

Aus der Medizinischen Tierklinik
Lehrstuhl für Innere Medizin der kleinen Haustiere und Heimtiere
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Katrin Hartmann

Angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Katrin Hartmann

Leptospirose bei Hunden in Süddeutschland

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

von
Vera Geisen
aus Mertloch

München 2009

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

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. J. Braun
Referentin:	Univ.-Prof. Dr. K. Hartmann
Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. Straubinger

Tag der Promotion: 17. Juli 2009

Meinen Eltern und Geschwistern

Inhaltsverzeichnis:

I. Einleitung	1
II. Literaturübersicht.....	2
1. Ätiologie der caninen Leptospirose	2
1.1. Morphologie der Leptospiren.....	2
1.2. Tenazität.....	3
1.3. Taxonomie.....	3
1.2.1. Serologische Klassifizierung.....	4
1.2.2. Molekulargenetische Klassifizierung.....	4
2. Epidemiologie der caninen Leptospirose	6
2.1. Wirtsspektrum und Reservoir.....	6
2.2. Übertragung.....	9
2.3. Geographische Verbreitung	10
2.4. Bedeutung als Zoonose	11
3. Pathogenese der caninen Leptospirose	12
3.1. Virulenzfaktoren	13
3.2. Organmanifestation	14
3.2. Krankheitsverlauf.....	16
4. Diagnose der caninen Leptospirose	17
4.1. Direkter Erregernachweis.....	18
4.1.1. Mikroskopischer Erregernachweis.....	18
4.1.2. Kultureller Nachweis	19
4.1.3. Polymerase-Kettenreaktion	21
4.2. Indirekte Nachweismethoden.....	22
4.2.1. Mikroagglutinationstest	23
4.2.2. Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay.....	26
III. Kapitel I: Canine leptospirosis infections – clinical signs and outcome with different suspected <i>Leptospira</i> serogroups (42 cases)	29

IV. Kapitel II: Epidemiologische Situation der Leptospirose beim Hund in Süddeutschland	35
V. Diskussion	42
VI. Zusammenfassung	49
VII. Summary	51
VIII. Literaturverzeichnis	53
IX. Anhang.....	70
Lebenslauf.....	70
Danksagung	72

Abkürzungen

ALT	Alaninaminotransferase (alanine aminotransferase)
ALP	Alkalische Phosphatase (alkaline phosphatase)
°C	Grad Celsius
d. h.	das heißt
DIC	disseminierte intravasale Koagulopathie (disseminated intravascular coagulopathy)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay
et al.	„et alii“ - und andere
IS	Insertionssequenz
kDA	kilo-Dalton
<i>L.</i>	<i>Leptospira</i>
Lip	Lipoprotein
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LPS	Lipopolysaccharide
M	Michigan
MAT	Mikroagglutinationstest
n	number of samples (Anzahl der Proben)
NJ	New Jersey
Omp	outer membrane protein
p	Wahrscheinlichkeit
PCR	Polymerasekettenreaktion
Prof.	Professor
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
S.	Serovar
sp., spp.	species (Spezies)
TNF	Tumor Nekrose Faktor
U/l	units per liter (Maßeinheiten pro Liter)
USA	United States of America (Vereinigte Staaten von Amerika)
µl	Mikroliter
v. a.	vor allem
WHO	World Health Organization
z. B.	zum Beispiel

I. Einleitung

Leptospirose ist eine weltweit auftretende Zoonose (LEVETT, 2001; GOLDSTEIN et al., 2006). Sie wird durch Spirochäten des Genus *Leptospira* (*L.*) hervorgerufen, das mehr als 200 Serovare besitzt (LEVETT, 2001). Die pathogenetische Bedeutung der einzelnen Serovare ist nicht bekannt (BALDWIN & ATKINS, 1987). Bis etwa 1960 trat die Leptospirose bei Hunden in Deutschland, hervorgerufen durch die Serovare (*S.*) *copenhageni* und *canicola*, relativ häufig mit den Symptomen einer akuten oder subakuten Hepatitis und/oder eines Nierenversagens auf (BROWN et al., 1996). Seitdem weitflächig bivalente, serovar-spezifische Impfstoffe gegen *L. copenhageni* und *canicola* in Europa und den USA eingesetzt werden, hat die Prävalenz der caninen Leptospirose deutlich abgenommen (RENTKO et al., 1992). Diese Impfstoffe induzieren jedoch keine Immunität gegen Serovare, die anderen Serogruppen angehören. In den letzten fünfzehn Jahren trat die Leptospirose in Deutschland trotz Impfung wieder vermehrt auf. Auch in der Humanmedizin ist sie kürzlich in die Klasse der „reemerging infectious diseases“ aufgenommen worden (MESLIN, 1997; LEVETT, 2001; JANSEN et al., 2005). Vermutlich wird die Bedeutung und Häufigkeit der Leptospirose beim Hund daher unterschätzt.

Ziel dieser kumulativen Arbeit, die zwei Publikationen umfasst, war eine retrospektive Auswertung der Krankenakten von 337 Hunden mit klinischem Verdacht einer Leptospirose, die in der Zeit von Januar 1990 bis Dezember 2004 in der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität in München vorgestellt wurden und deren Seren auf Antikörper gegen acht Leptospiren-Serovare untersucht wurden. Dabei wurden die ätiologischen Serovare der 42 Hunde mit der Diagnose „Leptospirose“ bezüglich Anamnese, klinischer Symptome, Laborveränderungen und Überlebenszeit verglichen. Weiterhin wurde ermittelt, gegen welche Serovare in der Hundepopulation in Süddeutschland hauptsächlich Antikörper vorhanden sind, ob es diesbezüglich Rasse-, Geschlechts- oder Altersprädispositionen gibt und ob dieselben Serovare auch bei den Hunden vorkommen, die an Leptospirose erkrankt sind.

