173 (62%)	2 bis 26	8,5 \pm 3,9	66 (54%)	3 bis 25	11,2 \pm 4,8
Männliche	128 (59%)	128/205 (62%)	1 bis 26	7,9 \pm 3,9	77 (63%)	3 bis 25	10,4 \pm 5,0
Stuten	88 (41%)	88/133 (66%)	2 bis 24	7,5 \pm 4,0	45 (37%)	1 bis 20	10,6 \pm 4,9
Pferde	216 (100%)		1 bis 26	7,7 \pm 3,9	122 (100%)	1 bis 25	10,5 \pm 5,0

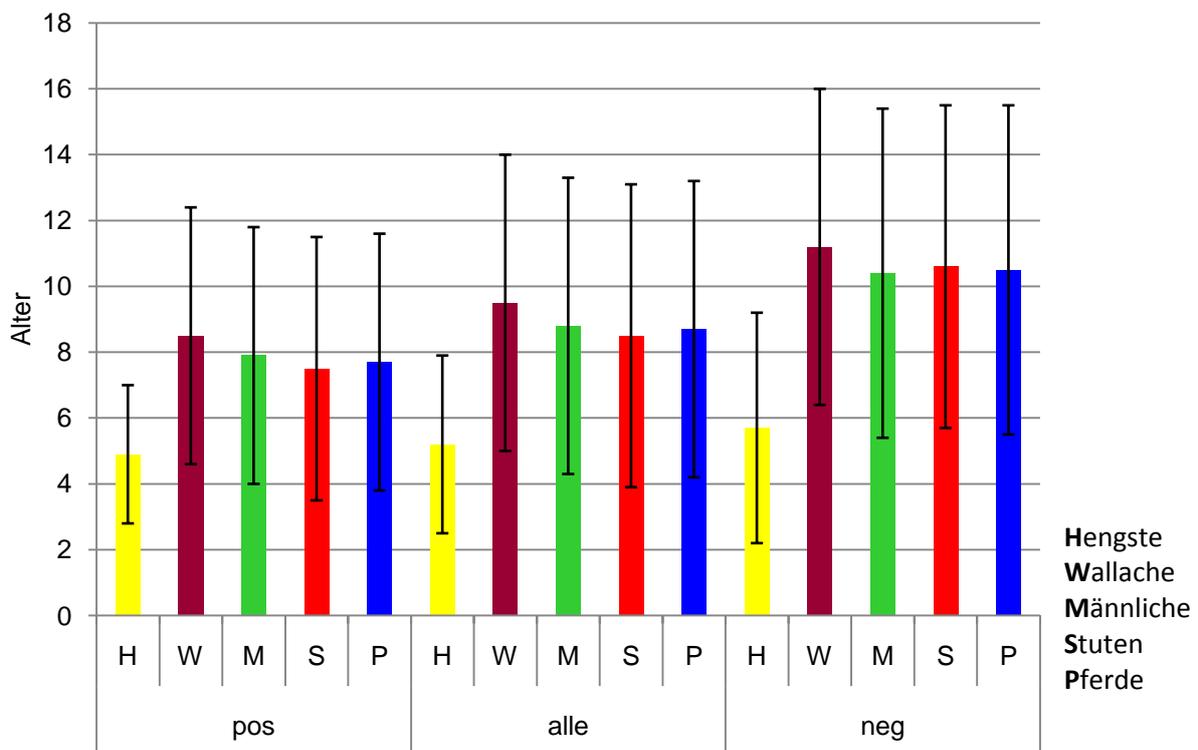


Abbildung 19. Vergleich vom arithmetischen Mittel \bar{x} und der Standardabweichung s des Alters (in Jahren) von positiven, allen und negativen Pferden in Abhängigkeit oder unabhängig (P) vom Geschlecht

Außer aus dem Bundesland Bremen wurden Proben von Pferden aus ganz Deutschland, sowie aus Österreich, der Schweiz und Tschechien untersucht. Zusätzlich standen zwei Pferde in Luxemburg, eines in Holland, Südtirol, England und den USA (Abbildung 20). Soweit ersichtlich kamen mindestens drei Vollblutpferde aus demselben Stall in Tschechien und reagierten jeweils positiv; ein Brandenburger- und ein Bayerisches Warmblut kamen aus demselben Stall in Hessen und wurden positiv getestet; ein Deutsches Reitpony und ein Oldenburger

Ergebnisse

Warmblut kamen aus demselben Stall in Schleswig Holstein und wurden negativ befundet; hingegen standen zwei Isländer im selben Stall in Baden-Württemberg sowie zwei Deutsche Reitponys in einem Stall in Österreich und alle reagierten positiv. Für den Stall in Tschechien, Österreich und Hessen wurde eine kulturelle Isolierung aus Glaskörpermaterial der betroffenen Pferde versucht und war auch jedesmal zumindest für ein Pferd erfolgreich; damit würde für den Stall die Möglichkeit bestehen, eine bestandsspezifische Vakzine auf Wunsch der Besitzer herzustellen zu lassen.

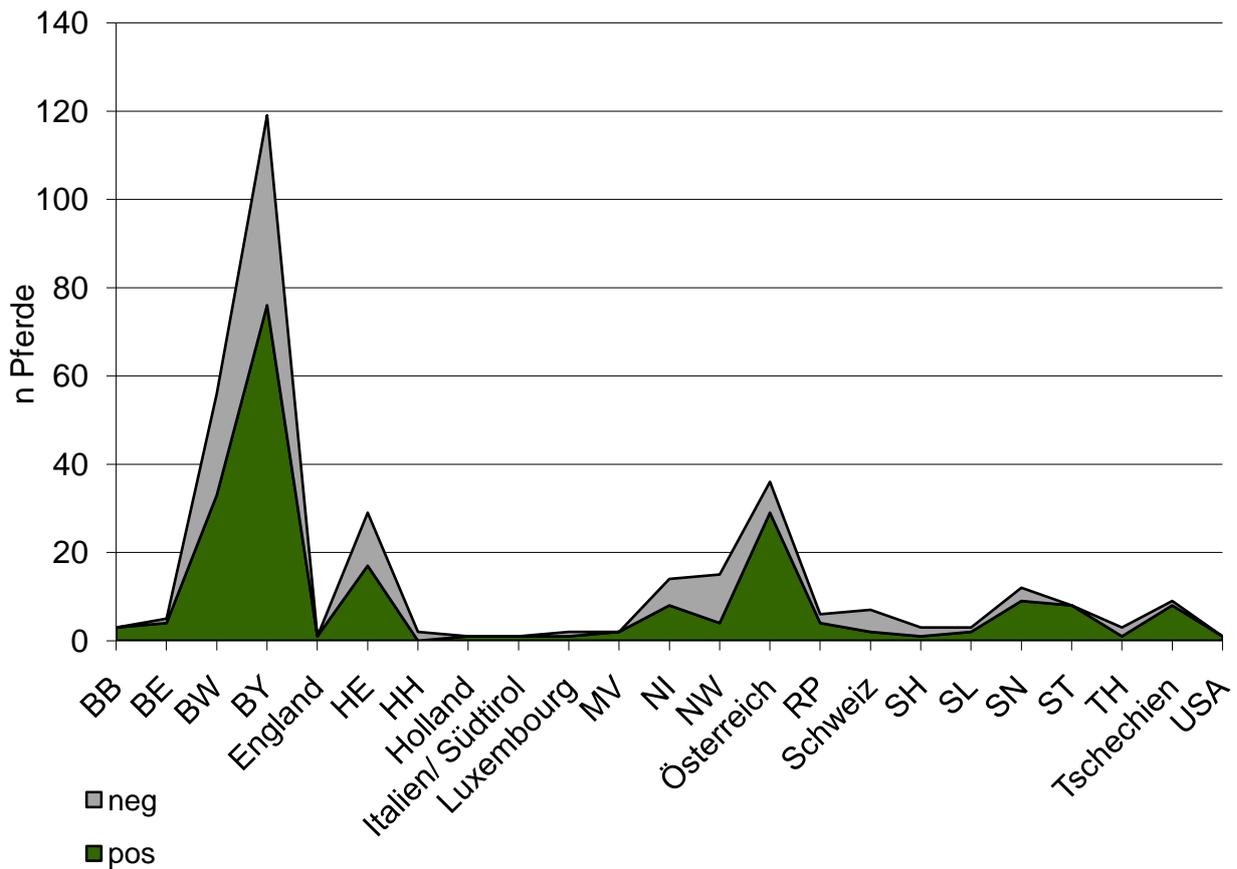


Abbildung 20. Standortverteilung der 338 untersuchten Pferde
Die Bezeichnungen der einzelnen Bundesländer finden sich im Abkürzungsverzeichnis

Mit 35% (119) der Gesamtzahl waren Pferde aus Bayern am meisten vertreten. In der Regel hatte der Standort des Pferdes keinen Einfluss auf das Testergebnis (Fisher's Exact Test; $1,0 \geq p \geq 0,103$). Einzig bei Pferden aus Österreich ($p = 0,028$) war ein deutlicher Trend ersichtlich: Die meisten Pferde wurden positiv befundet. Umgekehrt verhielt es sich, wenn Besitzer mit ihren Pferden extra von Nordrhein-Westfalen nach München kamen: In diesem Fall bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Herkunft bzw. dem Standort des Pferdes und einem negativen Testergebnis ($p = 0,004$).

Die Pferde wurden, nach dem Vermerk auf den Karteikarten den Rassen zugeteilt. Insgesamt verteilen sich die 338 untersuchten Pferde auf 56 Bezeichnungen (Tabelle 31). Eine Zuordnung in Warmblut-, Vollblut- und Kaltblutpferde wurde nicht

vorgenommen; dadurch ließ sich zumindest für zwei Rassen ein signifikanter Zusammenhang zwischen einem positiven Testergebnis für die Friesen ($p = 0,029$) und einem negativen Testergebnis für Pferde der Rasse Appaloosa ($p = 0,017$) ausmachen. Von 9 untersuchten Friesen reagierten alle neun positiv. Es kam nur einer davon aus Österreich, dafür einer auch aus Nordrhein-Westfalen, der Rest verteilte sich auf Bayern, Niedersachsen, und Baden-Württemberg. Die Tiere kamen auch nicht aus demselben Stall. Genauso war auch die Verteilung der Appaloosas aus den verschiedenen Standorten homogen; demnach bestand kein Zusammenhang zwischen dem Testergebnis (4 positiv, 9 negativ) und dem Standort. Ein deutlicher Zusammenhang bestand allerdings zwischen dem Alter der Appaloosas und dem negativen Testergebnis. Demnach unterschied sich das mittlere Alter der Appaloosas ($\bar{x} = 11,6 \pm 4,7$) signifikant von dem Durchschnittsalter der positiven Pferde ($p < 0,001$), jedoch nicht von dem der negativen Pferde. Anders verhielt es sich für die Friesen; in diesem Fall konnte kein Zusammenhang zwischen dem Testergebnis und dem Alter der Friesen ($\bar{x} = 9,3 \pm 4,3$) ermittelt werden.

Tabelle 31. Übersicht Rasseverteilung

Rasse	Total	pos	Rasse	Total	pos	Rasse	Total	pos
American Saddlebred Horse	1	1	Kleinpferd	1	0	Rheinländer	3	1
Andalusier	3	3	Knabstrupper	8	4	Sachse	5	4
Appaloosa	13	4	KWPN	3	1	Sachsen Anhaltiner Wbl	7	5
Araber	8	7	Lette	1	1	Sächsisch Thüringer Wbl	1	1
Araber Berber	1	1	Lipizzaner	2	2	Shagya Araber	1	0
Bayer	17	13	Lusitano	2	1	Süddeutsches Kaltblut	1	1
Brandenburger	3	2	Mecklenburger	2	1	Thüringer	2	0
Connemara Pony	1	1	Merens	1	1	Tinker	1	1
Criollo	1	1	Nonius	1	0	Traber	13	9
Däne	1	0	Noriker	1	1	Trakehner	4	1
Deutsches Reitpony	12	5	Norweger	1	1	Tschechisches Wbl	7	4
Fjordpferd	1	1	Oldenburger	22	13	Ungarn Wbl	4	4
Freiberger	1	0	Paint Horse	7	6	Vollblut	7	6
Friese	9	9	Pinto	2	0	Warmblut (Wbl)	43	30
Haflinger	2	2	Polnischer Trakehner	1	1	Welsh Pony	1	1
Hannoveraner	23	13	Polopony	1	1	Westfale	4	3
Hesse	4	3	Pony	4	3	Württembergiger	7	3
Holsteiner	15	8	Quarter Horse	17	11	Zweibrücker	2	1
Islandpferd	31	18	Reitpferd	1	1	Total	338	216

Ergebnisse

Von 52 Augen (31 links und 21 rechts) konnten sowohl das Kammerwasser als auch der Glaskörper untersucht werden. In 7,7% stimmten die Ergebnisse nicht überein. In diesen Fällen war der Antikörpernachweis im Kammerwasser positiv, während für die Glaskörperproben jedes Testverfahren negativ blieb. Von 106 Pferden (31%) wurden beide Augen untersucht, davon jeweils der Glaskörper bei 25 Pferden, jeweils das Kammerwasser bei 38 Pferden und entweder Kammerwasser oder Glaskörper von jeweils einem Auge bei 43 Pferden. Bei 34 Pferden waren beide Augen positiv (32%). Wohingegen die Laboruntersuchungen beider Augen bei 25 Pferden (24%) in allen Testverfahren negativ blieb. Bei 14 Augen wurde nach einer Vitrektomie (vor 2, 8, 10 Wochen, 4 Monaten bzw. 1, 2, 3, 4, 6, 8 oder 9 Jahren) eine erneute Untersuchung des Auges durchgeführt. In keiner dieser Proben gelang ein direkter Erregernachweis. Bei nur drei Augen bestand die Indikation der Kammerwasserentnahme aufgrund einer Augenentzündung, 8 Wochen, 4 Monate bzw. 2 Jahre nach Vitrektomie. Bei einem 11-jährigem Knabstrupper Wallach, der vor 4 Monaten vitrektomiert wurde nachdem er seit Jahren unter rezidivierenden Uveitiden litt, war zwar ein deutlicher Rückgang im MAT-Titer zu verzeichnen (von 1:6400 auf 1:800 gegen das Serovar Grippotyphosa) doch der ELISA blieb einschließlich einem positiven IgM-Titer unverändert stark positiv; es wurde von einer bleibenden Infektion ausgegangen. Wohingegen bei einem 5-jährigem Sachsen Wallach der vor 2 Jahren vitrektomiert wurde, ein stark positiver ELISA für IgA auf eine Reinfektion hinwies. Die Augenentzündung des Pferdes, welches vor acht Wochen vitrektomiert wurde, war hingegen nicht auf eine Leptospireninfektion zurückzuführen; es wurde eine andere Genese angenommen. Dies fand auch Bestätigung in der Leptospirose diagnostik: Im MAT waren keine Antikörper mehr nachweisbar, lediglich der ELISA zeigte noch eine stark positive IgA-Reaktion. Schließlich war bei den anderen 11 Augen stets ein deutlicher Rückgang im Antikörpertiter zu verzeichnen und mit einem Jahr nach Vitrektomie waren keine spezifischen Antikörper mehr nachweisbar.

4.2.2 Mikroskopischer Agglutinationstest (MAT)

Der MAT war bei 38% (193) der untersuchten 505 Proben positiv, dabei reagierten 59% der Glaskörperproben und 15% der Kammerwasserproben (Fisher's Exact Test; $p < 0,001$). Die Antikörper in den Proben agglutinierten am häufigsten (163) das Serovar Grippotyphosa (84%). In keinem Fall wurde eine Agglutination mit dem Serovar Tarassovi beobachtet. 18% der Proben (34) zeigten eine Reaktion gegen das Serovar Pomona und 17% (32) gegen Copenhageni, danach verteilten sich in der Reihenfolge Canicola (20), Pyrogenes (19), Javanica (15), Bratislava (14), und Saxkoebing (14), sowie schließlich Icterohaemorrhagiae (4) und zuletzt Hardjo (3) auf die hinteren Ränge mit einer Reaktionshäufigkeit von 10% bis 2%. Der höchste Antikörpertiter war für das Serovar Grippotyphosa bei einer Verdünnung von 1:51200 nachweisbar (Tabelle 32 und 33).

Tabelle 32. Sämtliche verzeichnete Reaktionen im MAT für 193 positive Proben

MAT	100 ^a	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200	Total
Grip ^b	48	26	26	29	11	17	1	1	3	1	163
Pom	11	9	1	6	6	1					34
Cop	11	7	8	1	2	1	1	1			32
Can	8	3	1	5	1		1		1		20
Pyr	7	3	2	3		3		1			19
Jav	4	3	2	2	1	3					15
Brat	6	5	1	1		1					14
Sax	6	1	4	2	1						14
Hard	2	1									3
Ict	2	2									4
Total	105	60	45	49	22	26	3	3	4	1	318

^a: reziproker MAT-Titer; ^b: Leptospirenserovare, Bezeichnungen vergleiche Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 33. Für jede positive Probe (193) ist das Serovar mit dem höchsten Titer angegeben

MAT	100 ^a	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200	Total
Grip ^b	45	24	23	28	11	17	1	1	3	1	154
Pom	1	1		2	2						6
Cop	1		2		1			1			5
Can	2	1		1	1				1		6
Pyr						2					2
Jav	1	1		1	1	2					6
Brat	3	3				1					7
Sax	2	1	1	2	1						7
Hard											0
Ict											0
Total	55	31	26	34	17	22	1	2	4	1	193

^a: reziproker MAT-Titer; ^b: Leptospirenserovare, Bezeichnungen vergleiche Abkürzungsverzeichnis

39% (174) der untersuchten Augen (444) wiesen agglutinierende Antikörper gegen Leptospiren auf. Davon waren 101 linke Augen (43%) und 73 (35%) der rechten Augen positiv ($p = 0,099$). Bezieht man das MAT-Ergebnis auf die untersuchten Pferde, so waren 48% (163) positiv (Tabelle 35). Wie wertvoll sich direkte und indirekte Nachweisverfahren im Hinblick auf die Diagnose einer Leptospiren bedingten Augenentzündung ergänzen, verdeutlichen für MAT und ELISA getrennt aufgeführt Abbildung 21 und 22. Im Einzelnen bedeutete ein negatives Testergebnis keinen Ausschluss einer Leptospireninfektion; in Kombination war die Wahrscheinlichkeit bei Anwesenheit von Leptospiren im Auge auch gegen diese gerichtete intraokulare Antikörper nachweisen zu können hoch, jedoch keine Bedingung.

Ergebnisse

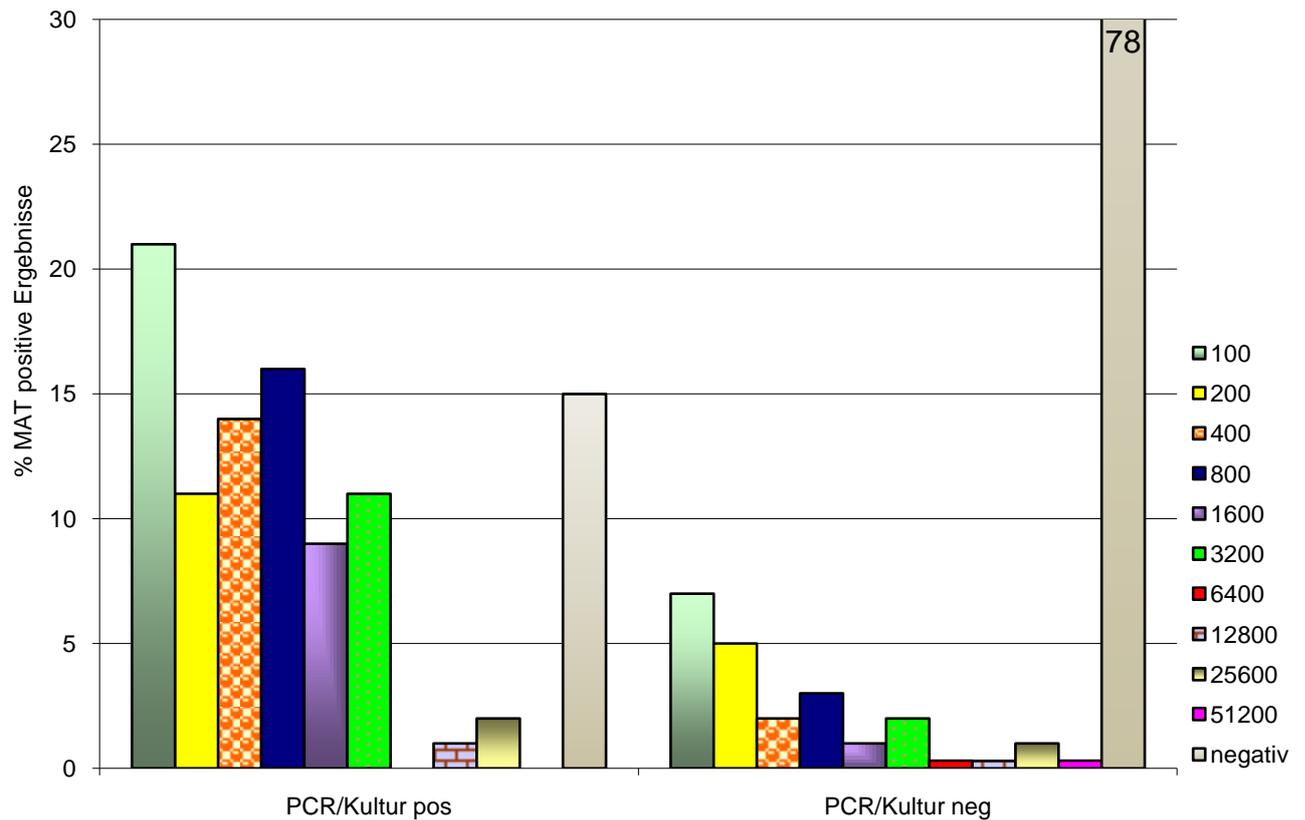


Abbildung 21. Darstellung der höchsten Antikörper-Titerstufen (reziprok) der Proben im MAT mit Bezug auf den direkten Erregernachweis

4.2.3 „Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay“ (ELISA)

Eindeutig positive MAT-Ergebnisse wurden in der Regel nicht über einen ELISA bestätigt, denn ein positives MAT-Ergebnis resultiert stets (100%) in einem positiven ELISA Ergebnis (Tabelle 37). Dennoch, wenn Proben von Augenflüssigkeiten beider Augen untersucht wurden und ein Auge reagierte in der MAT positiv das andere negativ, so wurde die Probe mit dem positiven MAT-Ergebnis im ELISA als Kontrolle für die Probe mit dem negativen MAT-Ergebnis verwendet. In diesem Fall richtete sich die Wahl des ELISA-Antigenes nach dem Serovar, welches im MAT mit den Antikörpern in der Probe agglutinierte. So wurden immerhin 54 im MAT positive Proben auch im ELISA untersucht. Zudem reagierten noch weitere 91 Proben im ELISA. Die übrigen der insgesamt 361 im ELISA untersuchten Proben blieben negativ (60%).

Glaskörper- und Kammerwasserproben

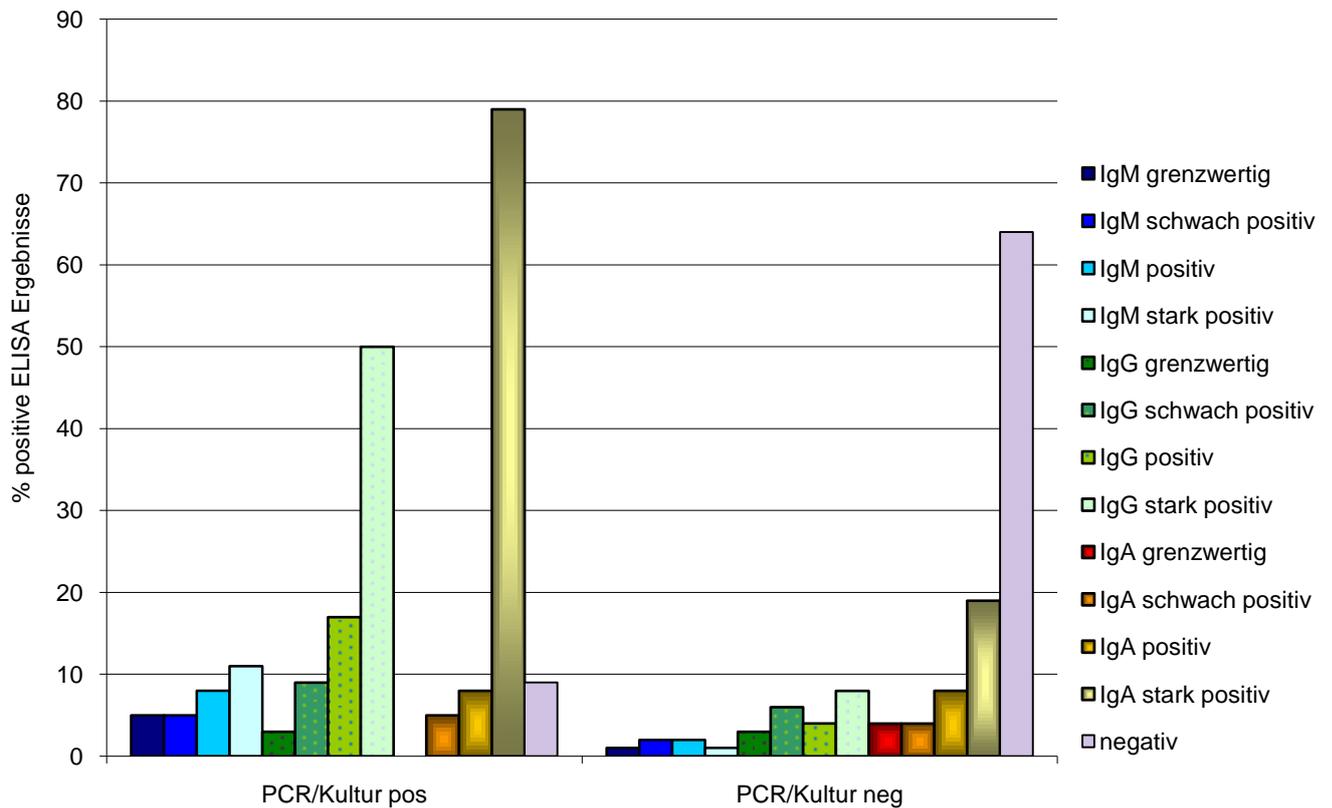


Abbildung 22. Darstellung der ELISA-Ergebnisse der einzelnen Proben mit Bezug auf den direkten Erregernachweis

4.2.4 Kulturelle Isolierung

Insgesamt wurden 46 Glaskörperproben (35 links und 29 rechts) sowie 2 Kammerwasserproben (rechts) von 62 Pferden für eine Leptospirenkultur zur Erregerisolierung angesetzt. Für 37 (56%) Augen (21 links und 16 rechts) verlief die Isolierung vermehrungsfähiger, pathogener Leptospiren erfolgreich (Abbildung 23).

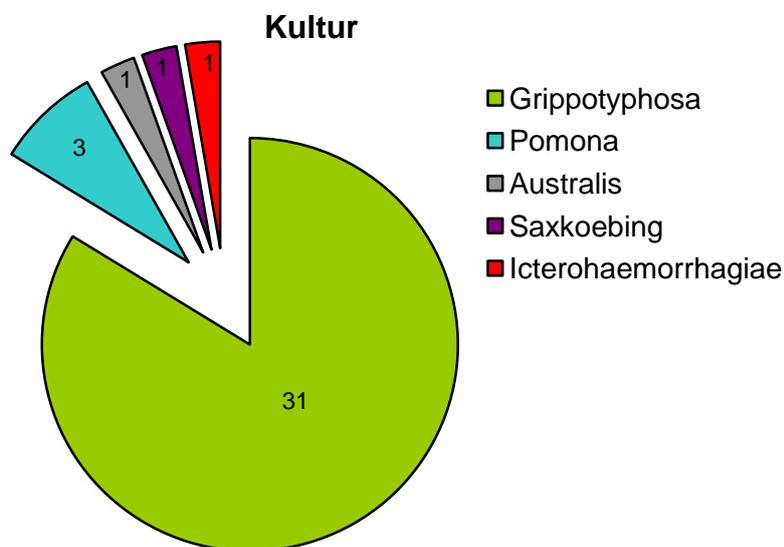


Abbildung 23. Verhältnis isolierter Leptospirenservare aus 37 Glaskörperproben

Ergebnisse

Von den Leptospirenisolaten waren 84% (31) dem *L. kirschneri* Serovar Grippotyphosa zuzuordnen. Die Übrigen gehörten zu der Genospezies *L. interrogans*. Isolate von *L. borgpetersenii* wurden nicht erhalten (Tabelle 34). Im Schnitt dauerte es 40 Tage ($s = \pm 28$, $\bar{x} = 31$) bis unter dem Dunkelfeldmikroskop (160fache Vergrößerung) die ersten Leptospiren sichtbar waren, mindestens jedoch 10 Tage (ca. 2 Wochen) und maximal 138 Tage (19,7 Wochen bzw. 5 Monate). Wurde die Zeit bis zum 1. Nachweis und dem MAT-Titer der Probe analysiert (Regressionstest), so konnte kein Trend ($R^2 \leq 0,045$) ausgemacht werden. Genauso wenig bestand ein Zusammenhang zwischen der mittels LUX™ qPCR in einer Probe ermittelten Leptospirenmenge und der Geschwindigkeit des Leptospirenwachstums ($R^2 \leq 0,052$).

Von jedem verfügbaren Transportmedium (Herbst 2006 bis Mai 2007) wurde bei Ansetzen der Kultur 1 ml für die DNA-Extraktion verwendet. War die Kultur positiv, so war auch die LUX™ qPCR des Transportmediums positiv für DNA-Präsenz pathogener Leptospiren. Damit trifft die LUX™ qPCR eine 100% Vorhersage, ob sich die Mühe für einen kulturellen Isolierversuch lohnt. Andererseits waren auch einige Transportmedien zum Teil sogar hoch positiv in der LUX™ qPCR, und es konnten keine Leptospiren angezüchtet werden.

Tabelle 34. Isolate aus Glaskörperproben von 37 Pferden

Genospezies	Serovar	Standort	Jahr ^a	Tage ^b	Rasse	Alter ^c	Geschlecht	Probe
<i>L. kirschneri</i>	Grip	HE	2006	82	Hannoveraner	4	W	GK li
<i>L. kirschneri</i>	Grip	Holland	2006	42	Wbl	8	S	GK re
<i>L. kirschneri</i>	Grip	HE	2006	22	Brandenburger	4	S	GK re
<i>L. kirschneri</i>	Grip	BY	2005	26	Sachsen Anhaltiner Wbl	7	S	GK li
<i>L. kirschneri</i>	Grip	BY	2005	33	Bayer	9	W	GK li
<i>L. kirschneri</i>	Grip	Österreich	2005	16	Deutsches Reitpony	4	S	GK li
<i>L. kirschneri</i>	Grip	BY	2005	31	Friese	7	S	GK li
<i>L. kirschneri</i>	Grip	BY	2005	20	Islandpferd	10	S	GK li
<i>L. kirschneri</i>	Grip	SN	2007	83	Oldenburger	5	S	GK li
<i>L. kirschneri</i>	Grip	Österreich	2007	21	Wbl	3	H	GK li
<i>L. kirschneri</i>	Grip	BY	2006	40	Islandpferd	7	W	GK li
<i>L. kirschneri</i>	Grip	BY	2006	108	Traber	11	W	GK li
<i>L. kirschneri</i>	Grip	SN	2005	40	Wbl	9	W	GK re
<i>L. kirschneri</i>	Grip	NI	2005	40	Haflinger	7	W	GK li
<i>L. kirschneri</i>	Grip	BY	2005	35	Oldenburger	3	S	GK re
<i>L. kirschneri</i>	Grip	Österreich	2007	14	Friese	8	S	GK li
<i>L. kirschneri</i>	Grip	HE	2006	28	Deutsches Reitpony	5	W	GK re

Glaskörper- und Kammerwasserproben

Genospezies	Serovar	Standort	Jahr ^a	Tage ^b	Rasse	Alter ^c	Geschlecht	Probe
<i>L. kirschneri</i>	Grip	BY	2006	41	Wbl	8	W	GK re
<i>L. kirschneri</i>	Grip	SL	2006	24	Sachsen Anhaltiner Wbl	6	W	GK li
<i>L. kirschneri</i>	Grip	ST	2006	10	Vollblut	2	H	GK re
<i>L. kirschneri</i>	Grip	BY	2006	65	Wbl	8	W	GK re
<i>L. kirschneri</i>	Grip	NI	2007	17	Araber	3	S	GK re
<i>L. kirschneri</i>	Grip	Österreich	2007	14	Wbl	15	S	GK li
<i>L. kirschneri</i>	Grip	BY	2005	30	Pony	5	S	GK li
<i>L. kirschneri</i>	Grip	Tschechien	2005	27	Vollblut	6	S	GK li
<i>L. kirschneri</i>	Grip	BY	2006	63	Bayer	6	S	GK re
<i>L. kirschneri</i>	Grip	Österreich	2005	22	Wbl	3	H	GK re
<i>L. kirschneri</i>	Grip	HE	2006	27	Islandpferd	9	W	GK re
<i>L. kirschneri</i>	Grip	BY	2007	19	Bayer	5	S	GK li
<i>L. kirschneri</i>	Grip	Österreich	2006	14	Oldenburger	3	S	GK re
<i>L. kirschneri</i>	Grip	NW	2007	26	American Saddlebred Horse	3	H	GK li
<i>L. interrogans</i>	Pom	MV	2006	138	Trakehner	4	W	GK re
<i>L. interrogans</i>	Pom	England	2006	42	Polopony	7	S	GK li
<i>L. interrogans</i>	Pom	USA	2006	34	Holsteiner	14	S	GK re
<i>L. interrogans</i>	Aust	BY	2005	38	Ungarn Wbl	17	W	GK li
<i>L. interrogans</i>	Sax	BY	2005	41	Ungarn Wbl	18	W	GK li
<i>L. interrogans</i>	Ict	Österreich	2006	101	Ungarn Wbl	11	S	GK re

Bezeichnungen zu den Serovaren und Bundesländern sind dem Abkürzungsverzeichnis zu entnehmen

L.: *Leptospira*; Wbl: Warmblut; W: Wallach; S: Stute; H: Hengst; GK: Glaskörper; li: links; re: rechts

^a: Jahr der Probennahme; ^b: Tage bis zum ersten mikroskopischen Nachweis; ^c: Alter in Jahren

4.2.5 Mikroskopie

Aus dem Untersuchungszeitraum von Juli 2006 bis Mai 2007 wurden 80% (152) der Glaskörper- und Kammerwasserproben im Dunkelfeldmikroskop auf das Vorhandensein von Leptospiren untersucht. Die Beurteilung der meisten Kammerwasserproben war aufgrund eines dichten Wachstums kokkoider Bakterien erschwert. In einer sehr zähflüssigen und inhomogenen Glaskörperprobe wurden zahlreiche, bewegliche Leptospiren entdeckt. Sie bildeten ein dichtes Bakterien-Knäuel. Insgesamt sahen sie sehr fein aus, im Vergleich zu sonst bekannten Kulturleptospiren. Die Probe (Glaskörper links) stammte von einem 2-jährigem Quarter Horse Wallach mit Standort in Bayern. Das Auge zeigte eine hochgradige Glaskörpertrübung und Fibrin in der vorderen Augenkammer. Der Versuch einer kulturellen Isolierung blieb erfolglos. Der MAT-Titer lag bei 1:1600 für das Serovar Grippotyphosa und der ELISA bestätigte die Anwesenheit von IgG und IgA. Mithilfe der LUX™ qPCR konnte DNA pathogener Leptospiren nachgewiesen werden;

Ergebnisse

demnach befanden sich in der Probe mindestens 15.050 Leptospiren. Eine Kontrolluntersuchung des Kammerwassers vom rechten Auge (ohne besonderen Befund, o.b.B.) blieb in MAT, ELISA und PCR negativ.

4.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

In Proben aus klinisch gesunden Augen (o.b.B.) konnte keine DNA pathogener Leptospiren nachgewiesen werden. 126 Proben reagierten in der LUX™ qPCR positiv (Abbildung 24 und 25, Tabelle 35). Von 13 Augen, bei denen Kammerwasser- und Glaskörperproben in der LUX™ qPCR untersucht wurden, konnten ausschließlich in den Glaskörperproben Leptospiren-DNA detektiert werden. Bei den acht positiven Kammerwasserproben lag die mittlere nachweisbare Menge an Leptospiren bei $\bar{x} = 33$ (Median: $\tilde{x} = 20$). Zu einer der positiven Kammerwasserproben, wurde von demselben Auge auch eine Glaskörperprobe zur Untersuchung eingesandt. Auch diese reagierte in der LUX™ qPCR positiv. Wurde nach dem beschriebenen Protokoll vorgegangen, so enthielt kein LUX™ qPCR-Ansatz einen PCR-Inhibitor, der die Amplifikation vollständig hemmte. Hin und wieder erzielte die interne Kontrolle jedoch etwas höhere Ct-Werte als erwartet ($Ct > 45$), dann wurde um sicher zu gehen eine semi-nested PCR durchgeführt. Mit der Zeit wurde klar, dass dies nicht nötig ist. Aufgrund der im Vergleich zu den Glaskörperproben (118) geringen Anzahl an positiven Kammerwasserproben (8) wurden mindestens 75% der negativen LUX™ qPCR-Ansätze in der semi-nested PCR überprüft. Doch es konnte keine Sensitivitätssteigerung erreicht werden. Die Proben blieben negativ. Schließlich wurden anstatt 5 μl „Template“ bzw. Probenextrakt 1 μl , 3 μl , 7 μl , 10 μl , 15 μl oder 20 μl von den acht positiven Kammerwasserproben, einigen positiven Glaskörperproben und jeweils 50% der negativ befundeten DNA-Extrakte erneut in die LUX™ qPCR eingesetzt, um den Einfluss der Probenmenge zu testen. Tatsächlich entstand mit ansteigender Probenmenge ein inverser Effekt: die Effizienz der LUX™ qPCR nahm ab und nun wurde auch bisweilen die interne Kontrolle in der LUX™ qPCR nicht mehr amplifiziert, als Hinweis auf eine Hemmung der PCR-Reaktion. Mehr Einsatz von „Template“ bedeutete nicht eine höhere Sicherheit beim Nachweis von Leptospiren-DNA in einer Ausgangsprobe. Wohingegen die Reproduzierbarkeit und Linearität der LUX™ qPCR-Ergebnisse sank, wenn in Proben mit wenig Leptospiren-DNA die Menge an „Template“ weniger als 5 μl betrug.

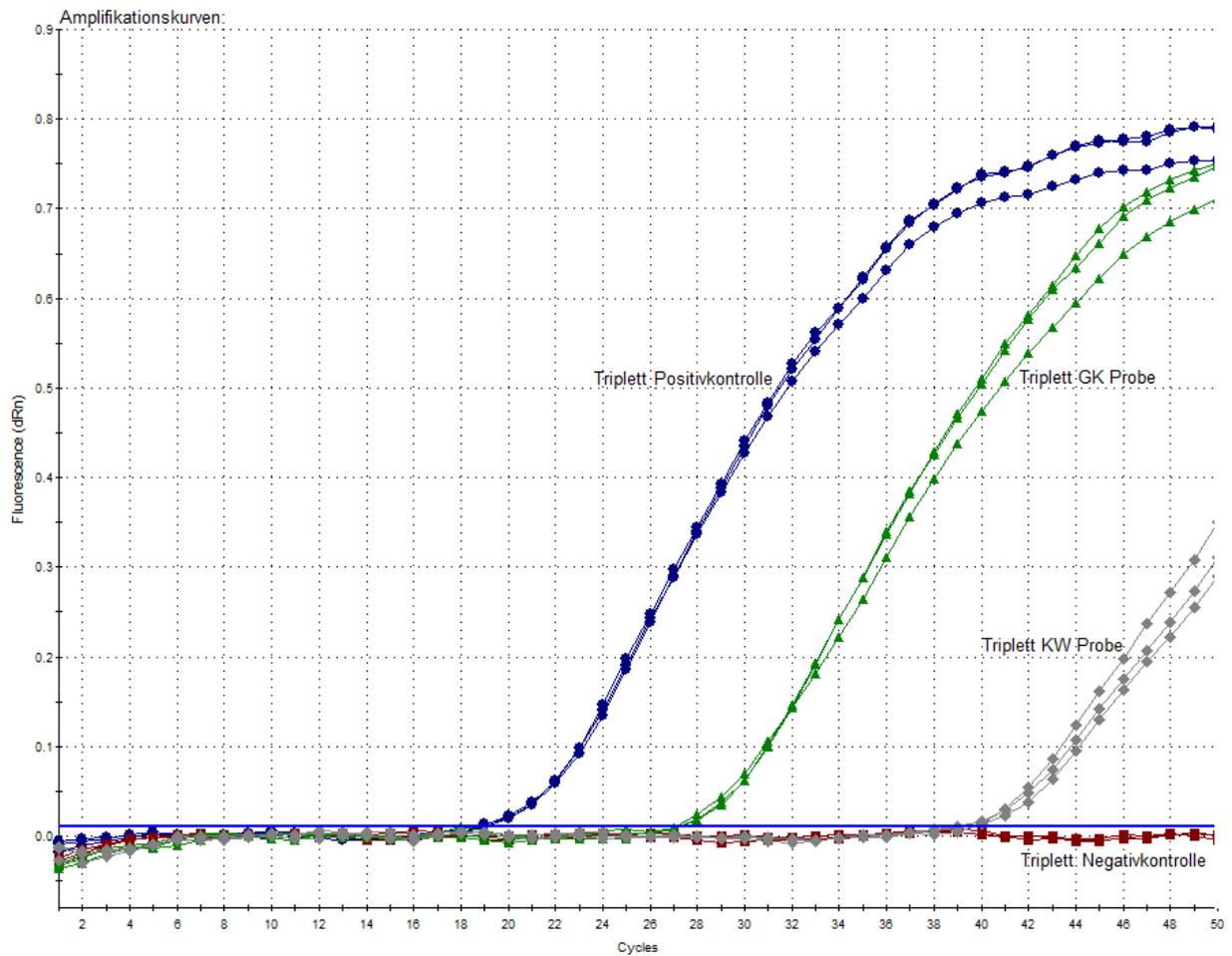


Abbildung 24. Beispiel für die Amplifikation eines Fragmentes der LipL32 DNA-Sequenz von pathogenen Leptospiren in einer Glaskörperprobe und Kammerwasserprobe sowie zum Vergleich die positive Extraktionskontrolle und das Grundrauschen einer Negativkontrolle jeweils im Dreifachansatz (Einstellung der Software zum MX3005P Thermocycler von Stratagene: „Treat individually“, „Amplification plots“, FAM, „Threshold“: 0,010)

Ergebnisse

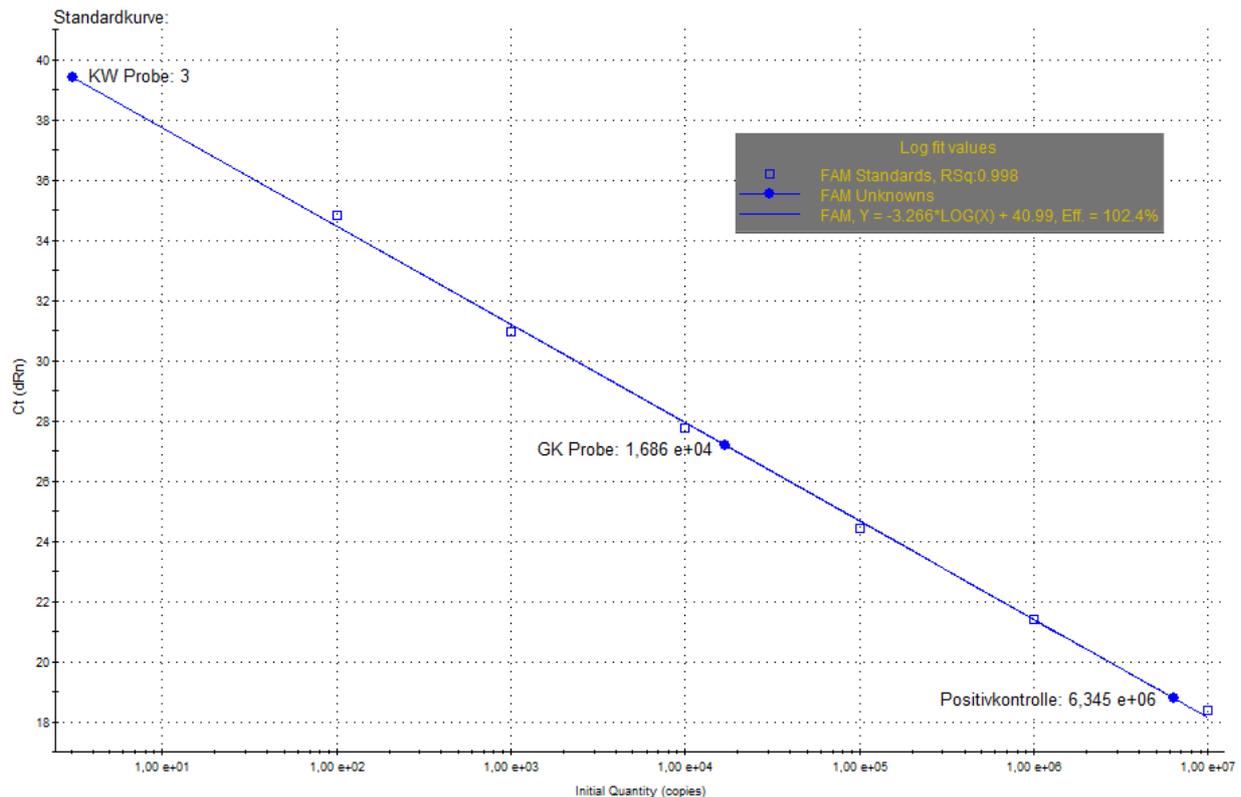


Abbildung 25. Regressionsgerade durch die Standardkurvenpunkte. Angaben der errechneten Ausgangsmenge an Genomkopien (Leptospiren) pro Reaktionsansatz in je 5 µl DNA-Extrakt der Kammerwasserprobe, Glaskörperprobe und der positiven Extraktionskontrolle. Die Mindestmenge an Leptospiren in der klinischen Originalprobe ergeben sich aus dem Faktor 20 der angegebenen Zahl (vergleiche Abbildung 24) (Einstellung der Software zum MX3005P Thermocycler von Stratagene: „Treat collectively“, „Standard curve“, FAM, „Threshold“: 0,010) R²: Bestimmtheitsmaß; Eff.: Effizienz

4.2.7 Vergleich: MAT/ELISA/PCR/Kultur

Von 505 Proben wurden 290 (57%) positiv beurteilt. Davon waren 142 (49%) Proben in nur einer Methode reaktiv, davon wiederum 78 Proben aufgrund eines ELISA-Ergebnisses, 60 Proben aufgrund eines MAT-Ergebnisses und 4 Proben aufgrund eines positiven LUX™ qPCR-Ergebnisses. Hingegen wurden 148 Proben in mindestens zwei verschiedenen Tests als positiv bestätigt. Je nachdem welche Diagnostikmethoden miteinander kombiniert wurden, konnte durch die PCR eine Sensitivitätssteigerung von 1% bis 15% erreicht werden. Die beste Kombination (100%) stellte der ELISA und ein direktes Nachweisverfahren dar (Tabelle 36). Ein Vergleich der direkten Nachweisverfahren zeigt eine gute Übereinstimmung zwischen der PCR und der Kultur (Cohen's Kappa Test, $\kappa = 0,653$). Bei 83% der Proben (55/66) wurde dasselbe Ergebnis erzielt (Tabelle 37). Dagegen konnte nur eine moderate Übereinstimmung zwischen den indirekten Nachweisverfahren MAT und ELISA ermittelt werden ($\kappa = 0,415$). Von 361 untersuchten Proben wurden 75% (270) gleich gewertet. Ein Vergleich von PCR und MAT weist ebenfalls nur auf eine moderate Übereinstimmung hin ($\kappa = 0,528$) und die Genauigkeit steht mit 80% (400/505) an zweiter Stelle. Jeder andere Bezug zwischen direkter und indirekter Diagnostik zeigt nur eine faire Übereinstimmung: Kultur und MAT bewegen sich im Mittelfeld ($\kappa = 0,395$). Bei fünf in der Kultur positiven Proben (8%) konnten in der

MAT keine spezifischen Antikörper detektiert werden; davon wiederum bei zwei Proben (7%) auch keine Immunglobuline mit dem ELISA (Abbildung 21 und 22). Die Genauigkeit von Kultur und ELISA liegt nur bei 63% (19/30). Ein Vergleich von PCR und ELISA, womit wenigstens 361 Proben untersucht wurden, zeigte eine bessere Genauigkeit mit 70% (210). Doch unabhängig von der untersuchten Probenanzahl müssen Kultur und ELISA bzw. PCR und ELISA in der Übereinstimmung sich den letzten Platz teilen ($\kappa = 0,298$ bzw. $\kappa = 0,294$). Bei 30% (11/37) der Glaskörperproben stimmte das Ergebnis zwischen Kultur und MAT hinsichtlich des Serovares nicht überein (Tabelle 38). Grundsätzlich besteht kein Zusammenhang zwischen einem positiven oder negativen Testergebnis und der beprobten Augenseite (links/rechts).

Tabelle 35. Zuordnung und Verteilung der positiven Testergebnisse

	MAT	PCR	ELISA	Kultur	Total
Proben	193/505 (38)*	126/505 (25)	145/361 (40)	37/66 (56)	290/505 (57)
GK	157/271 (58)	118/271 (44)	92/157 (59)	37/64 (58)	210/271 (77)
KW	36/234 (15)	8/234 (3)	53/204 (26)	0/2 (0)	80/234 (34)
Pferde	163/338 (48)	120/338 (36)	104/231 (45)	37/62 (60)	216/338 (64)
Augen	174/444 (39)	125/444 (28)	129/326 (40)	37/66 (56)	250/444 (56)
links	101/236 (43)	71/236 (30)	70/171 (41)	21/35 (60)	140/236 (59)
rechts	73/208 (35)	54/208 (26)	59/155 (38)	16/31 (52)	110/208 (53)

* n positiv/ n Total (%)

GK: Glaskörper; KW: Kammerwasser

Tabelle 36. Vergleich der Sensitivität einzelner Testverfahren und in Kombination

Methode	n Proben pos im Test/ n Proben pos Total (%)
PCR	126/290 (43)
Kultur	37/58 (64)
MAT	193/290 (67)
ELISA	145/151 (96)
PCR und Kultur	46/58 (79)
PCR und MAT	212/290 (73)
PCR und ELISA	151/151 (100)
MAT und ELISA	145/151 (96)
MAT und Kultur	51/58 (88)
Kultur und ELISA	22/22 (100)
Kultur und PCR und MAT	52/58 (90)

Ergebnisse

Tabelle 37. Vergleich der Ergebnisse der Methoden untereinander für die einzelnen Proben

PCR	Kultur			MAT			ELISA		
	pos	neg	Total	pos	neg	Total	pos	neg	Total
pos	35	9	44	107	19	126	42	6	48
neg	2	20	22	86	293	379	103	210	313
Total	37	29	66	193	312	505	145	216	361

Kultur	MAT			ELISA		
	pos	neg	Total	pos	neg	Total
pos	32	5	37	11	2	13
neg	14	15	29	9	8	17
Total	46	20	66	20	10	30

MAT	ELISA		
	pos	neg	Total
pos	54	0	54
neg	91	216	307
Total	145	216	361

Tabelle 38. Darstellung der Ergebnisse von PCR, MAT und ELISA bei positiver Kultur

Kultur ¹	PCR ²	MAT ³	ELISA ⁴
Aust 38	440	Cop 400; Brat 400	Brat IgM:-; IgG:+++; IgA:+++ Cop IgM:-; IgG:+++; IgA:+++
Grip 108	300	Grip 800	n.d.
Grip 14	2.060	Grip 400	n.d.
Grip 14	8.552.000	Grip 800; lct 100	Grip IgM:++; IgG:+++; IgA:+++
Grip 14	4.760	Grip 800	n.d.
Grip 16	neg	Grip 3200	Grip IgM:+++; IgG:+++; IgA:+++
Grip 17	80	Grip 800	n.d.
Grip 19	1.200	Grip 800	n.d.
Grip 20	120	Grip 1600; Can 200; Pom 100; Pyr 100	Grip IgM:+++; IgG:+++; IgA:+++
Grip 21	1.240	Grip 3200	n.d.
Grip 22	5.680	Grip 1600; Pom 200	n.d.
Grip 22	140	Grip 400; Pom 100	n.d.
Grip 24	5.000	neg	neg
Grip 26	740	Grip 200; Can 100	n.d.
Grip 26	175.400	neg	neg
Grip 27	680	Grip 3200; Cop 200	n.d.
Grip 27	49.800	Grip 200	n.d.
Grip 28	5.260	Grip 800	n.d.
Grip 30	1.660	Grip 200	n.d.
Grip 31	20	Grip 25600; Pom 1600; Cop 100; Pyr 100	n.d.
Grip 33	8.440	Jav 3200; Grip 400; Cop 400; Pom 200	Grip IgM:+++; IgG:+++; IgA:+++ Jav IgM:+++; IgG:+++; IgA:+++

Leptospiren bedingte Augenveränderungen

Kultur ¹	PCR ²	MAT ³	ELISA ⁴
Grip 35	neg	Grip 100	n.d.
Grip 40	1.730	Grip 200	n.d.
Grip 40	1.301.000	Pom 1600; Can 800; Grip 800; Cop 400; Pyr 400; Sax 100	Grip IgM:+++; IgG:+++; IgA:+++
Grip 40	1.020	Grip 1600; Cop 100; Pom 100; Sax 100	n.d.
Grip 41	2.600	Grip 100	n.d.
Grip 42	1.940	Grip 3200; Brat 200; Pom 100	n.d.
Grip 63	2.140	neg	Grip IgM:-; IgG:+++; IgA:+++
Grip 65	1.560	Grip 400	n.d.
Grip 82	860	Grip 200; Pyr 200; Pom 200; Cop 200; Can 100	Grip IgM:-; IgG:+++; IgA:+++
Grip 83	60	Grip 3200	n.d.
Grip 10	560	Grip 100	Grip IgM:-; IgG:-; IgA:++
Ict 101	172.100	Can 25600; Cop 6400; Pyr 3200; Jav 800; Pom 200	n.d.
Pom 138	29.430	neg	Grip IgM:(+); IgG:+++; IgA:+++ Brat IgM:-; IgG:+++; IgA:+++
Pom 34	1.200	neg	Grip IgM:-; IgG:(+); IgA:+++ Pom IgM:-; IgG:+; IgA:+++ Brat IgM:-; IgG:+; IgA:+++
Pom 42	2.000	Brat 3200; Pom 800; Pyr 800	n.d.
Sax 41	300	Jav 100	n.d.

¹ Serovar und Tage bis zum ersten mikroskopischen Nachweis

² Mindestmenge an Leptospiren in der Probe für die PCR

³ Serovar und reziproker Wert der ermittelten Titerstufe

⁴ n.d.: nicht durchgeführt; Bewertung: - neg, (+) grenzwertig, + schwach pos, ++ pos, +++ stark pos
IgM, IgA und IgG: Immunglobuline der Klassen M, A und G

Bezeichnungen für die Leptospirenserovare sind dem Abkürzungsverzeichnis zu entnehmen

4.3 Leptospiren bedingte Augenveränderungen

4.3.1 Klinik

Sämtliche Glaskörper- und Kammerwasserproben, die an das Leptospirelabor des LGL, Oberschleißheim, aus der Klinik für Pferde der LMU, München, geschickt wurden, dienten primär der Untersuchung auf Antikörper gegen Leptospiren. Dabei musste nicht unbedingt der Verdacht auf eine Leptospiren bedingte Augenveränderung bestanden haben. Die Indikationen für eine Kammerwasser- oder Glaskörperentnahme bzw. Vitrektomie waren unterschiedlich. Zum Zeitpunkt der Untersuchung der Proben war dem Labor vom Vorbericht oder der Klinik des Pferdes meist wenig bekannt. Die Durchsicht der Karteikarten erfolgte retrospektiv, dabei lagen wiederum die Laborergebnisse der Pferde nicht vor. Eine Übersicht von dem Erscheinungsbild der Augen zum Zeitpunkt der Laboruntersuchung und mögliche Indikationen für die Probenentnahme gibt Tabelle 39 wieder.

Ergebnisse

Tabelle 39. Indikationen für eine Kammerwasser- und/oder Glaskörperentnahme bzw. Befunde an den betroffenen Augen

von A bis W

abgeflachte vordere Augenkammer, Besitzerwunsch, Bindehautrötung, Blepharospasmus, Bulbusatrophie, Bulbusexstirpation, „Bullethole lesions“, chorioretinische Narben, Dacryoadenitis, Depigmentierung der Iris, diagnostische Parazentese, Drohreflex (negativ, vermindert, schwach), Dyskorie, Endophthalmitis, Epiphora, Erblindung, ERU, Euthanasie, Fibrin in der vorderen Augenkammer, fokale Depigmentation des Tapetum nigrum, Fuchs Heterochromie Iridocyclitis, Glaskörpereinlagerung (Fibrinschwaden, Stränge, Membranen, entzündlich, fusselig, wolkig), Glaskörpertrübung (diffus, zellulär, serös, grün, gelb, orange), Glaskörperverflüssigung, Glaukom, Hämophthalmus, „Headshaking“, Herpesviren, Hornhautvaskularisation, Hornhautabzeß, Hornhautdegeneration, Hornautödem, Hornhautdebridement, Hornhauttrübung (diffus, hauchartig, rauchig, milchig, Bänder-), Hornhautverletzung, Hyphäma, Hypopyon, Augeninnendruck erniedrigt, Iris bombee, Irisödem, Irisresiduen (Hornhautendothel, Linsenvorderfläche), Iritis, Katarakt (punktförmig, senil, matur, Kapsel-, bläschenförmig, rauchig, milchig, nukleär, complicata, radiär), Keratektomie, Keratitis (chronica, parenchymatosa, punctata, pannös, ulcerosa), Kontrolle, Kammerwassertrübung, Laserzyklokoagulation, Lidödem, Linsensub-/luxation, Miosis, Netzhautablösung, Netzhautfalten, o.b.B., Papillenrötung, Photophobie, Pigmentverschiebung Augenhintergrund, Präzipitate auf Hornhautendothel, Präzipitate auf Linsenrückfläche, Pupillenreflex (negativ, verzögert), reizfrei, Rezidivprophylaxe, Rittigkeitsprobleme, Rubeosis iridis, Schmerzen, Schreckhaftigkeit/Scheu, Seclusio pupillae, Sehnervenatrophie, Synechie (vordere/hintere), Synechiolyse, therapieresistente Keratouveitis, tiefe vordere Augenkammer, Trauma, Tumor (malignes Lymphom), Uveitis (phakogen, traumatisch, unbekannter Genese, therapieresistent), verdickte Retinagefäße, Vitrektomie, wissenschaftliches Interesse

4.3.2 Pferde mit einem direkten Erregernachweis

Pferde, bei denen von Glaskörper- und/oder Kammerwasserproben ein direkter Erregernachweis mittels PCR und/oder Kultur gelang, zeigten folgende Augenveränderungen:

- Schmerzen
- Abwehrtrias (Epiphora, Photophobie, Blepharospasmus)
- Bindehautrötung
- Lidödem
- Glaskörpertrübung (grün-gelb, diffus, zellulär, serös), $p < 0,001$
- Glaskörpereinlagerung (entzündlich, fusselig, wolkig, Fibrinschwaden, Stränge, Membranen), $p < 0,001$
- Netzhautfalten (einzeln, mehrere, sternförmig), $p = 0,023$
- Netzhautablösung (partiell, komplett), $p = 0,001$
- Hornhauttrübung (diffus, hauchartig, rauchig, Bändertrübung)
- Hornhautvaskularisation
- Hornhautverletzung
- Hornhautödem (diffus, rauchig, milchig)
- Katarakt (bläschenförmig, punktförmig, rauchig, milchig, senil), $p < 0,001$
- Präzipitate auf Hornhautendothel
- Präzipitate auf Linsenrückfläche, $p < 0,001$

Leptospiren bedingte Augenveränderungen

- Synechie (hintere, vordere, Seclusio pupillae), $p = 0,003$
- Irisresiduen auf der Linsenvorderfläche, $p = 0,048$
- Kammerwassertrübung (gelblich, serös, diffus, sero-hämorrhagisch)
- Kammerwassereinlagerungen (Fibrin, Hypopyon, Hyphäma), $p < 0,001$
- Bulbusatrophie, $p < 0,001$
- Erblindung, $p = 0,008$
- Linsensubluxation
- Pupillenreflex negativ
- Drohreflex negativ oder vermindert, $p = 0,006$
- Miosis, $p < 0,001$
- Dyskorie
- Depigmentierung der Iris
- Pigmentverschiebung Augenhintergrund
- „Bullethole lesions“
- Verdickte Retinagefäße
- Irisödem
- Rubeosis iridis
- Papillenrötung
- Hornhautdegeneration
- Chorioretinische Narben, $p = 0,037$
- Abgeflachte vordere Augenkammer, $p = 0,021$
- Glaukom
- Iritis
- Glaskörperverflüssigung

Die Angaben der Besitzer zu der Dauer der Erkrankung waren folgende:

- akut
- seit 4 Wochen, 6 Wochen, Wochen
- seit 3 Monaten, 5 Monaten, 6 Monaten, 7 Monaten
- seit 1 Jahr, 2 Jahren, 3 Jahren
- 1 Schub, 2 Schübe, 3 Schübe, 4 Schübe, 6 Schübe, 7 Schübe, mehrere

Insgesamt gelang bei 128 Proben der direkte Erregernachweis; doch bei 14,8% (19) dieser Proben konnten mittels MAT keine agglutinierenden Antikörper nachgewiesen werden; davon waren wiederum sechs Proben (4,7%) auch im ELISA negativ. Die Angabe eines p-Wertes (Fisher's Exact Test) beschreiben einen signifikanten Zusammenhang zwischen einem positiven Laborergebnis im Allgemeinen, unabhängig von einem direkten Erregernachweis oder einem Antikörpernachweis, und der bestehenden Augenveränderung. Das Gleiche gilt, wenn bereits vor einer Laboruntersuchung die Verdachtsdiagnose einer ERU gestellt wurde ($p < 0,001$). Umgekehrt, wurde der Verdacht auf eine andere Uveitis, zum Beispiel phakogene Uveitis oder traumatische Uveitis, ausgesprochen so bestand ein signifikanter Zusammenhang mit einem in jeder Hinsicht negativen Laborergebnis ($p = 0,007$). Entsprechendes konnte für das Glaukom ($p < 0,001$),

Ergebnisse

die Keratitis ($p < 0,001$), bei Vorliegen eines Hornhautödemes ($p = 0,02$) oder wenn eine Augenuntersuchung das Prädikat o.b.B. ($p < 0,001$) erhielt, beobachtet werden. Schließlich wurde für jedes positive Laborergebnis in Abhängigkeit von der Augenveränderung eruiert, ob ein direkter Erregernachweis gelang oder das positive Ergebnis ausschließlich auf dem Nachweis von Antikörpern beruhte. Ein Beispiel: immerhin bei 19% (7/37) der Augen, die ohne besonderen ophthalmoskopischen Befund durchgingen konnten in der Augenflüssigkeit Antikörper gegen Leptospiren nachgewiesen werden. Ein direkter Erregernachweis gelang jedoch niemals ($p = 0,006$). Obwohl beim Vorliegen einer Glaskörperverflüssigung kein Zusammenhang zwischen einem positiven und negativen Laborergebnis auf Leptospirose bestand ($p = 0,367$), so war ein positives Ergebnis doch überwiegend (27/10) auf einen Antikörpernachweis zurückzuführen ($p = 0,002$). Immerhin korrelieren doch einige der beschriebenen Augenveränderungen deutlich mit einem positiven Testergebnis unabhängig von der angewandten Methode. Dabei bestand in den meisten Fällen eine Gleichverteilung; doch gibt es auch ein paar klinische Erscheinungen, bei denen ein direkter Erregernachweis sei es mit PCR oder Kultur unverhältnismäßig oft gelang, dazu zählen: die Glaskörpertrübung ($p < 0,001$), Glaskörpereinlagerungen ($p = 0,018$), Präzipitate auf der Linsenrückfläche ($p = 0,024$) und schließlich die Netzhautfalten ($p = 0,042$). Die Diagnose einer Leptospirose konnte bei solch betroffenen Augen zu 57% bis 76% alleine anhand des direkten Erregernachweises gestellt werden. Zu guter Letzt noch genau das umgekehrte Beispiel: von 190 Augen mit einer Katarakt erhielten 130 ein positives Laborergebnis, allerdings gelang nur bei 40% (52) dieser Augen der direkte Erregernachweis. Das positive Laborergebnis beruhte zum überwiegenden Teil ausschließlich auf dem Nachweis von Antikörpern gegen Leptospiren ($p < 0,001$).

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, für die Routinediagnostik eine quantitative „real-time“ PCR zur Untersuchung klinischer Proben auf die Präsenz von DNA pathogener Leptospiren zu entwickeln, die einfach in der Anwendung, robust, zuverlässig und kostengünstig ist. Die Methode sollte für Jedermann leicht praktikabel und nachvollziehbar sein, Kontinuität und Stabilität für Wiederholungen gegeben sein und damit eine Vergleichbarkeit gewährleistet werden. Daher wurde das Protokoll recht einfach gehalten, möglichst unter Verwendung kommerziell verfügbarer Kitsysteme ohne Extravaganzen um eine gute Reproduzierbarkeit zu garantieren. Auf den Zusatz von PCR-Beschleunigern wurde verzichtet (Espy et al., 2006; Lucchesi et al., 2004; Teo et al., 2002).

Eine Leptospirose zu diagnostizieren ist nicht ganz einfach. Mit dem Wandel der epidemiologischen Situation scheint sich auch die klinische Verlaufsform zu ändern. Um so bedeutender ist die Leptospirose wenigstens als Differentialdiagnose mit einzubeziehen, denn sonst kann es passieren, dass manche Leptospireninfektion erst post mortem erkannt wird (Cachay et Vinetz, 2005; Spichler et al., 2007; Zaki et Shieh, 1996). Gerade das akute Stadium einer Leptospireninfektion stellte lange Zeit eine diagnostische Lücke dar. Zwar können Leptospiren bereits einen spätestens zwei Tage post infectionem im Blut und verschiedenen Organsystemen nachgewiesen werden, doch vor Einführung molekularbiologischer Methoden mangelte es an genügend sensitiven und raschen Verfahren (Brown et al., 2003; Čermáková et al., 2005; Gavin et al., 2005; Greenlee et al., 2004; Kee et al., 1994; Romero et al., 1998). Da die kulturelle Isolierung aufwändig, geradezu frustrierend unsicher und auch nicht unbedingt kostengünstig ist, sowie ein Ergebnis dem Patienten zum Beispiel acht Wochen nach Einsendung der Probe kaum hilft, wird die Kultur nur noch von wenigen Praktikern angefordert. Dies hat zur Folge, dass die Anzahl spezialisierter Labore, die mit der Isolierung von Leptospiren ausreichend Erfahrung haben, begrenzt ist. Bis heute beruht die labordiagnostische Untersuchung zum Teil ausschließlich auf dem Nachweis von Antikörpern gegen Leptospiren-LPS mittels MAT und/oder ELISA (Chapola et al., 2005; Ghneim et al., 2007; Goldstein et al., 2006; Govindarjan et al., 2006; Hajikolaei et al., 2005; Jauréguiberry et al., 2005). Erst die PCR brachte es eindeutig ans Tageslicht, welche ein Irrtum hinter einem MAT-Ergebnis verborgen sein kann. Für die Entwicklung und Evaluierung der PCR-Protokolle wurden auch vermehrt Kulturen angesetzt. So bildet die PCR einen wichtigen Ausgangspunkt für neue Erkenntnisse in der Epidemiologie, Pathogenese sowie Therapie und Prophylaxe (Cox et al., 2005). Leptospiren können beim Menschen über eine ganze Zeit lang noch über den Urin ausgeschieden werden, unabhängig davon dass es dem Patienten zunächst besser geht, eine Behandlung mit β -Lactamantibiotika erfolgte und der MAT-Titer deutlich gesunken ist. Damit stellt auch der Mensch potentiell eine Ansteckungsquelle für seine Umgebung dar (Segura et al., 2005). Unabhängig von einem MAT-Titer konnten beim Menschen noch 56 Tage nach Eintreten der Symptome Leptospiren im Blut nachgewiesen werden (Mérien et al., 1995). Momentan laufen Untersuchungen, die überprüfen sollen, ob

die Bakterienlast im Blut einen prognostischen Parameter bilden könnte; das Problem hierbei ist, dass die Untersuchungen mit verschiedenen PCR-Protokollen (Probenvolumina, Extraktionsart, PCR, Quantifizierung) durchgeführt werden. Außerdem ist noch nicht ganz klar, in wieweit sich die Leptospiren in ihrer Virulenz unterscheiden, sowie welche anderen Faktoren tatsächlich eher für einen günstigen oder ungünstigen Verlauf der Erkrankung ausschlaggebend sind. Zukünftig wird die PCR entscheidend dabei helfen MAT-Titer oder ein ELISA-Ergebnis besser einschätzen zu lernen (Masri et al., 1997; Gale et Kingscote, 1989; Ellis et Thiermann, 1986; Ellis et al., 1981, 1986a, 1986b; Levett, 1999; Lupidi et al., 1991; Miller et al., 1991; Rocha et al., 2004). Zwar ist man sich weltweit darin einig, dass ein vierfacher Titeranstieg gepaarter Serumproben oder aber ein sehr hoher Einstiegstiter von $\geq 1:800$ eine akute Leptospireninfektion anzeigt, doch relative Willkür findet sich bei der Unterscheidungsgrenze („Cut-off“) für den MAT (Bajani et al., 2003; Chappel et al., 1992; Ko et al., 1999; Rocha et al., 2004; Segura et al., 2005; Shivakumar et Krishnakumar, 2006; Suwimonteerabutr et al., 2005). Auch der ELISA bietet wenig Sicherheit; IgM können über Wochen im Blut nachweisbar sein. Ob dahinter allerdings immer eine chronische Infektion steckt, ist noch zu untersuchen. Genauso kann es vorkommen, dass niemals IgM detektierbar sind, dafür allerdings IgG; oder es werden keine IgG-Isotypen gebildet und da die wenigsten ELISA auf IgA untersuchen, bleibt eine Immunantwort gegen Leptospiren möglicherweise unerkant. Mit Sicherheit ist die Untersuchung auf Antikörper im Serum allein in keinsten Weise geeignet organbezogene Leptospirosen chronisch infizierter Wirte aufzuspüren, weder bei einem asymptomatischen Träger, noch bei klinischen Verlaufsformen (Blackmore et al., 1984; Chu et al., 1998; Clegg et Heath, 1975; Cox et al., 2005; Ellis et al., 1986a; Feigin et al., 1973; Harkin et al., 2003b; Heinemann et al., 1999; Masri et al., 1997; Thiermann, 1983). Doch einige Untersuchungen vergleichen die PCR mit der Serologie. Nur Wirte mit einem positiven Antikörpertiter wurden auch in der PCR oder Kultur untersucht, da noch weithin die Einstellung existiert, dass ein Tier oder Mensch ohne detektierbare Antikörper im Serum gegen Leptospiren auch keine Leptospireninfektion hat. Dabei verliert die Sensitivität und/oder Spezifität der direkten Nachweisverfahren natürlich immer. Im Vergleich dazu liegen momentan relativ wenig Daten von Studien vor, welche die Immunreaktion von PCR-positiven Wirten beschreiben (Ellis et al., 1986a; Gerritsen et al., 1994; Harkin et al., 2003a, 2003b; LaRocque et al., 2005; Romero et al., 1998; Ruiz et al., 2005; Schönberg et al., 2005). Für das Einzelindividuum wenig geeignet, bietet die serologische Untersuchung einer Population oder das Screening in einer bestimmten Gegend einen Hinweis über die Prävalenz der Leptospirose und stellt damit einen sehr wichtigen epidemiologischen Parameter dar (Burriel et al., 2003; Caley et al., 2001; Koteeswaran, 2006; Krawczyk, 2005; Naito et al., 2007; Odontsetseg et al., 2005; Özdemir et Erol, 2002; Smythe et al., 2002b; Straube, 2007; Thai et al., 2006). Bis in Kürze kommerzielle ELISA zur Verfügung stehen werden, die es ermöglichen Serovar-unabhängig eine Probe zu beurteilen, wird bei Ergebnissen mit dem ELISA und vor allem mit dem MAT stets mit falsch negativen Resultaten zu rechnen sein (Bomfim et al., 2005; Flannery et al., 2001; Mariya et al.,

2006; Mino, 1942; Naito et al., 2007; Srivastava et al., 2006). Hinzu kommt, dass die Reaktionen einer klinischen Probe im MAT nicht das tatsächliche Serovar anzeigen müssen; dies beweisen inzwischen 16S rDNA Sequenzierungen. Dank molekularbiologischer Untersuchungen konnten zahlreiche pathogene Leptospirenspezies ausgemacht werden, von denen man bis dahin gar nichts wusste, weil keiner der verwendeten Serovare im MAT mit den Antikörpern in der Probe kreuzreagierten (Haake, 2006). Werden demnach Patienten, deren klinische Proben (u.a. Serum) im MAT oder ELISA negativ reagieren, gar nicht auf eine Leptospireninfektion mittels direkter Nachweisverfahren untersucht, kann auch keine Diagnose erwartet werden. Dies hat zur Folge, dass zum Beispiel eine Uveitis idiopathisch oder der Grund der Fruchtbarkeitsstörung unerkannt bleibt (Chu et al., 1998; Faber et al., 2000; Heinemann et al., 1999; Romero et al., 1998). Obwohl bei unseren Untersuchungen im Vergleich recht wenig Kulturen angesetzt wurden und die Glaskörper- und Kammerwasserproben für die PCR suboptimal vorbereitet waren, konnten von 128 Proben, mit einem direkten Erregernachweis, bei 14,8% im MAT und bei 4,7% im MAT und ELISA keine intraokularen Antikörper detektiert werden. Dabei handelte es sich nicht um Augen ohne ophthalmoskopischen Befund, sondern sie zeigten alle klinischen Symptome einer Augenentzündung. Zu der Dauer der Erkrankung lag nicht für alle Pferde eine Information vor, aber zumindest für vier Pferde, die 1, 2 oder 3 Schübe bereits hinter sich hatten bzw. bei einem Pferd, das seit einem Jahr unter einer Uveitis litt. Die Ergebnisse des MAT hängen sehr von den verwendeten Referenzstämmen ab (Naito et al., 2007). Immerhin gelang es bei 30% der Glaskörper- oder Kammerwasserproben nicht, das korrekte Serovar vorherzusagen. Würden die Proben nach Isolierung der Leptospiren mit diesem Feldisolat in einer MAT getestet werden, so wären die ermittelten Antikörpertiter noch viel höher als zuvor bestimmt. Einerseits spricht das für die hohe Spezifität einer MAT, andererseits auch für das Vorkommen von falsch negativen bzw. zu niedrigen Ergebnissen, wenn die Referenzstämmen nicht hoch spezifisch und mit hoher Avidität mit den Antikörpern in den Proben reagieren (Levett, 2003). Wie zu erwarten war, reagierten die 54 in der MAT positiven Proben alle im ELISA; da der Abgrenzungsbereich („Cut-off“) für den MAT bei 1:100 festgelegt wurde, kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, ob die 91 Proben, welche im ELISA zusätzlich positiv waren, im MAT nicht vielleicht doch wenigstens einen geringen Titer von z.B. 1:50 gezeigt hätten (Suwimonteerabutr et al., 2005). Der ELISA ist ein wirklich sehr sensitives Verfahren, doch hängt sein Ergebnis, genauso wie das der MAT, von dem für die Reaktion ausgewählten Leptospirenreferenzstämmen ab. So gibt es für die immerhin sechs negativen ELISA-Ergebnisse bei direktem Erregernachweis zwei mögliche Erklärungen; entweder es sind in der Probe keine detektierbaren Antikörper gegen Leptospiren vorhanden gewesen, oder aber sie waren mit dem Teststamm nicht reaktiv. Meist wurde nur gegen das Serovar Grippotyphosa getestet; in den Fällen, in denen zwei oder drei Stämme verwendet wurden, konnten zum Teil deutliche Unterschiede ausgemacht werden. Die antikörperhaltige Probe reagierte dann zum Beispiel mit dem richtigen Serovar stark

durch IgG- und IgA-Bindung, mit einem anderem Stamm vielleicht gerade mal grenzwertig nur durch IgA-Reaktion.

Saprophytäre Leptospiren gibt es überall; sie können Laborkontaminationen darstellen oder aus Wirten isoliert werden (Brendle et Alexander, 1974; Cinco et al., 1980a; Henry et Johnson, 1978; Koizumi et al., 2003; Myers, 1976; Nizamuddin et al., 2006; Noubade et al., 2002; Rubin et al., 1980; Tumilowicz et al., 1974). DNA pathogener Leptospiren in einer klinischen Probe sind beweisend für eine Infektion; auf der Suche nach möglichen Ansteckungsquellen bietet der Nachweis von DNA pathogener Leptospiren mittels qPCR im Wasser wichtige Informationen (Ganoza et al., 2006). Die Spezifität der Primer einer PCR determiniert die Glaubwürdigkeit der Ergebnisse. Das Problem bei der Primerentwicklung ist der aktuelle Wissensstand zu Erregersequenzen. Gerade für Sequenzen der 16S rDNA, der 23S rDNA und der Präprotein-Translokase-SecY-Untereinheit musste sich über die Jahre herausstellen, dass eine Aussage wie „100% spezifisch für pathogene Leptospiren“ nicht unbedingt zutreffend ist. Eine PCR, die als Primer Oligonucleotide für Sequenzen enthält, die rein theoretisch bei allen Leptospiren vorkommen, ist nur dann sinnvoll, wenn jedes erhaltene PCR-Produkt sequenziert wird und dieses dann auch genügend Informationen für eine Differenzierung wenigstens der Genospezies beinhaltet. Doch wird es aus finanziellen Gründen in der veterinärmedizinischen Routinediagnostik wohl kaum tragbar sein, jedes PCR-Produkt zu sequenzieren (Cai et al., 2003; Faber et al., 2000; Harkin et al., 2003a; Mérien et al., 1992; Oliveira et al., 2003; Tansuphasiri et al., 2006). Die von Smythe et al. (2002a) beschriebene TaqMan™ PCR generiert ein 87 bp PCR-Fragment der 16S rDNA. Dieses sehr kurze Fragment reicht für eine Typisierung nicht aus und eine Restunsicherheit, ob es sich bei der Sequenz tatsächlich nur um pathogene Leptospiren handelt, bleibt (Straube, 2007). Schließlich zeigen Sequenzierungen zunehmend, dass sich der Nachweis von tatsächlich allen pathogenen Leptospiren mit nur einem Primerpaar als schwierig darstellt. Die Unterschiede im Genom können beträchtlich sein, was alleine die Vollsequenzierung der bisher nur vier Leptospirenstämme verdeutlicht (Haake et al., 2004; Vemulapalli et al., 2005). Für die hier entwickelte quantitative „real-time“ PCR wurde die LipL32 Sequenz gewählt, da sie ausschließlich Bestandteil des Genomes pathogener Leptospiren ist. Das davon kodierte Protein wird während einer Infektion exprimiert und ist als Virulenzfaktor direkt in der Immunpathogenese beteiligt (Branger et al., 2001; Flannery et al., 2001a; Gavin et al., 2005; Haake et al., 2000; Lee et al., 2000; Levett et al., 2005; Nally et al., 2007; Yang et al., 2002). Schließlich finden sich in der NCBI-Gendatenbank zahlreiche Vorlagen, und seien es auch nur Teilsequenzen, der verschiedensten Genospezies. Beste Voraussetzungen demnach für die Primerentwicklung die Unterschiede in der Nucleotidsequenz der Spezies herauszuarbeiten, um möglichst für pathogene Leptospiren universelle Primer zu entwickeln. Es gestaltete sich schwieriger als gedacht, Primer für eine „real-time“ LUX™ PCR sowie für eine semi-nested PCR, als Qualitätskontrolle für eine leichte Spezifizierung des qPCR-Produktes, auszuwählen. Auch wenn es weniger Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz des LipL32 hat, so sind die Unterschiede zwischen den Spezies auf Nucleinsäurebasis doch recht hoch (Amutha et al., 2007;

Bomfim et Koury, 2006; Dey et al., 2007; Haake et Matsunaga, 2005). Hinzu kommt das Dilemma, dass für die LUX™ Primer am 3' Ende optimaler Weise eine ‚cg‘ Struktur vorliegen sollte (Li et Makrigiorgos, 2007; Nazarenko et al., 2002a). Von Vorteil war hierbei, dass es egal ist, ob der LUX™ Primer ein „forward“ oder ein „reverse“ Primer ist. Die dritte Schwierigkeit bestand in den Primerdimeren, die erst in der „real-time“ PCR erkannt wurden. Es war nicht sinnvoll, zuerst eine konventionelle PCR zu optimieren. Die Übertragung des Protokolles auf die „real-time“ PCR hat nicht funktioniert. Die Darstellung der Amplifikationskurven nach Messung der Fluoreszenzintensität zeigte sehr empfindliche Schwankungen auf die Primerkonzentration, die Annealingtemperatur und die Annealingzeit (Hilscher et al., 2005). Nachdem die Sequenz einer Adenylatcyclase auf Chromosom II von *L. interrogans* für die Inhibitionskontrolle ausgewählt wurde, war es erstaunlich leicht geeignete Primer zu finden. Die Bedingung war, ein PCR-Produkt zu generieren, das um 50 bp bis 100 bp größer sein sollte, als das der LipL32 Zielsequenz der Größe 433 bp. Dies ermöglichte sowohl eine Unterscheidung der PCR-Produkte auf Basis der Schmelzkurve in der „real-time“ PCR, als auch auf dem Agarosegel; zudem war angedacht der DNA-Polymerase als Proben-Zielsequenz das kürzere Fragment anzubieten, um bei Anwesenheit weniger Leptospiren die Amplifikation der LipL32 Sequenz zu begünstigen (Nolte, 2004; Theodoridis, 2004). Es stellte sich heraus, dass die ausgewählten Primer für die Inhibitionskontrolle hoch spezifisch sind und der LUX™ Primer nur äußerst selten zu Primerdimeren neigt. Welche Leptospirengenospezies tatsächlich von den Acl Primern erkannt werden, müssen zukünftige Sequenzierungen zeigen; von den verfügbaren Referenzstämmen am LGL, Oberschleißheim, wurde ausschließlich von Chromosom II der Genospezies *L. interrogans* ein spezifisches PCR-Produkt gebildet. Es mag sich in naher Zukunft durchaus herausstellen, dass zum Nachweis pathogener Leptospiren höher konservierte, spezifische Sequenzen existieren und diese auch für die Entwicklung von LUX™ Primern noch besser geeignet sind, als die LipL32 Sequenz; doch derartige Informationen lagen zum gegebenen Zeitpunkt (Frühjahr 2006) nicht in ausreichender Menge vor.