II. Literaturübersicht

1. Ätiologie der caninen Leptospirose

Die klinischen Symptome der Leptospirose wurden 1886 das erste Mal beschrieben (WEIL, 1886). Zwei Jahre später wurde die Erkrankung nach ihrem Entdecker als „Weil'sche Erkrankung“ benannt (FIEDLER, 1988).

1.1. Morphologie der Leptospiren

Leptospiren sind gramnegative, helikal gewundene, bewegliche Schraubenbakterien mit hakenförmig eingebogenen oder knopfartig verdickten Enden. Sie haben einen Durchmesser von 0,1 – 0,2 μm und, je nach Anzahl der Windungen, eine Länge von 6 – 20 μm (ZUELZER, 1918; KATHE & MOCHMANN, 1967; PLANC & DEAN, 2000; LEVETT, 2001). Die Leptospiren bestehen aus zwei zentralen Axialfilamenten, die sich, ohne zu überlappen, von beiden Enden gegen die Mitte der Zelle ausdehnen (CZEKALOWSKI & EAVES, 1955; BIRCH-ANDERSON et al., 1973). Um die Achsenfilamente sind eine Protoplasmaspirale sowie eine zytoplasmatische Hülle gewickelt. Da eines oder beide der Enden der Leptospiren gebogen sind, kommt eine „kleiderbügel-“ oder „spazierstockähnliche“ Form zustande (FAINE & VALENTINE, 1984). Leptospiren haben aufgrund ihrer Struktur und Beweglichkeit ein typisches Erscheinungsbild im Phasenkontrast- und Dunkelfeldmikroskop (LEVETT, 2001). Die Bakterien sind aktiv beweglich und können sich um ihre eigene Achse drehen sowie spiralförmige Vor- und Rückwärtsbewegungen durchführen (ZUELZER, 1918; SELBITZ, 2006). Die Lipopolysaccharide der Hülle sind ähnlich der anderer gram-negativer Bakterien zusammengesetzt, haben jedoch eine niedrigere endotoxische Aktivität (LANGSTON & HEUTER, 2003; GREENE et al., 2006; SELBITZ, 2006).

Leptospiren sind obligat aerobe Bakterien, die Spezialmedien und -bedingungen zur Kultivierung benötigen, jedoch nicht so schwierig anzuzüchten und am Leben zu erhalten sind wie *Treponema*- und *Borrelia*-Arten (LANGSTON & HEUTER, 2003; GREENE et al., 2006; SELBITZ, 2006). Die optimale Wachstumstemperatur für Leptospiren liegt bei 28 bis 30 °C, Vermehrung ist jedoch auch zwischen 13 und 40 °C möglich. Diese Vorliebe erklärt das typische Auftreten der Leptospirose in den späten Sommer- und Herbstmonaten (SIMPSON et al., 1998).

Um das Überleben in der Umwelt zu gewährleisten, wurde eine Mindesttemperatur von 18 °C ermittelt (ZUELZER, 1918; KATHE & MOCHMANN, 1967; PLANC & DEAN, 2000; LEVETT, 2001). Leptospiren können ihren Energie- und Kohlenstoffbedarf nur aus Fettsäuren und Alkoholen beziehen. Weiterhin benötigen sie Fettsäuren als Substrat für den Aufbau der Zytoplasmamembran, da langkettige Fettsäuren selbst nicht neu synthetisiert werden können (PLANC & DEAN, 2000; LEVETT, 2001). Die Vermehrung erfolgt durch Zweiteilung bei einer Generationszeit von sieben bis zwölf Stunden. Das Wachstum ist meist sehr langsam, und die Kultivierung dauert teilweise bis zu 13 Wochen (LEVETT, 2001).

1.2. Tenazität

Die Tenazität der Leptospiren ist insgesamt sehr gering. Bei feuchter Umgebung, leicht alkalischem pH-Wert und Temperaturen über 18 °C sind sie in der Lage, im Boden bis zu sechs Wochen und im Wasser über drei Monate zu überleben (SIMPSON et al., 1998).

Leptospiren sind gegen Austrocknung und pH-Werte unter 6,8 oder über 8,0 sehr empfindlich. Aus diesem Grund geht vom sauren Urin der Carnivoren ein geringeres Infektionsrisiko aus als von dem leicht alkalischen Urin der Herbivoren. Da jedoch, je nach Wassergehalt des Erdreiches, der Urin oft rasch verdünnt wird und sich so die Bedingungen für die Leptospiren verbessern, können die Leptospiren auch über den sauren Harn der Fleischfresser verbreitet werden (FAINE et al., 1999; PLANC & DEAN, 2000). Twigg und Mitarbeiter (1969) stellten eine positive Korrelation zwischen dem Wassergehalt des Bodens und der Befallsrate von Mäusen mit Leptospirosen fest (TWIGG et al., 1969).

Bei Körpertemperaturen von 41 – 42 °C gehen die Leptospiren zugrunde. Bei Temperaturen über 56 °C werden Leptospiren innerhalb von zehn bis 35 Minuten, bei Einwirkung von Sonnenlicht innerhalb von ein bis zwei Stunden getötet. Gegen Kälte sind sie jedoch recht unempfindlich. Gängige Desinfektionsmittel führen zur raschen Abtötung (ROLLE, 2006).

1.3. Taxonomie

Die Familie der *Leptospiraceae* beinhaltet die Gattungen *Leptospira* und *Leptonema*. Aufgrund ähnlicher Morphologie wurden diese beiden Gattungen,

neben den Gattungen *Spirochaeta*, *Treponema*, *Borrelia* und *Brachyspira*, der Ordnung *Spirochaetales* zugeordnet (JOHNSON & FAINE, 1984).

Die Klassifizierung der Leptospiren ist sehr komplex und basierte vor 1989 nur auf den „serologischen“ Eigenschaften, während sie heute auch nach molekulargenetischen Eigenschaften erfolgt (JOHNSON & FAINE, 1984). Die beiden Klassifizierungen führen zu unterschiedlichen Einteilungen. Da zur Zeit der Nachweis meist durch den Mikroagglutinationstest (MAT) erbracht wird, benutzt man im Moment noch überwiegend die serologische Klassifizierung. Sie ist auch in dieser Dissertation zugrunde gelegt.