Die Probenvorbereitung mit anschließender DNA-Extraktion bildet die Basis für eine erfolgreiche und sensitive PCR (Hoorfar et al., 2004). Dabei sind die Anforderungen an eine Extraktionsmethode hoch: Entfernen respektive Zerstören potentieller PCR-Inhibitoren, Gewinnung reiner und hochmolekularer DNA, Erfassung selbst geringer Mengen an Leptospiren ohne DNA-Verlust, Standardisierbarkeit sowie einfache und kostengünstige Durchführbarkeit. Alle Punkte werden wohl kaum von einem Verfahren zur vollsten Zufriedenheit erfüllt (Espy et al., 2006). Der DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden) basiert auf der Verwendung von Silica Membranen; dieser Methodik wird oftmals eine zu geringe Sensitivität zugesprochen; das mag wohl daran liegen, dass die Säulen sehr empfindlich gegen ein Überladen mit DNA reagieren (Patterson et Singer, 2006; Rudenko et al., 2005; Tansuphasiri et al., 2006; Vitale et al., 2005). Daher gilt es für die Proben, ein gewisses Feingefühl zu entwickeln. Um die oftmals geringen Mengen an Leptospiren in einer Probe richtig zu erfassen, möchte man natürlich so viel als möglich an Probenvolumen verwenden.

So stellt es für den Qiagen Kit auch kein Problem dar, Sediment von 10 ml Urin zu extrahieren, sofern die Probe noch nicht mit Bakterien überwuchert war. Daher ist zu empfehlen jede Flüssigkeit vor der Extraktion mikroskopisch auf den Zellgehalt zu überprüfen, um dann die richtige Menge an Probenvolumen für die Extraktion auszuwählen. DNA aus Flüssigkeiten von ≤ 1 ml wurde stets einwandfrei extrahiert. Bei solch kleinen Volumina war es möglich die Extraktion direkt, also ohne vorherige Zentrifugation durchzuführen und eignete sich somit auch für eingefrorene Proben bei retrospektiven Untersuchungen. Wenn möglich ist eine Zentrifugation der frischen Probe und das Verwerfen des Überstandes immer anzuraten, da hierbei bereits lösliche PCR-Inhibitoren entfernt werden (Schneeweiß et al., 2007). Neben der DNA-Last, sind für den Qiagen Kit Kammerwasserproben und Urinproben mit sichtbaren Blutbestandteilen (Häm-) eine Herausforderung. In diesem Fall gilt es die Extraktion besonders sorgfältig durchzuführen und falls nötig einen weiteren Waschschrift einzufügen. Wird die DNA-Extraktion ausschließlich nach Herstellerangaben durchgeführt, so erhält man zwar Leptospiren-DNA, doch ist die Ausbeute bei weitem größer, wenn die Inkubationszeiten verlängert werden. Grundsätzlich wirkte es sich auf die DNA-Extraktion der Leptospiren günstig aus, frische Proben zu zentrifugieren und mit dem Überstand unnötige PCR-Inhibitoren zu entfernen, das Sediment dann einzufrieren, um das Platzen der Zellen zu begünstigen sowie weitere Inhibitoren zu inaktivieren und schließlich während der Extraktion einen Erhitzungsschritt von über $+70^{\circ}\text{C}$ für mindestens 10 Minuten einzubauen und nach der Extraktion die DNA-Lösung sofort einzufrieren (Richtzenhain et al., 2002). Ungünstig hingegen wurde zu häufiges Vortexen empfunden, häufiges Pipettieren sowohl zum Mischen als auch zum Überführen der Lösung von einem Reaktionsgefäß in ein Anderes und die umgehende Verwendung des DNA-Extraktes (Eluates) für eine PCR oder zur Messung der DNA-Konzentration. Wiederholungen am nächsten Tag oder selbst einige Zeit später brachten stets ein besseres Ergebnis.

Ist das Probenvolumen begrenzt und möchte der Auftraggeber jedoch sowohl die kulturelle Isolierung möglicher Leptospiren versucht haben als auch eine PCR, so wird die Probe idealerweise noch am Entnahmeort direkt in ein Transportmedium mit Hemmstoff gegeben und dann bei Raumtemperatur versandt (Faber et al., 2000; Miller et al., 1990; Thiermann, 1984; Thurau, 2003). Der Vorteil hierbei ist, dass vitale Leptospiren sich zunächst vermehren und somit selbst bei sehr kleinen Probenvolumina die Erfolgsrate der PCR gesteigert werden kann. Auch wenn die Leptospiren dann von Fremdflora überwuchert werden sollten und eine Anzucht daher fehlschlägt, so ist damit zu rechnen, dass wenigstens die ersten drei Tage die Leptospiren noch im Transportmedium nachweisbar sind, bevor sie von den anderen Bakterien verdrängt werden und verschwinden. Damit wird aber auch der zweite Vorteil evident, wenn die Proben direkt in ein Transportmedium gegeben werden. Ist damit zu rechnen, dass die Probe einen längeren Transportweg zum Labor hat und eine Kühlung der Nativprobe über eine so lange Zeit nicht möglich ist, können die Leptospiren im Transportmedium über diese Zeit konserviert werden. Von zwei Glaskörperproben aus dem Tiefkühlasservat des Leptospiroselabores am LGL, Oberschleißheim, von denen bekannt war, dass die kulturelle Isolierung positiv

verlaufen war, gelang in der PCR kein direkter Erregernachweis. Das Probenvolumen betrug beides Mal um die 100 µl und es ist davon auszugehen, dass diese beiden negativen Ergebnisse der PCR bei positiver Kultur nicht repräsentativ sind, da bei allen frisch untersuchten Proben so etwas nicht vorkam. Da aus biologischen Proben generell saprophytäre Leptospiren isoliert werden könnten, bietet die LipL32 PCR den Vorteil dies schnell, sicher und einfach zu überprüfen.

Die Standardkurve wurde in jeder PCR mitgeführt, um der bestehenden inter- und intra-Test Varianz gerecht zu werden (Rutledge et Côté, 2003). Das Resultat war, dass wenn von einem DNA-Extrakt erneut eine PCR angesetzt wurde, die errechnete Menge an Genomäquivalenten gleich blieb. Die Sensitivität der qPCR betrug mindestens ≤ 10 Leptospiren pro Reaktion. Damit steht die LUX™ qPCR bisherigen Protokollen zum Nachweis von Leptospiren-DNA in keiner Weise nach (Čermáková et al., 2005; Kositanont et al., 2007a; Levett et al., 2005; Mérien et al., 2005; Slack et al., 2007a). Es war unabhängig aus welcher klinischen Probe DNA extrahiert wurde; sofern die Inhibitionskontrolle amplifiziert wurde, war mit einer Störung der Empfindlichkeit nicht zu rechnen. Auch die Anwesenheit der Inhibitionskontrolle hatte keinen Einfluss. Rein rechnerisch war es möglich nur eine Genomkopie nachzuweisen, doch wurde die Probe erneut in die qPCR eingesetzt, so war dies Ergebnis nicht immer reproduzierbar.

Eine PCR ist eine hoch sensitive Methode. Eine Genomkopie im Reaktionsgefäß würde für ein positives Ergebnis ausreichen. DNA ist potentiell sehr stabil. Viele Schritte von der Probenentnahme an müssen durchlaufen werden, ehe eine PCR angesetzt werden kann. In jeder Phase ist es möglich eine Kontamination einzutragen. Das Vermeiden einer Kontamination und das frühzeitige Erkennen einer Solchen, um der Gefahr der Akkumulation entgegen zu wirken, ist sehr wichtig (Espy et al., 2006; van Gelder, 2001b; Pusterla et al., 2006). Das hier entwickelte PCR-Protokoll hat den Vorteil, dass zwischen einer Kontamination, die während der DNA-Extraktion eingetragen wurde, einer Kontamination während des Ansetzens der qPCR oder aber post qPCR unterschieden werden kann. Ist man in den Umgang der DNA-Extraktion von Leptospiren, dem Vorbereiten, Durchführen und Auswerten der LUX™ qPCR eingearbeitet, so ist zu über 95% eine semi-nested PCR nicht mehr notwendig. Gerade wenn die Untersuchung einer Vielzahl an unterschiedlichem biologischem Ausgangsmaterial ansteht, die Bedingungen möglicherweise für diese Proben nicht optimal waren (z.B. stark verkeimt, verschmutzt, fortgeschrittene Autolyse u.a.), vielleicht noch wenig Routine für den Umgang mit solchen Proben besteht, kann es zu unklaren qPCR-Ergebnissen kommen, bei denen die semi-nested PCR schnell ein eindeutiges Ergebnis liefert. Hinzu kommt, dass wenn negative Kontrollen selbst nach 85 Zyklen einer PCR immer noch negativ sind, man mit gutem Gewissen weiterarbeiten kann. Wenn man sich von vornherein sämtlicher möglicher Eintragungsquellen von Kontaminationen bewusst wird, ein Plan zu deren Vermeidung von allen Beteiligten diszipliniert eingehalten wird und immer die Kontrollen durchgeführt werden (wobei jede negative Probe auch gleichzeitig eine Kontrolle darstellt) dann bietet eine semi-nested PCR mehr Vor- als Nachteile.

Zwar ist die PCR an sich sehr empfindlich, doch darauf sollte man sich nicht verlassen; zahlreiche Faktoren spielen eine Rolle, ob die ursprünglich in der Probe enthaltene Leptospiren-DNA am Ende mit der qPCR nachweisbar ist. Grundsätzlich gilt daher, dass auch ein negatives PCR-Ergebnis keine Aussage zulässt, ob eine Leptospireninfektion vorliegt oder nicht. Besteht dennoch der Verdacht, so sind unbedingt wiederholt Proben zu untersuchen. Gleichzeitig kann man durch gewisse Vorkehrungen möglicherweise ein positives PCR-Ergebnis begünstigen. So wird empfohlen, für Urinuntersuchungen vorher, sofern möglich, harntreibende Mittel zu verabreichen und den Mittelstrahl bis Endstrahl zu nehmen, um einerseits einen Spüleffekt der Niere zu erreichen und andererseits mehr Probenvolumen zu erhalten (Bomfim et al., 2007; Gerritsen et al., 1991; Schönberg et al., 2005). Je mehr Probe dem Labor eingesandt wird, desto besser. Ganz ungünstig wird der erste Urinstrahl, frischer Morgenurin und Zystozenthesurin sein, da gerade bei Wirtspezies mit einem vom neutralen abweichenden pH-Wert, die Leptospiren im Urin nicht nur schnell absterben, sondern deren DNA auch degradiert. Das geht innerhalb weniger Stunden (Fairbrother, 1985; Lucchesi et al., 2004). Zystozentheseharn kann auch schon eine Weile in der Harnblase verweilt haben und schließlich wird er auch immer etwas Blut enthalten. Blut vermischt mit Urin stellt für jede DNA-Extraktion eine Herausforderung dar. Leptospiren bilden in viskösen Flüssigkeiten Grüppchen bzw. richtige Bakterienklumpen (Trueba et al., 2004). Dieses Verhalten kann für den direkten Erregernachweis aus Augenflüssigkeiten ein Problem darstellen. Die Verteilung der Leptospiren in den Proben wird immer inhomogen sein. Zunächst bedeutet, die bei der Vitrektomie verwendete Glaskörperspülflüssigkeit für die Leptospiren einen Schock; sie werden wohl kaum sehr lange darin überleben. Doch wäre es durchaus möglich, dass eine große Menge von der ersten entnommenen Spülflüssigkeit, sofern die Probenvorbereitung so bald wie möglich stattfindet, für die PCR besser geeignet und das Ergebnis repräsentativer ist, als z.B. aus 100 µl purer Glaskörperprobe. Durch die Verdünnung werden die Bakterien besser in der Lösung verteilt. Mit der LUX™ qPCR konnten aus 2 ml bis 10 ml Spülflüssigkeit, je nach Verdünnungsgrad oder bereits bestehendem Wachstum von Fremdbakterien, die einen Tag mit dem Postweg bei Raumtemperatur unterwegs waren, Leptospiren-DNA nachgewiesen werden; die ermittelte Menge an Leptospiren entsprach in etwa dem Gesamtdurchschnitt aus allen untersuchten reinen Glaskörperproben; da zu den Spülflüssigkeiten natürlich aber keine reinen Glaskörperproben mit eingesandt wurden, war ein direkter Vergleich nicht möglich. Untersuchungen von Spülproben und 100% Proben mittels qPCR könnten zukünftig beitragen, diese Frage zu klären. Außerdem müsste ermittelt werden, wie lange unter Bedingungen in praxi Leptospiren-DNA in Glaskörperspülproben intakt bleibt und ein direkter Erregernachweis mittels qPCR möglich ist, sowie welchen Einfluss der Gehalt an Antibiotikaspuren in der Spülung hat (van Gelder, 2001b).

In den positiven Glaskörper- und Kammerwasserproben aus der Klinik für Pferde der LMU, München, konnten mindestens 20 bis 8.552.000 Leptospiren nachgewiesen werden. Diese Angaben beziehen sich auf unverdünnte 100 µl bis 1 ml Probe. Die genaue Angaben der Menge war aufgrund der Konsistenz der Proben nicht immer

möglich; die Leptospiren, wie bei einigen Proben festzustellen war, sind nicht gleichmäßig verteilt sondern in zwei 500 µl ein und derselben Probe kann die Anzahl an Leptospiren beträchtlich variieren (Trueba et al., 2004). Dennoch, bedenkt man, dass die Proben zum Teil seit zwei Jahren bei -20°C eingefroren waren, zuvor bis zu acht Wochen in der Kühlung verweilt hatten, bereits über den Postweg und im Labor Zeiten bei Raumtemperatur verbracht haben, ist es erstaunlich, wie viele Genomkopien nachgewiesen werden konnten. Obwohl Hochrechnungen auf die möglichen 28 ml Volumen, die ein Glaskörper eines ausgewachsenen Pferdes beinhalten kann, bestimmt der disseminierten Verteilung der Leptospiren nicht gerecht werden, so wird einem doch bewusst mit wie viel Bakterien sich ein erkranktes Auge auseinandersetzen muss (Wissdorf et al., 2002). Bei positiver Kultur und/oder qPCR konnten manches Mal in einer Probe gar keine Antikörper gegen Leptospiren nachgewiesen werden, manches Mal aber auch MAT-Titer von bis zu 1:25600. Soweit Angaben zur vermuteten Dauer der Erkrankung vorlagen, konnte zu keinem der erhobenen Befunde ein Zusammenhang gesehen werden. Vielmehr bestätigt sich die Vermutung, dass die Bildung von Antikörpern gegen Leptospiren-LPS nicht ausreicht, die Bakterien aus dem Körper zu eliminieren bzw. keine protektive Immunantwort darstellt, um vor einer Infektion zu schützen (Bolin et al., 1989a, 1989b; Nally et al., 2005b; Rohrbach et al., 2005; Trucullo et al., 2001; Zuerner et al., 1991). Bei Rindern wird ein Schutz nur durch die Beteiligung der Th1-Zell medierten Immunantwort erreicht. Bei Pferden mit einer Augenentzündung können aktivierte CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen werden. Ihnen wurde bisher eine Rolle in der Autoimmunpathogenese zugeschrieben; ob sie auch in direktem Zusammenhang mit der Leptospireninfektion stehen, und welche prognostische Bedeutung diese Zellen für die Leptospiren im Auge haben, ist noch weitestgehend unbekannt. Vielleicht könnten einige Parallelen zur Borrelienforschung gezogen werden. So beschreiben Lünemann et al. (2007), dass bereits im frühen Stadium einer Borrelieninfektion, Antigen spezifische, IFN-γ produzierende CD4⁺ Th1-Zellen aktiviert werden, welche auch mit Antigenen des Zentralnervensystems kreuzreagierten. Damit konnte nachgewiesen werden, dass die Bildung von Autoantikörpern nicht auf chronische und therapieresistente Verlaufsformen beschränkt ist (Naiman et al., 2001, 2002; Brown et al., 2003, Diamant et al., 2002; de Fost et al., 2003, Klimpel et al., 2003; Wollanke, 2002). Vor Einführung der PCR waren die Kultur und die Histologie bzw. Mikroskopie nicht sensitiv genug, um die tatsächliche Leptospirenlast im Auge zu beurteilen; zukünftig wird es einfacher sein, den direkten Leptospirennachweis durchzuführen und somit die Befunde in der Histo- und Immunpathologie nicht nur einem klinischen Bild, sondern sicher auch einer Ätiologie zuzuordnen.

Welche potentielle Infektionsgefahr sich für den Besitzer hinter infizierten Hausratten verbergen kann, verdeutlicht die Untersuchung von reiskorngroßen Nierenproben dreier ausgewachsener Hausratten, die Träger von *L. interrogans* Serovar Icterohaemorrhagiae waren. Die Bakterienlast in den Proben betrug mindestens 60.200 bis 788.000 Leptospiren. Nicht jede Ratte befindet sich im Stadium der Ausscheidung; doch ist klar, dass wenn eine solch große Menge an Bakterien mit

dem Urin ausgeschieden wird und Kontakt zu einer Hautwunde bekommt, dies etwa einer experimentellen Injektion gleichkommt. Da die Prävalenz von Leptospiren in der Wildnagerpopulation als recht hoch anzunehmen ist, sollte der Kontakt von Haus- zu wildlebenden Nagetieren vermieden werden (Bakoss et al., 2007; Brem et al., 1995; DOUNGCHAWEE et al., 2005; GOLLOP et al., 1993; Jansen et al., 2005; Rao, 2006; RKI, 1998, 2007; Straube, 2007; Sunbul et al., 2001). Leptospiren sind in der Lage auch gesunde Haut und Schleimhaut problemlos zu durchdringen (Mino, 1942). Nachdem zwei von drei Tierpflegern einer Tierhandlung in Japan an einer Leptospireninfektion erkrankt sind, wurden mit Hilfe der PCR Nachforschungen angestellt, um die Quelle ausfindig zu machen. Ursächlich waren 6 von 106 amerikanischen Zwerggleithörnchen, die kurz zuvor aus den USA importiert wurden. Man konnte DNA von *L. kirschneri* Serovar Grippotyphosa in den Nieren und dem Urin der sechs Tiere nachweisen. Doch nicht nur das; die nur für pathogene Leptospiren spezifische PCR (flaB) wies auch DNA auf der Körperoberfläche der Käfigkollegen nach und auf dem mit Urin vollgesogenen Papier, womit der Käfigboden ausgelegt war. Die Tierpfleger brauchten nicht von den Tieren gebissen werden, sondern es reichte aus, dass sie mit bloßen Händen, wie üblich, die Käfige reinigten und Umgang mit den Tieren hatten. Obwohl die sechs Tiere über zwei Monate in der Tierhandlung mit vielen anderen Tieren direkt oder indirekt Kontakt hatten und insgesamt 75 Tiere von 7 verschiedenen Spezies mit der PCR im nachhinein untersucht wurden, konnten keine weiteren Infektionen nachgewiesen werden (Masuzawa et al., 2006).

Leptospiren sind ubiquitär; das Wirtsreservoir ist grenzenlos; es ist demnach nicht verwunderlich, dass die Leptospirose keine Einzelerkrankung darstellt. Obwohl selbst beim Menschen der Ausbruch von Epidemien bekannt ist, wird dieser Aspekt in der modernen Tierhaltung gerne vernachlässigt, trotz das Konzept der Bestandsbetreuung und des Herdmanagements hoch im Kurs steht und in der Zucht jedes Jahr durch Leptospireninfektionen Millionenschäden entstehen (Ellis, 1994; Lilenbaum et al., 2007; Ruiz et al., 2005). Bisher existieren keine Hinweise, dass es sich bei den Leptospiren vornehmlich um opportunistische Krankheitserreger handelt. Auch im Interesse des Menschen selber ist es notwendig, potentielle Ansteckungsquellen für die unter seinem Schutz stehenden Tiere ausfindig zu machen und die Infektionsgefahr zu senken (Gerritsen et al., 1994; Heinemann et al., 1999; RKI, 1998; Straube, 2007; Talpada et al., 2003). Dabei ist jedes klinisch manifest erkrankte Tier gleichzeitig ein Indikator dafür, dass in seiner Umgebung mit dem Vorkommen hochvirulenter Stämme zu rechnen ist. Erkrankten, wie in immerhin vier Ställen nachgewiesen werden konnte, innerhalb kürzester Zeit mehrere Pferde an einer Leptospiren bedingten Augenentzündung, so handelt es sich dabei nicht nur um eine individuelle Tragödie für die Pferde und deren Besitzer, sondern beweist auch dringenden Handlungsbedarf (Bernard et al., 1993; Roberts et al., 1952; Sova, 1965).

Theoretisch muss in jedem Alter damit gerechnet werden, an einer Leptospireninfektion zu erkranken. So fanden sich Leptospiren bedingte Augenveränderungen auch bei Pferden zwischen 1 bis 26 Jahren. In Gegenden mit einem sehr hohen Infektionsdruck, in denen man um den Kontakt mit der

kontaminierten Umwelt bereits als junger Mensch nicht herum kommt, wie z.B. in Slumgebieten konnte man feststellen, dass kein Zusammenhang zwischen einer Leptospireninfektion und dem Geschlecht besteht und außerdem das Durchschnittsalter der Erkrankten eher bei den Jüngeren (< 20 Jahre) liegt. Wohingegen in den ländlichen Gebieten bzw. in Ländern mit einer gleichmäßigen, relativ niedrigen endemischen Verteilung, die Ansteckung mit den Bakterien weniger bereits Daheim, als viel mehr erst während der Arbeit passiert; daher erkranken in solchen Gegenden vor allem Menschen im Alter zwischen 20 und 60 Jahren. Da Männer weithin immer noch die Arbeiten mit dem höheren Leptospiren-Berufsrisiko ausführen, ist auch mit einer höheren Inzidenz bei diesem Geschlecht zu rechnen (Jansen et al., 2005; Pappachan et al., 2007; Rathinam et Namperumalsamy, 2007; Sehgal, 2006; Swapna et al., 2006; Thai et al., 2006). Pferde verbringen vor allem ihre jungen Jahre unbeschwert auf Weiden; frische Luft, Bewegung und soziale Kontakte fördern die Entwicklung; je früher die Hengste kastriert werden, desto eher können sie sich als Wallache mit den Stuten vermischen und zusammengehalten werden. In der modernen Pferdehaltung wird sich bemüht, den Pferden immer mehr Auslauf in Gruppen zu geben. Sofern die Wiesen und Koppeln allerdings nicht trockengelegt sind, die Tränken nicht regelmäßig gereinigt und desinfiziert werden, direkter Zugang zu einem Flussufer besteht, Heu vom Boden aus gefüttert wird, Einstreu in Unterständen nicht regelmäßig gewechselt, sondern als Matratze aufgeschüttet wird, sich Flüssigkeiten wie Exkremate in Ecken sammeln können, stellen Auslauf und Gruppenhaltung einen signifikanten Risikofaktor für die Pferde dar (Barwick et al. 1998; Hajikolaei et al., 2005). Es bestand kein Unterschied in der Geschlechterverteilung bei Pferden die an einer Leptospiren bedingten Augenentzündung litten. Doch waren signifikant junge im Schnitt 7-jährige Pferde betroffen (Kalisch, 1952; Rocha et al., 2004; Wollanke, 2002).

In Deutschland erweisen sich Glaskörperproben von Pferden als eine zuverlässige Quelle für ein positives PCR-Ergebnis. Das ist die Schlussfolgerung aus einem sehr angenehmen Gespräch mit dem Geschäftsführer Herrn Dr. M. Hohmuth der Gesellschaft für Innovative Veterinärdiagnostik mbH (IVD GmbH), Hannover, am bayerischen Tierärztetag in Nürnberg, 2007. Es beweist aber auch, dass es inzwischen einige Pferdekliniken in Deutschland gibt, die eine Vitrektomie bei Pferden durchführen. Darauf ist auch zurückzuführen, dass Pferde, die aus Nordrhein-Westfalen an die Pferdeklinik der LMU, München, überwiesen wurden, weniger oft mit einer Leptospiren bedingten Augenveränderung zu tun hatten (4/11) sowie Pferde aus Bremen erst gar nicht den weiten Weg für eine Vitrektomie nach Bayern finden müssen. Dass tatsächlich dies der einzige Grund für einen derart signifikanten Unterschied darstellt, beweisen nicht nur die Untersuchungen aus Hannover, sondern auch positive PCR-Ergebnisse von Glaskörperproben aus anderen Pferdekliniken Deutschlands, die an das LGL, Oberschleißheim, gesandt wurden. Nun sind die Leptospiren nicht nur für Pferde aus Deutschland ein Problem, unsere Nachbarländer sind gleichermaßen betroffen. Für Pferde aus Österreich wäre es vielleicht zukünftig günstig, um ihnen weite Anfahrtswege zu ersparen, wenn auch dort vermehrt Kliniken eine Vitrektomie durchführen würden.

Unabhängig von der Rasse kann jedes Pferd an einer Leptospireninfektion erkranken. Ob Friesen so selten andere Indikationen als eine Leptospiren bedingte Augenveränderung für eine Vitrektomie aufweisen, ist an den nur neun untersuchten Tieren wohl kaum repräsentativ festzuhalten. Es kann sich genauso gut um einen Zufall handeln. Doch nur wenn die Ergebnisse den Rassen zugeordnet werden und nicht eine Verallgemeinerung in Vollblüter, Warmblüter oder Kaltblüter durchgeführt wird, können zukünftig vielleicht doch Tendenzen einer bestimmten Linie bzw. Herkunft ausgemacht werden (Szemes et Gerhards, 2000). Die Herkunft eines Pferdes, oder wo sich das Pferd möglicherweise mit Leptospiren angesteckt haben könnte, verrät auch die Typisierung des infizierenden Leptospirenstammes; dass ein Pferd aus Amerika eine Infektion mit *L. Pomona* hat, ist genauso wahrscheinlich, wie ein Pferd aus Bayern mit *L. Grippytyphosa* infiziert ist (Brem et al., 1999, Donahue et Williams, 2000; Faber et al., 2000; Halliwell et al., 1985, Hartskeerl et al., 2004; Smith et al., 1976; Verma et al., 1977; Wollanke, 2002). Sehr interessant ist in diesem Zusammenhang, dass ausgerechnet die eher seltenen, differenten isolierten Stämme wie *L. Australis*, *L. Saxkoebing* und *L. Icterohaemorrhagiae* alle von Ungarischen Warmblütern stammten. Würde man annehmen, dass diese Pferde sich bereits in Ungarn und nicht ihrem momentanen Standort (Bayern und Österreich) angesteckt haben, würde dies auf eine hohe Variabilität der Feldstämme in Ungarn hinweisen. Doch auch dies bleibt aufgrund der geringen Fallzahl nur eine Spekulation und kann sich genauso gut um einen Zufall handeln. Anders verhält es sich für die Appaloosas; auch diese Pferde (4) können an Leptospiren erkranken, gar keine Frage. Doch scheinen sie, vor allem wenn sie etwas älter sind ebenso an anderen Augenveränderungen zu leiden, die eine Vitrektomie erfordern (9). Das ist unheimlich bedeutend für die Beurteilung von bisherigen und zukünftigen Studien für die Immunpathogenese von ERU Patienten. Untersuchungen von Augen über zehnjähriger Appaloosas müssen demnach nicht repräsentativ für die tatsächlichen Verhältnisse bei anderen Pferden, die von einer ERU (Leptospiren bedingt) betroffen sind, sein. Dasselbe gilt für Pferde mit einem Glaukom und/oder einer Keratitis (Gilger et al., 2006; Kalsow et Dwyer, 1989; Wollanke, 2002). Für einige Zuchtlinien von Appaloosas wird ein Zusammenhang zwischen dem Vorkommen eines bestimmten Haupthistokompatibilitätskomplexes, „Major Histocompatibility Complex“ = MHC, (Lymphozyten-Antigen-Subtyp ELA-B1) und der Anfälligkeit gegenüber einer Uveitis vermutet (Angelos et al., 1988; Dwyer et al., 1995; McLaughlin et al., 1992). Es gibt einige Veröffentlichungen, die sich mit chronisch, rezidivierenden Augenentzündungen des Pferdes beschäftigen, ohne jedoch die Ätiologie der Erkrankung z.B. durch eine Untersuchung von Kammerwasser oder Glaskörper auf Leptospiren, weder direkt noch indirekt, zu definieren. Solche Untersuchungen würden aber zur Aufklärung der Pathogenese einer Leptospiren bedingten Augenveränderung beitragen und somit auch für die Humanmedizin wichtige Informationen für das Verständnis um die Erkrankung liefern (Cooley et al., 1990; Deeg et al., 2002, 2007b; Dubielzig et al., 1997; Eule et al., 2000; Fife et al., 2006; Frühauf et al., 1998; Gilger et al., 2001, 2002, 2006; Hauck et al., 2007; Romeike et al., 1998; Wagner et al., 1997).

Bei Pferden mit der klinischen Verdachtsdiagnose „ERU“ gelang bei 62% der betroffenen Augen ein direkter Erregernachweis. Nur bei 6% der Augen verliefen sowohl die direkten als auch indirekten Nachweisverfahren für eine intraokulare Leptospireninfektion negativ. Die Untersuchung fand an Glaskörper- und Kammerwasserproben aus der Klinik für Pferde der LMU, München, über den Zeitraum von Januar 2005 bis Mai 2006 bzw. von Juli 2006 bis Mai 2007 statt. Wollanke (2002) konnte bei 90% der Pferde, die von einer ERU betroffen waren intraokulare Antikörper gegen Leptospiren nachweisen. Auch hierfür wurden Proben aus dem Zeitraum von Juli 1998 bis Juli 2001 aus derselben Klinik an das gleiche Labor gesandt, welches damals allerdings noch unter einer anderen Leitung stand. Faber et al. von der Universität California-Davis (2000) gelangen bei 70% der Pferde mit der klinischen Verdachtsdiagnose „ERU“ der direkte Erregernachweis aus Kammerwasserproben mittels PCR. Daraus ergibt sich, dass sich über neun Jahre vieles ändern kann, aber nicht, dass Leptospiren die Augen von Pferden besiedeln und zu dem klinischen Erscheinungsbild einer ERU führen können.

Bestand der klinische Verdacht auf eine andere Uveitis, zum Beispiel phakogen oder traumatisch, als der ERU, so ergab sich bei 73% der Augen kein Hinweis auf eine Leptospirose. Doch immerhin, bei 9% der Augen gelang ein direkter Erregernachweis und auch bei Pferden, die vornehmlich wegen einer Hornhautverletzung vorgestellt wurden, lohnte sich eine gründliche anamnestische Erhebung und ophthalmoskopische Untersuchung. Bei 20% der Augen wurden Leptospiren detektiert und bei weiteren 32% waren zusätzlich intraokulare Antikörper gegen Leptospiren in den Augenflüssigkeiten vorhanden. Der Kontakt des Auges mit Leptospiren kann aber auch asymptomatisch bzw. subklinisch verlaufen; es dürfte sich ähnlich wie in der Humanmedizin verhalten, dass ein Großteil der Infektionen von alleine wieder abheilt (David et Barkay, 1976). Darauf weist das Ergebnis der Laboruntersuchung von Augen hin, die keinen ophthalmoskopischen Befund (o.b.B.) lieferten und auch von Seiten der Besitzer keine bisherigen Auffälligkeiten beschrieben wurden. Leptospiren konnten keine detektiert werden, doch immerhin 19% der Augenflüssigkeiten enthielten Antikörper gegen Leptospiren.

Neben einer ERU im Allgemeinen sprach für eine Auseinandersetzung des Auges mit Leptospiren eine Glaskörpertrübung, Glaskörpereinlagerungen, eine Katarakt, Netzhautfalten, eine Netzhautablösung, Irisresiduen und /oder eine Synechie, Fibrin in der vorderen Augenkammer, eine abgeflachte vordere Augenkammer, ein negativer oder verminderter Drohreflex, eine Erblindung, eine Bulbusatrophie, Präzipitate auf der Linsenrückfläche, eine Miosis und chorioretinische Narben. Dabei kam es nicht unbedingt darauf an, dass diese Veränderungen alle gleichzeitig vorlagen. Der Vergleich von den Augenbefunden mit den Laborergebnissen zeigte einen signifikanten Zusammenhang zwischen klinischen Erscheinungen und einem direkten Erregernachweis. Die Wahrscheinlichkeit bei Vorliegen einer intraokularen Leptospireninfektion die Bakterien direkt nachzuweisen, war bei folgenden Symptomen am höchsten: Glaskörpertrübung, Glaskörpereinlagerungen, Präzipitate auf der Linsenrückfläche, Netzhautfalten. Neben den Augen ohne besonderen ophthalmoskopischen Befund (o.b.B.) gibt es aber auch Erscheinungen, bei denen,

wenn eine Leptospireninfektion vorliegt (oder vielleicht auch vorgelegen hat), ein direkter Erregernachweis nicht so oft gelingen mag und sich die Diagnose vornehmlich auf dem Antikörpernachweis stützen wird: Das betrifft die Katarakt und die Glaskörperverflüssigung. Eine Keratitis, ein Glaukom bzw. ein Hornhautödem schließen a priori eine Leptospireninfektion zwar nicht aus, doch sind es diejenigen Befunde, bei denen am ehesten mit einem negativen Laborergebnis zu rechnen ist. Dwyer et al. (1995) sahen für Pferde mit einem positiven Antikörpertiter gegen Leptospiren im Blut, ein erhöhtes Risiko zu erblinden. Chu et al. (1998) konnten gar bei Patienten mit einer Katarakt, die eigentlich als Kontrolle vorgesehen waren im Kammerwasser DNA von Leptospiren nachweisen. Zudem korrelierte ein positiver PCR-Befund signifikant mit dem Auftreten einer Panuveitis, einer beidseitigen Panuveitis, Infiltration der vorderen Augenkammer mit Zellen, einer Vaskulitis, Papillitis und/oder Glaskörpertrübung. Rathinam et al. (2000) beschrieben bei Patienten mit einer Leptospirenuveitis das Auftreten einer spontanen Kataraktabsorption nach Abheilung.

5.1 Ausblick

Eine quantitative „real-time“ PCR eröffnet eine Vielzahl an Möglichkeiten, die zum Verständnis der Epidemiologie, Pathogenese, Therapie und Prophylaxe der Leptospirose, einer bedeutenden Zoonose, beitragen können. Es ist möglich anhand der PCR eine Vorhersage zu treffen, ob sich der Aufwand einer kulturellen Isolierung lohnt. Dazu wird die Probe direkt am Patienten in ein Transportmedium mit Hemmstoffen gegeben und bei Raumtemperatur dem Labor zurückgeschickt. Dort findet eine Untersuchung des Transportmediums mittels einer quantitativen PCR statt. Nur bei einem positiven PCR-Ergebnis wird anschließend die Kultur angesetzt. Sobald die Leptospiren unter dem Dunkelfeldmikroskop detektierbar sind, ist eine genügend große Menge an Bakterien, für eine weitergehende molekularbiologische Typisierung der Leptospirengenospezies, vorhanden. Nur wenn die Spezies noch nicht in der Laborstammsammlung enthalten ist, wird eine weiterführende Pflege und vollständige Isolierung, mit anschließender serologischer Typisierung empfohlen. Mit dieser Vorgehensweise würde ein umfassendes Bild tatsächlich in einer Gegend vorkommender Leptospirenstämme geliefert ohne mehr Aufwand. Da nicht nur vereinzelt, sondern jeder Probe die Möglichkeit einer kulturellen Isolierung eingeräumt wird, entsteht ein dichtes Netzwerk. Nur so kann frühzeitig ein epidemiologischer Wandel erkannt, neue Zusammenhänge aufgedeckt und geeignete Schutzmaßnahmen entwickelt werden (Haake, 2006; Kositanont et al., 2007b; Levett, 2003; Mgode et al., 2006; Morey et al., 2006; Perolat et al., 1998; Resch et al., 2007; Romero et Yasuda, 2006). Vielleicht wird zukünftig auch möglich sein, sicher ein Muster der Leptospiren zu erkennen, ob sie sich lieber im Genitaltrakt, Auge oder der Niere aufhalten. Das Erkennen solcher Unterschiede und damit das Ermitteln der Angriffspunkte, öffnet den Weg für die Entwicklung neuer Antinfektiva.

Zurzeit existiert noch kein Patentrezept einer antibiotischen Behandlung, um Leptospiren sicher aus dem Organismus zu entfernen, insbesondere nach einer chronischen Organbesiedelung (Griffith et al., 2006; Pappas et Cascio, 2006; Rathinam, 2002; Theodoridis et al., 2007). Für die Entwicklung und Überprüfung zukünftiger Therapiepläne bietet die quantitative „real-time“ PCR das optimale Instrument zur Therapiekontrolle (Becker et al., 2003; Dworkin et al., 2002; van Gelder, 2001a). Vielleicht wird es doch irgendwann möglich sein, bei Einsatz eines geeigneten Antibiotikums, bereits bei einer ersten Entzündung, Pferde vor weiteren Uveitis Schüben und deren unangenehmen Folgen zu bewahren. Die Untersuchung der Glaskörperflüssigkeit nach einer Vitrektomie und Quantifizierung der Leptospiren bietet eine hervorragende Möglichkeit vorangegangene Effekte zu beurteilen.

Leptospirosen bei Haus- und Nutztieren führen jährlich weltweit zu enormen wirtschaftlichen und privaten Verlusten. Es ist höchste Zeit harte Zahlen und Fakten vorzulegen, um die Dringlichkeit für die Entwicklung geeigneter Impfstoffe klar zu machen. Die Forschung bemüht sich um die Identifizierung immunogener Kandidaten für eine sichere, Serovar-übergreifende Vakzine. Es bedarf aber der Überzeugung der Impfstoffhersteller, dass sich zum Beispiel die Produktion einer Vakzine für Pferde lohnt. Dazu ist es absolut notwendig, die tatsächliche epidemiologische Situation in den Ställen Deutschlands bzw. von Europa zu erfassen (Cachay et Vinetz, 2005; Gerritsen et al., 1994; John, 2005; Maneewatch et al., 2007; Seixas et al., 2007). Als Screeninguntersuchung von stillen Ausscheidern in Schweine-, Rinder-, Schaf- und Ziegenbetrieben würde sich beispielsweise die flächendeckende Untersuchung von Nieren- bzw. Urin- und Gebärmutterproben am Schlachthof eignen (Chappel et al., 1992; Rocha et al., 2004; Schönberg et al., 2005; Talpada et al., 2003). Da eine derartige Entwicklung wohl noch ein Weilchen auf sich warten lässt, würde sich wenigstens die routinemäßige Probenentnahme bei Tieren in der Pathologie anbieten: Niere, Gebärmutter, Plazenta sowie Glaskörperproben. Da die Leptospiren in einem kontaminiertem Stall ubiquitär vorkommen, stellen eine Vergesellschaftung der Symptome und Komplikationen mit anderen Krankheiten keine Seltenheit dar (Costa et al., 2000; Cvetko et al., 2006; Lee et Liu, 2007; Lu et Tseng, 2005; Srinivas et al., 2007).

Bisher beruht die direkte Diagnose einer Leptospiren bedingten Augenveränderung beim Pferd auf dem Erregernachweis in Augenflüssigkeiten des betroffenen Tieres. Doch irgendwo müssen die Leptospiren ja herkommen. Wo liegt das Management Problem der Ställe, bei denen mehrere Pferde an einer ERU erkranken oder Fruchtbarkeitsstörungen auftreten? Wie stecken sich die Pferde an? Gibt es eine Möglichkeit den aktuellen Status, den Infektionsdruck in einem Stall zu überprüfen? Hierzu bieten sich Untersuchungen der hiesigen Nagerpopulation in einem Stall an, sowie die Überprüfung der Tränken und anderer Wasserquellen (Ganoza et Vinetz, 2006; Murgia et al., 1997; Tansuphasiri et al., 2006). Kann eine asymptomatische oder symptomatische Leptospireninfektion bei Pferden durch eine einfache Untersuchung entdeckt werden? Dazu würden sich zum Beispiel Urinuntersuchungen der Pferde anbieten (Ellis et al., 1983; Morter et al., 1969; Myers, 1976; Rocha et al., 2004; Wada et al., 2003). Vierteljährlich eine Urinprobe

oder einmal im Jahr drei Urinproben im Abstand von ein oder zwei Wochen, frisch und gekühlt direkt an das Labor zur quantitativen Ermittlung von Leptospiren. Da es sich bei einer Leptospireninfektion zunächst immer um eine systemische Erkrankung handelt, wird es auch immer Pferde geben, die Leptospiren mit dem Urin ausscheiden und dadurch eine Infektionsquelle für andere Tiere und den Menschen darstellen (Weese, 2002).

5.2 Schlussfolgerung

Es konnte eine einfache quantitative „real-time“ PCR auf Basis der LUX™ Technologie entwickelt werden, die in ihrer Sensitivität mit jeder bisher beschriebenen Leptospiren-PCR konkurrieren kann. Der DNeasy® Blood & Tissue Kit von der Firma Qiagen (Hilden) erlaubt mit geringen Modifikationen die DNA-Extraktion von Leptospiren aus sämtlichen biologischen Proben, selbst wenn nur wenig Leptospiren in der Probe enthalten sind. Die entwickelten Primer für die LipL32 Sequenz bilden ausschließlich ein spezifisches 433 bp PCR-Produkt mit der DNA pathogener Leptospiren. Eine Inhibitionskontrolle ermöglicht die Wahrnehmung falsch negativer PCR-Reaktionen. Die LUX™ PCR bietet eine günstige Alternative zu einer TaqMan™ PCR und weitaus mehr diagnostische Sicherheit als eine „real-time“ PCR mit dem interkalierenden Farbstoff SYBRGreen™ I. Die Anwendung der semi-nested PCR erlaubt unklare qPCR-Reaktionen rasch und günstig abzuklären und eignet sich hervorragend als Labor interne Qualitätskontrolle.

Obwohl die Bedingungen nicht optimal waren, gelang der direkte Erregernachweis mittels qPCR aus Glaskörper- und Kammerwasserproben von der Klinik für Pferde der LMU, München, in 126 Proben. Weitere Nachweise von Leptospiren-DNA in Glaskörper- und Kammerwasserproben aus anderen Pferdekliniken Deutschlands und der Schweiz, in Nierenproben von drei Hausratten, der Urinprobe eines Hundes sowie der Urinprobe und einer Serumprobe zweier Menschen zeigt die Einsatzbreite und Qualität der qPCR für die Routinediagnostik. Es wird deutlich, dass sich für die Labordiagnose der Einsatz einer PCR für den direkten Nachweis von Leptospiren in jeder Hinsicht lohnt.

6 Zusammenfassung

Es war das Ziel, für die Routinediagnostik eine quantitative „real-time“ Polymerase-Kettenreaktion (qPCR), auf Basis der „Light Upon eXtension“ (LUX™) Technologie, zum Nachweis der Deoxyribonucleinsäure (DNA) pathogener Leptospiren in biologischen Proben zu entwickeln. Als Zielsequenz wurde das LipL32 Gen auf Chromosom I ausgewählt. Eine interne qPCR-Inhibitionskontrolle wurde entwickelt, um falsch negative PCR-Ergebnisse zu erkennen. Für die Bestimmung der Genomäquivalenten von Leptospiren in einer Probe wurde eine Standardkurve verwendet. Dazu wurde das PCR-Produkt der Zielsequenz kloniert und eine Verdünnungsreihe des erhaltenen Plasmides erstellt. Eine semi-nested PCR wurde für eine schnelle und einfache Bestätigung des erhaltenen qPCR-Produktes entwickelt.

Die Spezifität der LUX™ qPCR erwies sich als nahezu 100% nachdem eine Vielfalt an relevanter Kontroll-DNA mit negativem Ergebnis getestet wurde. Die Bildung von Primerdimeren ist minimal und beeinflusst das Testergebnis nicht. Die entwickelten LipL32 Primer weisen ausschließlich DNA pathogener Leptospiren nach und können dabei jede Genospezies erkennen. Die Primer sind sowohl für eine konventionelle PCR als auch nach Markierung des „forward“ Primer mit einem Fluoreszenzfarbstoff für eine LUX™ qPCR geeignet. Für die DNA-Extraktion wurde das Protokoll des Qiagen DNeasy® Blood & Tissue Kit selektiert und optimiert. Die Nachweisgrenze der LUX™ qPCR beträgt ≤ 10 Genomkopien von Leptospiren pro Reaktion.

Im Zusammenhang mit der Diagnostik der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU) wurden 271 Glaskörper- und 234 Kammerwasserproben von Pferden auf die Präsenz von DNA pathogener Leptospiren mit der LUX™ qPCR untersucht. Gleichfalls wurden die Proben auf das Vorhandensein intraokularer Antikörper gegen Leptospiren mit einem mikroskopischen Agglutinationstest (MAT) überprüft. Bei negativem MAT-Ergebnis wurde zudem ein „Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay“ (ELISA) durchgeführt. Mit ausgewählten Proben aus erkrankten Pferden mit ERU-Symptomatik wurde eine Isolierung vermehrungsfähiger Leptospiren versucht. Insgesamt reagierten 126 Proben von Pferden mit einer Augenveränderung in der LUX™ qPCR positiv. In 100 μ l bis 1 ml Augenflüssigkeiten der Pferde waren mindestens 20 bis 8.552.000 Leptospiren enthalten. Es bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen einem direkten Erregernachweis und dem Vorliegen von diffusen Glaskörpertrübungen, Glaskörpereinlagerungen, Präzipitaten auf der Linsenrückfläche und/oder Netzhautfalten. Die breite Anwendungsmöglichkeit der neuen und kostengünstigen LUX™ qPCR hat sich bereits bei einem Zoonosefall, ausgelöst durch infizierte Hausratten, bewährt. Der Nachweis von DNA pathogener Leptospiren gelang auch im Urin von einem an Leptospirose erkrankten Hund und einem Menschen sowie im Serum eines weiteren Patienten.

6.1 Summary

Development of a quantitative PCR for the detection of DNA from pathogenic leptospires in vitreous- and aqueous humor samples of horses

The aim was to develop a quantitative real-time polymerase chain reaction assay (qPCR) for routine diagnostics, based on Light Upon eXtension (LUX™) technology, to detect the existence of deoxyribonucleic acid (DNA) from pathogenic leptospires in biological samples. The LipL32 gene on chromosome I was chosen as the target sequence. An internal qPCR inhibition control was developed in order to detect negative PCR results. A standard curve was used to determine the genome equivalents of leptospires in a sample. For this, the PCR product of the target sequence was cloned and a dilution series of the plasmids that were obtained was created. A semi-nested PCR was developed for a quick and simple confirmation of the qPCR product that was obtained.

Once a great number of relevant control DNA had been tested with negative results, the specificity of the LUX™ qPCR proved to be almost 100%. The creation of primer dimers is minimal and does not influence the test results. The LipL32 primers that were developed provide evidence exclusively of DNA from pathogenic leptospires and can thereby identify each genospecies. The primers are suitable both for a conventional PCR and, after marking the forward primer with a fluorescent dye, for a LUX™ qPCR. For the DNA extraction, the protocol of the Qiagen DNeasy® Blood & Tissue Kit was selected and optimized. The detection limit of the LUX™ qPCR constitutes ≤ 10 genome copies of leptospires per reaction.

In connection with the diagnostics of the equine recurrent uveitis (ERU), 271 vitreous- and 234 aqueous humor samples from horses were examined with the LUX™ qPCR for the presence of DNA from pathogenic leptospires. Likewise, with a microscopic agglutination test (MAT), the samples were examined for the presence of intraocular antileptospiral antibodies. When the MAT results were negative, an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was also conducted. An attempt was made to isolate leptospires that are capable of replication, using selected samples from diseased horses with ERU symptoms. Altogether, 126 samples from horses with an eye change reacted positively in the LUX™ qPCR. 100 μ l to 1 ml of eye fluid from the horses contained at least 20 to 8,552,000 leptospires. There was a significant correlation between a direct proof of the pathogen and the existence of vitreous opacities, vitreous exudates, precipitates on the posterior lens surface and/or retina folds. The broad applications of the new and inexpensive LUX™ qPCR has already proven itself in a case of zoonosis, which was caused by infected house rats. It was also possible to detect DNA from pathogenic leptospires in the urine of a dog and a human being who were diseased with leptospirosis, as well as in the serum of yet another patient.

Literaturverzeichnis

- Abdulkader RC, Daher EF, Camargo ED, Spinosa C, da Silva MV.** *Leptospirosis severity may be associated with the intensity of humoral immune response.* Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2002;**44**:79-83.
- Abrahamian A, Jusuf Y, Donahue MJ, Timoney JF, Fitzgerald BP, Dubielzig RR.** *Desequestration of eye antigens, serum melatonin derangement and iso/auto-immune-mediated pinealitis and uveitis in infectious (leptospiral) uveitides.* Invest Ophthalmol Vis Sci 1997;**38**:950-B861.
- De Abreu Fonseca C, Teixeira de Freitas VL, Calo Romero E, Spinosa C, Arroyo Sanches MC, da Silva MV, Shikanai-Yasuda MA.** *Polymerase chain reaction in comparison with serological tests for early diagnosis of human leptospirosis.* Trop Med Int Health 2006;**11**:1699-1707.
- Acevedo-Whitehouse K, de la Cueva H, Gulland FM, Aurioles-Gamboa D, Arellano-Carbajal F, Suarez-Güemes F.** *Evidence of Leptospira interrogans infection in California sea lion pups from the Gulf of California.* J Wildl Dis 2003;**39**:145-151.
- Adler B, Faine S.** *Host immunological mechanisms in the resistance of mice to leptospiral infections.* Infect Immun 1977;**17**:67-72.
- Adler B, Faine S.** *The antibodies involved in the human immune response to leptospiral infection.* J Med Microbiol 1978;**11**:387-400.
- Adler B, Bragger JM.** *Lethal infections caused by Leptospira interrogans serovar hardjo in immunosuppressed hamsters.* Aust Vet J 1979;**55**:600-601.
- Adler B, Murphy AM, Locarnini SA, Faine S.** *Detection of specific anti-leptospiral immunoglobulins M and G in human serum by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay.* J Clin Microbiol 1980;**11**:452-457.
- Adler B, Faine S, Christopher WL, Chappel RJ.** *Development of an improved selective medium for isolation of leptospire from clinical material.* Vet Microbiol 1986;**12**:377-381.
- Aguirre AA, Keefe TJ, Reif JS, Kashinsky L, Yochem PK, Saliki JT, Stott JL, Goldstein T, Dubey JP, Braun R, Antonelis G.** *Infectious disease monitoring of the endangered Hawaiian monk seal.* J Wildl Dis 2007;**43**:229-241.
- Ahmad SN, Shah S, Ahmad FM.** *Laboratory diagnosis of leptospirosis.* J Postgrad Med 2005;**51**:195-200.
- Ahokas H, Erkkila MJ.** *Interference of PCR amplification by the polyamines, spermine and spermidine.* PCR Methods Appl 1993;**3**:65-68.
- Aitichou M, Javorschi S, Ibrahim MS.** *Two-color multiplex assay for the identification of orthopox viruses with real-time LUX-PCR.* Mol Cell Probes 2005;**19**:323-328.
- Alexander AD, Rule PL.** *Penicillins, cephalosporins, and tetracyclines in treatment of hamsters with fatal leptospirosis.* Antimicrob Agents Chemother 1986;**30**:835-839.
- Alexander A, Baer A, Fair JR, Gochenour WS, King JH, Yager RH.** *Leptospiral uveitis: Report of a bacteriologically verified case.* AMA Arch Ophthalmol 1952;**48**:292-297.

Literaturverzeichnis

- Alexander AD, Benenson AS, Byrne RJ, Diaz Rivera RS, Evans LB, Gochenour WS, Hall HE, Hightower JA, Jeffries H, Dejesus J, Martinez E, Paniagua M, Pons JA, Ramos Morales F, Rodriguez Molina R, Swisher KY, Woodward TE, Yager RH.** *Leptospirosis in Puerto Rico.* Zoonoses Res 1963;**26**:152-227.
- Alexander CS, Keller H.** *Ätiologie und Vorkommen der periodischen Augenentzündung des Pferdes im Raum Berlin.* Tierärztl Prax 1990;**18**:623-627.
- Alt DP, Bolin CA.** *Preliminary evaluation of antimicrobial agents for treatment of Leptospira interrogans serovar Pomona infection in hamsters and swine.* Am J Vet Res 1996;**57**:59-62.
- Alt DP, Zuerner RL, Bolin CA.** *Evaluation of antibiotics for treatment of cattle infected with Leptospira borgpetersenii serovar Hardjo.* J Am Vet Med Assoc 2001;**219**:636-639.
- Alves VA, Gayotto LC, Yasuda PH, Wakamatsu A, Kanamura CT, De Brito T.** *Leptospiral antigens (L. interrogans serogroup Ictero-haemorrhagiae) in the kidney of experimentally infected guinea pigs and their relation to the pathogenesis of the renal injury.* Exp Pathol 1991;**42**:81-93.
- Amutha R, Chaudhuri P, Garg AP, Cheema PS, Srivastava SK.** *Immunoreactive outer membrane proteins of Leptospira interrogans serovar Canicola strain Hond Utrecht IV.* Indian J Med Res 2006;**124**:569-574.
- Amutha R, Chaudhury P, Garg AP, Vasani P, Cheema PS, Srivastava SK.** *Cloning and sequence analysis of gene encoding LipL32 of Leptospira interrogans serovar Sejroe.* Vet Res Commun 2007;**31**:513-519.
- Andre-Fontaine G, Branger C, Gray AW, Klaasen HL.** *Comparison of the efficacy of three commercial bacterins in preventing canine leptospirosis.* Vet Rec 2003;**153**:165-169.
- Angelos J, Oppenheim Y, Rebhun W, Mohammed H, Antczak DF.** *Evaluation of breed as a risk factor for sarcoid and uveitis in horses.* Anim Genet 1988;**19**:417-425.
- Anon.** *How common is leptospiral infection in horses in the UK.* Vet Rec 2007;**160**:5.
- Antal M, Farkas T, Germán P, Belák S, Kiss I.** *Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction detection of Newcastle disease virus using light upon extension fluorogenic primers.* J Vet Diagn Invest 2007;**19**:400-404.
- Arean VM, Sarasin G, Green JH.** *The pathogenesis of leptospirosis: Toxin production by Leptospira Icterohaemorrhagiae.* Am J Vet Res 1964;**25**:836-843.
- Arimitsu Y, Kobayashi S, Matuhasi T, Suzuki H, Yamaji Y, Suprasert S, Supawadee J.** *Epidemiological studies on leptospirosis in Chiang Mai (Thailand).* Epidemiol Infect 1987;**98**:97-100.
- Artiushin S, Timoney JF, Nally J, Verma A.** *Host-inducible immunogenic sphingomyelinase-like protein, Lk73.5, of Leptospira interrogans.* Infect Immun 2004;**72**:742-749.
- Arzouni JP, Parola P, La Scola B, Postic D, Brouqui P, Raoult D.** *Human infection caused by Leptospira fainei.* Emerg Infect Dis 2002;**8**:865-868.

- Ashford DA, Kaiser RM, Spiegel RA, Perkins BA, Weyant RS, Bragg SL, Plikaytis B, Jarquin C, De Lose Reyes JO, Amador JJ.** *Asymptomatic infection and risk factors for leptospirosis in Nicaragua.* Am J Trop Med Hyg 2000;**63**:249–254.
- Ausubel FM, Brent A, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K.** *Current Protocols in Molecular Biology.* John Wiley & Sons, NY, USA 1995.
- Awad-Masalmeh M, Hussein A, El Magbul S, Fürst W, Kmety E, Bakoss P.** *PCR methods to distinguish saprophytic and pathogenic leptospira strains.* Biol Brat 2002;**57**:747-753.
- Awad-Masalmeh M, Kmety E, Bakoss P, El Magbul S, Köfer J.** *Konservierung, Gewinnung und Nachweis von Leptospiren-DNA im Harn.* Tierärztl Umschau 2004;**59**:275-281.
- Babu MM, Priya ML, Selvan AT, Madera M, Gough J, Aravind L, Sankaran K.** *A database of bacterial lipoproteins (DOLOP) with functional assignments to predicted lipoproteins.* J Bacteriol 2006;**188**:2761-2773.
- Baburaj P, Nandkumar VS, Khanna L.** *Polymerase chain reaction in the diagnosis of leptospiral infection.* J Assoc Physicians India 2006;**54**:339-340.
- Bailey J, Tyson-Capper AJ, Gilmore K, Robson SC, Europe-Finner GN.** *Identification of human myometrial target genes of the cAMP pathway: the role of cAMP-response element binding (CREB) and modulator (CREM α and CREM $\tau_2\alpha$) proteins.* J Mol Endocrinol 2005;**34**:1-17.
- Baitchman EJ, Calle PP, James SB, Linn MJ, Raphael BL.** *Leptospirosis in Wied's marmosets (Callithrix kuhlii).* J Zoo Wildl Med 2006;**37**:182-185.
- Bajani MD, Ashford DA, Bragg SL, Woods CW, Aye T, Spiegel RA, Plikaytis BD, Perkins BA, Phelan M, Levett PN, Weyant RS.** *Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis.* J Clin Microbiol 2003;**41**:803-809.
- Bakoss P, Jarekova J, Labuda M.** *An attempt to control a natural focus of leptospirosis grippotyphosa by rodenticide--a long-term study (1977-2004).* Ann Agric Environ Med 2007;**14**:51-56.
- Bal AE, Gravekamp C, Hartskeerl RA, De Meza-Brewster J, Korver H, Terpstra WJ.** *Detection of leptospires in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis.* J Clin Microbiol 1994;**32**:1894-1898.
- Bal AM.** *Unusual clinical manifestations of leptospirosis.* J Postgrad Med 2005a;**51**:179-183.
- Bal AM.** *Use of ciprofloxacin for treating leptospirosis--need for clinical trials.* J Med Microbiol 2005b;**54**:907.
- Bal AM, Bharadwaj RS, Joshi SA, Kagal AS, Arjunwadkar VP.** *Common infecting leptospiral serovars in and around Pune, Maharashtra.* Indian J Med Res 2002;**115**:14-16.
- Bal AM, Bharadwaj RS, Gita N, Joshi SA, Thakare JP.** *Guillain-Barre syndrome in a pediatric patient following infection due to Leptospira.* Jpn J Infect Dis 2003;**56**:29-31.
- Baldwin CL, Sathiyaseelan T, Naiman B, White AM, Brown R, Blumerman S, Rogers A, Black SJ.** *Activation of bovine peripheral blood $\gamma\delta$ T cells for cell division and IFN- γ production.* Vet Immun Immunopathol 2002;**87**:251-259.

Literaturverzeichnis

- Ballard SA, Williamson M, Adler B, Vinh T, Faine S.** *Interactions of virulent and avirulent leptospires with primary cultures of renal epithelial cells.* J Med Microbiol 1986;**21**:59-67.
- Ballard SA, Go M, Segers RP, Adler B.** *Molecular analysis of the dnaK locus Leptospira interrogans serovar Copenhageni.* Gene 1998;**216**:21-29.
- Barbosa AS, Abreu PA, Neves FO, Atzingen MV, Watanabe MM, Vieira ML, Morais ZM, Vasconcellos SA, Nascimento AL.** *A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin.* Infect Immun 2006;**74**:6356-6364.
- Barkay S, Garzosi H.** *Leptospirosis and uveitis.* Ann Ophthalmol 1984;**16**:164-168.
- Barnett JK, Barnett D, Bolin CA, Summers TA, Wagar EA, Cheville NF, Hartskeerl RA, Haake DA.** *Expression and distribution of leptospiral outer membrane components during renal infection of hamsters.* Infect Immun 1999;**67**:853-861.
- Barocchi MA, Ko AI, Reis MG, McDonald KL, Riley LW.** *Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by Leptospira interrogans, an invasive but nonintracellular pathogen.* Infect Immun 2002;**70**:6926-6932.
- Barr SC, McDonough PL, Scipioni-Ball RL, Starr JK.** *Serologic responses of dogs given commercial vaccine against Leptospira interrogans serovar Pomona and Leptospira kirschneri serovar Grippytyphosa,* Am J Vet Res 2005;**66**:1780-1784.
- Barry M, Wisnewski AV, Matthias MA, Inouye SK, Vinetz JM.** *Suburban leptospirosis: Atypical lymphocytosis and $\gamma\delta$ T cell response.* Clin Infect Dis 2006;**43**:1304-1307.
- Barwick RS, Mohammed HO, McDonough PL, White ME.** *Epidemiologic features of equine Leptospira interrogans of human significance.* Prev Vet Med 1998;**36**:153-165.
- Basile DP, Fredrich K, Alausa M, Vio CP, Liang M, Rieder MR, Greene AS, Cowley AW.** *Identification of persistently altered gene expression in the kidney after functional recovery from ischemic acute renal failure.* Am J Physiol Renal Physiol 2005;**288**:F953-963.
- Becker MD, Bodaghi B, Holz FG, Harsch N, Hoang PL.** *Diagnostische Vitrektomie bei Uveitis.* Ophthalmologie 2003;**100**:796-801.
- Bek M, Koppl H, Schwarzkopf G, Freudenberg N.** *Weil's disease and necrotizing herpes pneumonia as the cause of death of a 39-year-old sewage drain worker.* Pathologie 1996;**17**:471-476.
- Van den Berg M, Verboom AJ, Meenken C, Bökenkamp A.** *Question - Answer.* Pediatr Nephrol 2003;**18**:720-721.
- Berlioz-Arthaud A, Kiedrzyński T, Singh N, Yvon JF, Roualen G, Coudert C, Uliviti V.** *Multicentre survey of incidence and public health impact of leptospirosis in the Western Pacific.* Trans Roy Soc Trop Med Hyg 2007;**101**:714-721.
- Bernard DJ.** *Both SMAD2 and SMAD3 mediate activin-stimulated expression of the follicle-stimulating hormone beta subunit in mouse gonadotrope cells.* Mol Endocrinol 2004;**18**:606-623.
- Bernard WV, Bolin C, Riddle T, Durando M, Smith BJ, Tramontin RR.** *Leptospiral abortion and leptospiruria in horses from the same farm.* J Am Vet Med Assoc 1993;**202**:1285-1286.

- Bernheimer AW, Bey RF.** Copurification of *Leptospira interrogans* serovar Pomona hemolysin and sphingomyelinase C. *Infect Immun* 1986;**54**:262-264.
- Beutler E, Gelbart T, Kuhl W.** Interference of heparin with the polymerase chain reaction. *Biotechniques* 1990;**9**:166.
- Bharadwaj R.** Leptospirosis – a reemerging disease? *Indian J Med Res* 2004;**120**:136-138.
- Bharadwaj R, Bal AM, Joshi SA, Kagal A, Pol SS, Garad G, Arjunwadkar V, Katti R.** An urban outbreak of leptospirosis in Mumbai, India. *Jpn J Infect Dis* 2002;**55**:194-196.
- Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM.** Leptospirosis: A zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 2003;**3**:757-771.
- Bielanski A, Surujballi O, Golsteyn Thomas E, Tanaka E.** Sanitary status of oocytes and embryos collected from heifers experimentally exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjobovis. *Anim Reprod Sci* 1998;**54**:65-73.
- Biswas D, Roy S, Vijayachari P, Sugunan AP, Natarajaseenivasan K, Sehgal SC.** Comparison of immunoreactive proteins of commonly circulating serogroups of *Leptospira* in Andaman Islands, India. *Indian J Med Res* 2005;**121**:151-158.
- Blackmore DK, Schollum LM, Moriarty KM.** The magnitude and duration of titres of leptospiral agglutinins in human sera. *NZ Med J* 1984;**97**:83-86.
- Blacksell SD, Smythe L, Phetsouvanh R, Dohnt M, Hartskeerl R, Symonds M, Slack A, Vongsouvath M, Davong V, Lattana O, Phongmany S, Keoulouangkot V, White NJ, Day NP, Newton PN.** Limited diagnostic capacities of two commercial assays for the detection of *Leptospira* immunoglobulin M antibodies in Laos. *Clin Vaccine Immunol* 2006;**13**:1166-1169.
- Blaney JE, Matro JM, Murphy BR, Whitehead SS.** Recombinant, live-attenuated tetravalent dengue virus vaccine formulations induce a balanced, broad, and protective neutralizing antibody response against each of the four serotypes in rhesus monkeys. *J Virol* 2005;**79**:5516-5528.
- Blumerman SL, Herzig CT, Baldwin CL.** WC1+ $\gamma\delta$ T cell memory population is induced by killed bacterial vaccine. *Eur J Immunol* 2007a;**37**:1204-1216.
- Blumerman SL, Herzig CT, Wang F, Coussens PM, Baldwin CL.** Comparison of gene expression by co-cultured WC1+ $\gamma\delta$ and CD4+ $\alpha\beta$ T cells exhibiting a recall response to bacterial antigen. *Mol Immunol* 2007b;**44**:2023-2035.
- Bodaghi B, LeHoang P.** Testing ocular fluids in uveitis. *Ophthalmol Clin North Am* 2002;**15**:271-279.
- Bolin CA, Koellner P.** Human-to-human transmission of *Leptospira interrogans* by milk. *J Infect Dis* 1988;**158**:246-247.
- Bolin CA, Alt DP.** Use of a monovalent leptospiral vaccine to prevent renal colonization and urinary shedding in cattle exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. *Am J Vet Res* 2001;**62**:995-1000.

Literaturverzeichnis

- Bolin CA, Thiermann AB, Handsaker AL, Foley JW.** *Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine on Leptospira interrogans serovar Hardjo type Hardjo-bovis infection of pregnant cattle.* Am J Vet Res 1989a;**50**:161-165.
- Bolin CA, Zuerner RL, Trueba G.** *Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine containing Leptospira interrogans serovar Hardjo type Hardjo-bovis on type Hardjo-bovis infection of cattle.* Am J Vet Res 1989b;**50**:2004-2008.
- Bolin CA, Cassells JA, Zuerner RL, Trueba G.** *Effect of vaccination with a monovalent Leptospira interrogans serovar Hardjo type Hardjo-bovis vaccine on type Hardjo-bovis infection of cattle.* Am J Vet Res 1991;**52**:1639-1643.
- Bomfim MR, Koury MC.** *Evaluation of LSSP-PCR for identification of Leptospira spp. in urine samples of cattle with clinical suspicion of leptospirosis.* Vet Microbiol 2006;**118**:278-288.
- Bomfim MR, Ko AI, Koury MC.** *Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis.* Vet Microbiol 2005;**109**:89-94.
- Bomfim MR, Barbosa-Stancioli EF, Koury MC.** *Detection of pathogenic leptospire in urine from naturally infected cattle by nested PCR.* Vet J 2007;doi:10.1016/j.tvjl.2007.07.029.
- Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim van Dillen PM, van der Noordaa J.** *Rapid and simple method for purification of nucleic acids.* J Clin Microbiol 1990;**28**:495-503.
- Boom R, Sol CJ, Heijntink R, Wertheim van Dillen PM, van der Noordaa J.** *Rapid purification of hepatitis B virus DNA from serum.* J Clin Microbiol 1991;**29**:1804-1811.
- Boonyod D, Poovorawan Y, Bhattarakosol P, Chirathaworn C.** *LipL32, an outer membrane protein of Leptospira, as an antigen in a dipstick assay for diagnosis of leptospirosis.* Asian Pac J Allergy Immunol 2005;**23**:133-141.
- Bou G, Figueroa MS, Marti-Belda P, Navas E, Guerrero A.** *Value of PCR for detection of Toxoplasma gondii in aqueous humor and blood samples from immunocompetent patients with ocular toxoplasmosis.* J Clin Microbiol 1999;**37**:3465-3468.
- Bourhy P, Salaün L, Lajus A, Médigue C, Boursaux-Eude C, Picardeau M.** *A genomic island of the pathogen Leptospira interrogans serovar Lai can excise from its chromosome.* Infect Immun 2007;**75**:677-683.
- Boursaux-Eude C, Saint Girons I, Zuerner R.** *Leptospira genomics.* Electrophoresis 1998;**19**:589-592.
- Bovet P, Yersin C, Mérien F, Davis CE, Perolat P.** *Factors associated with clinical leptospirosis: A population-based case-control study in the Seychelles (Indian Ocean).* Int J Epidemiol 1999;**28**:583-590.
- Brandão AP, Camargo ED, Da Silva ED, Silva MV, Abrão RV.** *Macroscopic agglutination test for rapid diagnosis of human leptospirosis.* J Clin Microbiol 1998;**36**:3138-3142.
- Brandes K, Wollanke B, Niedermaier G, Brem S, Gerhards H.** *Recurrent uveitis in horses: Vitreal examinations with ultrastructural detection of leptospire.* J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med 2007;**54**:270-275.

- Brandling-Bennett AD, Penheiro F.** *Infectious diseases in Latin America and the Caribbean: Are they really emerging and increasing?* Emerg Infect Dis 1996;**2**:59-61.
- Branger C, Sonrier C, Chatrenet B, Klonjowski B, Ruvoen-Clouet N, Aubert A, André-Fontaine G, Eloit M.** *Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of Leptospira interrogans by adenovirus-mediated vaccination.* Infect Immun 2001;**69**:6831-6838.
- Branger C, Blanchard B, Fillonneau C, Suard I, Aviat F, Chevallier B, André-Fontaine G.** *Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic Leptospira based on the gene hap1 encoding the hemolysis-associated protein-1.* FEMS Microbiol Lett 2005;**243**:437-445.
- Brem S, Radu O, Bauer T, Schönberg A, Reißhauer K, Waidmann R, Kopp H, Meyer P.** *Leptospireninfizierte Rattenpopulation als wahrscheinliche Ursache eines Morbus Weil mit tödlichem Verlauf.* Berl Münch Tierärztl Wochenschr 1995;**108**:405-407.
- Brem S, Gerhards H, Wollanke B, Meyer P, Kopp H.** *Intraokularer Leptospirennachweis bei 4 Pferden mit rezidivierender Uveitis (ERU).* Berl Münch Tierärztl Wochenschr 1998;**111**:415-417.
- Brem S, Gerhards H, Wollanke B, Meyer P, Kopp H.** *35 Leptospirenisolationen aus Glaskörpern von 32 Pferden mit rezidivierender Uveitis (ERU).* Berl Münch Tierärztl Wochenschr 1999;**112**:390-393.
- Brenner DJ, Kaufmann AF, Sulzer KR, Steigerwalt AG, Rogers FC, Weyant RS.** *Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for Leptospira alexanderi sp. nov. and four new Leptospira genomospecies.* Int J Syst Bacteriol 1999;**49**:839-858.
- Brenot A, Trott D, Saint Girons I, Zuerner R.** *Penicillin-binding proteins in Leptospira interrogans.* Antimicrob Agents Chemother 2001;**45**:870-877.
- McBride AJ, Athanazio DA, Reis MG, Ko AI.** *Leptospirosis.* Curr Opin Infect Dis 2005;**18**:376-386.
- McBride AJ, Santos BL, Queiroz A, Santos AC, Hartskeerl RA, Reis MG, Ko AI.** *Evaluation of four whole-cell leptospira-based serological tests for diagnosis of urban leptospirosis.* Clin Vaccine Immunol 2007;**14**:1245-1248.
- De Brito T, Bohm GM, Yasuda PH.** *Vascular damage in acute experimental leptospirosis of the guinea-pig.* J Pathol 1979;**128**:177-182.
- De Brito T, Prado MJ, Negreiros VA, Nicastrri AL, Sakata EE, Yasuda PH, Santos RT, Alves VA.** *Detection of leptospiral antigen (L. interrogans serovar Copenhageni serogroup Icterohaemorrhagiae) by immunoelectron microscopy in the liver and kidney of experimentally infected guinea-pigs.* Int J Exp Pathol 1992;**73**:633-642.
- Brown PD, Levett PN.** *Differentiation of Leptospira species and serovars by PCR-restriction endonuclease analysis, arbitrarily primed PCR and low-stringency PCR.* J Med Microbiol 1997;**46**:173-181.
- Brown PD, Gravekamp C, Carrington DG, Van de Kemp H, Hartskeerl RA, Edwards CN, Everard CO, Terpstra WJ, Levett PN.** *Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis.* J Med Microbiol 1995;**43**:110-114.

Literaturverzeichnis

- Brown PD, Carrington DG, Gravekamp C, Van de Kemp H, Edwards CN, Jones SR, Prussia PR, Garriques S, Terpstra WJ, Levett PN.** *Direct detection of leptospiral material in human postmortem samples.* Res Microbiol 2003;**154**:581-586.
- Brown RA, Blumerman S, Gay C, Bolin C, Duby R, Baldwin CL.** *Comparison of three different leptospiral vaccines for induction of a type 1 immune response to *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo.* Vaccine 2003;**21**:4448-4458.
- Bulach DM, Kalambaheti T, de la Peña-Moctezuma A, Adler B.** *Functional analysis of genes in the *rfb* locus of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo subtype Hardjobovis.* Infect Immun 2000a;**68**:3793-3798.
- Bulach DM, Kalambaheti T, de la Peña-Moctezuma A, Adler B.** *Lipopolysaccharide biosynthesis in *Leptospira*.* J Mol Microbiol Biotechnol 2000b;**2**:375-380.
- Bulach DM, Zuerner RL, Wilson P, Seemann T, McGrath A, Cullen PA, Davis J, Johnson M, Kuczek, E, Alt DP, Peterson-Burch B, Coppel RL, Rood JI, Davies JK, Adler B.** *Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential.* Proc Natl Acad Sci USA 2006;**103**:14560-14565.
- Bunnell JE, Hice CL, Watts DM, Montrueil V, Tesh RB, Vinetz JM.** *Detection of pathogenic *Leptospira* spp. infections among mammals captured in the peruvian amazon basin region.* Am J Trop Med Hyg 2000;**63**:255-258.
- Burdick RK, Borrer CM, Montgomery DC.** *Design and Analysis of Gauge R&R Studies: Making Decisions with Confidence Intervals in Random and Mixed ANOVA Models (ASA-SIAM series on statistics and applied probability 17).* Society for Industrial and Applied Mathematics Philadelphia, PA, USA 2005.
- Burkardt HJ.** *Standardization and quality control of PCR analyses.* Clin Chem Lab Med 2000;**38**:87-91.
- Burriel AR, Dalley C, Woodward MJ.** *Prevalence of *Leptospira* species among farmed and domestic animals in Greece.* Vet Rec 2003;**153**:146-148.
- De Caballero OL, Dias Neto E, Koury MC, Romanha AJ, Simpson AJ.** *Low-stringency PCR provides an internal control for negative results in PCR-based diagnosis.* PCR Methods Appl 1994a;**3**:305-307.
- De Caballero OL, Neto ED, Koury MC, Romanha AJ, Simpson AJ.** *Low-stringency PCR with diagnostically useful primers for identification of *Leptospira* serovars.* J Clin Microbiol 1994b;**32**:1369-1372.
- Cachay ER, Vinetz JM.** *A global research agenda for leptospirosis.* J Postgrad Med 2005;**51**:174-178.
- Cai HY, Hornby G, Key DW, Osuch MR, Maxie MG.** *Preliminary study on differentiation of *Leptospira Grippotyphosa* and *Leptospira Sejroe* from other common pathogenic leptospiral serovars in canine urine by polymerase chain reaction assay.* J Vet Diagn Invest 2002;**14**:164-168.
- Cai HY, Archambault M, Gyles CL, Prescott JF.** *Molecular genetic methods in the veterinary clinical bacteriology laboratory: Current usage and future applications.* Anim Health Res Rev 2003;**4**:73-93.

- Caley P, Ramsey D.** *Estimating disease transmission in wildlife, with emphasis on leptospirosis and bovine tuberculosis in possums, and effect of fertility control.* J Applied Ecol 2001;**38**:1362-1370.
- Canale-Parola E.** *Physiology and evolution of spirochetes.* Bacteriol Rev 1977;**41**:181-204.
- Caplin BE, Rasmussen RP, Bernard PS, Wittwer CT.** *LightCycler™ Hybridization Probes.* Biochemica 1999;**1**:5-8.
- Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, Zamecnik PC, Wolf DE.** *Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer.* Proc Natl Acad Sci USA 1988;**85**:8790-8794.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention).** *Brief report: Leptospirosis after flooding of a university campus - Hawaii, 2004.* MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2006;**55**:125-127.
- Čermáková Z, Plíšková L, Ryšková O.** *Laboratory diagnosis of leptospirosis.* Folia Microbiol 2005;**50**:345-347.
- Chandrasekaran S, Gomathi S.** *A standard screening test for the early and rapid diagnosis of leptospirosis.* Indian J Med Microbiol 2004;**22**:23-27.
- Chandrasekaran S, Krishnaveni S, Chandrasekaran N.** *Darkfield microscopic (DFM) and serologic evidences for leptospiral infection in panuveitis cases.* Indian J Med Sci 1998;**52**:294-298.
- Chapola EG, dos Santos M, Bessa TA, de Oliveira ML.** *Human and canine leptospirosis: Serological data of São Paulo City, Brazil, 2000 to 2003.* Rev Cubana Med Trop 2005;**57**:61-62.
- Chappel RJ, Prime RW, Millar BD, Mead LJ, Jones RT, Adler B.** *Comparison of diagnostic procedures for porcine leptospirosis.* Vet Microbiol 1992;**30**:151-163.
- Chappel RJ, Khalik DA, Adler B, Bulach DM, Faine S, Perolat P, Vallance V.** *Serological titres to Leptospira fainei serovar Hurstbridge in human sera in Australia.* Epidemiol Infect 1998;**121**:473-475.
- Chappel RJ, Goris M, Palmer MF, Hartskeerl RA.** *Impact of proficiency testing on results of the microscopic agglutination test for diagnosis of leptospirosis.* J Clin Microbiol 2004;**42**:5484-5488.
- Charon NW, Goldstein SF.** *Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: The spirochetes.* Annu Rev Genet 2002;**36**:47-73.
- Cheema PS, Srivastava SK, Chaudhuri P, Amutha R, Singh S, Sankar M, Thangapandian E.** *Cloning and sequencing of a 21 kDa outer membrane protein gene of Leptospira interrogans serovar Canicola strain Hond Utrecht IV.* Vet Res Commun 2007;**31**:521-527.
- Chen HI, Kao SJ, Hsu YH.** *Pathophysiological mechanism of lung injury in patients with leptospirosis.* Pathology 2007;**39**:339-344.
- Chen R, Huang W, Lin Z, Zhou Z, Yu H, Zhu D.** *Development of a novel real-time RT-PCR assay with LUX primer for the detection of swine transmissible gastroenteritis virus.* J Virol Methods 2004;**122**:57-61.

Literaturverzeichnis

- Choy HA, Kelley MM, Chen TL, Møller AK, Matsunaga J, Haake DA.** *Physiological osmotic induction of Leptospira interrogans adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen.* Infect Immun 2007;**75**:2441-2450.
- Chu KM, Rathinam R, Namperumalsamy P, Dean D.** *Identification of Leptospira species in the pathogenesis of uveitis and determination of clinical ocular characteristics in South India.* J Infect Dis 1998;**177**:1314-1321.
- Ciceroni L, Pinto A, Benedetti E, Pizzocaro P, Lupidi R, Cinco M, Gelosa L, Grillo R, Rondinella V, Marcuccio L, Mansueto S, Ioli A, Franzin L, Giannico F, Cacciapuoti B.** *Human leptospirosis in Italy, 1986-1993.* Eur J Epidemiol 1995;**11**:707-710.
- Ciceroni L, Ciarrocchi S, Ciervo A, Petrucca A, Pinto A, Calderaro A, Viani I, Galati L, Dettori G, Chezzi C.** *Differentiation of leptospire of the serogroup Pomona by monoclonal antibodies, pulsed-field gel electrophoresis and arbitrarily primed polymerase chain reaction* Res Microbiol 2002;**153**:37-44.
- Cinco M, Banfi E.** *Activation of complement by leptospire and its bactericidal activity.* Zentralbl Bakteriologie Mikrobiologie Hyg [A] 1983;**254**:261-265.
- Cinco M, Coghlan JD, Matthews PR.** *Isolation and classification of sixteen strains of saprophytic leptospire.* J Hyg (Lond) 1980a;**84**:173-179.
- Cinco M, Banfi E, Furlani A, Scarcia V.** *Cytotoxic activity of supernatant extracts of virulent and saprophytic leptospire.* Zentralbl Bakteriologie A 1980b;**248**:260-267.
- Cinco M, Banfi E, Soranzo MR.** *Studies on the interaction between macrophages and leptospire.* J Gen Microbiol 1981;**124**:409-413.
- Cinco M, Banfi E, Soranzo MR.** *Leptospire macrophage interactions.* Adv Exp Med Biol 1982;**141**:167-174.
- Cinco M, Balanzin D, Banfi E.** *Evaluation of an immunoenzymatic test (ELISA) for the diagnosis of leptospirosis in Italy.* Eur J Epidemiol 1992;**8**:677-682.
- Cinco M, Vecile E, Murgia R, Dobrina P, Dobrina A.** *Leptospira interrogans and Leptospira peptidoglycans induce the release of tumor necrosis factor alpha from human monocytes.* FEMS Microbiol Lett 1996;**138**:211-214.
- Cinco M, Cini B, Perticarari S, Presani G.** *Leptospira interrogans binds to the CR3 receptor on mammalian cells.* Microb Pathog 2002;**33**:299-305.
- Cinco M, Domenis R, Perticarari S, Presani G, Marangoni A, Blasi E.** *Interaction of leptospire with murine microglial cells.* New Microbiol 2006;**29**:193-199.
- McClain JB, Ballou WR, Harrison SM, Steinweg DL.** *Doxycycline therapy for leptospirosis.* Ann Intern Med 1984;**100**:696-698.
- Clegg FG, Heath PJ.** *Subclinical L Icterohaemorrhagiae infection in dogs associated with a case of human leptospirosis.* Vet Rec 1975;**96**:385.
- Cockerill FR, Smith TF.** *Rapid-cycle real-time PCR: A revolution for clinical microbiology.* ASM News 2002;**68**:77-83.