1.2.1. Serologische Klassifizierung

In der serologischen Klassifizierung wird die Gattung *Leptospira* in die beiden Spezies *Leptospira interrogans*, die alle pathogenen Stämme enthält, und *Leptospira biflexa*, die alle saprophytären, apathogenen Stämme beinhaltet, unterteilt (ABDUSSALAM et al., 1965; JOHNSON & FAINE, 1984; STALLMAN, 1984).

Die Unterscheidung der beiden Spezies erfolgt anhand des Wachstumsvermögens bei 13 °C und in Gegenwart von 225 µg/ml 8-Azaguanin (LEVETT, 2001). Außerdem bildet *L. interrogans* in einer 1-molaren NaCl-Lösung sphärische Zellen, wozu *L. biflexa* nicht in der Lage ist (LEVETT, 2001).

Die Unterscheidung der Serovare erfolgt aufgrund verschiedener Oberflächenantigene mit Hilfe des MAT (DIKKEN & KMETY, 1978; JOHNSON & FAINE, 1984; KMETY & DIKKEN, 1993). Serovare mit ähnlichen Antigenstrukturen werden dabei in Serogruppen zusammengefasst. Spezies *L. interrogans* besitzt 202 Serovare in 23 Serogruppen (JOHNSON & FAINE, 1984; KMETY & DIKKEN, 1993). Davon sind einige Serogruppen mit ihren Serovaren für den Hund von Bedeutung (Tabelle 1) (DIKKEN & KMETY, 1978; BREM et al., 1999).

1.2.2. Molekulargenetische Klassifizierung

Phylogenetische Verwandtschaftsverhältnisse, die durch Vergleich der 16S- und 23S-rRNA aufgestellt wurden, haben in jüngster Zeit zu einer molekulargenetischen Klassifizierung der Leptospiren geführt (PEROLAT et al., 1990; RAMADASS et al., 1990; RAMADASS et al., 1992). Mit dieser Klassifizierung können serologisch identische Isolate, die allerdings genetische

Unterschiede sowie Unterschiede in ihrer Lipopolysaccharid-Zusammensetzung, Pathogenität und Epidemiologie aufweisen, als unterschiedliche Organismen angesehen und in verschiedene Spezies oder Gattungen eingeteilt werden (MARSHALL, 1992).

Tabelle 1: Serologische Klassifizierung mit den häufigsten Serogruppen und ihren Serovaren, die beim Hund von Bedeutung sind (modifiziert nach DIKKEN & KMETY, 1978; BREM et al., 1999).

Serogruppen	Serovare
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>copenhageni</i>
<i>Canicola</i>	<i>canicola</i>
<i>Grippotyphosa</i>	<i>grippotyphosa</i>
<i>Australis</i>	<i>bratislava</i> <i>australis</i>
<i>Pomona</i>	<i>pomona</i>
<i>Sejroe</i>	<i>saxkoebing</i> <i>sejro</i> <i>hardjo</i>
<i>Autumnalis</i>	<i>autumnalis</i>
<i>Bataviae</i>	<i>bataviae</i>
<i>Tarassovi</i>	<i>tarassovi</i>

Diese Art der Klassifizierung unterscheidet acht pathogene (*L. borgpetersenii*, *L. fainei*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. weilii*) und vier apathogene Genospezies (*L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. parva*, *L. wolbachii*) (RAMADASS et al., 1992; PEROLAT et al., 1998). Für Hunde sind die beiden Spezies *L. kirschneri* und *L. interrogans sensu stricto* mit einigen Serovaren von pathogener Bedeutung (Tabelle 2) (PEROLAT et al., 1990).

Tabelle 2: Molekulargenetische Klassifizierung in zwei Genospezies mit ihren Serovaren, die beim Hund von Bedeutung sind (modifiziert nach PEROLAT et al., 1990).

Genospezies	Serogruppe	Serovare
<i>kirschneri</i>	<i>Grippotyphosa</i>	<i>grippotyphosa</i>
<i>interrogans sensu stricto</i>	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>copenhageni</i>
		<i>icterohaemorrhagiae</i>
	<i>Canicola</i>	<i>canicola</i>
	<i>Pomona</i>	<i>pomona</i>
	<i>Sejroe</i>	<i>saxkoebing</i>
		<i>sejroe</i>
		<i>hardjo</i>
	<i>Bataviae</i>	<i>bataviae</i>
	<i>Autumnalis</i>	<i>autumnalis</i>
<i>Australis</i>	<i>australis</i>	

2. Epidemiologie der caninen Leptospirose

Die Leptospirose ist eine weltweit vorkommende Zoonose. Infektionen beim Menschen und vielen anderen Spezies gehen meist direkt oder indirekt von wildlebenden Tieren oder Haustieren aus, die als Erregerreservoir dienen (FAINE et al., 1999; PLANC & DEAN, 2000).

2.1. Wirtsspektrum und Reservoir

Das Wirtsspektrum der Leptospiren umfasst neben Säugetieren und Menschen auch Reptilien, Amphibien und Vögel (VAN DER HOEDEN, 1966; FAINE et al., 1999). Jedes Serovar besitzt mindestens einen primären Wirt (Tabelle 3), der als Reservoir für den Erreger dient und das Überleben der Leptospiren sichert, und mehrere Nebenwirte (HEATH & JOHNSON, 1994; STEGER-LIEB et al., 1999). Als Hauptwirte fungieren häufig wild lebende Nager. Diese sind hochempfindlich, zeigen in der Regel nur eine milde oder keine Erkrankung und können den Erreger über Monate oder teilweise sogar lebenslänglich ausscheiden (BALDWIN & ATKINS, 1987; FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001). Im Gegensatz dazu erkranken Nebenwirte oft schwer und scheiden den Erreger nur kurz aus (RENTKO et al., 1992; HEATH & JOHNSON, 1994; BOLIN, 1996).

Nebenwirte können jedoch auch subklinisch infiziert sein (SONGER & THIERMANN, 1988).

Bei der „klassischen Hundeleptospirose“, die durch *L. canicola* hervorgerufen wird, sind hauptsächlich der Hund und andere hundeartige Säuger Hauptwirte. Bei der Weil'schen Krankheit, die durch *L. copenhageni* verursacht wird, ist der Hund Nebenwirt und die Ratte Hauptwirt (STEGER-LIEB et al., 1999; BOLIN & ALT, 2001). Studien ergaben, dass etwa 8 % der klinisch gesunden Hunde Leptospiren über den Urin ausscheiden (VAN DEN BROEK et al., 1991; HARKIN et al., 2003b). Serovar *hardjo* hat v. a. Wiederkäuer wie Schafe und Rinder als primären Wirt (GERRITSEN et al., 1994; BOLIN & ALT, 2001).

Tabelle 3: Häufigste Leptospirenservare, die Hunde infizieren, mit ihren Hauptwirten (modifiziert nach WOHL, 1996; GREENE et al., 2006).

Serovar	Hauptwirte
<i>bratislava</i>	Ratte, Schwein, Pferd, Igel
<i>canicola</i>	Hund
<i>hardjo</i>	Wiederkäuer
<i>copenhageni</i>	Ratte
<i>pomona</i>	Rinder, Schwein, Skunk, Opossum
<i>autumnalis</i>	Maus
<i>bataviae</i>	Hund , Ratte, Maus
<i>grippotyphosa</i>	Wühlmaus, Waschbär, Skunk, Opossum, Bisamratte
<i>ballum</i>	Maus

Pferde sind größtenteils mit dem Serovar *bratislava* infiziert (CERRI et al., 2003) und Schweine mit den Serovaren *pomona* und *bratislava* (VICENTE et al., 2002; JANSEN et al., 2007). Bei Katzen gibt es nur einzelne Fallberichte über Erkrankungen durch Leptospiren (REES, 1964; CARLOS et al., 1971; MASON et al., 1972; BRYSON & ELLIS, 1976; REILLY et al., 1994; LANGSTON & HEUTER, 2003). Verschiedene Studien fanden Antikörper gegen Leptospiren bei acht bis 16 % gesunder Katzen, hauptsächlich gegen das Serovar *hardjo* und *grippotyphosa* (DICKESON & LOVE, 1993; AGUNLOYE & NASH, 1996; MYLONAKIS et al., 2005). Ungewöhnlich viele Katzen (35 %) hatten in

Griechenland Antikörper gegen Leptospiren, hauptsächlich gegen die Serovare *autumnalis* und *australis* (MYLONAKIS et al., 2005). Kleine Säugetiere sind die bedeutsamsten Reservoir für Leptospiren (DEDIE et al., 1993; FAINE et al., 1999; PLANC & DEAN, 2000; ADLER et al., 2002). Das Serovar *grippotyphosa* wird typischerweise durch Wühlmäuse (*Arvicolidae*) verbreitet (KMETY, 1955). Da Ratten neben dem Serovar *copenhageni* auch viele andere Serovare beherbergen, spielen diese Nagetiere die größte Rolle in der Übertragung der Leptospirose. VINETZ und Mitarbeiter (1996) fanden in Baltimore bei einer Untersuchung in 19 von 21 untersuchten Ratten Leptospiren (VINETZ et al., 1996). SUNBUL und Mitarbeiter (2001) fanden in der Türkei bei einer Untersuchung von 59 norwegischen Wanderratten bei 27,1 % Leptospiren-DNA in den Nieren und bei 16,9 % in Gehirnproben (SUNBUL et al., 2001).

Für Hirsche wird die Rolle in Europa als Reservoir für Leptospiren als eher gering eingestuft (TWIGG et al., 1969; CERRI et al., 2003). Das Wildschwein hingegen ist offenbar häufig Träger und Ausscheider von Leptospiren. Zwölf – 18 % der Tiere haben Antikörpertiter gegen die Serovare *pomona* oder *bratislava*, für die beide das Schwein der Hauptwirt ist (VICENTE et al., 2002; JANSEN et al., 2007). Feldhasen zeigten in mehreren Untersuchungen einen hohen Anteil seropositiver Reagenten, besonders gegen das Serovar *grippotyphosa*. Jedoch schwankte der Anteil jahreszeitlich und zwischen verschiedenen Revieren beträchtlich zwischen fünf und fast 40 % (HARTMAN & BROEKHUIZEN, 1980; EBANI et al., 2003; WINKELMAYER et al., 2005).

Vögel, die experimentell mit Leptospiren infiziert wurden, erkrankten nicht an Leptospirose und wurden auch nicht zu Ausscheidern. Bei diesen Tieren konnten lediglich Antikörper gegen Leptospiren festgestellt werden. Vermutlich können aber Jungvögel an Leptospirose erkranken (TORTEN et al., 1965). Unter natürlichen Bedingungen werden bei Vögeln nur selten Antikörper gegen Leptospiren festgestellt (KMETY, 1955; HOWARTH & REINA-GUERRA, 1958; TORTEN et al., 1965). Wasservögel können jedoch wochenlang Leptospiren ausscheiden und so für die Verbreitung von Leptospirose sorgen (DEDIE et al., 1993).

Wechselwarme Tiere wie Eidechsen, Schildkröten, Schlangen und Kröten wurden ebenfalls als Reservoirwirte beschrieben (WHITE, 1963; PLESKO et al., 1964; MARCUS, 1971; GLOSSER et al., 1974; EVERARD et al., 1983). Experimentell wurden auch Fische infiziert (VAN DER HOEDEN, 1966; VAN DER HOEDEN

et al., 1967; FAINE et al., 1999; SELBITZ, 2006). Diese können als Vektoren dienen, wenn sie aus verunreinigten Gewässern kommen. Eine Reservoirfunktion bei Fischen ist nicht bekannt (EULENBERGER et al., 2002).