- Colagross-Schouten AM, Mazet JA, Gulland FM, Miller MA, Hietala S.** *Diagnosis and seroprevalence of leptospirosis in California sea lions from coastal California.* J Wildl Dis 2002;**38**:7-17.
- Cole JR, Sulzer CR, Pursell AR.** *Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test.* Appl Microbiol 1973;**25**:976-980.
- Constantin A, Marin F, Oksman F, Bouteiller G.** *Antineutrophil cytoplasmic antibodies in leptospirosis.* J Rheumatol 1996;**23**:411.
- Cooley PL, Wyman M, Kindig O.** *Pars plicata in equine recurrent uveitis.* Vet Pathol 1990;**27**:138-140.
- Corney BG, Colley J, Djordjevic SP, Whittington R, Graham GC.** *Rapid identification of some Leptospira isolates from cattle by random amplified polymorphic DNA fingerprinting.* J Clin Microbiol 1993;**31**:2927-2932.
- Costa E, Lopes AA, Sacramento E, Santos PA.** *Massive ocular hemorrhage resulting in blindness in a patient with the sickle cell trait who developed leptospirosis. Case report.* Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2000;**42**:287-289.
- Cox TE, Smythe LD, Leung LK.** *Flying foxes as carriers of pathogenic Leptospira species.* J Wildl Dis 2005;**41**:753-757.
- McCrea JK, Liu C, Ng LK, Wang G.** *Detection of the Escherichia coli pathogenic gene eae with three real-time polymerase chain reaction methods.* Can J Microbiol 2007;**53**:398-403.
- Van Crevel R, Speelman P, Gravekamp C, Terpstra WJ.** *Leptospirosis in travelers.* Clin Infect Dis 1994;**19**:132-134.
- Croda J, Ramos JG, Matsunaga J, Queiroz A, Homma A, Riley LW, Haake DA, Reis MG, Ko AI.** *Leptospira immunoglobulin-like proteins as a serodiagnostic marker for acute leptospirosis.* J Clin Microbiol 2007;**45**:1528-1534.
- Crouse CA, Pflugfelder SC, Cleary T, Demick SM, Atherton SS.** *Detection of Epstein-Barr virus genomes in normal human lacrimal glands.* J Clin Microbiol 1990;**28**:1026-1032.
- Cullen PA, Cordwell SJ, Bulach DM, Haake DA, Adler B.** *Global analysis of outer membrane proteins from Leptospira interrogans serovar Lai.* Infect Immun 2002;**70**:2311-2318.
- Cullen PA, Haake DA, Bulach DM, Zuerner RL, Adler B.** *LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic Leptospira species.* Infect Immun 2003;**71**:2414-2421.
- Cullen PA, Haake DA, Adler B.** *Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes.* FEMS Microbiol Rev 2004;**28**:291-318.
- Cullen PA, Xu X, Matsunaga J, Sanchez Y, Ko AI, Haake DA, Adler B.** *Surfaceome of Leptospira spp.* Infect Immun 2005;**73**:4853-4863.
- Cumberland P, Everard CO, Levett PN.** *Assessment of the efficacy of an IgM-ELISA and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis.* Am J Trop Med Hyg 1999;**61**:731-734.

Literaturverzeichnis

- Cumberland P, Everard CO, Wheeler JG, Levett PN.** Persistence of anti-leptospiral IgM, IgG and agglutinating antibodies in patients presenting with acute febrile illness in Barbados 1979-1989. *Eur J Epidemiol* 2001;**17**:601-608.
- Cvetko L, Turk N, Markotic A, Milas Z, Margaletic J, Miletic-Medved M, Plyusnin A, Baranton G, Postic D, Avsic-Zupanc T.** Short report: dual infections with Puumala virus and *Leptospira interrogans* serovar Iora in a bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Am J Trop Med Hyg* 2006;**74**:612-614.
- Czekalowski JW, Eaves G.** The structure of leptospirae as revealed by electron microscopy. *J Pathol Bacteriol* 1955;**69**:129-132.
- Dabil H, Boley ML, Schmitz TM, van Gelder RN.** Validation of a diagnostic multiplex polymerase chain reaction assay for infectious posterior uveitis. *Arch Ophthalmol* 2001;**119**:1315-1322.
- Dadhwal V, Bahadur A, Deka D.** Leptospirosis as a cause of fever in pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet* 2007;**99**:252-253.
- Daher E, Zanetta DM, Cavalcante MB, Abdulkader RC.** Risk factors for death and changing patterns in leptospirosis acute renal failure. *Am J Trop Med Hyg* 1999;**61**:630-634.
- Davenport A, Rugman FP, Desmond MJ, Ganta R.** Is thrombocytopenia seen in patients with leptospirosis immunologically mediated? *J Clin Pathol* 1989;**42**:439-440.
- David R, Barkay S.** Anterior uveitis and leptospirosis. *Ann Ophthalmol* 1976;**8**:958-962.
- Davidson MG, Nasisse MP, Roberts SM.** Immunodiagnosis of leptospiral uveitis in two horses. *Equine Vet J* 1987;**19**:155-157.
- Day TD, O'Connor CE, Waas JR, Pearson AJ, Matthews LR.** Transmission of *Leptospira interrogans* serovar Balcanica infection among socially housed brushtail possums in New Zealand. *J Wildl Dis* 1998;**34**:576-581.
- Deeg CA, Kaspers B, Gerhards H, Thurau SR, Wollanke B, Wildner G.** Immune response to retinal autoantigens and peptides in equine recurrent uveitis (ERU). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;**42**:393-398.
- Deeg CA, Ehrenhofer M, Thurau SR, Reese S, Wildner G, Kaspers B.** Immunopathology of recurrent uveitis in spontaneously diseased horses. *Exp Eye Res* 2002;**75**:127-133.
- Deeg CA, Pompetzki D, Raith AJ, Hauck SM, Amann B, Suppmann S, Goebel TW, Olazabal U, Gerhards H, Reese S, Stangassinger M, Kaspers B, Ueffing M.** Identification and functional validation of novel autoantigens in equine uveitis. *Mol Cell Proteomics* 2006;**5**:1462-1470.
- Deeg AC, Altmann F, Hauck SM, Schoeffmann S, Amann B, Stangassinger M, Ueffing M.** Down-regulation of pigment epithelium-derived factor in uveitic lesion associates with focal vascular endothelial growth factor expression and breakdown of the blood-retinal barrier. *Proteomics* 2007a;**7**:1540-1548.
- Deeg AC, Hauck SM, Amann B, Kremmer E, Stangassinger M, Ueffing M.** Major retinal autoantigens remain stably expressed during all stages of spontaneous uveitis. *Mol Immunol* 2007b;**44**:3291-3296.

- Demeke T, Adams RP.** *The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR.* Biotechniques 1992;**12**:332-334.
- Dey S, Mohan MC, Kumar TM, Ramadass P, Nainar AM, Nachimuthu K.** *Recombinant LipL32 antigen-based single serum dilution ELISA for detection of canine leptospirosis.* Vet Microbiol 2004;**103**:99-106.
- Dey S, Mohan CM, Ramadass P, Nachimuthu K.** *Phylogenetic analysis of LipL32 gene sequence of different pathogenic serovars of Leptospira.* Vet Res Commun 2007;**31**:509-511.
- Diament D, Brunialti MK, Romero EC, Kallas EG, Salomao R.** *Peripheral blood mononuclear cell activation by Leptospira interrogans Glycolipoprotein.* Infect Immun 2002;**70**:1677-1683.
- Dierauf LA, Vandenbroek DJ, Roletto J, Koski M, Amaya L, Gage LJ.** *An epizootic of leptospirosis in California sea lions.* J Am Vet Med Assoc 1985;**187**:1145-1148.
- Dikken H, Kmety E, de Geus A, Adinarayanan N, Timmer VE.** *Two new leptospira serovars belonging to the Hebdomadis serogroup.* Trop Geogr Med 1978;**30**:537-542.
- DIN EN ISO/IEC 17025.** *Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien.* Deutsches Institut für Normung e.V.; Beuth Verlag, Berlin, 2005.
- DIN ISO 5725-2.** *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen. Teil2: Grundlegende Methode für die Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens.* Deutsches Institut für Normung e.V.; Beuth Verlag, Berlin, 2002.
- Dobrina A, Nardon E, Vecile E, Cinco M, Patriarca P.** *Leptospira icterohemorrhagiae and leptospire peptidoglycans induce endothelial cell adhesiveness for polymorphonuclear leukocytes.* Infect Immun 1995;**63**:2995-2999.
- Donahue JM, Williams NM.** *Emergent causes of placentitis and abortion.* Vet Clin North Am Equine Pract 2000;**16**:443-456.
- Donahue JM, Smith BJ, Redmon KJ, Donahue JK.** *Diagnosis and prevalence of Leptospira infection in aborted and stillborn horses.* J Vet Diagn Invest 1991;**3**:148-151.
- Donahue JM, Smith BJ, Donahue JK, Rigsby CL, Tramontin RR, Poonacha KB, Wilson MA.** *Prevalence and serovars of Leptospira involved in equine abortions in central Kentucky during the 1990 foaling season.* J Vet Diagn Invest 1992;**4**:279-284.
- Donahue JM, Smith BJ, Poonacha KB, Donahue JK, Rigsby CL.** *Prevalence and serovars of Leptospira involved in equine abortions in central Kentucky during the 1991-1993 foaling seasons.* J Vet Diagn Invest 1995;**7**:87-91.
- Doret M, Rohm A.** *Ocular complications of benign leptospirosis.* Klin Monatsblätter Augenheilkd Augenarztl Fortbild 1951;**118**:51-66.
- Douglin CP, Jordan C, Rock R, Hurley A, Levett PN.** *Risk factors for severe leptospirosis in the parish of St. Andrew, Barbados.* Emerg Infect Dis 1997;**3**:78-80.
- Doungchawee G, Phulsuksombat D, Naigowit P, Khoaprasert Y, Sangjun N, Kongtim S, Smythe L.** *Survey of leptospirosis of small mammals in Thailand.* Southeast Asian J Trop Med Public Health 2005;**36**:1516-1522.

Literaturverzeichnis

- Doungchawee G, Sirawaraporn W, Icksang-Ko A, Kongtim S, Naigowit P, Thongboonkerd V.** *Use of immunoblotting as an alternative method for serogrouping Leptospira.* J Med Microbiol 2007;**56**:587-592.
- Von den Driesch A, Peters J.** *Geschichte der Tiermedizin - 5000 Jahre Tierheilkunde.* 2te Ed. 2003 Schattauer Verlag, Stuttgart, New York.
- Dupont H, Dupont-Perdrizet D, Perie JL, Zehner-Hansen S, Jarrige B, Daijardin JB.** *Leptospirosis: prognostic factors associated with mortality.* Clin Infect Dis 1997;**25**:720-724.
- Dworkin LL, Gibler TM, van Gelder RN.** *Real-time quantitative polymerase chain reaction diagnosis of infectious posterior uveitis.* Arch Ophthalmol 2002;**120**:1534-1539.
- Dwyer AE, Crockett RS, Kalsow CM.** *Association of leptospiral seroreactivity and breed with uveitis and blindness in horses: 372 cases (1986-1993).* J Am Vet Med Assoc 1995;**207**:1327-1331.
- Dziezyc J.** *Canine systemic bacterial infections.* Vet Clin North Am 2000;**30**:1103-1117.
- Effler PV, Bogard AK, Domen HY, Katz AR, Higa HJ, Sasaki DM.** *Evaluation of eight rapid screening tests for acute leptospirosis in Hawaii.* J Clin Microbiol 2002;**40**:1464-1469.
- Ellinghausen HC.** *Stimulation of leptospiral growth by glucose.* Am J Vet Res 1968;**29**:191-199.
- Ellinghausen HC.** *Growth temperatures, virulence, survival, and nutrition of leptospire.* J Med Microbiol 1973;**6**:487-497.
- Ellinghausen HC.** *Variable factors influencing the isolation of leptospire involving culture ingredients and testing.* Proc Annu Meet US Anim Health Assoc 1975;**79**:126-141.
- Ellinghausen HC.** *Growth, cultural characteristics, and antibacterial sensitivity of Leptospira interrogans serovar Hardjo.* Cornell Vet 1983;**73**:225-139.
- Ellinghausen HC, McCullough WG.** *Nutrition of Leptospira Pomona and growth of 13 other serotypes: A serum-free medium employing oleic albumin complex.* Am J Vet Res 1965a;**26**:39-44.
- Ellinghausen HC, McCullough WG.** *Nutrition of Leptospira Pomona and growth of 13 other serotypes: Fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80.* Am J Vet Res 1965b;**26**:45-51.
- Ellis WA.** *Leptospirosis as a cause of reproductive failure.* Vet Clin North Am Food Anim Pract 1994;**10**:463-478.
- Ellis WA, Thiermann AB.** *Isolation of leptospire from the genital tracts of Iowa cows.* Am J Vet Res 1986;**47**:1694-1696.
- Ellis WA, O'Brien JJ, Neill S, Hanna J, Bryson DG.** *The isolation of a leptospire from an aborted bovine fetus.* Vet Rec 1976;**99**:458-459.
- Ellis WA, O'Brien JJ, Cassells J.** *Role of cattle in the maintenance of Leptospira interrogans serotype Hardjo infection in Northern Ireland.* Vet Rec 1981;**108**:555-557.

- Ellis WA, O'Brien JJ, Neill SD, Ferguson HW, Hanna J.** *Bovine leptospirosis: Microbiological and serological findings in aborted fetuses.* Vet Rec 1982;**110**:147-150.
- Ellis WA, O'Brien JJ, Cassells JA, Montgomery J.** *Leptospiral infection in horses in Northern Ireland: Serological and microbiological findings.* Equine Vet J 1983;**15**:317-320.
- Ellis WA, McParland PJ, Bryson DG, McNulty MS.** *Leptospire in pig urogenital tracts and fetuses.* Vet Rec 1985;**117**:66-67.
- Ellis WA, Songer JG, Montgomery J, Cassells JA.** *Prevalence of Leptospira interrogans serovar Hardjo in the genital and urinary tracts of nonpregnant cattle.* Vet Rec 1986a;**118**:11-13.
- Ellis WA, Cassells JA, Doyle J.** *Genital leptospirosis in bulls.* Vet Rec 1986b;**118**:333.
- Ellis WA, Thiermann AB, Montgomery J, Handsaker A, Winter PJ, Marshall RB.** *Restriction endonuclease analysis of Leptospira interrogans serovar Hardjo isolates from cattle.* Res Vet Sci 1988;**44**:375-379.
- Ellis WA, Montgomery JM, Thiermann AB.** *Restriction endonuclease analysis as a taxonomic tool in the study of pig isolates belonging to the Australis serogroup of Leptospira interrogans.* J Clin Microbiol 1991;**29**:957-961.
- Emmanouilides CE, Kohn OF, Garibaldi R.** *Leptospirosis complicated by a Jarisch-Herxheimer reaction and adult respiratory distress syndrome: Case report.* Clin Infect Dis 1994;**18**:1004-1006.
- Esen S, Sunbul M, Leblebicioglu H, Eroglu C, Turan D.** *Impact of clinical and laboratory findings on prognosis in leptospirosis.* Swiss Med Wkly 2004;**134**:347-352.
- Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JD, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill FR, Smith TF.** *Real-time PCR in clinical microbiology: Applications for routine laboratory testing.* Clin Microbiol Rev 2006;**19**:165-256.
- Estavoyer JM, Racadot E, Couetdic G, Leroy J, Groperrin L.** *Tumor necrosis factor in patients with leptospirosis.* Rev Infect Dis 1991;**13**:1245-1246.
- Eule JC, Wagner B, Leibold W, Deegen E.** *Vorkommen verschiedener Immunglobulinisotypen bei Pferden mit equiner rezidivierender Uveitis (ERU).* Berl Münch Tierärztl Wochenschr 2000;**113**:253-257.
- Everard CO, Green AE, Glosser JW.** *Leptospirosis in Trinidad and Grenada, with special reference to the mongoose.* Trans R Soc Trop Med Hyg 1976;**70**:57-61.
- Everard CO, Sulzer CR, Bhagwandin LJ, Fraser-Chanpong GM, James AC.** *Pathogenic leptospira isolates from the Caribbean Islands of Trinidad, Grenada and St. Vincent.* Int J Zoonoses 1980;**7**:90-100.
- Everard CO, Edwards CN, Webb GB, White HS, Nicholson GD.** *The prevalence of severe leptospirosis among humans on Barbados.* Trans R Soc Trop Med Hyg 1984;**78**:596-603.
- Everard CO, Carrington D, Korver H, Everard JD.** *Leptospire in the marine toad (Bufo marinus) on Barbados.* J Wildl Dis 1988;**24**:334-338.

Literaturverzeichnis

- Everard CO, Edwards CN, Everard JD, Carrington DG.** *A twelve-year study of leptospirosis on Barbados.* Eur J Epidemiol 1995;**11**:311-320.
- Van Eys GJ, Gravekamp C, Gerritsen MJ, Quint W, Cornelissen MT, Schegget JT, Terpstra WJ.** *Detection of leptospire in urine by polymerase chain reaction.* J Clin Microbiol 1989;**27**:2258-2262.
- Faber NA, Crawford M, LeFebvre RB, Buyukmihci NC, Madigan JE, Willits NH.** *Detection of Leptospira spp. in the aqueous humor of horses with naturally acquired recurrent uveitis.* J Clin Microbiol 2000;**38**:2731-2733.
- Fahrmeir L, Kneib T, Lang S.** *Regression - Modelle, Methoden und Anwendungen.* Springer-Verlag, Heidelberg, 2007.
- Faine S, Kaipainen WJ.** *Erythromycin in experimental leptospirosis.* J Infect Dis 1955;**97**:146-151.
- Fairbrother JM.** *Effects of products of autolysis of tissue and urine on the viability, morphology, and antigenicity of Leptospira interrogans serovar Pomona.* J Clin Microbiol 1985;**21**:189-194.
- Fang G, Ho C, Qiu Y, Cubas V, Yu Z, Cabau C, Cheung F, Moszer I, Danchin A.** *Specialized microbial database for inductive exploration of microbial genome sequences.* BMC Genomics 2005;**6**:14.
- Farr RW.** *Leptospirosis.* Clin Infect Dis 1995;**21**:1-8.
- Farrelly HE, Adler B, Faine S.** *Opsonic monoclonal antibodies against lipopolysaccharide antigens of Leptospira interrogans serovar Hardjo.* J Med Microbiol 1987;**23**:1-7.
- Faucher JF, Hoen B, Estavoyer JM.** *The management of leptospirosis.* Expert Opin Pharmacother 2004;**5**:819-827.
- LeFebvre RB, Foley JW, Thiermann AB.** *Rapid and simplified protocol for isolation and characterization of leptospiral chromosomal DNA for taxonomy and diagnosis.* J Clin Microbiol 1985;**22**:606-608.
- Feigin RD, Lobes LA Jr, Anderson D, Pickering L.** *Human leptospirosis from immunized dogs.* Ann Intern Med 1973;**79**:777-785.
- Ferguson IR.** *Leptospirosis surveillance: 1990-1992.* Commun Dis Rep CDR Rev 1993;**3**:R47-48.
- Fernandes CP, Seixas FK, Coutinho ML, Vasconcellos FA, Seyffert N, Croda J, McBride AJ, Ko AI, Dellagostin OA, Aleixo JA.** *Monoclonal antibodies against LipL32, the major outer membrane protein of pathogenic Leptospira: Production, characterization, and testing in diagnostic applications.* Hybridoma 2007;**26**:35-41.
- Fife TM, Gemensky-Metzler AJ, Wilkie DA, Colitz CM, Bras ID, Klages DC.** *Clinical features and outcomes of phacoemulsification in 39 horses: A retrospective study (1993-2003).* Vet Ophthalmol 2006;**9**:361-368.
- Fischer A, Freytag B, Remky H.** *Clinical, bacteriological and serological findings in leptospiral uveitis.* Albrecht Von Graefes Arch Ophthalmol 1955;**156**:494-502.

- Flannery B, Costa D, Carvalho FP, Guerreiro H, Matsunaga J, Da Silva ED, Ferreira AG, Riley LW, Reis MG, Haake DA, Ko AI.** *Evaluation of recombinant Leptospira antigen-based enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of leptospirosis.* J Clin Microbiol 2001a;**39**:3303-3310.
- Flannery B, Pereira MM, De Freitas Velloso L, De Castro Carvalho C, De Codes LG, De Saboia Orrico G, Dourado CM, Riley LW, Reis MG, Ko AI.** *Referral pattern of leptospirosis cases during a large urban epidemic of dengue.* Am J Trop Med Hyg 2001b;**65**:657-663.
- Fletcher W.** *Recent work on leptospirosis, tsutsugamushi disease and tropical typhus in the federated Malay States.* Trans R Soc Trop Med 1928;**21**:265-287.
- Fonseca C de A, Teixeira MM, Romero EC, Tengan FM, Silva MV, Shikanai-Yasuda MA.** *Leptospira DNA detection for the diagnosis of human leptospirosis.* J Infect 2006;**52**:15-22.
- De Fost M, Hartskeerl RA, Groenendijk MR, van der Poll T.** *Interleukin 12 in part regulates gamma interferon release in human whole blood stimulated with Leptospira interrogans.* Clin Diagn Lab Immunol 2003;**10**:332-335.
- De Fost M, Chierakul W, Limpiboon R, Dondorp A, White NJ, van der Poll T.** *Release of granzymes and chemokines in Thai patients with leptospirosis.* Clin Microbiol Infect 2007;**13**:433-436.
- De Francesco Daher E, Oliveira Neto FH, Ramirez SM.** *Evaluation of hemostasis disorders and anticardiolipin antibody in patients with severe leptospirosis.* Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2002;**44**:85-90.
- Frühaufl B, Ohnesorge B, Deegen E, Boevé M.** *Surgical management of equine recurrent uveitis with single port pars plana vitrectomy.* Vet Ophthalmol 1998;**1**:137-151.
- Fukunaga M, Mifuchi I.** *The number of large ribosomal RNA genes in Leptospira interrogans and Leptospira biflexa.* Microbiol Immunol 1989;**33**:459-466.
- Gale SP, Kingscote BF.** *Failure of a seropositive bull to transmit Leptospira interrogans serovar Hardjo infection to heifers.* Can Vet J 1989;**30**:65-67.
- Gamberini M, Gómez RM, Atzingen MV, Martins EA, Vasconcellos SA, Romero EC, Leite LC, Ho PL, Nascimento AL.** *Whole-genome analysis of Leptospira interrogans to identify potential vaccine candidates against leptospirosis.* FEMS Microbiol Lett 2005;**244**:305-313.
- Ganoza CA, Vinetz JM.** *Quantification of pathogenic Leptospira in surface waters explains urban predominance of severe human leptospirosis in the Peruvian Amazon.* J Invest Med 2006;**54**:S134/316.
- Ganoza CA, Matthias MA, Collins-Richards D, Brouwer KC, Cunningham CB, Segura ER, Gilman RH, Gotuzzo E, Vinetz JM.** *Determining risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic Leptospira.* PLoS Med 2006;**3**:e308.
- Gavin PJ, Thomson RB, Donnersberger DR, Fischer MJ, Vescio TM, Levett PN.** *Detection of leptospiral DNA by real-time polymerase chain reaction in acute Weil syndrome.* Infect Dis Clin Pract 2005;**13**:187-189.

Literaturverzeichnis

- Gaynor K, Katz AR, Park SY, Nakata M, Clark TA, von Effler P.** *Leptospirosis on Oahu: An outbreak associated with flooding of a university campus.* Am J Trop Med Hyg 2007;**76**:882-885.
- Gebriel AM, Subramaniam G, Sekaran SD.** *The detection and characterization of pathogenic Leptospira and the use of OMPs as potential antigens and immunogens.* Trop Biomed 2006;**23**:194-207.
- Geisen V, Stengel C, Brem S, Müller W, Greene C, Hartmann K.** *Canine leptospirosis infections – clinical signs and outcome with different suspected Leptospira serogroups (42 cases).* J Small Anim Pract 2007;**48**:324-328.
- Van Gelder RN.** *Frontiers of polymerase chain reaction diagnostics for uveitis.* Ocul Immunol Inflamm 2001a;**9**:67-73.
- Van Gelder RN.** *Applications of the polymerase chain reaction to diagnosis of ophthalmic disease.* Surv Ophthalmol 2001b;**46**:248-258.
- Gelman SS, Gundlapalli AV, Hale D, Croft A, Hindiye M, Carroll KC.** *Spotting the spirochete: rapid diagnosis of leptospirosis in two returned travelers.* J Travel Med 2002;**9**:165-167.
- Genelhu MS, Zanini MS, Veloso IF, Carneiro AM, Lopes MT, Salas CE.** *Use of a cysteine proteinase from Carica candamarcensis as a protective agent during DNA extraction.* Braz J Med Biol Res 1998;**31**:1129-1132.
- Gerard MP, Wotman KL, Komáromy AM.** *Infections of the head and ocular structures in the horse.* Vet Clin North Am Equine Pract 2006;**22**:591-631.
- Gerhards H, Wollanke B.** *Uveitis bei Pferden – Diagnose und Therapie.* Pferdeheilkunde 2001;**17**:319-329.
- Gerritsen MJ, Olyhoek T, Smits MA, Bokhout BA.** *Sample preparation method for polymerase chain reaction-based semiquantitative detection of Leptospira interrogans serovar Hardjo subtype Hardjobovis in bovine urine.* J Clin Microbiol 1991;**29**:2805-2808.
- Gerritsen MJ, Koopmans MJ, Dekker TC, de Jong MC, Moerman A, Olyhoek T.** *Effective treatment with dihydrostreptomycin of naturally infected cows shedding Leptospira interrogans serovar Hardjo subtype Hardjobovis.* Am J Vet Res 1994;**55**:339-343.
- Gerritsen MA, Smits MA, Olyhoek T.** *Random amplified polymorphic DNA fingerprinting for rapid identification of leptospiras of serogroup Sejroe.* J Med Microbiol 1995;**42**:336-339.
- Gesell S.** *Gibt es eine asymptomatische intraokulare Leptospireninfektion beim Pferd?* Inaugural Dissertation; Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2004.
- Ghneim GS, Viers JH, Chomel BB, Kass PH, Descollonges DA, Johnson ML.** *Use of a case-control study and geographic information systems to determine environmental and demographic risk factors for canine leptospirosis.* Vet Res 2007;**38**:37-50.
- Gilger BC, Allen JB.** *A review of recent advancements in the surgical treatment of equine recurrent uveitis.* AAEP Proceedings 2001;**47**:32-35.
- Gilger BC, Michau TM.** *Equine recurrent uveitis: new methods of management.* Vet Clin Equine 2004;**20**:417-427.

- Gilger BC, Malok E, Cutter KV, Stewart T, Horohov DW, Allen JB.** *Characterization of T-lymphocytes in the anterior uvea of eyes with chronic equine recurrent uveitis.* Vet Immunol Immunopathol 1999;**71**:17-28.
- Gilger BC, Malok E, Stewart T, Horohov D, Ashton P, Smith T, Jaffe GJ, Allen JB.** *Effect of an intravitreal cyclosporine implant on experimental uveitis in horses.* Vet Immunol Immunopathol 2000;**76**:239-255.
- Gilger BC, Wilkie DA, Davidson MG, Allen JB.** *Use of an intravitreal sustained-release cyclosporine delivery device for treatment of equine recurrent uveitis.* Am J Vet Res 2001;**62**:1892-1896.
- Gilger BC, Yang P, Salmon JH, Jaffe GJ, Allen JB.** *Expression of a chemokines by ciliary body epithelium in horses with naturally occurring recurrent uveitis and in cultured ciliary body epithelial cells.* Am J Vet Res 2002;**63**:942-947.
- Gilger BC, Salmon JH, Wilkie DA, Cruysberg LP, Kim J, Hayat M, Kim H, Kim S, Yuan P, Lee SS, Harrington SM, Murray PR, Edelhauser HF, Csaky KG, Robinson MR.** *A novel bioerodible deep scleral lamellar cyclosporine implant for uveitis.* Invest Ophthalmol Vis Sci 2006;**47**:2596-2605.
- Gilmour MA, Clarke CR, MacAllister CG, Dedeo JM, Caudell DL, Morton RJ, Pugh M.** *Ocular penetration of oral doxycycline in the horse.* Vet Ophthalmol 2005;**8**:331-335.
- Gilsbach R, Kouta M, Bönisch H, Brüß M.** *Comparison of in vitro and in vivo reference genes for internal standardization of real-time PCR data.* BioTechniques 2006;**40**:173-177.
- Gleiser CA.** *Experimental canine leptospirosis. III. Histopathologic changes.* J Infect Dis 1957;**100**:249-256.
- Godinez CR, Zelaya de Romillo B, Auriolles-Gamboa D, Verdugo-Rodriguez A, Rodriguez-Reyes EA, De la Peña-Moctezuma A.** *Antibodies against Leptospira interrogans in California sea lion pups from Gulf of California.* J Wildl Dis 1999;**35**:108-111.
- Goldstein RE, Lin RC, Langston CE, Scrivani PV, Erb HN, Barr SC.** *Influence of infecting serogroup on clinical features of leptospirosis in dogs.* J Vet Intern Med 2006;**20**:489-494.
- Gollop JH, Katz AR, Rudoy RC, Sasaki DM.** *Rat-bite leptospirosis.* West J Med 1993;**159**:76-77.
- Govindarjan R, Meenambigai TV, Jayakumar V, Ramprabhu R, Rajeswar JJ, Bruce MS, Koteeswaran A.** *Leptospirosis in an indian elephant.* Indian Vet J 2006;**83**:437-438.
- Gravekamp C, Van de Kemp H, Franzen M, Carrington D, Schoone GJ, Van Eys GJ, Everard CO, Hartskeerl RA, Terpstra WJ.** *Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers.* J Gen Microbiol 1993;**139**:1691-1700.
- Green JH, Arean VM.** *Virulence and distribution of Leptospira Icterohaemorrhagiae in experimental Guinea pig infections.* Am J Vet Res 1964;**25**:264-267.
- Green MJ, Bradley AJ, Medley GF, Browne WJ.** *Cow, farm, and management factors during the dry period that determine the rate of clinical mastitis after calving.* J Dairy Sci 2007;**90**:3764-3776.
- Greenberg EP, Canale-Parola E.** *Relationship between cell coiling and motility of spirochetes in viscous environments.* J Bacteriol 1977;**131**:960-969.

Literaturverzeichnis

- Greenlee JJ, Bolin CA, Alt DP, Cheville NF, Andreasen CB.** *Clinical and pathologic comparison of acute leptospirosis in dogs caused by two strains of Leptospira kirschneri serovar Grippotyphosa.* Am J Vet Res 2004;**65**:1100-1107.
- Griffith ME, Horvath LL, Mika WV, Hawley JS, Moon JE, Hospenthal DR, Murray CK.** *Viability of Leptospira in BacT/ALERT® MB media.* Diag Microbiol Infect Dis 2006;**54**:263-266.
- Griffith ME, Hospenthal DR, Murray CK.** *Antimicrobial therapy of leptospirosis.* Curr Opin Infect Dis 2006;**19**:533-537.
- Grobusch MP, Bollmann R, Schonberg A, Slevogt H, Garcia V, Teichmann D, Jelinek T, Flick H, Bergmann F, Rosseau S, Temmesfeld-Wollbrück B, Suttorp N.** *Leptospirosis in travelers returning from the Dominican Republic.* J Travel Med 2003;**10**:55-58.
- De Groot-Mijnes JD, Rothova A, Van Loon AM, Schuller M, Ten Dam-Van Loon NH, De Boer JH, Schuurman B, Weersink AJ.** *Polymerase chain reaction and Goldman-Witmer coefficient analysis are complimentary for the diagnosis of infectious uveitis.* Am J Ophthalmol 2006;**141**:313-318.
- Gsell O.** *The history of leptospirosis: 100 years.* Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A] 1984;**257**:473-478.
- Gsell O, Rehsteiner K, Verrey F.** *Iridocyclitis following leptospirosis Pomona.* Ophthalmologica 1946;**112**:320-334.
- Guerreiro H, Croda J, Flannery B, Mazel M, Matsunaga J, Reis MG, Levett PN, Ko AI, Haake DA.** *Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans.* Infect Immun 2001;**69**:4958-4968.
- Guidugli F, Castro AA, Atallah AN.** *Antibiotics for treating leptospirosis.* Cochrane Database Syst Rev 2000;**2**:CD001306.
- Gulland FM, Koski M, Lowenstine LJ, Colagross A, Morgan L, Spraker T.** *Leptospirosis in California sea lions (Zalophus californianus) stranded along the central California coast, 1981-1994.* J Wildl Dis 1996;**32**:572-580.
- Gupta A, Gulnar DP, Srinivasan R, Kaliaperumal S.** *Bilateral acute keratouveitis in leptospirosis: A new entity.* Indian J Ophthalmol 2007;**55**:399.
- Gussenhoven GC, van der Hoorn MA, Goris MG, Terpstra WJ, Hartskeerl RA, Mol BW, van Ingen CW, Smits HL.** *LEPTO dipstick, a dipstick assay for detection of Leptospira-specific immunoglobulin M antibodies in human sera.* J Clin Microbiol 1997;**35**:92-97.
- Gutman I, Walsh JB, Knapp AB.** *Cotton-wool spots as a sign in leptospirosis (Weill's disease).* Ophthalmologica 1983;**187**:133-136.
- Haake DA.** *Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis.* Microbiology 2000;**146**:1491-1504.
- Haake DA.** *Molecular epidemiology of leptospirosis in the Amazon.* PLoS Med 2006;**3**:e302.
- Haake DA, Matsunaga J.** *Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins.* Infect Immun 2002;**70**:4936-4945.

- Haake DA, Matsunaga J.** *Leptospiral membrane proteins – variations on a theme?* Indian J Med Res 2005;**121**:143-145.
- Haake DA, Walker EM, Blanco DR, Bolin CA, Miller JN, Lovett MA.** *Changes in the surface of Leptospira interrogans serovar Grippityphosa during in vitro cultivation.* Infect Immun 1991;**59**:1131-1140.
- Haake DA, Champion CI, Martinich C, Shang ES, Blanco DR, Miller JN, Lovett MA.** *Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding OmpL1, a transmembrane outer membrane protein of pathogenic Leptospira spp.* J Bacteriol 1993;**175**:4225-4234.
- Haake DA, Martinich C, Summers TA, Shang ES, Pruetz JD, McCoy AM, Mazel MK, Bolin CA.** *Characterization of leptospiral outer membrane lipoprotein LipL36: Downregulation associated with late-log-phase growth and mammalian infection.* Infect Immun 1998;**66**:1579-1587.
- Haake DA, Mazel MK, McCoy AM, Milward F, Chao G, Matsunaga J, Wagar EA.** *Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection.* Infect Immun 1999;**67**:6572-6582.
- Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, Matsunaga J, Levett PN, Bolin CA.** *The leptospiral outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection.* Infect Immun 2000;**68**:2276-2285.
- Haake DA, Dundoo M, Cader R, Kubak BM, Hartskeerl RA, Sejvar JJ, Ashford DA.** *Leptospirosis, water sports, and chemoprophylaxis.* Clin Infect Dis 2002;**34**:e40-e43.
- Haake DA, Suchard MA, Kelley MM, Dundoo M, Alt DP, Zuerner RL.** *Molecular evolution and mosaicism of leptospiral outer membrane proteins involves horizontal DNA transfer.* J Bacteriol 2004;**186**:2818-2828.
- Haddock RL, Gilmore JW, Pimentel F.** *A leptospirosis outbreak on Guam associated with an athletic event.* Pac Health Dialog 2002;**9**:186-189.
- Hajikolaie MR, Gorbanpour M, Haidari M, Abdollahpour G.** *Comparison of leptospiral infection in the horse and donkey.* Bull Vet Inst Pulawy 2005;**49**:175-178.
- Halliwell RE, Hines MT.** *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 1985;**4**:1023-1031.
- Halliwell RE, Brim TA, Hines MT, Wolf D, White FH.** *Studies on equine recurrent uveitis. II: The role of infection with Leptospira interrogans serovar Pomona.* Curr Eye Res 1985;**4**:1033-1040.
- Haltiner AL, Mitchell TD, Harris RB.** *Leptin action is modified by an interaction between dietary fat content and ambient temperature.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2004;**287**:R1250-1255.
- Hanno HA, Cleveland AF.** *Leptospiral uveitis.* Am J Ophthalmol 1949;**32**:1564-1566.
- Harkin KR, Gartrell CL.** *Canine leptospirosis in New Jersey and Michigan: 17 cases (1990-1995).* J Am Anim Hosp Assoc 1996;**32**:495-501.

Literaturverzeichnis

- Harkin KR, Roshto YM, Sullivan JT.** *Clinical application of a polymerase chain reaction assay for diagnosis of leptospirosis in dogs.* J Am Vet Med Assoc 2003a;**222**:1224-1229.
- Harkin KR, Roshto YM, Sullivan JT, Purvis TJ, Chengappa MM.** *Comparison of polymerase chain reaction assay, bacteriologic culture, and serologic testing in assessment of prevalence of urinary shedding of leptospires in dogs.* J Am Vet Med Assoc 2003b;**222**:1230-1233.
- Hartskeerl RA.** *International Leptospirosis Society: Objectives and achievements.* Rev Cubana Med Trop 2005;**57**:7-10.
- Hartskeerl RA, Terpstra WJ.** *Leptospirosis in wild animals.* Vet Q 1996;**18**:S149-S150.
- Hartskeerl RA, Goris MG, Brem S, Meyer P, Kopp H, Gerhards H, Wollanke B.** *Classification of Leptospira from the eyes of horses suffering from recurrent uveitis.* J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 2004;**51**:110-115.
- Hartwigk H.** *Die periodische Augenentzündung des Pferdes als Spätsymptom der Leptospirose.* Tierärztl Umschau 1953;**8**:154-157.
- Hathaway SC, Blackmore DK, Marshall RB.** *The serologic and cultural prevalence of Leptospira interrogans serovar Balcanica in possums (Trichosurus vulpecula) in New Zealand.* J Wildl Dis 1978;**14**:345-350.
- Hathaway SC, Little TW, Finch SM, Stevens AE.** *Leptospiral infection in horses in England: A serological study.* Vet Rec 1981;**108**:396-398.
- Hauck SM, Schoeffmann S, Amann B, Stangassinger M, Gerhards H, Ueffing M, Deeg CA.** *Retinal Mueller glial cells trigger the hallmark inflammatory process in autoimmune uveitis.* J Proteome Res 2007;**6**:2121-2131.
- Hauk P, Negrotto S, Romero EC, Vasconcellos SA, Genovez ME, Ward RJ, Schattner M, Gomez RM, Ho PL.** *Expression and characterization of HlyX hemolysin from Leptospira interrogans serovar Copenhageni: Potentiation of hemolytic activity by LipL32.* Biochem Biophys Res Commun 2005;**333**:1341-1347.
- He P, Sheng YY, Shi YZ, Jiang XG, Qin JH, Zhang ZM, Zhao GP, Guo XK.** *Genetic diversity among major endemic strains of Leptospira interrogans in China.* BMC Genomics 2007;**8**:204.
- Heath CW Jr, Alexander AD, Galton MM.** *Leptospirosis in the United States. Analysis of 483 cases in man, 1949, 1961.* N Engl J Med 1965;**273**:915-922.
- Heath SE, Johnson R.** *Leptospirosis.* J Am Vet Med Assoc 1994;**205**:1518-1523.
- Heinemann MB, Garcia JF, Nunes CM, Morais ZM, Gregori F, Cortez A, Vasconcellos SA, Visintin JA, Richtzenhain LJ.** *Detection of leptospires in bovine semen by polymerase chain reaction.* Aust Vet J 1999;**77**:32-34.
- Heinemann MB, Garcia JF, Nunes CM, Gregori F, Higa ZM, Vasconcellos SA, Richtzenhain LJ.** *Detection and differentiation of Leptospira spp. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism.* Vet Microbiol 2000;**73**:261-267.
- Henneberry RC, Cox CD.** *Beta-oxidation of fatty acids by Leptospira.* Can J Microbiol 1970;**16**:41-45.

- Henry RA, Johnson RC.** *Distribution of the genus Leptospira in soil and water.* Appl Environ Microbiol 1978;**35**:492-499.
- Heron LG, Reiss-Levy EA, Jacques TC, Dickeson DJ, Smythe LD, Sorrell TC.** *Leptospirosis presenting as a haemorrhagic fever in a traveller from Africa.* Med J Aust 1997;**167**:477-479.
- Herrmann JL, Baril C, Belenger E, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I.** *Genome conservation in isolates of Leptospira interrogans.* J Bacteriol 1991;**173**:7582-7588.
- Herrmann JL, Bellenger E, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I.** *Pulsed-field gel electrophoresis of NotI digests of leptospiral DNA: A new rapid method of serovars identification.* J Clin Microbiol 1992;**30**:1696-1702.
- Hill FI, Wyeth TK.** *Serological reactions against Leptospira interrogans serovars in alpacas after vaccination.* NZ Vet J 1991;**39**:32-33.
- Hilscher C, Vahrson W, Dittmer DP.** *Faster quantitative real-time PCR protocols may lose sensitivity and show increased variability.* Nucleic Acids Res 2005;**33**:e182.
- Hoag WG, Bell WB.** *Isolation of Leptospira Pomona from bovine eye.* J Am Vet Med Assoc 1954;**125**:381-382.
- Hodge W, Sivakumar R, Dean D.** *Leptospirosis induced uveitis: Ophthalmic characteristics and methods of diagnosis.* Invest Ophthalmol Vis Sci 1996;**37**:1669-B572.
- Hodges RT, Day AM.** *Bovine leptospirosis: The effects of vaccination on serological responses as determined by complement fixation and microscopic agglutination tests.* NZ Vet J 1987;**35**:61-64.
- Holodniy M, Kim S, Katzenstein D, Konrad M, Groves E, Merigan TC.** *Inhibition of human immunodeficiency virus gene amplification by heparin.* J Clin Microbiol 1991;**29**:676-679.
- Holt J, Davis S, Leirs H.** *A model of leptospirosis infection in an African rodent to determine risk to humans: Seasonal fluctuations and the impact of rodent control.* Acta Trop 2006;**99**:218-225.
- Hong JE, Foster CS.** *Spirochetal Uveitis.* Int Ophthalmol Clin 2006;**46**:123-139.
- Hookey JV.** *Detection of Leptospiraceae by amplification of 16S ribosomal DNA.* FEMS Microbiol Lett 1992;**90**:267-274.
- Hoorfar J, Wolffs P, Rådström P.** *Diagnostic PCR: Validation and samples preparation are two sides of the same coin.* APMIS 2004;**112**:808-814.
- Hospenthal DR, Murray CK.** *In vitro susceptibilities of seven Leptospira species to traditional and newer antibiotics.* Antimicrob Agents Chemother 2003;**47**:2646-2648.
- Hotka ML, Wilson MA, Anderson TM, Tichenor CL, Miller DA.** *Comparative serological study of Leptospira serovar hardjo genotypes for use in the microscopic agglutination test.* J Vet Diagn Invest 2007;**19**:84-87.
- Hsieh WJ, Pan MJ.** *Identification Leptospira santarosai serovar Shermani specific sequences by suppression subtractive hybridization.* FEMS Microbiol Lett 2004;**235**:117-124.

Literaturverzeichnis

- Huitron-Resendiz S, De Rozières S, Sanchez-Alavez M, Buhler B, Lin YC, Lerner DL, Henriksen NW, Burudi M, Fox HS, Torbett BE, Henriksen S, Elder JH.** *Resolution and prevention of feline immunodeficiency virus-induced neurological deficits by treatment with the protease inhibitor TL-3.* J Virol 2004;**78**:4525-4532.
- Huygens F, Inman-Bamber J, Nimmo GR, Munckhof W, Schooneveldt J, Harrison B, McMahon JA, Giffard PM.** *Staphylococcus aureus genotyping using novel real-time PCR formats.* J Clin Microbiol 2006;**44**:3712-3719.
- Inzana TJ, Dawe DL.** *Experimentally induced Leptospira interrogans serovar Autumnalis infections in young swine.* Am J Vet Res 1979;**40**:1355-1358.
- Isogai E, Isogai H, Fujii N, Oguma K.** *Macrophage activation by leptospiral Lipopolysaccharide.* Zentralbl Bakteriologie 1990;**273**:200-208.
- Ito T, Yanagawa R.** *Leptospiral attachment to extracellular matrix of mouse fibroblast (L929) cells.* Vet Microbiol 1987;**15**:89-96.
- Jansen A, Schöneberg I, Frank C, Alpers K, Schneider T, Stark K.** *Leptospirosis in Germany, 1962-2003.* Emerg Infect Dis 2005;**11**:1048-1054.
- Jansen A, Nöckler K, Schönberg A, Luge E, Ehlert D, Schneider T.** *Wild boars as possible source of hemorrhagic leptospirosis in Berlin, Germany.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2006;**25**:544-546.
- Jansen A, Stark K, Schneider T, Schöneberg I.** *Sex differences in clinical leptospirosis in Germany: 1997-2005.* Clin Infect Dis 2007a;**44**:e69-e72.
- Jansen A, Luge E, Guerra B, Wittschen P, Gruber AD, Loddenkemper C, Schneider T, Lierz M, Ehlert D, Appel B, Stark K, Nöckler K.** *Leptospirosis in urban wild boars, Berlin, Germany.* Emerg Infect Dis 2007b;**13**:739-742.
- Jauréguiberry S, Roussel M, Brinchault-Rabin G, Gacouin A, Le Meur A, Arvieux C, Michelet C, Tattevin P.** *Clinical presentation of leptospirosis: A retrospective study of 34 patients admitted to a single institution in metropolitan France.* Clin Microbiol Infect 2005;**11**:391-394.
- Jena AB, Mohanty KC, Devadasan N.** *An outbreak of leptospirosis in Orissa, India: the importance of surveillance.* Trop Med Int Health 2004;**9**:1016-1021.
- John TJ.** *The prevention and control of human leptospirosis.* J Postgrad Med 2005;**51**:205-209.
- Johnson RC, Rogers P.** *5-Fluorouracil as a selective agent for growth of Leptospirae.* J Bacteriol 1964a;**87**:422-426.
- Johnson RC, Rogers P.** *Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospirae with 8-azaguanine.* J Bacteriol 1964b;**88**:1618-1623.
- Johnson RC, Harris VG.** *Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospirae. I. Growth at low temperatures.* J Bacteriol 1967;**94**:27-31.
- Johnson RC, Harris VG, Walby JK.** *Characterization of leptospirae according to fatty acid requirements.* J Gen Microbiol 1969;**55**:399-407.

- Johnson RC, Walby J, Henry RA, Auran NE.** *Cultivation of parasitic leptospire: Effect of pyruvate.* Appl Microbiol 1973;**26**:118-119.
- Johnson MA, Smith H, Joeph P, Gilman RH, Bautista CT, Campos KJ, Cespedes M, Klatsky P, Vidal C, Terry H, Calderon MM, Coral C, Cabrera L, Parmar PS, Vinetz JM.** *Environmental exposure and leptospirosis, Peru.* Emerg Infect Dis 2004;**10**:1016-1022.
- Jones TC.** *Equine periodic ophthalmia.* Am J Vet Res 1942;**3**:45-71.
- Jost BH, Adler B, Vinh T, Faine S.** *A monoclonal antibody reacting with a determinant on leptospiral lipopolysaccharide protects guinea pigs against leptospirosis.* J Med Microbiol 1986;**22**:269-275.
- Jost BH, Adler B, Faine S.** *Experimental immunisation of hamsters with lipopolysaccharide antigens of Leptospira interrogans.* J Med Microbiol 1989;**29**:115-120.
- Jouglard SD, Simionatto S, Seixas FK, Nassi FL, Dellagostin OA.** *Nested polymerase chain reaction for detection of pathogenic leptospire.* Can J Microbiol 2006;**52**:747-752.
- Ju J, Ruan C, Fuller CW, Glazer AN, Mathies RA.** *Fluorescence energy transfer dye-labeled primers for DNA sequencing and analysis.* Proc Natl Acad Sci USA 1995;**92**:4347-4351.
- Jungebloud A, Bohle K, Göcke Y, Cordes C, Horn H, Hempel DC.** *Quantification of product-specific gene expression in biopellets of Aspergillus niger with real-time PCR.* Enzym Microb Tech 2007;**40**:653-660.
- Jusatz HJ.** *Europäisches Feldfieber (Schlammfieber) in Südwestfrankreich.* Med Microbiol Immunol 1941;**123**:374-382.
- Kalisch J.** *Leptospirose und periodische Augenentzündung.* Berl Münch Tierärztl Wochenschr 1952;**65**:5-9.
- Kalsow CM, Dwyer AE.** *Retinal immunopathology in horses with uveitis.* Ocul Immunol Inflamm 1998;**6**:239-251.
- Kan W, Wolgemuth WC.** *The shape and dynamics of the Leptospiraceae.* Biophys J 2007;**93**:54-91.
- Karaseva EV, Chernukha YG, Piskunova LA.** *Results of studying the time of survival of pathogenic leptospira under natural conditions.* J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol 1973;**17**:339-345.
- Kasper K, Lunn KF.** *Development of a real-time PCR assay for the detection of pathogenic leptospire in canine urine.* J Vet Intern Med 2006;**20**:763.
- Katz AR, Ansdell VE, Effler PV, Middleton CR, Sasaki DM.** *Assessment of the clinical presentation and treatment of 353 cases of laboratory-confirmed leptospirosis in Hawaii, 1974-1998.* Clin Infect Dis 2001;**33**:1834-1841.
- Katz AR, Ansdell VE, Effler PV, Middleton CR, Sasaki DM.** *Leptospirosis in Hawaii, 1974-1998: Epidemiologic analysis of 353 laboratory-confirmed cases.* Am J Trop Med Hyg 2002;**66**:61-70.
- Katz AR, Effler PV, Ansdell VE.** *Comparison of serology and isolates for the identification of infecting leptospiral serogroups in Hawaii, 1979-1998.* Trop Med Int Health 2003;**8**:639-642.
- Kaur H, John M.** *Mixed infection due to leptospira and dengue.* Indian J Gastroenterol 2002;**21**:206.

Literaturverzeichnis

- Kaushik SP, Yim HB, Tan CC.** *Weils' syndrome and concomitant hepatitis B infection.* Singapore Med J 1999;**40**:104-105.
- Kawabata H, Dancel LA, Villanueva SY, Yanagihara Y, Koizumi N, Watanabe H.** *FlaB-polymerase chain reaction (flaB-PCR) and its restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis are an efficient tool for detection and identification of Leptospira spp.* Microbiol Immunol 2001;**45**:491-496.
- Kee SH, Kim IS, Choi MS, Chang WH.** *Detection of leptospiral DNA by PCR.* J Clin Microbiol 1994;**32**:1035-1039.
- Kik MJ, Goris MG, Bos JH, Hartskeerl RA, Dorrestein GM.** *An outbreak of leptospirosis in seals (Phoca vitulina) in captivity.* Vet Q 2006;**28**:33-39.
- Kim S, Lee DS, Suzuki H, Watarai M.** *Detection of Brucella canis and Leptospira interrogans in canine semen by multiplex nested PCR.* J Vet Med Sci 2006;**68**:615-618.
- Kinde H, Hietala SK, Bolin CA, Dowe JT.** *Leptospiral abortion in horses following a flooding incident.* Equine Vet J 1996;**28**:327-330.
- Kingscote BF.** *Leptospirosis: An Occupational Hazard to Veterinarians.* Can Vet J 1986;**27**:78-81.
- Kirkbride CA, Johnson MW.** *Serologic examination of aborted ovine and bovine fetal fluids for the diagnosis of border disease, bluetongue, bovine viral diarrhea, and leptospiral infections.* J Vet Diagn Invest 1989;**1**:132-138.
- Kiss I, Germán P, Sámi L, Antal M, Farkas T, Kardos G, Kecskeméti S, Dán Á, Belák S.** *Application of real-time RT-PCR utilising LUX (Light Upon eXtension) fluorogenic primer for rapid detection of avian influenza viruses.* Acta Vet Hungarica 2006;**54**:525-533.
- Klimpel GR, Matthias MA, Vinetz JM.** *Leptospira interrogans activation of human peripheral blood mononuclear cells: Preferential expansion of TCR $\gamma\delta$ + T cells vs TCR $\alpha\beta$ + T cells.* J Immunol 2003;**171**:1447-1455.
- Kmety E.** *Paradox reactions and their significance in serodiagnosis of some types of leptospirosis.* Zentralbl Bakteriol [Orig] 1958;**170**:597-608.
- Kmety E, Plesko I, Chylo E.** *Further results of research on leptospirosis in Slovakia.* Zentralbl Bakteriol [Orig] 1956;**167**:243-253.
- Ko AI, Galvao Reis M, Ribeiro Dourado CM, Johnson WD, Riley LW.** *Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group.* Lancet 1999;**354**:820-825.
- Kobayashi Y.** *Discovery of the causative organism of Weil's disease: Historical view.* J Infect Chemother 2001;**7**:10-15.
- Kobayashi Y.** *Human leptospirosis: Management and prognosis.* J Postgrad Med 2005;**51**:201-204.
- Koizumi N, Watanabe H.** *Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity.* Vaccine 2004;**22**:1545-1552.
- Koizumi N, Watanabe H.** *Leptospirosis vaccines: Past, present and future.* J Postgrad Med 2005;**51**:210-214.

- Koizumi N, Kawabata H, Watanabe H.** *Probable laboratory contamination of clinical specimens with *Leptospira meyeri*.* Microbiol Immunol 2003;**47**:305-306.
- Kositanont U, Rugsasuk S, Leelaporn A, Phulsuksombati D, Tantitanawat S, Naigowit P.** *Detection and differentiation between pathogenic and saprophytic *Leptospira* spp. by multiplex polymerase chain reaction.* Diagn Microbiol Infect Dis 2007a;**57**:117-122.
- Kositanont U, Chotinantakul K, Phulsuksombati D, Tribuddharat C.** *Assessment of southern blot ribotyping for differentiation of *Leptospira* strains isolated from field rats.* J Microbiol Meth 2007b;**69**:288-297.
- Koteeswaran A.** *Seroprevalence of leptospirosis in man and animals in Tamil Nadu.* Indian J Med Microbiol 2006;**24**:329-331.
- Kotorii S.** *Zur Klinik der sogenannten "Hasamiyami".* J Mol Med 1935;**14**:1147-1149.
- Kovács AD, Chakraborty-Sett S, Ramirez SH, Sniderhan LF, Williamson AL, Maggirwar SB.** *Mechanism of NF- κ B inactivation induced by survival signal withdrawal in cerebellar granule neurons.* Eur J Neurosci 2004;**20**:345-352.
- Krawczyk M.** *Serological evidence of leptospirosis in animals in northern Poland.* Vet Rec 2005;**156**:88-89.
- Kreuzer KA, Bohn A, Lass U, Peters UR, Schmidt CA.** *Influence of DNA polymerases on quantitative PCR results using TaqMan™ probe format in the LightCycler™ instrument.* Mol Cell Probes 2000;**14**:57-60.
- Kudesia G, Christie P, Walker E, Pinkerton I, Lloyd G.** *Dual infection with leptospira and hantavirus.* Lancet 1988;**1**:1397.
- Kumar AS, Ramadass P, Nachimuthu K.** *Use of polymerase chain reaction for the detection of leptospire in clinical samples.* Indian Vet J 2001;**78**:1087-1090.
- Kuo HL, Lin CL, Huang CC.** *Reversible thick ascending limb dysfunction and aseptic meningitis syndrome: early manifestation in two leptospirosis patients.* Ren Fail 2003;**25**:639-646.
- Kupek E, de Sousa Santos Faversani MC, de Souza Philippi JM.** *The relationship between rainfall and human leptospirosis in Florianopolis, Brazil, 1991–1996.* Brazilian J Infect Dis 2000;**4**:131–134.
- Kusser W, Nery J, Sparks K, Selway D, Javorschi S, Warrick S.** *Fluorogenic primers for real-time quantitative PCR.* Am Biotechnol Lab 2003;**7**:52-56.
- Laber G, Schutze E.** *In vitro and in vivo activity of tiamulin against leptospire.* Zentralbl Bakteriol [Orig A] 1977;**239**:403-408.
- Langston CE, Heuter KJ.** *Leptospirosis. A re-emerging zoonotic disease.* Vet Clin North Am Small Anim Pract 2003;**33**:791-807.
- Laras K, Cao BV, Bounlu K, Nguyen TK, Olson JG, Thongchanh S, Tran NV, Hoang KL, Punjabi N, Ha BK, Ung SA, Insisiengmay S, Watts DM, Beecham HJ, Corwin AL.** *The importance of leptospirosis in Southeast Asia.* Am J Trop Med Hyg 2002;**67**:278-286.

Literaturverzeichnis

- McLaughlin SA, Whitley RD, Gilger BC.** *Diagnosis and treatment of lens diseases.* Vet Clin North Am Equine Pract 1992;**8**:575-585.
- Laurichesse H, Gourdon F, Smits HL, Abdoe TH, Estavoyer JM, Rebika H, Pouliquen P, Catalina P, Dubray C, Beytout J.** *Safety and immunogenicity of subcutaneous or intramuscular administration of a monovalent inactivated vaccine against Leptospira interrogans serogroup Icterohaemorrhagiae in healthy volunteers.* Clin Microbiol Infect 2007;**13**:395-403.
- Lee CH, Liu JW.** *Coinfection with leptospirosis and scrub typhus in taiwanese patients.* Am J Trop Med Hyg 2007;**77**:525-527.
- Lee SH, Kim KA, Park YK, Seong IW, Kim MJ, Lee YJ.** *Identification and partial characterization of a novel hemolysin from Leptospira interrogans serovar Lai.* Gene 2000;**254**:19-28.
- Lee SH, Kim S, Park SC, Kim MJ.** *Cytotoxic activities of Leptospira interrogans hemolysin sphH as a pore-forming protein on mammalian cells.* Infect Immun 2002;**70**:315-322.
- Léon A, Pronost S, Tapprest J, Foucher N, Blanchard B, André-Fontaine G, Laugier C, Fortier G, Leclercq R.** *Identification of pathogenic Leptospira strains in tissue of a premature foal by use of polymerase chain reaction analysis.* J Vet Diagn Invest 2006;**18**:218-221.
- Leonard FC, Quinn PJ, Ellis WA, O'Farrell K.** *Duration of urinary excretion of leptospire by cattle naturally or experimentally infected with Leptospira interrogans serovar hardjo.* Vet Rec 1992;**131**:435-439.
- Lepur D, Himbele J, Klinar I, Vranjican Z, Baršić B.** *Anti-ganglioside antibodies-mediated leptospiral meningomyeloencephalopolyneuritis.* Scand J Infect Dis 2007;**39**:472-475.
- Letocart M, Baranton G, Perolat P.** *Rapid identification of pathogenic Leptospira species (Leptospira interrogans, L. borgpetersenii, and L. kirschneri) with species-specific DNA probes produced by arbitrarily primed PCR.* J Clin Microbiol 1997;**35**:248-253.
- Levett PN.** *Leptospirosis: re-emerging or re-discovered disease?* J Med Microbiol 1999;**48**:417-418.
- Levett PN.** *Leptospirosis.* Clin Microbiol Rev 2001;**14**:296-326.
- Levett PN.** *Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis.* Clin Infect Dis 2003;**36**:447-452.
- Levett PN.** *Leptospirosis: A forgotten zoonosis?* Clin Appl Immunol Rev 2004;**4**:435-448.
- Levett PN, Whittington CU.** *Evaluation of the indirect hemagglutination assay for diagnosis of acute leptospirosis.* J Clin Microbiol 1998;**36**:11-14.
- Levett PN, Branch SL.** *Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay methods for detection of immunoglobulin M antibodies in acute leptospirosis.* Am J Trop Med Hyg 2002;**66**:745-748.
- Levett PN, Smythe L.** *International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of Leptospiraceae.* Int J Syst Evol Microbiol 2006;**56**:2019-2020.
- Levett PN, Walton D, Waterman LD, Whittington CU, Mathison GE, Everard CO.** *Surveillance of leptospiral carriage by feral rats in Barbados.* West Indian Med J 1998;**47**:15-17.

- Levett PN, Branch SL, Edwards CN.** *Detection of dengue infection in patients investigated for leptospirosis in Barbados.* Am J Trop Med Hyg 2000;**62**:112-114.
- Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG, Mayer LW.** *Detection of pathogenic leptospire by real-time quantitative PCR.* J Med Microbiol 2005;**54**:45-49.
- Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Steigerwalt AG.** *Leptospira broomii sp. nov., isolated from humans with leptospirosis.* Int J Syst Evol Microbiol 2006;**56**:671-673.
- Levin N, Nguyen-Khoa JL, Charpentier D, Strobel M, Fournie-Amazouz E, Denis P.** *Panuveitis with papillitis in leptospirosis.* Am J Ophthalmol 1994;**117**:118-119.
- Li C, Corum L, Morgan D, Rosey EL, Stanton TB, Charon NW.** *The spirochete FlaA periplasmic flagellar sheath protein impacts flagellar helicity.* J Bacteriol 2000;**182**:6698-6706.
- Li J, Makrigiorgos M.** *Anti-primer quenching-based real-time PCR for simplex or multiplex DNA quantification and single-nucleotide polymorphism genotyping.* Nature Protocols 2007;**2**:50-58.
- Li L, Ojcius DM, Yan J.** *Comparison of invasion of fibroblasts and macrophages by high- and low-virulence Leptospira strains: Colonization of the host-cell nucleus and induction of necrosis by the virulent strain.* Arch Microbiol 2007;**188**:591-598.
- Lilenbaum W, Varges R, Medeiros L, Cordeiro AG, Cavalcanti A, Souza GN, Richtzenhain L, Vasconcellos SA.** *Risk factors associated with leptospirosis in dairy goats under tropical conditions in Brazil.* Res Vet Sci 2008;**84**:14-17.
- Lin CH, Hsieh HF, Yu JC, Hsu SD, Chuang CH, Hsieh CB.** *Gastrointestinal: Leptospirosis and abdominal pain.* J Gastroenterol Hepatol 2006;**21**:1755.
- Lin YP, Chang YF.** *A domain of the Leptospira LigB contributes to high affinity binding of fibronectin.* Biochem Biophys Res Commun 2007;**362**:443-448.
- Liu D, Lawrence ML, Austin FW, Ainsworth AJ, Pace LW.** *PCR detection of pathogenic Leptospira genomospecies targeting putative transcriptional regulator genes.* Can J Microbiol 2006;**52**:272-277.
- Liu Y, Zheng W, Li L, Mao Y, Yan J.** *Pathogenesis of leptospirosis: interaction of Leptospira interrogans with in vitro cultured mammalian cells.* Med Microbiol Immunol 2007;**196**:233-239.
- Lo M, Bulach DM, Powell DR, Haake DA, Matsunaga J, Paustian ML, Zuerner RL, Adler B.** *Effects of temperature on gene expression patterns in Leptospira interrogans serovar Lai as assessed by whole-genome microarrays.* Infect Immun 2006;**74**:5848-4859.
- Lohmann CP, Linde HJ, Reischl U.** *Improved detection of microorganisms by polymerase chain reaction in delayed endophthalmitis after cataract surgery.* Ophthalmology 2000;**107**:1047-1052.
- Lomar AV, Diamant D, Torres JR.** *Leptospirosis in Latin America.* Infect Dis Clin North Am 2000;**14**:23-39.
- Louvel H, Bommezzadri S, Zidane N, Boursaux-Eude C, Creno S, Magnier A, Rouy Z, Médigue C, Saint Girons I, Bouchier C, Picardeau M.** *Comparative and functional genomic analyses of iron transport and regulation in Leptospira spp.* J Bacteriol 2006;**188**:7893-7904.

Literaturverzeichnis

- Lowe B, Avila HA, Bloom FR, Gleeson M, Kusser W.** *Quantitation of gene expression in neural precursors by reverse-transcription polymerase chain reaction using self-quenched, fluorogenic primers.* Anal Biochem 2003;**315**:95-105.
- Lu PL, Tseng SH.** *Fatal septicemic melioidosis in a young military person possibly co-infected with Leptospira interrogans and Orientia tsutsugamushi.* Kaohsiung J Med Sci 2005;**21**:173-178.
- Lucchesi PM, Parma AE.** *A DNA-Fragment of Leptospira interrogans encodes a protein which shares epitopes with equine cornea.* Vet Immunol Immunopathol 1999;**71**:173-179.
- Lucchesi PM, Parma AE, Arroyo GH.** *Serovar distribution of a DNA sequence involved in the antigenic relationship between Leptospira and equine cornea.* BMC Microbiol 2002;**2**:3.
- Lucchesi PM, Arroyo GH, Etcheverría AI, Parma AE, Seijo AC.** *Recommendations for the detection of Leptospira in urine by PCR.* Rev Soc Bras Med Trop 2004;**37**:131-134.
- Lüdtke CB, Coutinho ML, Jouglard SD, Moreira CN, Fernandes CH, Brod CS, Haake DA, Ko AI, Dellagostin OA, Aleixo JA.** *Monoclonal antibodies against an outer membrane protein from pathogenic Leptospira.* Braz J Microbiol 2003;**34**:1-4.
- Lünemann JD, Gelderblom H, Sospedra M, Quandt JA, Pinilla C, Marques A, Martin R.** *Cerebrospinal fluid-infiltrating CD4+ T cells recognize Borrelia burgdorferi lysine-enriched protein domains and central nervous system autoantigens in early lyme encephalitis.* Infect Immun 2007;**75**:243-251.
- Lupidi R, Cinco M, Balanzin D, Delprete E, Varaldo PE.** *Serological follow-up of patients involved in a localized outbreak of leptospirosis.* J Clin Microbiol 1991;**29**:805-809.
- Luzzi GA, Milne LM, Waitkins SA.** *Rat-bite acquired leptospirosis.* J Infect 1987;**15**:57-60.
- Machang'u RS, Mgone GF, Assenga J, Mhamphi G, Weetjens B, Cox C, Verhagen R, Sondij S, Goris MG, Hartskeerl RA.** *Serological and molecular characterization of leptospira serovar Kenya from captive African giant pouched rats (Cricetomys gambianus) from Morogoro Tanzania.* FEMS Immunol Med Microbiol 2004;**41**:117-121.
- Mackay IM.** *Real-time PCR in the microbiology laboratory.* Clin Microbiol Infect 2004;**10**:190-212.
- Mackintosh CG, Marshall RB.** *Serological titres resulting from leptospiral vaccine.* NZ Vet J 1980;**28**:172.
- Mackintosh CG, Marshall RB, Broughton ES.** *The use of a hardjo-pomona vaccine to prevent leptospiruria in cattle exposed to natural challenge with Leptospira interrogans serovar Hardjo.* NZ Vet J 1980;**28**:174-177.
- Majed Z, Bellenger E, Postic D, Pourcel C, Baranton G, Picardeau M.** *Identification of variable-number tandem-repeat loci in Leptospira interrogans sensu stricto.* J Clin Microbiol 2005;**43**:539-545.
- Mancel E, Mérien F, Pesenti L, Salino D, Angibaud G, Perolat P.** *Clinical aspects of ocular leptospirosis in New Caledonia (South Pacific).* Aust NZ J Ophthalmol 1999;**27**:380-386.

- Maneewatch S, Tapchaisri P, Sakolvaree Y, Klaysing B, Tongtawe P, Chaisri U, Songserm T, Wongratanacheewin S, Srimanote P, Chongsa-nguanz M, Chaicumpa W.** *OmpL1 DNA vaccine cross-protects against heterologous Leptospira spp. challenge.* Asian Pac J Allergy Immunol 2007;**25**:75-82.
- Marangoni A, Aldini R, Sambri V, Montagnani M, Ballardini G, Storni E, Cevenini R.** *Uptake and killing of Leptospira interrogans and Borrelia burgdorferi, spirochetes pathogenic to humans, by reticuloendothelial cells in perfused rat liver.* Infect Immun 2000;**68**:5408-5411.
- Mariya R, Chaudhary P, Kumar AA, Thangapandian E, Amutha R, Srivastava SK.** *Evaluation of a recombinant LipL41 antigen of Leptospira interrogans serovar Canicola in ELISA for serodiagnosis of bovine leptospirosis.* Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2006;**29**:269-277.
- Markotic A, Kuzman I, Babic K, Gagro A, Nichol S, Ksiazek TG, Rabatic S, Dekaris D.** *Double trouble: hemorrhagic fever with renal syndrome and leptospirosis.* Scand J Infect Dis 2002;**34**:221-224.
- Marotto PC, Nascimento CM, Eluf-Neto J, Marotto MS, Andrade L, Sztajnbok J, Seguro AC.** *Acute lung injury in leptospirosis: clinical and laboratory features, outcome, and factors associated with mortality.* Clin Infect Dis 1999;**29**:1561-1563.
- Marshall RB, Winter PJ, Yanagawa R.** *Restriction endonuclease DNA analysis of Leptospira interrogans serovars icterohaemorrhagiae and hebdomadis.* J Clin Microbiol 1984;**20**:808-810.
- Martins MG, Matos KT, da Silva MV, de Abreu MT.** *Ocular manifestations in the acute phase of leptospirosis.* Ocul Immunol Inflamm 1998;**6**:75-79.
- Martins Soto FR, Regina Pinheiro S, Honma Ito F, Maria Moraes Z, Paldes Goncales A, Santos de Azevedo S, Bernardi F, Rodrigues Camargo S, Arruda Vasconcellos S.** *Evaluation of colostral immunity in swine with commercial anti-leptospira polyvalent whole-bacteria vaccine.* Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2007;doi:10.1016/j.cimid.2007.03.002.
- Martone WJ, Kaufmann AF.** *Leptospirosis in humans in the United States, 1974-1978.* J Infect Dis 1979;**140**:1020-1022.
- Maskey M, Shastri JS, Saraswathi K, Surpam R, Vaidya N.** *Leptospirosis in Mumbai: Post-deluge outbreak 2005.* Indian J Med Microbiol 2006;**24**:337-338.
- Masri SA, Nguyen PT, Gale SP, Howard CJ, Jung SC.** *A polymerase chain reaction assay for the detection of leptospira spp. in bovine semen.* Can J Vet Res 1997;**61**:15-20.
- Masuzawa T, Okamoto Y, Une Y, Takeuchi T, Tsukagoshi K, Koizumi N, Kawabata H, Ohta S, Yoshikawa Y.** *Leptospirosis in squirrels imported from United States to Japan.* Emerg Infect Dis 2006;**12**:1153-1155.
- Mathew T, Satishchandra P, Mahadevan A, Nagarathna S, Yasha TC, Chandramukhi A, Subbakrishna DK, Shankar SK.** *Neuroleptospirosis – revisited: Experience from a tertiary care neurological centre from south India.* Indian J Med Res 2006;**124**:155-162.
- Matsunaga J, Young TA, Barnett JK, Barnett D, Bolin CA, Haake DA.** *Novel 45-kilodalton leptospiral protein that is processed to a 31-kilodalton growth-phase-regulated peripheral membrane protein.* Infect Immun 2002;**70**:323-334.

- Matsunaga J, Barocchi MA, Croda J, Young TA, Sanchez Y, Siqueira I, Bolin CA, Reis MG, Riley LW, Haake DA, Ko AI.** *Pathogenic Leptospira species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily.* Mol Microbiol 2003;**49**:929-945.
- Matsunaga J, Sanchez Y, Xu X, Haake DA.** *Osmolarity, a key environmental signal controlling expression leptospiral proteins LigA and LigB and the extracellular release of LigA.* Infect Immun 2005;**73**:70-78.
- Matsunaga J, Lo M, Bulach DM, Zuerner RL, Adler B, Haake DA.** *Response of Leptospira interrogans to physiologic osmolarity: Relevance in signaling the environment-to-host transition.* Infect Immun 2007;**75**:2864-2874.
- Matsuo K, Isogai E, Araki Y.** *Control of immunologically crossreactive leptospiral infection by administration of lipopolysaccharides from a nonpathogenic strain of Leptospira biflexa.* Microbiol Immunol 2000;**44**:887-890.
- Matthews A.** *Equine recurrent uveitis – an update.* Practice 1999;**21**:370-376.
- Matthews AG, Waitkins SA, Palmer MF.** *Serological study of leptospiral infections and endogenous uveitis among horses and ponies in the United Kingdom.* Equine Vet J 1987;**19**:125-128.
- Matthias MA, Levett PN.** *Leptospiral carriage by mice and mongooses on the island of Barbados.* West Indian Med J 2002;**51**:10-13.
- Mendoza L, Prescott JF.** *Serodiagnosis of leptospirosis in pigs using an axial filament enzyme-linked immunosorbent assay.* Vet Microbiol 1992;**31**:55-70.
- Mercier B, Gaucher C, Feugeas O, Mazurier C.** *Direct PCR from whole blood, without DNA extraction.* Nucleic Acids Res 1990;**18**:5908.
- Meri T, Murgia R, Stefanel P, Meri S, Cinco M.** *Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospire.* Microb Pathog 2005;**39**:139-147.
- Mérien F, Perolat P.** *Public health importance of human leptospirosis in the South Pacific: a five-year study in New Caledonia.* Am J Trop Med Hyg 1996;**55**:174-178.
- Mérien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I.** *Polymerase chain reaction for detection of Leptospira spp. in clinical samples.* J Clin Microbiol 1992;**30**:2219-2224.
- Mérien F, Perolat P, Mancel E, Persan D, Baranton G.** *Detection of Leptospira DNA by polymerase chain reaction in aqueous humor of a patient with unilateral uveitis.* J Infect Dis 1993;**168**:1335-1336.
- Mérien F, Baranton G, Perolat P.** *Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis.* J Infect Dis 1995;**172**:281-285.
- Mérien F, Baranton G, Perolat P.** *Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic Leptospira interrogans are correlated with virulence.* Infect Immun 1997;**65**:729-738.
- Mérien F, Truccolo J, Baranton G, Perolat P.** *Identification of a 36-kDa fibronectin-binding protein expressed by a virulent variant of Leptospira interrogans serovar Icterohaemorrhagiae.* FEMS Microbiol Lett 2000;**185**:17-22.

- Mérien F, Portnoi D, Bourhy P, Charavay F, Berlioz-Arthaud A, Baranton G.** *A rapid and quantitative method for the detection of Leptospira species in human leptospirosis.* FEMS Microbiol Lett 2005;**249**:139-147.
- Mgode GF, Machang'u RS, Goris MG, Engelbert M, Sondij S, Hartskeerl RA.** *New Leptospira serovar Sokoine of serogroup Icterohaemorrhagiae from cattle in Tanzania.* Int J Syst Evol Microbiol 2006;**56**:593-597.
- Michel V, Ruvoen-Clouet N, Menard A, Sonrier C, Fillonneau C, Rakotovo F, Ganière JP, André-Fontaine G.** *Role of the coypu (Myocastor coypus) in the epidemiology of leptospirosis in the domestic animals and humans in France.* Eur J Epidemiol 2001;**17**:111-121.
- Michel V, Branger C, Andre-Fontaine G.** *Epidemiology of leptospirosis.* Rev Cubana Med Trop 2002;**54**:7-10.
- Michna SW.** *Leptospirosis.* Vet Rec 1970;**86**:484-496.
- Michot JM, Lidove O, Boutboul D, Aguilar C, Merle H, Olindo S, Cabre P, Papo T.** *Leptospirosis: An unusual etiology of anterior uveitis.* Rev Med Interne 2007;**28**:566-567.
- Midwinter A, Vinh T, Faine S, Adler B.** *Characterization of an antigenic oligosaccharide from Leptospira interrogans serovar pomona and its role in immunity.* Infect Immun 1994;**62**:5477-5482.
- Millar BD, Chappel RJ, Adler B.** *Detection of leptospirosis in biological fluids using DNA hybridisation.* Vet Microbiol 1987a;**15**:71-78.
- Millar BD, Chappel RJ, Adler B, Driesen SJ, Jones RT.** *Effect of maternal vaccination on the susceptibility of growing pigs to leptospiral infection.* Vet Microbiol 1987b;**15**:79-87.
- Miller DA, Wilson MA, Beran GW.** *The effect of storage time on isolation of Leptospira interrogans from bovine kidneys.* J Vet Diagn Invest 1990;**2**:63-65.
- Miller DA, Wilson MA, Beran GW.** *Survey to estimate prevalence of Leptospira interrogans infection in mature cattle in the United States.* Am J Vet Res 1991;**52**:1761-1765.
- Miller NG, Wilson RB.** *Electron microscopy of the liver of the hamster during acute and chronic leptospirosis.* Am J Vet Res 1966;**17**:1071-1081.
- Miller NG, Froehling RC, White RJ.** *Activity of leptospire and their products on L cell monolayers.* Am J Vet Res 1970;**31**:371-377.
- Miller RE, Miller NG, White RJ.** *Growth of Leptospira Pomona and Its Effect on Various Tissue Culture Systems.* J Bacteriol 1966;**92**:502-509.
- Mino P.** *Zur Epidemiologie der Leptospirosen.* Klin Wochenschr 1942;**21**:337-342.
- Mitchison M, Rood JI, Faine S, Adler B.** *Molecular analysis of a Leptospira borgpetersenii gene encoding endoflagellar subunit protein.* J Gen Microbiol 1991;**137**:1529-1536.
- Monis PT, Giglio S, Saint CP.** *Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis.* Anal Biochem 2005;**340**:24-34.

Literaturverzeichnis

- Monsuez JJ, Kidouche R, Le Gueno B, Postic D.** *Leptospirosis presenting as haemorrhagic fever in visitor to Africa.* Lancet 1997;**349**:254-255.
- Moore GE, Guptill LF, Glickman NW, Caldanaro RJ, Aucoin D, Glickman LT.** *Canine leptospirosis, United States, 2002-2004.* Emerg Infect Dis 2006;**12**:501-503.
- Morey RE, Galloway RL, Bragg SL, Steigerwalt AG, Mayer LW, Levett PN.** *Species-specific identification of Leptospiraceae by 16S rRNA gene sequencing.* J Clin Microbiol 2006;**44**:3510-3516.
- Morgan J, Bornstein SL, Karpati AM, Bruce M, Bolin CA, Austin CC, Woods CW, Lingappa J, Langkop C, Davis B, Graham DR, Proctor M, Ashford DA, Bajani M, Bragg SL, Shutt K, Perkins BA, Tappero JW.** *Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998.* Clin Infect Dis 2002;**34**:1593-1599.
- Morter RL, Williams RD, Bolte H, Freeman MJ.** *Equine leptospirosis.* J Am Vet Med Assoc 1969;**155**:436-442.
- Mothershed EA, Whitney AM.** *Nucleic acid-based methods for the detection of bacterial pathogens: Present and future considerations for the clinical laboratory.* Clin Chim Acta 2006;**363**:206-220.
- Münnich D, Lakatos M.** *Treatment of human Leptospira infections with semicillin (ampicillin) or with amoxil (amoxicillin).* Chemotherapy 1976;**22**:372-380.
- Mulla S, Chakraborty T, Patel M, Pandya HP, Dadhaniya V, Vaghela G.** *Diagnosis of leptospirosis and comparison of ELISA and MAT techniques.* Indian J Pathol Microbiol 2006;**49**:468-470.
- Murgia R, Riquelme N, Baranton G, Cinco M.** *Oligonucleotides specific for pathogenic and saprophytic leptospira occurring in water.* FEMS Microbiol Lett 1997;**148**:27-34.
- Murray CK, Ellis MW, Hospenthal DR.** *Susceptibility of Leptospira serovars to antimalarial agents.* Am J Trop Med Hyg 2004;**71**:685-686.
- Myers DM.** *Serological studies and isolations of serotype Hardjo and Leptospira biflexa strains from horses of Argentina.* J Clin Microbiol 1976;**3**:548-555.
- Myers DM, Varela-Díaz VM.** *Selective isolation of leptospires from contaminated material by incorporation of neomycin to culture media.* Appl Microbiol 1973;**25**:781-786.
- Nahori M-A, Fournié-Amazouz E, Que-Gewirth NS, Balloy V, Chignard M, Raetz CR, Saint Girons I, Werts C.** *Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells.* J Immunol 2005;**175**:6022-6031.
- Naiman BM, Alt D, Bolin CA, Zuerner R, Baldwin CL.** *Protective killed Leptospira borgpetersenii vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and $\gamma\delta$ T lymphocytes.* Infect Immun 2001;**69**:7550-7558.
- Naiman BM, Blumerman S, Alt D, Bolin CA, Brown R, Zuerner R, Baldwin CL.** *Evaluation of type 1 immune response in naïve and vaccinated animals following challenge with Leptospira borgpetersenii serovar Hardjo: Involvement of WC1+ $\gamma\delta$ and CD4 T cells.* Infect Immun 2002;**70**:6147-6157.