2.2. Übertragung

Das Leben und die Verbreitung der Leptospiren wird in der Natur über eine chronische Infektion der Nierentubuli der primären Wirte gesichert (BABUDIARI, 1958). Nebenwirte spielen für die Aufrechterhaltung von Infektionszyklen nur eine untergeordnete Rolle, da sie im Vergleich zu Reservoirwirten die Leptospiren meist nur wenige Tage und nur in Ausnahmefällen mehrere Wochen ausscheiden (KATHE & MOCHMANN, 1967; BOLIN, 2003). Infizierte Tiere scheiden den Erreger hauptsächlich über den Urin aus (LANGSTON & HEUTER, 2003), aber auch über Speichel, Milch, Fruchtwasser, Nachgeburten und Sperma (DURA, 1993). Im Urin werden während der ersten Wochen der Infektion 10^5 Leptospiren pro Milliliter Urin ausgeschieden. Zur Infektion werden nur wenige Leptospiren benötigt (HEATH & JOHNSON, 1994). Leptospiren werden auch über die Milch ausgeschieden, insbesondere bei Mastitiden (ELLIS et al., 1976; DHALIWAL et al., 1996). Die Ausscheidung über die humane Muttermilch ist ebenfalls beschrieben (BOLIN & KOELLNER, 1988).

Leptospiren können direkt oder indirekt übertragen werden. Die direkte Übertragung findet über den Deckackt, transplazentar, über Bisswunden oder über Ingestion von infiziertem Gewebe statt (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001). Eine indirekte Übertragung des Erregers ist durch mit Urin kontaminiertem Wasser, Erde, Nahrung und Einstreu möglich. Leptospiren wurden auch in Flöhen und Zecken nachgewiesen (MICHNA, 1970) und können durch diese sowohl horizontal als auch vertikal übertragen werden (BURGDORFER, 1956). Die Wahrscheinlichkeit einer indirekten Übertragung ist um so größer, je besser die Umweltbedingungen für das Überleben der Leptospiren sind. Optimal sind ein neutraler bis leicht alkalischer pH-Wert, ruhiges oder sich langsam bewegendes, warmes Wasser oder auch Erde (GREENE et al., 2006). Infektionen bei Mensch und Tier erfolgen meist über den Kontakt von Hautwunden oder Schleimhäuten mit erregerhaltigen Sekreten oder Flüssigkeiten (DURA, 1993; FARR, 1995; FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001). Schleimhäute von Nase, Maul und Konjunktiven sowie Mikroläsionen, besonders im Zwischenzehnbereich, gelten

als Haupteintrittsporten. Der Magen-Darmtrakt spielt eine untergeordnete Rolle, da die Erreger durch die Säure im Magen abgetötet werden (FREUDIGER, 1997). Tiere, die die Infektion überstanden haben, können über Monate intermittierend Leptospiren über den Urin ausscheiden (BAL et al., 1994).

2.3. Geographische Verbreitung

Leptospirose ist eine weltweit verbreitete Erkrankung. Die Inzidenz der Leptospirose ist in Ländern mit warmen, feuchten Klimata aufgrund der Vorliebe der Leptospiren für diese Eigenschaften deutlich höher, als in der gemäßigten Zone (EVERARD & EVERARD, 1993; RATNAM, 1994). Die einzelnen Serovare haben in den verschiedenen Regionen ein unterschiedlich starkes Vorkommen (Tabelle 4) (BALDWIN & ATKINS, 1987; DURA, 1993).

Dies hängt vom Wanderverhalten der Erregerreservoirs (v. a. Ratten oder Mäuse) ab (DURA, 1993).

Das Serovarspektrum und die -häufigkeit können sich in Abhängigkeit von der Verbreitung der Reservoirwirte selbst sehr kleinräumig unterscheiden und auch kurzfristig wechseln (SCHWARZ, 1960; EBANI et al., 2003). Twigg und Mitarbeiter (1969) sprechen von einer von Biotop zu Biotop wechselnden Serovarverteilung (TWIGG et al., 1969). In USA kommen momentan hauptsächlich die Serovare *grippityphosa*, *pomona* und *bratislava* vor (ADIN & COWGILL, 2000; RIBOTTA et al., 2000a; PRESCOTT et al., 2002; BOUTILIER et al., 2003; WARD et al., 2004; GOLDSTEIN et al., 2006; GHNEIM et al., 2007). In den letzten Jahren hat auch das Serovar *autumnalis* an Bedeutung gewonnen (PRESCOTT et al., 2002; GOLDSTEIN, 2005).

In Asien sind die Serovare *sejroe* (Korea) und *cynopteri* (Mongolei) vorherrschend (ODONTSETSEG et al., 2005; JUNG et al., 2008). In Polen dominiert bei Hunden das Serovar *sejroe* (KRAWCZYK, 2005).

Tabelle 4: Übersicht, über die am häufigsten vorkommenden Leptospiren-Serovare bei Hunden mit Leptospirose in den verschiedenen geographischen Regionen.