- Naito M, Sakoda Y, Kamikawa T, Nitta Y, Hirose K, Sakashita M, Kurokawa S, Kida H.** *Serological evidence of leptospiral infection in pig populations in different districts in Japan.* Microbiol Immunol 2007;**51**:593-599.
- Nally JE, Timoney JF, Stevenson B.** *Temperature-regulated protein synthesis by Leptospira interrogans.* Infect Immun 2001a;**69**:400-404.
- Nally JE, Artiushin S, Timoney JF.** *Molecular characterization of thermoinduced immunogenic proteins Q1p42 and Hsp15 of Leptospira interrogans.* Infect Immun 2001b;**69**:7616-7624.
- Nally JE, Chantranuwat C, Wu XY, Fishbein MC, Pereira MM, Pereira da Silva JJ, Blanco DR, Lovett MA.** *Alveolar septal deposition of immunoglobulin and complement parallels pulmonary hemorrhage in a guinea pig model of severe pulmonary leptospirosis.* Am J Pathol 2004;**163**:1115-1127.
- Nally JE, Whitelegge JP, Aguilera R, Pereira MM, Blanco DR, Lovett MA.** *Purification and proteomic analysis of outer membrane vesicles from clinical isolates of Leptospira interrogans serovar Copenhageni.* Proteomics 2005a;**5**:144-152.
- Nally JE, Chow E, Fishbein MC, Blanco DR, Lovett MA.** *Changes in lipopolysaccharide O antigen distinguish acute versus chronic Leptospira interrogans infections.* Infect Immun 2005b;**73**:3251-3260.
- Nally JE, Whitelegge JP, Bassilian S, Blanco DR, Lovett MA.** *Characterization of the outer membrane proteome of Leptospira interrogans expressed during acute lethal infection.* Infect Immun 2007;**75**:766-773.
- Narita M, Fujitani S, Haake DA, Paterson DL.** *Leptospirosis after recreational exposure to water in the Yaeyama islands, Japan.* Am J Trop Med Hyg 2005;**73**:652-656.
- Nascimento AL, Verjovski-Almeida S, Van Sluys MA, Monteiro-Vitorello CB, Camargo LE, Digiampietri LA, Hartskeerl RA, Ho PL, Marques MV, Oliveira MC, Setubal JC, Haake DA, Martins EA.** *Genome features of Leptospira interrogans serovar Copenhageni.* Braz J Med Biol Res 2004a;**37**:459-478.
- Nascimento AL, Ko AI, Martins EA, Monteiro-Vitorello CB, Ho PL, Haake DA, Verjovski-Almeida S, Hartskeerl RA, Marques MV, Oliveira MC, Menck CF, Leite LC, Carrer H, Coutinho LL, Degraive WM, Dellagostin OA, El-Dorry H, Ferro ES, Ferro MI, Furlan LR, Gamberini M, Giglioti EA, Goes-Neto A, Goldman GH, Goldman MH, Harakava R, Jeronimo SM, Junqueira-de-Azevedo IL, Kimura ET, Kuramae EE, Lemos EG, Lemos MV, Marino CL, Nunes LR, de Oliveira RC, Pereira GG, Reis MS, Schriefer A, Siqueira WJ, Sommer P, Tsai SM, Simpson AJ, Ferro JA, Camargo LE, Kitajima JP, Setubal JC, Van Sluys MA.** *Comparative genomics of two Leptospira interrogans serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis.* J Bacteriol 2004b;**186**:2164-2172.
- Natarajaseenivasan K, Vijayachari P, Sugunan AP, Sharma S, Sehgal SC.** *Leptospiral proteins expressed during acute and convalescent phases of human leptospirosis.* Indian J Med Res 2004;**120**:151-159.
- Nazarenko I, Pires R, Lowe B, Obaidy M, Rashtchian A.** *Effect of primary and secondary structure of oligodeoxyribonucleotides on the fluorescent properties of conjugated dyes.* Nucleic Acids Res 2002a;**30**:2089-2095.

Literaturverzeichnis

- Nazarenko I, Lowe B, Darfler M, Ikonomi P, Schuster D, Rashtchian A.** *Multiplex quantitative PCR using self-quenched primers labeled with a single fluorophore.* Nucleic Acids Res 2002b;**30**:e37.
- O'Neil KM, Rickman LS, Lazarus AA.** *Pulmonary manifestations of leptospirosis.* Rev Infect Dis 1991;**13**:705-709.
- Neves FO, Abreu PA, Vasconcellos SA, de Moraes ZM, Romero EC, Nascimento AL.** *Identification of a novel potential antigen for early-phase serodiagnosis of leptospirosis.* Arch Microbiol 2007;**188**:523-532.
- Niedermaier G, Wollanke B, Hoffmann R, Brem S, Gerhards H.** *Darstellung von Leptospiren im Glaskörper augengesunder und an ERU erkrankter Pferde mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie.* Dtsch Tierärztl Wochenschr 2006;**113**:418-422.
- Nizamuddin M, Tuteja U, Shukla J, Nair L, Sudarsana J.** *Early diagnosis of human leptospirosis by antigen detection in blood.* Indian J Med Microbiol 2006;**24**:343-345.
- Nolte FS.** *Novel internal controls for real-time PCR assays.* Clin Chem 2004;**50**:801-802.
- Noubade R, Krishnamurthy GV, Murag S, Venkatesha MD, Krishnappa G.** *Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospire by polymerase chain reaction.* Indian J Med Microbiol 2002;**20**:33-36.
- Núñez JF, Fajardo EM, Pérez E, Ontivero I, Silva D, Muñoz P.** *Evaluation of two different potency tests for leptospirosis vaccine vax-SPIRAL®.* Rev Cubana Med Trop 2005;**57**:67-68.
- Odontsetseg N, Boldbataar D, Mweene AS, Kida H.** *Serological prevalence of Leptospira interrogans serovar Bratislava in horses in Mongolia.* Vet Rec 2005;**157**:518-519.
- Özdemir V, Erol E.** *Leptospirosis in Turkey.* Vet Rec 2002;**150**:248-249.
- Oie S, Hironaga K, Koshiro A, Konishi H, Yoshii Z.** *In vitro susceptibilities of five Leptospira strains to 16 antimicrobial agents.* Antimicrob Agents Chemother 1983;**24**:905-908.
- Oie S, Koshiro A, Konishi H, Yoshii Z.** *In vitro evaluation of combined usage of fosfomycin and 5-fluorouracil for selective isolation of Leptospira species.* J Clin Microbiol 1986;**23**:1084-1087.
- OIE.** *Leptospirosis.* In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 5te Ed. OIE, Paris, Frankreich 2004;**1**:316-327.
- Okuda M, Sakai Y, Matsuuchi M, Oikawa T, Watanabe M, Itamoto K, Iwata H, Kano R, Hasegawa A, Onishi T, Inokuma H.** *Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of canine Leptospira antibodies using recombinant OmpL1 protein.* J Vet Med Sci 2005;**67**:249-254.
- Oliveira MA, Caballero OL, Neto ED, Koury MC, Romanha AJ, Carvalho J, Hartskeerl RA, Simpson AJ.** *Use of nondenaturing silver-stained polyacrylamide gel analysis of polymerase chain reaction amplification products for the differential diagnosis of Leptospira interrogans infection.* Diagn Microbiol Infect Dis 1995;**22**:343-348.
- Oliveira MA, Caballero OL, Vago AR, Hartskeerl RA, Romanha AJ, Pena SD, Simpson AJ, Koury MC.** *Low-stringency single specific primer PCR for identification of Leptospira.* J Med Microbiol 2003;**52**:127-135.

- Ooteman MC, Vago AR, Koury MC.** *Potential application of low-stringency single specific primer-PCR in the identification of Leptospira in the serum of patients with suspected leptospirosis.* Can J Microbiol 2004;**50**:1073-1079.
- Ooteman MC, Vago AR, Koury MC.** *Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis.* J Microbiol Methods 2006;**65**:247-257.
- Othman N, Intan HI, Yip CW, Alias M, Amran F.** *Severe leptospirosis with unusual manifestation.* J Trop Pedi 2007;**53**:55-58.
- Pacciarini ML, Savio ML, Tagliabue S, Rossi C.** *Repetitive sequences cloned from Leptospira interrogans serovar Hardjo genotype hardjoprajitno and their application to serovar identification.* J Clin Microbiol 1992;**30**:1243-1249.
- Padre LP, Watt G, Tuazon ML, Gray MR, Laughlin LW.** *A serologic survey of rice-field leptospirosis in Central Luzon, Philippines.* Southeast Asian J Trop Med Public Health 1988;**19**:197-199.
- Paglia DT, Miller PE, Dubielzig, RR.** *James Wardrop and equine recurrent uveitis.* Arch Ophthalmol 2004;**122**:1218-1223.
- Palaniappan RU, Chang YF, Jusuf SS, Artiushin S, Timoney JF, McDonough SP, Barr SC, Divers TJ, Simpson KW, McDonough PL, Mohammed HO.** *Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of Leptospira interrogans.* Infect Immun 2002;**70**:5924-5930.
- Palaniappan RU, Chang Y-F, Hassan F, McDonough SP, Pough M, Barr SC, Simpson KW, Mohammed HO, Shin S, McDonough P, Zuerner RL, Qu J, Roe B.** *Expression of leptospiral immunoglobulin-like protein by Leptospira interrogans and evaluation of its diagnostic potential in a kinetic ELISA.* J Med Microbiol 2004;**53**:975-984.
- Palaniappan RU, Chang YF, Chang C-F, Pan MJ, Yang CW, Harpending P, McDonough SP, Dubovi E, Divers T, Qu J, Roe B.** *Evaluation of lig-based conventional and real-time PCR for the detection of pathogenic leptospires.* Mol Cell Probes 2005;**19**:111-117.
- Palaniappan RU, McDonough SP, Divers TJ, Chen CS, Pan MJ, Matsumoto M, Chang YF.** *Immunoprotection of recombinant leptospiral immunoglobulin-like protein A against Leptospira interrogans serovar Pomona infection.* Infect Immun 2006;**74**:1745-1750.
- Palaniappan RU Ramanujam S, Chang YF.** *Leptospirosis: Pathogenesis, immunity and diagnosis.* Curr Opin Infect Dis 2007;**20**:284-292.
- Palmer MF, Zochowski WJ.** *Survival of leptospires in commercial blood culture systems revisited.* J Clin Pathol 2000;**53**:713-714.
- Palmer M, Waitkins SA, Zochowski W.** *Survival of leptospires in commercial blood culture systems.* Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg [A] 1984;**257**:480-487.
- Panaphut T, Domrongkitchaiporn S, Thinkamrop B.** *Prognostic factors of death in leptospirosis: A prospective cohort study in Khon Kaen, Thailand.* Int J Infect Dis 2002;**6**:52-59.
- Panaphut T, Domrongkitchaiporn S, Vibhagool A, Thinkamrop B, Susaengrat W.** *Ceftriaxone compared with sodium penicillin G for treatment of severe leptospirosis.* Clin Infect Dis 2003;**36**:1507-1513.

Literaturverzeichnis

- Panicker JN, Mammachan R, Jayakumar RV.** *Primary neuroleptospirosis.* Postgrad Med J 2001;**77**:589-590.
- Pappachan MJ, Mathew S, Aravindan KP, Khader A, Bharghavan PV, Kareem MM, Tuteja U, Shukla J, Batra HV.** *Risk factors for mortality in patients with leptospirosis during an epidemic in northern Kerala.* Natl Med J India 2004a;**17**:240-242.
- Pappachan MJ, Sheela M, Aravindan KP.** *Relation of rainfall pattern and epidemic leptospirosis in the Indian state of Kerala.* J Epidemiol Community Health 2004b;**58**:1054.
- Pappachan JM, Mathew S, Thomas B, Renjini K, Scaria CK, Shukla J.** *The incidence and clinical characteristics of the immune phase eye disease in treated cases of human leptospirosis.* Indian J Med Sci 2007;**61**:441-447.
- Pappas G, Cascio A.** *Optimal treatment of leptospirosis: Queries and projections.* Int J Antimicrobiol Agents 2006;**28**:491-496.
- Pappas G, Akritidis N, Christou L, Mastora M, Tsianos E.** *Unusual causes of reactive arthritis: Leptospira and Coxiella burnetti.* Clin Rheumatol 2003;**22**:343-346.
- Praditpornsilpa K, Sangjun N, Kittikowit W, Phulsuksombati D, Avihingsanon Y, Kansanabuch T, Tungsanga K, Eiam-Ong S.** *Alleviation of renal and pulmonary injury by immunomodulation in leptospirosis: hamster model.* J Med Assoc Thai 2006;**89 Suppl 2**:S178-187.
- Park YG, Gordon JC, Bech-Nielsen S, Slemons RD.** *Factors for seropositivity to leptospirosis in horses.* Prev Vet Med 1992;**13**:121-127.
- Parker TM, Murray CK, Richards AL, Samir A, Ismail T, Fadeel MA, Jiang J, Wasfy MO, Pimentel G.** *Concurrent infections in acute febrile illness patients in Egypt.* Am J Trop Med Hyg 2007;**77**:390-392.
- Parma AE, Santisteban CG, Villalba JS, Bowden RA.** *Experimental demonstration of an antigenic relationship between Leptospira and equine cornea.* Vet Immunol Immunopathol 1985;**10**:215-224.
- Parma AE, Fernandez AS, Santisteban CG, Bowden RA, Cerone SI.** *Tears and aqueous humor from horses inoculated with Leptospira contain antibodies which bind to cornea.* Vet Immunol Immunopathol 1987;**14**:181-185.
- Parma AE, Cerone SI, Sansinanea SA.** *Biochemical analysis by SDS-PAGE and Western blotting of the antigenic relationship between Leptospira and equine ocular tissues.* Vet Immunol Immunopathol 1992a;**33**:179-185.
- Parma AE, Cerone SI, Sansinanea SA, Ghezzi M.** *C3 fixed in vivo to cornea from horses inoculated with Leptospira interrogans.* Vet Immunol Immunopathol 1992b;**34**:181-187.
- Parma AE, Sanz ME, Lucchesi PM, Mazzonelli J, Petruccelli MA.** *Detection of an antigenic protein of Leptospira interrogans which shares epitopes with the equine cornea and lens.* Vet J 1997a;**153**:75-79.
- Parma AE, Seijo A, Lucchesi PM, Deodato B, Sanz ME.** *Differentiation of pathogenic and non-pathogenic leptospire by means of the polymerase chain reaction.* Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1997b;**39**:203-207.

- Paster BJ, Dewhirst FE.** *Phylogenetic foundation of spirochetes.* J Mol Microbiol Biotechnol 2000;**2**:341-344.
- Paster BJ, Dewhirst FE, Weisburg WG, Tordoff LA, Fraser GJ, Hespell RB, Stanton TB, Zablen L, Mandelco L, Woese CR.** *Phylogenetic analysis of the spirochetes.* J Bacteriol 1991;**173**:6101-6109.
- Patel BK, Gandhi SJ, Desai DC.** *Clinico-epidemiological aspects of leptospirosis in south Gujarat.* Indian J Med Microbiol 2006;**24**:323-325.
- Patterson SK, Singer RS.** *Development of a polymerase chain reaction assay for the detection of antibiotic resistance genes in community DNA.* J Vet Diagn Invest 2006;**18**:172-181.
- Peña-Moctezuma A de la, Bulach DM, Kalambaheti T, Adler B.** *Comparative analysis of the LPS biosynthetic loci of the genetic subtypes of serovar Hardjo: Leptospira interrogans subtype Hardjoprajitno and Leptospira borgpetersenii subtype Hardjobovis.* FEMS Microbiol Lett 1999;**177**:319-326.
- Peña-Moctezuma A de la, Bulach DM, Adler B.** *Genetic differences among the LPS biosynthetic loci of serovars of Leptospira interrogans and Leptospira borgpetersenii.* FEMS Immunol Med Microbiol 2001;**31**:73-81.
- Pereira MM, Da Silva JJ, Pinto MA, Da Silva MF, Machado MP, Lenzi HL, Marchevsky RS.** *Experimental Leptospirosis in marmoset monkeys (callithrix jacchus): A new model for studies of severe pulmonary leptospirosis.* Am J Trop Med Hyg 2005;**72**:13-20.
- Perolat P, Grimont F, Regnault B, Grimont PA, Fournie E, Thevenet H, Baranton G.** *rRNA gene restriction patterns of Leptospira: A molecular typing system.* Res Microbiol 1990;**141**:159-171.
- Perolat P, Lecuyer I, Postic D, Baranton G.** *Diversity of ribosomal DNA fingerprints of Leptospira serovars provides a database for subtyping and species assignation.* Res Microbiol 1993;**144**:5-15.
- Perolat P, Mérien F, Ellis WA, Baranton G.** *Characterization of Leptospira isolates from serovars hardjo by Ribotyping, arbitrarily primed PCR, and mapped restriction site polymorphisms.* J Clin Microbiol 1994;**32**:1949-1957.
- Perolat P, Chappel RJ, Adler B, Baranton G, Bulach DM, Billingham ML, Letocart M, Mérien F, Serrano MS.** *Leptospira fainei sp. nov., isolated from pigs in Australia.* Int J Syst Bacteriol 1998;**48**:851-858.
- Persing DH.** *Polymerase chain reaction: Trenches to benches.* J Clin Microbiol 1991;**29**:1281-1285.
- Petersen AM, Boye K, Blom J, Schlichting P, Krogfelt KA.** *First isolation of Leptospira fainei serovar Hurstbridge from two human patients with Weil's syndrome.* J Med Microbiol 2001;**50**:96-100.
- Petrino MG, Doetsch RN.** *'Viscotaxis', a new behavioural response of Leptospira interrogans (biflexa) strain B16.* J Gen Microbiol 1978;**109**:113-117.
- Picardeau M, Brenot A, Saint Girons I.** *First evidence for gene replacement in Leptospira spp. inactivation of L. biflexa flaB results in non-motile mutants deficient in endoflagella.* Mol Microbiol 2001;**40**:189-199.

Literaturverzeichnis

- Pietruschka G, Hergt R.** *Beitrag zur Leptospiroseuveitis.* Klin Monatsbl Augenheilkd 1974;**165**:279-285.
- Plank R, Dean D.** *Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of Leptospira spp. in humans.* Microbes Infect 2000;**2**:1265-1276.
- Postic D, Riquelme-Sertour N, Mérien F, Perolat P, Baranton G.** *Interest of partial 16S rDNA gene sequences to resolve heterogeneities between Leptospira collections: Application to L. meyeri.* Res Microbiol 2000;**151**:333-341.
- Powledge TM.** *The polymerase chain reaction.* Adv Physiol Educ 2004;**28**:44-50.
- Praditpornsilpa K, Sangjun N, Kittikowit W, Phulsuksombati D, Avihingsanon Y, Kansanabuch T, Tungsanga K, Eiam-Ong S.** *Alleviation of renal and pulmonary injury by immunomodulation in leptospirosis: Hamster model.* J Med Assoc Thai 2006;**89 Suppl 2**:S178-187.
- Prescott J.** *Treatment of leptospirosis.* Cornell Vet 1991;**81**:7-12.
- Prescott JF, McEwen B, Taylor J, Woods JP, Abrams-Ogg A, Wilcock B.** *Resurgence of leptospirosis in dogs in Ontario: Recent findings.* Can Vet J 2002;**43**:955-961.
- Priya CG, Bhavani K, Rathinam SR, Muthukkaruppan VR.** *Identification and evaluation of LPS antigen for serodiagnosis of uveitis associated with leptospirosis.* J Med Microbiol 2003;**52**:667-673.
- Pusterla N, Madigan JE, Leutenegger CM.** *Real-time polymerase chain reaction: A novel molecular diagnostic tool for equine infectious diseases.* J Vet Intern Med 2006;**20**:3-12.
- Qin JH, Sheng YY, Zhang ZM, Shi YZ, He P, Hu BY, Yang Y, Liu SG, Zhao GP, Guo XK.** *Genome-wide transcriptional analysis of temperature shift in L. interrogans serovar Lai strain 56601.* BMC Microbiol 2006;**6**:51.
- Ralph D, McClelland M, Welsh J, Baranton G, Perolat P.** *Leptospira species categorized by arbitrarily primed polymerase chain reaction (PCR) and by mapped restriction polymorphisms in PCR-amplified rRNA genes.* J Bacteriol 1993;**175**:973-981.
- Ramadass P, Jarvis BDW, Corner RJ, Penny D, Marshall RB.** *Genetic characterization of pathogenic Leptospira species by DNA hybridization.* Int J Syst Bacteriol 1992;**42**:215-219.
- Ramadass P, Meerarani S, Kumar AS, Venkatesha MD, Nachimuthu K.** *Rapid diagnosis of leptospirosis by polymerase chain reaction.* Indian Vet 1997;**74**:457-460.
- Ramirez SH, Fan S, Maguire CA, Perry S, Hardiek K, Ramkumar V, Gelbard HA, Dewhurst S, Maggirwar SB.** *Activation of adenosine A2A receptor protects sympathetic neurons against nerve growth factor withdrawal.* J Neurosci Res 2004;**77**:258-269.
- Rao AM.** *Preventive measures for leptospirosis: rodent control.* Indian J Med Microbiol 2006;**24**:326-328.
- Rathinam SR.** *Ocular leptospirosis.* Curr Opin Ophthalmol 2002;**13**:381-386.
- Rathinam SR.** *Ocular manifestations of leptospirosis.* J Postgrad Med 2005;**51**:189-194.

- Rathinam SR, Namperumalsamy P.** *Leptospirosis*. Ocul Immunol Inflamm 1999;**7**:109-118.
- Rathinam SR, Namperumalsamy P.** *Global variation and pattern changes in epidemiology of uveitis*. Indian J Ophthalmol 2007;**55**:173-183.
- Rathinam SR, Rathinam S, Selvaraj S, Dean D, Nozik RA, Namperumalsamy P.** *Uveitis associated with an epidemic outbreak of leptospirosis*. Am J Ophthalmol 1997;**124**:71-79.
- Rathinam SR, Namperumalsamy P, Cunningham ET.** *Spontaneous cataract absorption in patients with leptospiral uveitis*. Br J Ophthalmol 2000;**84**:1135-1141.
- Rathinamsivakumar, Ratnam S, Sureshbabu L, Natarajaseenivasan K.** *Leptospiral antibodies in patients with recurrent ophthalmic involvement*. Indian J Med Res 1996;**103**:66-68.
- Reitstetter RE.** *Development of species-specific PCR primer sets for the detection of Leptospira*. FEMS Microbiol Lett 2006;**264**:31-39.
- Rekhviashvili N, Stevens G, Scott L, Stevens W.** *Fluorogenic LUX primer for quantitation of HIV-1 by real-time RT-PCR*. Mol Biotechnol 2006;**32**:101-110.
- Ren SX, Fu G, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, Xu H, Zhang YX, Xiong H, Lu G, Lu LF, Jiang HQ, Jia J, Tu YF, Jiang JX, Gu WY, Zhang YQ, Cai Z, Sheng HH, Yin HF, Zhang Y, Zhu GF, Wan M, Huang HL, Qian Z, Wang SY, Ma W, Yao ZJ, Shen Y, Qiang BQ, Xia QC, Guo XK, Danchin A, Saint Girons I, Somerville RL, Wen YM, Shi MH, Chen Z, Xu JG, Zhao GP.** *Unique physiological and pathogenic features of Leptospira interrogans revealed by whole-genome sequencing*. Nature 2003;**422**:888-893
- Renesto P, Lorvellec-Guillon K, Drancourt M, Raoult D.** *RpoB gene analysis as a novel strategy for identification of spirochetes from the genera Borrelia, Treponema, Leptospira*. J Clin Microbiol 2000;**38**:2200-2203.
- Rentko VT, Clark N, Ross LA, Schelling SH.** *Canine leptospirosis. A retrospective study of 17 cases*. J Vet Intern Med 1992;**6**:235-244.
- Resch G, Awad-Masalmeh M, Bakoss P, Jareková J.** *Utility of phylogenetic studies in the identification of Leptospira strains*. Epidemiol Infect 2007;**21**:1-8.
- Ribotta MJ, Higgins R, Gottschalk M, Lallier R.** *Development of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of leptospiral antibodies in dogs*. Can J Vet Res 2000;**64**:32-37.
- Ricaldi JN, Vinetz JM.** *Leptospirosis in the tropics and in travelers*. Curr Infect Dis Rep 2006;**8**:51-58.
- Richardson DJ, Gauthier JL.** *A serosurvey of leptospirosis in Connecticut peridomestic wildlife*. Vector Borne Zoonotic Dis 2003;**3**:187-193.
- Richtzenhain LJ, Cortez A, Heinemann MB, Soares RM, Sakamoto SM, Vasconcellos SA, Higa ZM, Scarcelli E, Genovez ME.** *A multiplex PCR for the detection of Brucella spp. and Leptospira spp. DNA from aborted bovine fetuses*. Vet Microbiol 2002;**87**:139-147.
- Rimpau W.** *Eine Einteilung der Leptospirosen*. Klin Wochenschr 1942;**21**:342-343.

Literaturverzeichnis

- Rimpau W.** *Leptospirose beim Pferd (Periodische Augenentzündung).* Tierärztl Umschau 1947;**2**:177-178.
- RKI.** *Leptospirose.* Epidemiologisches Bulletin 1998;**2**:7-9.
- RKI.** *Leptospirose als importierte Erkrankung aus der Dominikanischen Republik.* Epidemiologisches Bulletin 2001;**27**:198.
- RKI.** *Leptospirose.* Epidemiologisches Bulletin 2005;**28**:239-241.
- RKI.** *Leptospirose bei zwei Sportlern nach Triatlons in Baden-Württemberg.* Epidemiologisches Bulletin 2006;**38**:329.
- RKI.** *Fallbericht: Leptospirose unter dem Bild eines Multiorganversagens nach Rattenbiss.* Epidemiologisches Bulletin 2007;**9**:73-74.
- Roberts SJ.** *Sequelae of leptospirosis in horses on a small farm.* J Am Vet Med Assoc 1958;**133**:189-194.
- Roberts SJ, York CJ, Robinson JW.** *An outbreak of leptospirosis in horses on a small farm.* J Am Vet Med Assoc 1952;**121**:237-242.
- Rocha T, Ellis WA, Montgomery J, Gilmore C, Regalla J, Brem S.** *Microbiological and serological study of leptospirosis in horses at slaughter: First isolations.* Res Vet Sci 2004;**76**:199-202.
- LaRocque RC, Breiman RF, Ari MD, Morey RE, Janan FA, Hayes JM, Hossain MA, Brooks WA, Levett PN.** *Leptospirosis during dengue outbreak, Bangladesh.* Emerg Infect Dis 2005;**11**:766-769.
- Roda L.** *Anticardiolipin antibodies and severe leptospirosis.* Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2003;**45**:55.
- Rohrbach BW, Ward DA, Hendrix DV, Cawrse-Foss M, Moyers TD.** *Effect of vaccination against leptospirosis on the frequency, days to recurrence and progression of disease in horses with equine recurrent uveitis.* Vet Ophthalmol 2005;**8**:171-179.
- Romeike A, Brüggemann M, Drommer W.** *Immunohistochemical studies in equine recurrent uveitis (ERU).* Vet Pathol 1998;**35**:515-526.
- Romero EC, Billerbeck AE, Lando VS, Camargo ED, Souza CC, Yasuda PH.** *Detection of Leptospira DNA in patients with aseptic meningitis by PCR.* J Clin Microbiol 1998;**36**:1453-1455.
- Romero EC, Yasuda PH.** *Molecular characterization of Leptospira sp. strains isolated from human subjects in São Paulo, Brazil using a polymerase chain reaction-based assay: A public health tool.* Mem Inst Oswaldo Cruz 2006;**101**:373-378.
- Rossetti CA, Liem M, Samartino LE, Hartskeerl RA.** *Buenos Aires, a new Leptospira serovar of serogroup Djasiman, isolated from an aborted dog fetus in Argentina.* Vet Microbiol 2005;**107**:241-248.
- Rothova A, de Boer JH, Ten Dam-van Loon NH, Postma G, de Visser L, Zuurveen SJ, Schuller M, Weersink AJ, van Loon AM, de Groot-Mijnes JD.** *Usefulness of Aqueous Humor Analysis for the Diagnosis of Posterior Uveitis.* Ophthalmology 2008;**115**:306-311.

- Rowen GE.** *Leptospiral uveitis.* AMA Arch Ophthalmol 1957;**58**:754-757.
- De Rozieres S, Mathiason CK, Rolston MR, Chatterji U, Hoover EA, Elder JH.** *Characterization of a highly pathogenic molecular clone of feline immunodeficiency virus clade C.* J Virol 2004;**78**:8971-8982.
- Ruano G, Pagliaro EM, Schwartz TR, Lamy K, Messina D, Gaensslen RE, Lee HC.** *Heat-soaked PCR: an efficient method for DNA amplification with applications to forensic analysis.* Biotechniques 1992;**13**:266-274.
- Rubin SJ, Perlman S, Ellinghausen HC.** *Isolation of Leptospira biflexa from commercially prepared deionized water labeled „sterile for tissue culture“.* J Clin Microbiol 1980;**12**:121-123.
- Rudenko N, Golovchenko M, Nemeč J, Volkaert J, Mallatova N, Grubhoffer L.** *Improved method of detection and molecular typing of Borrelia burgdorferi sensu lato in clinical samples by polymerase chain reaction without DNA purification.* Folia Microbiol (Praha) 2005;**50**:31-39.
- Rugman FP, Pinn G, Palmer MF, Waite M, Hay CR.** *Anticardiolipin antibodies in leptospirosis.* J Clin Pathol 1991;**44**:517-519.
- Ruiz VM, Vega LE, Velázquez RM.** *Use of polymerase chain reaction for the identification of Leptospira sp. in urine of carriers.* Rev Cubana Med Trop 2005;**57**:47-48.
- Russell KL, Montiel Gonzalez MA, Watts DM, Lagos-Figueroa RC, Chauca G, Ore M, Gonzalez JE, Moron C, Tesh RB, Vinetz JM.** *An outbreak of leptospirosis among Peruvian military recruits.* Am J Trop Med Hyg 2003;**69**:53-57.
- Rutledge RG, Côté C.** *Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves.* Nucleic Acids Res 2003;**31**:e93.
- Ryan TJ, Marshall RB, Edwards JD, Stevenson BJ.** *Isolation of leptospires from the vitreous humor of aborted piglets.* NZ Vet J 1977;**25**:352.
- Ryu E.** *The Influence of CO₂ Supply on Colonial Formation of Leptospire.* Can J Comp Med Vet Sci 1963;**27**:261-266.
- Salaün L, Mérien F, Gurianova S, Baranton G, Picardeau M.** *Application of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of the agent of leptospirosis.* J Clin Microbiol 2006;**44**:3954-3962.
- Salkade HP, Divate S, Deshpande JR, Kawishwar V, Chaturvedi R, Kandalkar BM, Vaideeswar P.** *A study of sutopsy findings in 62 cases of Leptospirosis in a metropolitan city in India.* J Postgrad Med 2005;**51**:169-173.
- Sambasiva RR, Naveen G, Bhalla P, Agarwal SK.** *Leptospirosis in India and the rest of the world.* Braz J Infect Dis 2003;**7**:178-193.
- Sambrook J, Russel DW.** *Molecular cloning: A laboratory manual.* 3rd ed. Cold Spring Harbor Press, NY, USA 2001.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** *Molecular cloning: A laboratory manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor Press, NY, USA 1989.

Literaturverzeichnis

- Sanders EJ, Rigau-Pérez JG, Smits HL, Deseda CC, Vorndam VA, Aye T, Spiegel RA, Weyant RS, Bragg SL.** Increase of leptospirosis in dengue-negative patients after a hurricane in Puerto Rico in 1966. *Am J Trop Med Hyg* 1999;**61**:399-404.
- Sandmeyer LS, Grahn BH, Breaux CB.** Diagnostic ophthalmology: Anterior and posterior uveitis with inflammatory retinal detachment, most likely secondary to equine recurrent uveitis. *Can Vet J* 2007;**48**:97-98.
- Sanford SE, Morris PJ.** Serological titers to various leptospiral serovars before and after vaccinating gilts with three commercial vaccines. *Can Vet J* 1990;**31**:277-279.
- Santa Rosa CA, Sulzer CR, Giorgi W, da Silva AS, Yanaguaita RM, Lobao AO.** Leptospirosis in wildlife in Brazil: isolation of a new serotype in the pyrogenes group. *Am J Vet Res* 1975;**36**:1363-1365.
- Santiago M, Martinelli R, Ko A, Reis EA, Fontes RD, Nascimento EG, Pierangeli S, Espinola R, Gharavi A.** Anti-beta2 glycoprotein I and anticardiolipin antibodies in leptospirosis, syphilis and Kala-azar. *Clin Exp Rheumatol* 2001;**19**:425-430.
- Santiago M, Martinelli R, Reis MG, Reis EA, Ko A, Fontes RD, Silva MP, Nascimento EG, de Jesus R, Pierangeli S, Espinola R, Gharavi A.** Diagnostic performance of anti-beta2 glycoprotein I and anticardiolipin assays for clinical manifestations of the antiphospholipid syndrome. *Clin Rheumatol* 2004;**23**:485-489.
- Santiago MB, Martinelli R, Reis MG, Reis EA, Ko A, Fontes RD, Silva MP, Nascimento EG, Espinola R, Harris N, Gharavi A, Pierangeli S.** Frequency of antiphospholipid antibodies in patients with infectious diseases using three different ELISA methods. *J Bras Patol Med Lab* 2006;**42**:13-17.
- Sarkar G, Kapelner S, Sommer SS.** Formamide can dramatically improve the specificity of PCR. *Nucleic Acids Res* 1990;**18**:7465.
- Savio ML, Rossi C, Fusi P, Tagliabue S, Pacciarini ML.** Detection and identification of *Leptospira interrogans* serovars by PCR coupled with restriction endonuclease analysis of amplified DNA. *J Clin Microbiol* 1994;**32**:935-941.
- Scarcelli E, Piatti RM, Fedullo JD, Simon F, Cardoso MV, Castro V, Miyashiro S, Genovez ME.** *Leptospira* spp. detection by polymerase chain reaction (PCR) in clinical samples of captive black-capped capuchin monkey (*cebus apella*). *Braz J Microbiol* 2003;**34**:143-146.
- Schneeweiß W, Stanek C, Wagner M, Hein I.** Inhibitor-free DNA for real-time PCR analysis of synovial fluid from horses, cattle and pigs. *Vet Microbiol* 2007;**121**:189-193.
- Schoone GJ, Everard CO, Korver H, Carrington DG, Inniss VA, Baulu J, Terpstra WJ.** An immunoprotective monoclonal antibody directed against *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *J Gen Microbiol* 1989;**135**:73-78.
- Schröppel B, He JC.** Expression of Toll-like receptors in the kidney: Their potential role beyond infection. *Kidney Int* 2006;**69**:785-787.
- Schönberg A.** Studies on the effect of antibiotic substances on leptospire and their cultivation from material with a high bacterial count. *Zentralbl Bakteriologie A* 1981;**249**:400-406.

- Schönberg A, Ortmann G, Reetz J, Luge E, Richtzenhain LJ, Cortez A, Vasconcellos SA, Brem S.** Positive PCR for *Leptospira* spp. in a sow from German herd presenting animals with MAT titres for *Leptospira interrogans* serovar Bratislava. *Arq Inst Biol Sao Paulo* 2005;**72**:117-120.
- Schwink KL.** Equine Uveitis. *Vet Clin North Am Equine Pract* 1992;**8**:557-574.
- La Scola B, Bui LT, Baranton G, Khamis A, Raoult D.** Partial *rpoB* gene sequencing for identification of *Leptospira* species. *FEMS Microbiol Lett* 2006;**263**:142-147.
- Segers RP, van der Drift A, de Nijs A, Corcione P, van der Zeijst BA, Gaastra W.** Molecular analysis of a sphingomyelinase C gene from *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. *Infect Immun* 1990;**58**:2177-2185.
- Segers RP, van Gestel JA, van Eys GJ, van der Zeijst BA, Gaastra W.** Presence of putative sphingomyelinase genes among members of the family Leptospiraceae. *Infect Immun* 1992;**60**:1707-1710.
- Segura ER, Ganoza CA, Campos K, Ricaldi JN, Torres S, Silva H, Céspedes MJ, Matthias MA, Swancutt MA, Liñán RL, Gotuzzo E, Guerra H, Gilman RH, Vinetz JM.** Clinical spectrum of pulmonary involvement in leptospirosis in a region of endemicity, with quantification of leptospiral burden. *Clin Infect Dis* 2005;**40**:343-351.
- Sehgal SC.** Epidemiological patterns of leptospirosis. *Indian J Med Microbiol* 2006;**24**:310-311.
- Sehgal SC, Murhekar MV, Sugunan AP.** Outbreak of leptospirosis with pulmonary involvement in north Andaman. *Indian J Med Res* 1995;**102**:9-12.
- Sehgal SC, Sugunan AP, Murhekar MV, Sharma S, Vijayachari P.** Randomized controlled trial of doxycycline prophylaxis against leptospirosis in an endemic area. *Int J Antimicrob Agents* 2000;**13**:249-255.
- Sehgal SC, Sugunan AP, Vijayachari P.** Outbreak of leptospirosis after the cyclone in Orissa. *Natl Med J India* 2002;**15**:22-23.
- Seijo A, Coto H, San Juan J, Videla J, Deodato B, Cernigoi B, Messina OG, Colliá O, de Bassadoni D, Shtirbu R, Olenchuk A, de Mazzonelli GD, Parma A.** Lethal leptospiral pulmonary hemorrhage: an emerging disease in Buenos Aires, Argentina. *Emerg Infect Dis* 2002;**8**:1004-1005.
- Seixas FK, Fernandes CH, Hartwig DD, Conceicao FR, Aleixo JA, Dellagostin OA.** Evaluation of different ways of presenting LipL32 to the immune system with the aim of developing a recombinant vaccine against leptospirosis. *Can J Microbiol* 2007;**53**:472-479.
- Sejvar J, Bancroft E, Winthrop K, Bettinger J, Bajani M, Bragg S, Shutt K, Kaiser R, Marano N, Popovic T, Tappero J, Ashford D, Mascola L, Vugia D, Perkins B, Rosenstein N.** Leptospirosis in „Eco-Challenge“ athletes, Malaysian Borneo, 2000. *Emerg Infect Dis* 2003;**9**:702-707.
- Setubal JC, Reis M, Matsunaga J, Haake DA.** Lipoprotein computational prediction in spirochaetal genomes. *Microbiology* 2006;**152**:113-121.
- Shalit I, Barnea A, Shahar A.** Efficacy of ciprofloxacin against *Leptospira interrogans* serogroup icterohaemorrhagiae. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;**33**:788-789.

Literaturverzeichnis

- Shang ES, Exner MM, Summers TA, Martinich C, Champion CI, Hancock RE, Haake DA.** *The rare outer membrane protein, OmpL1, of pathogenic Leptospira species is a heat-modifiable porin.* Infect Immun 1995;**63**:3174-3181.
- Shang ES, Summers TA, Haake DA.** *Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic Leptospira species.* Infect Immun 1996;**64**:2322-2330.
- Shaw RD.** *Kayaking as a risk factor for leptospirosis.* Mo Med 1992;**89**:354-357.
- Shenberg E.** *Growth of pathogenic Leptospira in chemically defined media.* J Bacteriol 1967;**93**:1598-1606.
- Shimizu T, Matsusaka E, Nagakura N, Takayanagi K, Masuzawa T, Iwamoto Y, Morita T, Mifuchi I, Yanagihara Y.** *Chemical properties of lipopolysaccharide-like substance (LLS) extracted from Leptospira interrogans serovar Canicola strain Moulton.* Microbiol Immunol 1987a;**31**:717-725.
- Shimizu T, Matsusaka E, Takayanagi K, Masuzawa T, Iwamoto Y, Morita T, Mifuchi I, Yanagihara Y.** *Biological activities of lipopolysaccharide-like substance (LLS) extracted from Leptospira interrogans serovar Canicola strain Moulton.* Microbiol Immunol 1987b;**31**:727-735.
- Shinji Y, Tsukui T, Tatsuguchi A, Shinoki K, Kusunoki M, Suzuki K, Hiratsuka T, Wada K, Futagami S, Miyake K, Gudis K, Sakamoto C.** *Induced microsomal PGE synthase-1 is involved in cyclooxygenase-2-dependent PGE2 production in gastric fibroblasts.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2005;**288**:G308-315.
- Shivakumar S, Krishnakumar B.** *Diagnosis of leptospirosis - role of MAT.* J Assoc Physicians India 2006;**54**:338.
- Shpilberg O, Shaked Y, Maier MK, Samra D, Samra Y.** *Long-term follow-up after leptospirosis.* South Med J 1990;**83**:405-407.
- Silva EF, Brod CS, Cerqueira GM, Bourscheidt D, Seyffert N, Queiroz A, Santos CS, Ko AI, Dellagostin OA.** *Isolation of Leptospira noguchii from sheep.* Vet Microbiol 2007;**121**:144-149.
- Silva MV, Camargo ED, Batista L, Vaz AJ, Brandão AP, Nakamura PM, Negrão JM.** *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 1995;**98**:268-272.
- Da Silva MV, Nakamura PM, Camargo ED, Batista L, Vaz AJ, Romero EC, Brandao AP.** *Immunodiagnosis of human leptospirosis by dot-ELISA for the detection of IgM, IgG, and IgA antibodies.* Am J Trop Med Hyg 1997;**56**:650-655.
- Singh SS, Vijayachari P, Sinha A, Sugunan AP, Rasheed MA, Sehgal SC.** *Clinico-epidemiological study of hospitalized cases of severe leptospirosis.* Indian J Med Res 1999;**109**:94-99.
- Slack AT, Symonds ML, Dohnt MF, Smythe LD.** *Identification of pathogenic Leptospira species by conventional or real-time PCR and sequencing of the DNA gyrase subunit B encoding gene.* BMC Microbiol 2006a;**6**:95.