Region (Literaturangabe)	Jahr	Fall- zahl	prädominierendes Serovar
Kalifornien, USA (GHNEIM et al., 2007)	2007	42	<i>pomona</i>
Queensland, Australien (MILLER et al., 2007)	2007	40	<i>australis</i>
Cornell, USA (GOLDSTEIN et al., 2006)	2006	55	<i>grippotyphosa</i> <i>pomona</i>
Indiana, USA (WARD et al., 2004)	2004	40	<i>grippotyphosa</i>
Illinois, USA (BOUTILIER et al., 2003)	2003	15	<i>grippotyphosa</i>
Ontario, USA (PRESCOTT et al., 2002)	2002	31	<i>autumnalis</i> <i>bratislava</i>
Kalifornien, USA (ADIN & COWGILL, 2000)	2000	36	<i>pomona</i> <i>bratislava</i>
Quebec, USA (RIBOTTA et al., 2000a)	2000	19	<i>grippotyphosa</i> <i>pomona</i>
Ontario, USA (PRESCOTT et al., 1999)	1999	18	<i>grippotyphosa autumnalis</i>
New York, USA (BIRNBAUM et al., 1998)	1998	36	<i>grippotyphosa, pomona</i>
New Jersey/Michigan, USA (HARKIN & GARTRELL, 1996)	1996	17	NJ: <i>pomona</i> <i>grippotyphosa</i> M: <i>pomona</i> <i>autumnalis</i> <i>grippotyphosa</i>

2.4. Bedeutung als Zoonose

Leptospirose ist weltweit die am weitesten verbreitete Zoonose (WHO, 1999; JANSEN et al., 2005; SEHGAL, 2008). Sie wurde in der Humanmedizin kürzlich in die Klasse der „reemerging infectious diseases“ aufgenommen (MESLIN, 1997; LEVETT, 2001; JANSEN et al., 2005). Untersuchungen aus Asien (LAROCQUE et al., 2005) und Latein-Amerika (SARKAR et al., 2002; JOHNSON et al., 2004; SEGURA et al., 2005) zeigen, dass Leptospirose ein ernstzunehmendes Gesundheitsproblem darstellt. Obwohl die Erkrankung aufgrund der unspezifischen Symptome unterdiagnostiziert wird, wurden beispielsweise 1999 in China 500 000 und in Brasilien 28 000 Leptospirosefälle gemeldet (VINETZ, 2001). Die Länder Brasilien, Barbados und Neukaledonien

gehören mit mehr als 100 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner im Jahr zu den Ländern mit der höchsten Inzidenz (WHO, 1999).

In Deutschland ist die Prävalenz der humanen Leptospirose aufgrund der klimatischen Verhältnisse wesentlich niedriger und nahm in den Jahren 1962 bis 1997 stetig ab. In den Jahren 1998 bis 2003 stieg sie jedoch wieder auf 0,06 pro 100 000 Menschen an (JANSEN et al., 2005). Dies wird auf eine Vergrößerung der Rattenpopulation, das Wiederaufleben der caninen Leptospirose, vermehrtes internationales Reisen sowie auf häufigeren Aufenthalt in der Natur zurückgeführt (JANSEN et al., 2005). Von 102 Fällen humaner Leptospirose in Deutschland in den Jahren 1998 bis 2003 wurden 30 % durch beruflichen Kontakt, 30 % durch Freizeitaktivitäten im Freien, 37 % durch internationale Reisen und 31 % durch direkten Kontakt mit Ratten oder Hunden ausgelöst (JANSEN et al., 2005). Die Prävalenz der verschiedenen Leptospirenserovare beim Menschen reflektiert generell die der Tiere, mit denen die Menschen in direkten oder indirekten Kontakt kommen. Früher war das Serovar *copenhageni* das meist diagnostizierte Serovar in der Humanmedizin (PRESCOTT et al., 1991). In neueren Studien waren bei 62 % der Leptospirosefälle in Deutschland auch Serovare der Serogruppe *Icterohaemorrhagiae* die infektiösen Serovare, gefolgt von den Serogruppen *Canicola* und *Grippityphosa* mit je 9 % (JANSEN et al., 2007). In den USA hingegen überwiegt in der Humanmedizin die Serogruppe *Autumnalis* (41 %), gefolgt von *Icterohaemorrhagiae* (25 %) (LEVETT, 2003).

Neben Personen, die Kontakt zu Tieren haben, haben auch die, die in Seen baden oder sonstigen Wassersport betreiben, ein erhöhtes Risiko mit Leptospiren infiziert zu werden (JEVON et al., 1986; MUMFORD, 1989; SHAW, 1992). Arbeiter in landwirtschaftlichen Betrieben oder auf Schlachthöfen sind ebenfalls prädisponiert, auch mit anderen Serovaren wie zum Beispiel *L. pomona* oder *hardjo* in Kontakt zu kommen (HEATH & JOHNSON, 1994; CAMPAGNOLO et al., 2000).

3. Pathogenese der caninen Leptospirose

Der genaue Mechanismus, wie Leptospiren zur Erkrankung führen, ist noch nicht hinreichend erforscht. Es sind einige Virulenzfaktoren bekannt, deren Bedeutung in der Pathogenese jedoch, bis auf einige Ausnahmen, noch ungeklärt ist (LEVETT, 2001).

3.1. Virulenzfaktoren

Die Virulenzfaktoren bestehen hauptsächlich aus Toxinen, wie Hämolytinen und Glykolipoproteinen, und Adhäsinen, wie z. B. Fibronectin und Lipopolysacchariden (LEE et al., 2002). Die Hämolytine zählen zu den wichtigsten Toxinen. In diese Gruppe fallen die Phospholipasen, zu denen unter anderem auch die Sphingomyelinasen gehören. Phospholipasen greifen phospholipasehaltige Membranen, wie z. B. Erythrozytenmembranen an und führen zur Zytolyse (KASAROV, 1970; TROWBRIDGE et al., 1981; THOMPSON & MANKTELOW, 1986). *Leptospira ballum*, *hardjo*, *pomona* und *tarassovi* besitzen das Hämolytin Sphingomyelinase (BERNHEIMER & BEY, 1986; DEL REAL et al., 1989). Neben der hämolytischen wird diesem eine zytotoxische Aktivität auf Endothelzellen zugesprochen. Die genaue Rolle der Sphingomyelinase in der Pathogenese ist jedoch noch weitgehend ungeklärt (BERNHEIMER & BEY, 1986; LEE et al., 2002). Das Serovar *lai* besitzt ein Hämolytin (SphH), welches über porenbildende Proteine zur Hämolyse und Zytotoxizität führt. Dieses Hämolytin besitzt weder Phospholipase- noch Sphingomyelinaseaktivität. Seine Wirkung konnte experimentell durch Verabreichung von Kaninchenserum gegen SphH neutralisiert werden (LEE et al., 2002).

Die Hämolytine mancher Serovare führen nur speziesabhängig zur Hämolyse. So wirkt beispielsweise das Serovar *pomona* beim Rind hämolytisch (SPRADBROW & SEAWRIGHT, 1963), beim Hamster jedoch nicht (ABDU & SLEIGHT, 1965). Serovar *ballum* hingegen führt beim Hamster zur Hämolyse, jedoch nicht beim Rind. Wahrscheinlich liegt das daran, dass die einzelnen Spezies aufgrund des unterschiedlichen Gehaltes an Phospholipasen in den Erythrozytenmembranen verschiedenartig auf die unterschiedlichen phospholipaseartigen Toxine reagieren (KASAROV, 1970).

Eine weitere Toxinklasse stellen die Glykolipoproteine dar. Sie wirken direkt zytotoxisch, perforieren die Zellmembran, führen zum Austritt von Zellinhaltsstoffen und schließlich zum Zelltod (VINH et al., 1986). Darüberhinaus hemmen sie spezifisch die Natrium-Kalium-Adenosintriphosphatase ($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$). Dies ist vermutlich für den Kaliumverlust über die Nieren verantwortlich (YOUNES-IBRAHIM et al., 1995; NAKOU et al., 2000).

Neben den Toxinen gibt es noch weitere Virulenzfaktoren. Die äußeren Membranproteine der Leptospiren enthalten Lipopolysaccharide (LPS) sowie

einige Lipoproteine (HAAKE, 2000). LPS sind sehr immunogen und für die Serovarspezifität verantwortlich (CHAPMAN et al., 1988). Sie sind potente Aktivatoren von Makrophagen und stimulieren, zusätzlich zu ihrer phagozytierenden Fähigkeit, die Freisetzung von Interleukin 1 und Interferon (ISOGAI et al., 1990). Weiterhin stimulieren LPS die Anheftungsfähigkeit von neutrophilen Granulozyten an Endothelzellen und Thrombozyten. Dies spielt unter anderem eine Rolle in der Entwicklung von Thrombozytopenien (ISOGAI et al., 1997). Ein Adhäsion, ein 24 kDa Lipoprotein, hat zudem die Fähigkeit, an Laminin, welches in Epithelzellen vorhanden ist, zu binden. In Zellen mit hohem Laminin Gehalt ist die Adhäsion und Virulenz dadurch deutlich höher (BARBOSA et al., 2006).

Die Penetration und Invasion von Geweben ist wahrscheinlich aufgrund der Beweglichkeit der beiden Axialfilamente und durch die Freisetzung von Hyaluronidase möglich (MILLER et al., 1970). Einige virulente Stämme zeigen eine Chemotaxis in Richtung Hämoglobin (YURI et al., 1993).

Durch Zerstörung der Bakterienzelle und damit Freilegung der Peptidoglykanschicht wird von peripheren mononukleären Blutzellen die Produktion von TNF- α induziert (CINCO et al., 1996). Es liegt eine positive Korrelation zwischen dem TNF- α -Spiegel und der Schwere der Erkrankung vor; je mehr Bakterien also zerstört werden, desto mehr Entzündung und Nekrose wird hervorgerufen (TAJIKI & SALOMAO, 1996).

3.2. Organmanifestation

Die Leptospiren können zu Vaskulitiden in sämtlichen Organen führen (DE BRITO et al., 1992). Sie wurden in den Wänden von Kapillaren, mittelgroßen und großen Gefäßen nachgewiesen. Der genaue Mechanismus, wie es zu einer Vaskulitis kommt, ist nicht geklärt. Vermutlich haben die Leptospiren einen direkten toxischen Effekt auf die Gefäßwände; ein speziell hierfür verantwortliches Toxin, konnte jedoch bisher nicht nachgewiesen werden (DUTTA & CHRISTOPHER, 2005). Durch die Vaskulitis können in vielen Organen, wie z. B. den Nieren, der Leber, dem Gehirn und den Meningen, Petechien und Ecchymosen entstehen.

Besonders hoch ist die Affinität der Leptospiren zu den Tubulusepithelzellen der Nieren. Dort vermehren sie sich und persistieren. Die Leptospiren wirken direkt toxisch auf die Tubulusepithelzellen und es kommt zur Degeneration und Nekrose

der Zellen, zur fokalen Vaskulitis und zur Infiltration mit Lymphozyten. Das entstehende Nierenversagen ist Folge des Tubulusschaden. Es ist nicht immer zusätzlich eine interstitielle Entzündung vorhanden (FARR, 1995). Hypoxie aufgrund einer renalen Ischämie ist eine weitere wichtige Ursache für ein entstehendes Nierenversagen. Hypovolämie und Hypotension durch Dehydratation sowie massive Blutungen oder Vaskulitiden können dies hervorrufen (FARR, 1995; BROWN et al., 1996). Weiterhin kann es im fortgeschrittenen Stadium durch Ablagerungen von Antigen-Antikörper-Komplexen zu einer Glomerulonephritis und somit zu einer Proteinurie kommen (LEVETT, 2001).