- Slack A, Symonds M, Dohnt M, Smythe L.** *An improved multiple-locus variable number of tandem repeats analysis for Leptospira interrogans serovar Australis: A comparison with fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis and its use to redefine the molecular epidemiology of this serovar in Queensland, Australia.* J Med Microbiol 2006b;**55**:1549-1557.
- Slack AT, Symonds ML, Dohnt MF, Smythe LD.** *The epidemiology of leptospirosis and the emergence of Leptospira borgpetersenii serovar Arborea in Queensland, Australia, 1998-2004.* Epidemiol Infect 2006c;**134**:1217-1225.
- Slack A, Symonds M, Dohnt M, Harris C, Brookes D, Smythe L.** *Evaluation of modified TaqMan™ assay detecting pathogenic Leptospira spp. against culture and Leptospira-specific IgM enzyme-linked immunosorbent assay in a clinical environment.* Diagn Microbiol Infect Dis 2007a;**57**:361-366.
- Slack AT, Symonds ML, Dohnt MF, Corney BG, Smythe LD.** *Epidemiology of Leptospira weilii serovar Topaz infections in Australia.* Commun Dis Intell 2007b;**31**:216-22.
- Sleight SD, Williams JA.** *Transmission of bovine leptospirosis.* J Am Vet Med Assoc 1961;**138**:151-152.
- Sleight SD, Atallah OA, Steinbauer DJ.** *Experimental Leptospira Pomona infection in bulls.* Am J Vet Res 1964;**25**:1663-1668.
- Smith RE, Williams IA, Kingsbury ET.** *Serologic evidence of equine leptospirosis in the northeast United States.* Cornell Vet 1976;**66**:105-109.
- Smits HL.** *The potential use of the leptospiral major outer membrane lipoprotein LipL32 in the diagnosis of leptospirosis.* J Postgrad Med 2005;**51**:168.
- Smits HL, Van Der Hoorn MA, Goris MG, Gussenhoven GC, Yersin C, Sasaki DM, Terpstra WJ, Hartskeerl RA.** *Simple latex agglutination for rapid serodiagnosis of human leptospirosis.* J Clin Microbiol 2000;**38**:1272-1275.
- Smythe L, Dohnt M, Norris M, Symonds M, Scott J.** *Review of leptospirosis notifications in Queensland 1985 to 1996.* Commun Dis Intell 1997;**21**:17-20.
- Smythe LD, Smith IL, Smith GA, Dohnt MF, Symonds ML, Barnett LJ, McKay DB.** *A quantitative PCR (TaqMan™) assay for pathogenic Leptospira spp.* BMC Infect Dis 2002a;**2**:13.
- Smythe LD, Field HE, Barnett LJ, Smith CS, Dohnt MF, Symonds ML, Moore MR, Rolfe PF.** *Leptospiral antibodies in flying foxes in Australia.* J Wildl Dis 2002b;**38**:182-186.
- Songer JG, Thiermann AB.** *Leptospirosis.* J Am Vet Med Assoc 1988;**193**:1250-1254.
- Sonnier C, Branger C, Michel V, Ruvoën-Clouet N, Ganière JP, André-Fontaine G.** *Evidence of cross-protection within Leptospira interrogans in an experimental model.* Vaccine 2000;**19**:86-94.
- De Souza AL.** *Neuroleptospirosis: Unexplored and overlooked.* Indian J Med Res 2006;**124**:125-128.
- Sova Z.** *Eine akute, durch Leptospira Grippotyphosa hervorgerufene Infektionskrankheit der Pferde.* Zentralbl Bakteriol [Orig] 1964a;**193**:224-238.

Literaturverzeichnis

- Sova Z.** *Febris Grippytyphosa bei Pferden, inapparente Infektionen und Iridozyklochorioiditis.* Zentralbl Bakteriol [Orig] 1964b;**193**:239-248.
- Sova Z.** *Die Beziehung leptospiröser Infektionen bei Pferden zur Iridocyklochorioiditis recidiva.* Zentralbl Bakteriol [Orig] 1965;**197**:100-110.
- Sperhake JP, Schulz F.** *Tod eines Wassersportlers durch Leptospirose.* Rechtsmedizin 2006;**16**:156-160.
- Spichler A, Spichler E, Moock M, Vinetz JM, Leake JA.** *Acute pancreatitis in fatal anicteric leptospirosis.* Am J Trop Med Hyg 2007;**76**:886-887.
- Spieß BM.** *Zur equinen rezidivierenden Uveitis (ERU).* Schweiz Arch Tierheilkd 1997;**139**:126-133.
- Srinivas R, Agarwal R, Gupta D.** *Severe sepsis due to severe falciparum malaria and leptospirosis co-infection treated with activated protein C.* Malar J 2007;**6**:42.
- Sritharan M, Asuthkar S, Sridhar V.** *Understanding iron acquisition by pathogenic leptospire: A review.* Indian J Med Microbiol 2006;**24**:312-316.
- Srivastava SK.** *Prospects of developing leptospiral vaccines for animals.* Indian J Med Microbiol 2006;**24**:332-336.
- Srivastava SK, Chaudhuri P, Thangapandian E, Mariya R, Amutha R.** *Evaluation of recombinant Leptospira interrogans serovar Canicola outer membrane proteins as diagnostic antigen.* Indian J Med Microbiol 2006;**24**:347-348.
- Stalheim OH.** *Leptospiral lysis by lipids of renal tissue and milk.* J Bacteriol 1965;**89**:545.
- Stalheim OH.** *Effects of antimicrobial agents on leptospiral growth, respiration, motility, and viability.* Am J Vet Res 1966;**27**:797-802.
- Staneck JL, Henneberry RC, Cox CD.** *Growth requirements of pathogenic Leptospira.* Infect Immun 1973;**7**:886-897.
- Steffens F, Landwehrs A, Göke MN.** *Leptospirose nach Thailand-Aufenthalt.* Dtsch Med Wochenschr 2006;**131**:1521-1524.
- Stimson AF.** *Note of an organism found in yellow-fever tissue.* Public Health Rep 1907;**22**:541.
- Straube M.** *Vorkommen von Leptospiren in Tierbeständen zoologischer Gärten.* Inaugural-Dissertation, Justus-Liebig Universität, Gießen, 2007.
- Stuart RD.** *The preparation and use of a simple culture medium for Leptospirae.* J Pathol Bacteriol 1946;**58**:343-349.
- Sturman RM, Laval J, Weil VJ.** *Leptospiral uveitis.* AMA Arch Ophthalmol 1959;**61**:153-160.
- Sugathan S, Varghese TP.** *Multiplex PCR on leptospiral isolates from Kolenchery, Kerala, India.* Indian J Med Microbiol 2005;**23**:114-116.

- Sunbul M, Esen S, Leblebicioglu H, Hokelek M, Pekbay A, Eroglu C.** *Rattus norvegicus* acting as reservoir of *Leptospira interrogans* in the Middle Black Sea region of Turkey, as evidenced by PCR and presence of serum antibodies to *Leptospira* strain. *Scand J Infect Dis* 2001;**33**:896-898.
- Surujoballi O, Mallory M.** An indirect enzyme linked immunosorbent assay for the detection of bovine antibodies to multiple *Leptospira* serovars. *Can J Vet Res* 2004;**68**:1-6.
- Suttinont C, Losuwanaluk K, Niwatayakul K, Hoontrakul S, Intaranongpai W, Silpasakorn S, Suwancharoen D, Panlar P, Saisongkorh W, Rolain JM, Raoult D, Suputtamongkol Y.** Causes of acute, undifferentiated, febrile illness in rural Thailand: Results of a prospective observational study. *Ann Trop Med Parasitol* 2006;**100**:363-370.
- Suwimonteerabutr J, Chaicumpa W, Saengjaruk P, Tapchaisri P, Chongsa-nguan M, Kalambaheti T, Ramasoota P, Sakolvaree Y, Virakul P.** Evaluation of a monoclonal antibody-based dot-blot ELISA for detection of *Leptospira* spp. in bovine urine samples. *Am J Vet Res* 2005;**66**:762-766.
- Suzuki A, Kumashiro R, Shirachi M, Kuroki M, Suzuki H, Tanikawa K, Sata M.** Markedly prolonged jaundice from simultaneous infection with hepatitis E virus and *Leptospira*. *Kurume Med J* 2003;**50**:155-159.
- Swain RH.** Electron microscopic studies of the morphology of pathogenic spirochaetes. *J Pathol Bacteriol* 1955;**69**:117-132.
- Swapna RN, Tuteja U, Nair L, Sudarsana J.** Seroprevalence of leptospirosis in high risk groups in Calicut, North Kerala, India. *Indian J Med Microbiol* 2006;**24**:349-352.
- Swart KS, Calvert K, Meney C.** The prevalence of antibodies to serovars of *Leptospira interrogans* in horses. *Aust Vet J* 1982;**59**:25-27.
- Szemes PA, Gerhards H.** Untersuchungen zur Prävalenz der equinen rezidivierenden Uveitis im Großraum Köln-Bonn. *Prakt Tierarzt* 2000;**81**:408-420.
- Szeredi L, Haake DA.** Immunohistochemical identification and pathologic findings in natural cases of equine abortion caused by leptospiral infection. *Vet Pathol* 2006;**43**:755-761.
- Tahiliani P, Mohan KM, Chandu D, Kumar A, Nagaraj C, Nandi D.** Gel purified LipL32: A prospective antigen for detection of leptospirosis. *J Postgrad Med* 2005;**51**:164-168.
- Tajiki H, Salomao R.** Association of plasma levels of tumor necrosis factor alpha with severity of disease and mortality among patients with leptospirosis. *Clin Infect Dis* 1996;**23**:1177-1178.
- Takafuji ET, Kirkpatrick JW, Miller RN, Karwacki JJ, Kelley PW, Gray MR, McNeill KM, Timboe HL, Kane RE, Sanchez JL.** An efficacy trial of doxycycline chemoprophylaxis against leptospirosis. *N Engl J Med* 1984;**310**:497-500.
- Takashima I, Ngoma M, Hashimoto N.** Antimicrobial effects of a new carboxyquinolone drug, Q-35, on five serogroups of *Leptospira interrogans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;**37**:901-902.
- Talpada MD, Garvey N, Sprowls R, Eugster AK, Vinetz JM.** Prevalence of leptospiral infection in Texas cattle: Implications for transmission to humans. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2003;**3**:141-147.

Literaturverzeichnis

- Tamai T, Sada E, Kobayashi Y.** *Restriction endonuclease DNA analysis of Leptospira interrogans serovars Icterohaemorrhagiae and Copenhageni.* Microbiol Immunol 1988;**32**:887-894.
- Tansuphasiri U, Chanthadee R, Phulsuksombati D, Sangjun N.** *Development of a duplex-polymerase chain reaction for rapid detection of pathogenic Leptospira.* Southeast Asian J Trop Med Public Health 2006a;**37**:297-308.
- Tansuphasiri U, Thipsuk C, Phulsuksombati D, Chanyasanha C.** *Duplex PCR-hybridization based detection of pathogenic Leptospira in environmental water samples obtained from endemic areas in northeast region of Thailand.* Southeast Asian J Trop Med Public Health 2006b;**37**:729-741.
- Tantitanawat S, Tanjatham S.** *Prognostic factors associated with severe leptospirosis.* J Med Assoc Thai 2003;**86**:925-931.
- Tattevin P, Dupeux S, Hoff J.** *Leptospirosis and the antiphospholipid syndrome.* Am J Med 2003;**114**:164.
- Taylor MJ, Ellis WA, Montgomery JM, Yan KT, McDowell SW, Mackie DP.** *Magnetic immuno capture PCR assay (MIPA): Detection of Leptospira borgpetersenii serovar Hardjo.* Vet Microbiol 1997;**56**:135-145.
- Teo IA, Choi JW, Morlese J, Taylor G, Shaunak S.** *LightCycler qPCR optimisation for low copy number target DNA.* J Immunol Methods 2002;**270**:119-133.
- Terpstra WJ.** *Historical perspectives in leptospirosis.* Indian J Med Microbiol 2006;**24**:317-320.
- Terpstra WJ, Ligthart GS, Schoone GJ.** *Serodiagnosis of human leptospirosis by enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA).* Zentralbl Bakteriell A 1980;**247**:400-405.
- Terpstra WJ, Ligthart GS, Schoone GJ.** *ELISA for the detection of specific IgM and IgG in human leptospirosis.* J Gen Microbiol 1985;**131**:377-385.
- Thai KT, Binh TQ, Giao PT, Phuong HL, Hung LQ, Nam NV, Nga TT, Goris MG, De Vries PJ.** *Seroepidemiology of leptospirosis in southern vietnamese children.* Trop Med Int Health 2006;**11**:738-745.
- Theodoridis D.** *Entwicklung eines ELISA zur Serodiagnose der Leptospirose und einer PCR zum direkten Nachweis des Erregers.* Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Hochschule, Hannover, 2004.
- Theodoridis D, Böhmer J, Homuth M, Strutzberg-Minder K.** *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 2005;**57**:49-50.
- Theodoridis D, Schwarz S, Kietzmann M, Strutzberg-Minder K.** *In-vitro susceptibility testing of Leptospira by a modified broth microdilution methods.* Berl Münch Tierärztl Wochenschr 2007;**120**:50-60.
- Thiermann AB.** *The Norway rat as a selective chronic carrier of Leptospira icterohaemorrhagiae.* J Wildl Dis 1981;**17**:39-43.
- Thiermann AB.** *Experimental leptospiral infections in pregnant cattle with organisms of the Hebdomadis serogroup.* Am J Vet Res 1982;**43**:780-784.

- Thiermann AB.** *Bovine leptospirosis: bacteriologic versus serologic diagnosis of cows at slaughter.* Am J Vet Res 1983;**44**:2244-2245.
- Thiermann AB.** *Isolation of leptospire in diagnosis of leptospirosis.* Mod Vet Pract 1984;**65**:758-759.
- Thiermann AB, Handsaker AL.** *Experimental infection of calves with Leptospira interrogans serovar Hardjo: Conjunctival versus intravenous route of exposure.* Am J Vet Res 1985;**46**:329-331.
- Thomas DD, Higbie LM.** *In vitro association of leptospire with host cells.* Infect Immun 1990;**58**:581-585.
- Thurau S.** *Praktische Hinweise zur Gewinnung und erfolgreichen Aufbereitung von Vorderkammerpunktat und Vitrektomiematerial.* Ophthalmologie 2003;**100**:802-807.
- Torten M, Ben-Efraim S, Shenberg E, Beemer AM, Van Der Hoeden J.** *Experimental induction of ocular reaction resembling post leptospiral ophthalmia and its relation to skin reactions and circulating antibodies.* Clin Exp Immunol 1967;**2**:573-580.
- Townsend WM, Stiles J, Krohne SG.** *Leptospirosis and panuveitis in a dog.* Vet Ophthalmol 2006;**9**:169-173.
- Tracz DM, Backhouse PG, Olson AB, McCrear JK, Walsh JA, Ng LK, Gilmour MW.** *Rapid detection of Vibrio species using liquid microsphere arrays and real-time PCR targeting the ftsZ locus.* J Med Microbiol 2007;**56**:56-65.
- Trejejo RT, Rigau-Perez JG, Ashford DA, McClure EM, Jarquin-Gonzalez C, Amador JJ, de los Reyes JO, Gonzalez A, Zaki SR, Shieh WJ, McLean RG, Nasci RS, Weyant RS, Bolin CA, Bragg SL, Perkins BA, Spiegel RA.** *Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995.* J Infect Dis 1998;**178**:1457-1463.
- Trowbridge AA, Green JB, Bonnett JD, Shohet SB, Ponnappa BD, McCombs WB.** *Hemolytic anemia associated with leptospirosis. Morphologic and lipid studies.* Am J Clin Pathol 1981;**76**:493-498.
- Truccolo J, Serais O, Mérien F, Perolat P.** *Following the course of human leptospirosis: evidence of a critical threshold for the vital prognosis using a quantitative PCR assay.* FEMS Microbiol Lett 2001;**204**:317-321.
- Truccolo J, Charavay F, Mérien F, Perolat P.** *Quantitative PCR assay to evaluate ampicillin, ofloxacin, and doxycycline for treatment of experimental leptospirosis.* Antimicrobiol Agents Chemother 2002;**46**:848-853.
- Trueba GA, Bolin CA, Zuerner RL.** *Characterization of the periplasmic flagellum proteins of Leptospira interrogans.* J Bacteriol 1992;**174**:4761-4768.
- Trueba G, Zapata S, Madrid K, Cullen P, Haake D.** *Cell aggregation: A mechanism of pathogenic Leptospira to survive in fresh water.* Int Microbiol 2004;**7**:35-40.
- Trueba G.** *Epidemiological interpretation of fingerprinting profiles from leptospiral isolates.* Lett Appl Microbiol 2006;**42**:432-433.
- Tsuchimoto M, Niikura M, Ono E, Kida H, Yanagawa R.** *Leptospiral attachment to cultured cells.* Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg [A] 1984;**258**:268-274.

Literaturverzeichnis

- Tumilowicz JJ, Alexander AD, Stafford K.** *On the contamination of cell cultures by Leptospira biflexa.* In Vitro 1974;**10**:238-42.
- Turhan V, Cavuslu S.** *Leptospirosis is still a mortal infection in even today's world.* Scand J Infect Dis 2006;**38**:746.
- Turner LH.** *Leptospirosis. 3. Maintenance, isolation and demonstration of leptospire.* Trans R Soc Trop Med Hyg 1970;**64**:623-646.
- Uzal FA, Dobrenov B, Smythe L, Norris M, Dohnt M, Symonds M, O'Boyle D, Schouten F, Kelly WR.** *A study of "white spotted kidneys" in cattle.* Vet Microbiol 2002;**86**:369-375.
- Velineni S, Asuthkar S, Sritharan M.** *Iron limitation and expression of immunoreactive outer membrane proteins in Leptospira interrogans serovar Icterohaemorrhagiae strain Lai.* Indian J Med Microbiol 2006;**24**:339-342.
- Veloso IF, Lopes MT, Salas CE, Moreira EC.** *A comparison of three DNA extractive procedures with Leptospira for polymerase chain reaction analysis.* Mem Inst Oswaldo Cruz 2000;**95**:339-343.
- Vemulapalli R, Langohr IM, Sanchez A, Kiupel M, Bolin CA, Wu CC, Lin TL.** *Molecular detection of Leptospira kirschneri in tissues of a prematurely born foal.* J Vet Diagn Invest 2005;**17**:67-71.
- Verma A, Artiushin S, Matsunaga J, Haake DA, Timoney JF.** *LruA and LruB, novel lipoproteins of pathogenic Leptospira interrogans associated with equine recurrent uveitis.* Infect Immun 2005;**73**:7259-7266.
- Verma A, Hellwage J, Artiushin S, Zipfel PF, Kraiczy P, Timoney JF, Stevenson B.** *LfhA, a novel factor H-binding protein of Leptospira interrogans.* Infect Immun 2006;**74**:2659-2666.
- Verma BB, Biberstein EL, Meyer ME.** *Serologic survey of leptospiral antibodies in horses in California.* Am J Vet Res 1977;**38**:1443-1444.
- Vernel-Pauillac F, Mérien F.** *Proinflammatory and immunomodulatory cytokine mRNA time course profiles in hamsters infected with a virulent variant of Leptospira interrogans.* Infect Immun 2006;**74**:4172-4179.
- Vijayachari P, Ahmed N, Sugunan AP, Ghousunnissa S, Rao KR, Hasnain SE, Sehgal SC.** *Use of fluorescent amplified length polymorphism for molecular epidemiology of leptospirosis in India.* J Clin Microbiol 2004;**42**:3575-3580.
- Vijayachari P, Sehgal SC.** *Recent advances in the laboratory diagnosis of leptospirosis and characterisation of leptospire.* Indian J Med Microbiol 2006;**24**:321-322.
- Vinetz JM.** *Leptospirosis.* Curr Opin Infect Dis 1997;**10**:357-361.
- Vinetz JM.** *Leptospirosis.* Curr Opin Infect Dis 2001;**14**:527-538.
- Vinetz JM.** *A mountain out of a molehill: do we treat acute leptospirosis, and if so, with what?* Clin Infect Dis 2003;**36**:1514-1515.
- Vinetz JM.** *Leptospirosis is everywhere, just have to know what to look for. But how?* Swiss Med Wkly 2004;**134**:331-332.

- Vinetz JM, Glass GE, Flexner CE, Mueller P, Kaslow DC.** *Sporadic urban leptospirosis.* Ann Intern Med 1996;**125**:794-798.
- Vinh T, Faine S, Adler B.** *Adhesion of leptospires to mouse fibroblasts (L929) and its enhancement by specific antibody.* J Med Microbiol. 1984;**18**:73-85.
- Vinh T, Adler B, Faine S.** *Glycolipoprotein cytotoxin from Leptospira interrogans serovar Copenhageni.* J Gen Microbiol 1986;**132**:111-123.
- Vinh T, Faine S, Handley CJ, Adler B.** *Immunochemical studies of opsonic epitopes of the lipopolysaccharide of Leptospira interrogans serovar hardjo.* FEMS Immunol Med Microbiol 1994;**8**:99-107.
- Viriyakosol S, Matthias MA, Swancutt MA, Kirkland TN, Vinetz JM.** *Toll-like receptor 4 protects against lethal Leptospira interrogans serovar Icterohaemorrhagiae infection and contributes to in vivo control of leptospiral burden.* Infect Immun 2006;**74**:887-895.
- Visith S, Kearkiat P.** *Nephropathy in leptospirosis.* J Postgrad Med 2005;**51**:184-188.
- Vitale M, Vitale F, Di Marco V, Currò V, Vesco G, Caracappa S.** *Polymerase chain reaction method for leptospirosis, analysis on samples from an autochthon swine population in Sicily, Italy.* Rev Cubana Med Trop 2005a;**57**:25-27.
- Vitale M, Vitale F, Reale S, Vesco G, Currò V, Caracappa S.** *Comparison of different DNA extraction and polymerase chain reaction methods to detect Leptospira spp. on field samples.* Rev Cubana Med Trop 2005b;**57**:51-52.
- Voß HJ.** *Bericht zur 57. Tagung der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft vom 3. bis 5. September 1951 in Heidelberg.* Ophthalmologica 1952;**124**:113-114.
- Wada S, Yoshinari M, Katayama Y, Anzai T, Wada R, Akuzawa M.** *Nonulcerative keratouveitis as a manifestation of leptospiral infection in a horse.* Vet Ophthalmol 2003;**6**:191-195.
- Wächtler M, Sigl H, Brem S, Kaboth W, Thomsen R, Hörwick E, Hain N, Hatz H, Kopp J, Döring W, Meyer P, Kopp H, Rothenberger W, Eichenlaub D.** *Update: Leptospirose in Oberbayern.* Immun Infekt 1998;**2**:60-63.
- Wagenaar JA, Segers RP, Van der Zeijst BA.** *Rapid and specific detection of pathogenic Leptospira species by amplification of ribosomal sequences.* Mol Biotechnol 1994;**2**:1-14.
- Wagenaar J, Zuerner RL, Alt D, Bolin CA.** *Comparison of polymerase chain reaction assays with bacteriologic culture, immunofluorescence, and nucleic acid hybridization for detection of Leptospira borgpetersenii serovar Hardjo in urine of cattle.* Am J Vet Res 2000;**61**:316-320.
- Wagner B, Brandt K, Sheoran A, Holmes MA, Deegen E, Leibold W.** *Nachweis von Immunglobulinisotypen im Glaskörper als Beitrag zur Ätiologie der equinen rezidivierenden Uveitis.* Dtsch Tierärztl Wochenschr 1997;**104**:467-470.
- Wang B, Sullivan J, Sullivan GW, Mandell GL.** *Interaction of leptospires with human polymorphonuclear neutrophils.* Infect Immun 1984a;**44**:459-464.

Literaturverzeichnis

- Wang B, Sullivan JA, Sullivan GW, Mandell GL.** *Role of specific antibody in interaction of leptospire with human monocytes and monocyte-derived macrophages.* Infect Immun 1984b;**46**:809-813.
- Wangroongsarb P, Chanket T, Gunlabun K, Long DH, Satheanmethakul P, Jetanadee S, Thaipadungpanit J, Wuthiekanun V, Peacock SJ, Blacksell SD, Smythe LD, Bulach DM, Kalambaheti T.** *Molecular typing of Leptospira spp. based on putative O-antigen polymerase gene (wzy), the benefit over 16S rRNA gene sequence.* FEMS Microbiol Lett 2007;**271**:170-179.
- Ward MP.** *Seasonality of canine leptospirosis in the United States and Canada and its association with rainfall.* Prev Vet Med 2002;**56**:203-213.
- Ward MP, Guptill LF, Wu CC.** *Evaluation of environmental risk factors for leptospirosis in dogs: 36 cases (1997-2002).* J Am Vet Med Assoc 2004;**225**:72-77.
- Watt G.** *Leptospirosis.* Curr Opin Infect Dis 1997;**10**:149-152.
- Watt G, Padre LP, Tuazon ML, Calubaquib C, Santiago E, Ranoa CP, Laughlin LW.** *Placebo-controlled trial of intravenous penicillin for severe and late leptospirosis.* Lancet 1988;**1**:433-435.
- Watt G, Jongsakul K, Suttinont C.** *Possible scrub typhus coinfections in Thai agricultural workers hospitalized with leptospirosis.* Am J Trop Med Hyg 2003;**68**:89-91.
- Weese JS.** *A review of equine zoonotic diseases: Risks in veterinary medicine.* AAEP Proceedings 2002;**48**:362-369.
- Wenz M, Gorissen B, Wieshammer S.** *Weill's syndrome with bone marrow involvement after collecting walnuts.* Dtsch Med Wochenschr 2001;**126**:1132-1135.
- Werry H, Gerhards H.** *Zur operativen Therapie der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU).* Tierärztl Prax 1992;**20**:178-186.
- Werts C, Tapping RI, Mathison JC, Chuang TH, Kravchenko V, Saint Girons I, Haake DA, Godowski PJ, Hayashi F, Ozinsky A, Underhill DM, Kirschning CJ, Wagner H, Aderem A, Tobias PS, Ulevitch RJ.** *Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism.* Nat Immunol 2001;**2**:346-352.
- WHO.** *Leptospirosis worldwide, 1999.* Wkly Epidemiol Rec 1999;**74**:237-242.
- WHO.** *Human leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control.* International Leptospirosis Society. World Health Organization, Geneva, 2003.
- Wiedbrauk DL, Werner JC, Drevon AM.** *Inhibition of PCR by aqueous and vitreous fluids.* J Clin Microbiol 1995;**33**:2643-2646.
- Williams RD, Morter RL, Freeman MJ, Lavignette AM.** *Experimental chronic uveitis: Ophthalmic signs following equine leptospirosis.* Invest Ophthalmol 1971;**10**:948-954.
- Winslow WE, Merry DJ, Pirc ML, Devine PL.** *Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin M antibody in diagnosis of human leptospiral infection.* J Clin Microbiol 1997;**35**:1938-1942.

- Wisssdorf H, Gerhards H, Huskamp B, Deegen E.** *Praxisorientierte Anatomie und Propädeutik des Pferdes*. 2te Ed. M. & H. Schaper, Alfeld, Hannover, 2002;**3.6.1**:148.
- Witmer R.** *Periodic ophthalmia in horses*. Am J Ophthalmol 1954a;**37**:243-253.
- Witmer RH.** *Experimental leptospiral uveitis in rabbits*. AMA Arch Ophthalmol 1954b;**53**:547-559.
- Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP.** *Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification*. Biotechniques 1997;**22**:130-139.
- Wiwanitkit V.** *Predicted epitopes of Lig A of Leptospira interrogans by bioinformatics method: A clue for further vaccine development*. Vaccine 2007;**25**:2768-2770.
- Wolgemuth CW, Charon NW, Goldstein SF, Goldstein RE.** *The flagellar cytoskeleton of the spirochetes*. J Mol Microbiol Biotechnol 2006;**11**:221-227.
- Wollanke B.** *Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) als intraokulare Leptospirose*. Habilitationsschrift, Ludwig-Maximilians Universität, München, 2002.
- Wollanke B, Gerhards H, Brem S, Kopp H, Meyer P.** *Intraokulare und Serumantikörper gegen Leptospiren bei 150 wegen equiner rezidivierender Uveitis (ERU) vitrektomierten Pferden*. Berl Münch Tierärztl Wochenschr 1998;**111**:134-139.
- Wollanke B, Gerhards H, Brem S, Wolf E, Kopp H, Meyer P.** *Zur Leptospirenätiologie der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU)*. Tierärztl Prax 2000;**28**:153-158.
- Wollanke B, Rohrbach BW, Gerhards H.** *Serum and vitreous humor antibody titers in and isolation of Leptospira interrogans from horses with recurrent uveitis*. J Am Vet Med Assoc 2001;**219**:795-800.
- Wollanke B, Gerhards H, Brem S, Meyer P, Kopp H.** *Ätiologie der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU): Autoimmunkrankheit oder intraokulare Leptospireninfektion?* Pferdeheilkunde 2004a;**20**:327-340.
- Wollanke B, Brem S, Meyer P, Forbrig T, Grassl P, Gerhards H, Kopp H.** *Prophylaxe der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU): Erste Erfahrungen mit einem Leptospiren-Impfstoff bei Pferden*. Pferdeheilkunde 2004b;**20**:447-454.
- Wongsrichanalai C, Murray CK, Gray M, Miller RS, McDaniel P, Liao WJ, Pickard AL, Magill AJ.** *Co-infection with malaria and leptospirosis*. Am J Trop Med Hyg 2003;**68**:583-585.
- Woo TH, Patel BK, Smythe LD, Symonds ML, Norris MA, Dohnt MF.** *Comparison of two PCR methods for rapid identification of Leptospira genospecies interrogans*. FEMS Microbiol Lett 1997a;**155**:169-177.
- Woo TH, Patel BK, Smythe LD, Symonds ML, Norris MA, Dohnt MF.** *Identification of pathogenic Leptospira genospecies by continuous monitoring of fluorogenic hybridization probes during rapid-cycle PCR*. J Clin Microbiol 1997b;**35**:3140-3146.
- Woo TH, Patel BK, Smythe LD, Norris MA, Symonds ML, Dohnt MF.** *Identification of pathogenic Leptospira by TaqMan™ probe in a LightCycler*. Anal Biochem 1998;**256**:132-134.

Literaturverzeichnis

- Woo TH, Patel BK, Cinco M, Smythe LD, Norris MA, Symonds ML, Dohnt MF, Piispanen J.** *Identification of Leptospira biflexa by real-time homogeneous detection of rapid cycle PCR product.* J Microbiol Methods 1999;**35**:23-30.
- Wood RM, Davis GR.** *The correlation of periodic ophthalmia with Leptospira agglutinins in horses.* Am J Ophthalmol 1950;**33**:961-962.
- Woodward MJ, Redstone JS.** *Differentiation of Leptospira serovars by the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism.* Vet Rec 1993;**132**:325-326.
- Wuthiekanun V, Chierakul W, Limmathurotsakul D, Smythe LD, Symonds ML, Dohnt MF, Slack AT, Limpai boon R, Suputtamongkol Y, White NJ, Day NP, Peacock SJ.** *Optimization of culture of Leptospira from Humans with leptospirosis.* J Clin Microbiol 2007;**45**:1363-1365.
- Yager RH, Gochenour WS, Wetmore PW.** *Recurrent iridocyclitis (periodic ophthalmia) of horses; agglutination and lysis of leptospiras by serums deriving from horses affected with recurrent iridocyclitis.* J Am Vet Med Assoc 1950;**117**:207-209.
- Yan Y, Chen Y, Liou W, Ding J, Chen J, Zhang J, Zhang A, Zhou W, Gao Z, Ye X, Xiao Y.** *An evaluation of the serological and epidemiological effects of the outer envelope vaccine to Leptospira.* J Chin Med Assoc 2003;**66**:224-230.
- Yang CW.** *Leptospirosis renal disease: Understanding the initiation by Toll-like receptors.* Kidney Int 2007;**72**:918-925.
- Yang CW, Wu MS, Pan MJ, Hong JJ, Yu CC, Vandewalle A, Huang CC.** *Leptospira outer membrane protein activates NF- κ B and downstream genes expressed in medullary thick ascending limb cells.* J Am Soc Nephrol 2000;**11**:2017-2026.
- Yang CW, Wu MS, Pan MJ, Hsieh WJ, Vandewalle A, Huang CC.** *The Leptospira outer membrane protein LipL32 induces tubulointerstitial nephritis-mediated gene expression in mouse proximal tubule cells.* J Am Soc Nephrol 2002;**13**:2037-2045.
- Yang CW, Hung CC, Wu MS, Tian YC, Chang CT, Pan MJ, Vandewalle A.** *Toll-like receptor 2 mediates early inflammation by leptospiral outer membrane proteins in proximal tubule cells.* Kidney Int 2006;**69**:815-822.
- Yang HL, Zhu YZ, Qin JH, He P, Jiang XC, Zhao GP, Guo XK.** *In silico and microarray-based genomic approaches to identify potential vaccine candidates against Leptospira interrogans.* BMC Genomics 2006;**7**:293.
- Yasuda BH, Steigerwalt AG, Sulzer LR, Kauhmann AF, Rogers F, Brenner DJ.** *Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with proposals for seven new Leptospira species.* Int J Syst Bacteriol 1987;**37**:407-415.
- Yersin C, Bovet P, Mérien F, Wong T, Panowsky J, Perolat P.** *Human leptospirosis in the Seychelles (Indian Ocean): A population-based study.* Am J Trop Med Hyg 1998;**59**:933-940.
- Yersin C, Bovet P, Smits HL, Perolat P.** *Field evaluation of a one-step dipstick assay for the diagnosis of human leptospirosis in the Seychelles.* Trop Med Int Health 1999;**4**:38-45.

- Yersin C, Bovet P, Mérien F, Clement J, Laille M, Van Ranst M, Perolat P.** *Pulmonary haemorrhage as a predominant cause of death in leptospirosis in Seychelles.* Trans R Soc Trop Med Hyg 2000;**94**:71-76.
- Yoshimori RN, Goldberg HS, Blendin DC.** *Cephalothin in the treatment of experimental leptospirosis in hamsters.* Antimicrobial Agents Chemother (Bethesda) 1965;**5**:450-452.
- Younes-Ibrahim M, Burth P, Faria MV, Buffin-Meyer B, Marsy S, Barlet-Bas C, Cheval L, Doucet A.** *Inhibition of Na,K-ATPase by an endotoxin extracted from Leptospira interrogans: A possible mechanism for the physiopathology of leptospirosis.* CR Acad Sci III 1995;**318**:619-625.
- Younes-Ibrahim M, Buffin-Meyer B, Cheval L, Burth P, Castro-Faria MV, Barlet-Bas C, Marsy S, Doucet A.** *Na,K-ATPase: a molecular target for Leptospira interrogans endotoxin.* Braz J Med Biol Res 1997a;**30**:213-223.
- Younes-Ibrahim M, Burth P, Castro-Faria M, Cheval L, Buffin-Meyer B, Marsy S, Doucet A.** *Effect of Leptospira interrogans endotoxin on renal tubular Na,K-ATPase and H,K-ATPase activities.* Ann NY Acad Sci 1997b;**834**:684-686.
- Yuri K, Takamoto Y, Okada M, Hiramune T, Kikuchi N, Yanagawa R.** *Chemotaxis of leptospire to hemoglobin in relation to virulence.* Infect Immun 1993;**61**:2270-2272.
- Zaki SR, Shieh WJ.** *Leptospirosis associated with outbreak of acute febrile illness and pulmonary haemorrhage, Nicaragua, 1995. The Epidemic Working Group at Ministry of Health in Nicaragua.* Lancet 1996;**347**:535-536.
- Zhang XY, Yu Y, He P, Zhang YX, Hu BY, Yang Y, Nie YX, Jiang XG, Zhao GP, Guo XK.** *Expression and comparative analysis of genes encoding outer membrane proteins LipL21, LipL32 and OmpL1 in epidemic leptospire.* Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 2005;**37**:649-656.
- Zochowski WJ, Palmer MF, Coleman TJ.** *An evaluation of three commercial kits for use as screening methods for the detection of leptospiral antibodies in the UK.* J Clin Pathol 2001;**54**:25-30.
- Zou Y, Guo X, Picardeau M, Xu H, Zhao G.** *A comprehensive survey on isoleucine biosynthesis pathways in seven epidemic Leptospira interrogans reference strains of China.* FEMS Microbiol Lett 2007;**269**:90-96.
- Zuerner RL, Bolin CA.** *Differentiation of Leptospira interrogans isolates by IS1500 hybridization and PCR assay.* J Clin Microbiol 1997;**35**:2612-2617.
- Zuerner RL, Knudtson W, Bolin CA, Trueba G.** *Characterization of outer membrane and secreted proteins of Leptospira interrogans serovar Pomona.* Microb Pathog 1991;**10**:311-322.
- Zuerner RL, Herrmann JL, Saint Girons I.** *Comparison of genetic maps for two Leptospira interrogans serovars provides evidence for two chromosomes and intra species heterogeneity.* J Bacteriol 1993;**175**:5445-5451.
- Zuerner RL, Haake D, Adler B, Segers R.** *Technological advances in the molecular biology of Leptospira.* J. Mol Microbiol Biotechnol 2000;**2**:455-462.

Danksagung

Frau PD. Dr. Wollanke aus der Pferdeklinik der Ludwig-Maximilians-Universität, München, danke ich im Besonderen für ihr Vertrauen, mir ein so schönes Thema zu überlassen. Vielen Dank für die wertvollen Gespräche und die von der ganzen Pferdeklinik gewährte Unterstützung.

Meinem Mentor Herrn Prof. Dr. Büttner vom Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Oberschleißheim danke ich für die fachliche Beratung und jederzeit gewährte Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit. Herrn Dr. Barth danke ich für die Möglichkeit, am LGL angestellt zu werden. Allen Mitarbeitern des LGL danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft. Frau PD. Dr. Hafner-Marx und ihrem Team danke ich für die gewährte Ablenkung in der Pathologiehalle. Herrn Dr. Kopp und Herrn Dr. Raschel bzw. dem gesamten Team um Herrn PD. Dr. Dr. Rinder danke ich für ihre ungeteilte Aufmerksamkeit und das ehrliche Interesse. Bei Herrn Dr. Busch und seinem Team möchte ich mich bedanken, mir ihr Labor für das Klonieren zur Verfügung gestellt zu haben sowie für die bereitwillige und freundliche Unterstützung in meinem Vorhaben. Schließlich danke ich allen Mitarbeitern des F. und E. Labores, für die hervorragende Einarbeitung, konstruktive Kritik und freundschaftliche Atmosphäre.

Herrn Prof. Dr. Wolf, Leiter des Institutes für molekulare Tierzucht und Biotechnologie der LMU, München, danke ich für die Möglichkeit, unter der hervorragenden Betreuung von Herrn Dr. Klymiuk die Technik des Klonierens von PCR-Produkten am Moor- und Versuchsgut in Oberschleißheim erlernen zu dürfen. Allen Beteiligten danke ich für die freundliche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Küchenhoff vom Institut für Statistik der LMU, München, gilt mein Dank, mir die Möglichkeit der statistischen Beratung gewährleistet zu haben. Herrn Höhle, Ph.D., danke ich für seine geduldige und fachliche Hilfe bei der Auswertung der Daten der Standardkurve der qPCR.

Freunden und Bekannten, die mir auf irgendeine Weise bei dieser Arbeit geholfen haben, möchte ich für ihr Zuvorkommen danken.

Ein herzliches Dankeschön geht an meine Familie, die mich während des Studiums und der anschließenden Durchführung dieser Arbeit immer unterstützt hat.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Alexandra Helena Roczek
16.06.1981 geboren in Karlsruhe
Familienstand: ledig
Eltern: Dr. med. Stefan Roczek,
Facharzt für Orthopädie
Ludmilla Roczek, geb. Swietoslawski,
Krankenschwester
zwei ältere Brüder: Andrej, Meisterkoch
Steffen, Schauspieler

Ausbildungsweg:

Juni 2000 Abitur am Albertus-Magnus-Gymnasium,
Ettlingen
Oktober 2000 - Studium der Veterinärmedizin an der
Februar 2006 Ludwig-Maximilians-Universität,
München
März 2006 Approbation als Tierärztin
April 2006 - Promotionsvorhaben zum Dr. med. vet. an der
Februar 2008 Ludwig-Maximilians-Universität,
München

Beruflicher Werdegang:

Mai 2006 - technische Angestellte am Bayerischen Landesamt
September 2007 für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit,
Oberschleißheim
seit November 2007 Assistentin der Kleintierklinik Berthold Menzel,
Recklinghausen