Hunde mit leptospirosebedingten Hepatitiden können hochgradige Leberfunktionsstörungen entwickeln. Meist liegen jedoch keine hochgradigen Leberzellzerstörungen vor. Häufig ist eine intrahepatische Cholestase vorhanden (ARIMITSU et al., 1982). Die Aktivität der Alaninaminotransferase liegt häufig im Referenzbereich, während die der Alkalische Phosphatase sowie die Konzentration des Bilirubins oft deutlich erhöht sind (LEVETT, 2001). Histologisch sieht man milde degenerative Veränderungen der Hepatozyten, Hypertrophie und Hyperplasie der Kupffer'schen Zellen, Erythrophagozytose sowie intrahepatische Cholestase (ARIMITSU et al., 1982; DUTTA & CHRISTOPHER, 2005). Chronische Hepatitiden wurden sowohl im Zusammenhang mit dem Serovar *grippotyphosa* (BISHOP et al., 1979) als auch mit Serovaren der Serogruppe *Australis* beschrieben (ADAMUS et al., 1997). Der Pathomechanismus beim Hund ist noch nicht geklärt (ADAMUS et al., 1997). In der Humanmedizin geht man davon aus, dass der primäre Insult der Hepatozyten zu Veränderungen der Zytoplasmamembran führt. Als Folge kommt es wahrscheinlich zur Bildung von Antikörpern gegen die hepatozelluläre Membran und zur Sensibilisierung und Einwanderung von Lymphozyten (THOMAS, 1993). Weiterhin kommt es häufig zur Hämolyse. Diese kann entweder direkt durch Hämolysine oder sekundär immunbedingt durch auf Erythrozyten anheftende Leptospirenantigene verursacht werden (PRESCOTT et al., 1999).

Durch die Wirkung der Leptospiretoxine auf das Lungenparenchym kann eine akute Lungenerkrankung entstehen. Aufgrund einer Vaskulitis kann es zu einem nichtkardialen Lungenödem durch Exudation von Flüssigkeit kommen. In seltenen Fällen entsteht eine akute Lungenblutung (BIRNBAUM et al., 1998). Diese ist hauptsächlich auf Endothelschäden durch eine Vaskulitis

zurückzuführen. Disseminierte intravasale Koagulopathie (DIC) und Thrombozytopenie spielen bei der Verursachung der Lungenblutung eine untergeordnete Rolle. Bei schweren Infektionen können jedoch auch diese Faktoren zu einer Lungenblutung beitragen. Eine kürzlich durchgeführte Studie beschreibt 37 Hunde mit Leptospirose, von denen fast 60 % Dyspnoe zeigten. 55 % dieser Tiere mussten euthanasiert werden, wohingegen von den Hunden ohne Lungenmanifestation nur 27 % euthanasiert wurden. Dies zeigt, dass pulmonale Verlaufsformen bei der caninen Leptospirose eine schwerwiegende Komplikation mit erhöhter Letalität darstellen (RADEKE et al., 2009). In der Humanmedizin ist der Schweregrad der Lungenerkrankung auch prognostisch aussagekräftig (GILAD & BORER, 2000; DOLHNIKOFF et al., 2007).

Auch andere Organsysteme können während der akuten Phase der Leptospirose geschädigt werden. Durch Ablagerungen von Antigen-Antikörper-Komplexen kann es zu einer aseptischen, immunbedingten Meningitis kommen, auch wenn die Leptospiren selbst schon nicht mehr im Liquor zu finden sind (SPERBER & SCHLEUPNER, 1989). Gelegentlich kommt es zu einer Uveitis (TOWNSEND et al., 2006). In der Humanmedizin geht man davon aus, dass Leptospirenantikörper mit Gewebe des Auges reagieren (LEVETT, 2001). Das Serovar *bataviae* führte beim Hund durch transplazentare Infektion zu Aborten und zur Infertilität (ELLIS, 1986). Eine Polymyositis wurde bei einem Greyhound durch eine Infektion mit dem Serovar *australis* beschrieben. Beim Menschen werden ähnliche Veränderungen typischerweise durch das Serovar *icterohaemorrhagiae* hervorgerufen und sind dann meist mit einer Meningitis assoziiert (PONCELET et al., 1991).

3.2. Krankheitsverlauf

Die einzelnen Leptospiren-Serovare zeigen eine unterschiedliche Pathogenität (FAINE et al., 1999). Ein hoher Anteil der mit Leptospiren infizierten Tiere macht eine subklinische Infektion durch (SONGER & THIERMANN, 1988). An der Ausbildung einer klinisch manifesten Erkrankung sind verschiedene Faktoren beteiligt. Die beiden wichtigsten sind die Pathogenität des Serovars und der Immunstatus des Tieres. Sie spielen eine größere Rolle als die Menge der aufgenommenen Leptospiren (BISHOP et al., 1979; SONGER & THIERMANN, 1988). Hat ein Tier, das mit Leptospiren infiziert wird, einen hohen Antikörpertiter, wie zum Beispiel ein Welpen mit maternalen Antikörpern oder ein

vollständig geimpfter adulter Hund, so kann der Erreger meist eliminiert werden, ohne dass es zu klinischen Symptomen kommt. Bei einem etwas niedrigeren Antikörpertiter, kommt es zu einer geringgradigen und/oder kurzen Leptospiämie mit milden klinischen Anzeichen. Hat der Patient einen niedrigen Antikörpertiter oder keine Antikörper, so kommt es nach der Leptospiämie zur Replikation der Bakterien in Nieren, Leber, Milz, zentralem Nervensystem, Augen und im Genitaltrakt (GREENE et al., 2006). Weiterhin ist die Ausprägung der Erkrankung davon abhängig, ob es sich bei dem infizierten Patienten um einen Haupt- oder Nebenwirt handelt. Letztere erkranken meist schwerer, haben aber eine kürzere Ausscheidungsphase (KEENAN et al., 1978; BISHOP et al., 1979; THIERMANN, 1980; COLE et al., 1982; NIELSEN et al., 1991; RENTKO et al., 1992; DICKESON & LOVE, 1993).

Nach einer Inkubationszeit von sieben Tagen oder, je nach Serovar, auch länger kommt es zum Auftreten von klinischen Symptomen. Diese sind vorwiegend reduziertes Allgemeinbefinden, Anorexie, Dehydratation, Durchfall, Erbrechen, Fieber, Polyurie, Polydipsie, Ikterus, Hämorrhagien und Myalgien (NAVARRO & KOCIBA, 1982; WOHL, 1996). Es kommt häufig zu akuten Niereninsuffizienzen, Blutungen oder Leberfunktionsstörungen. Eine Assoziation von bestimmten Krankheitsbildern mit den einzelnen Serovaren, wie es in älteren Studien beschrieben wurde, konnte in neueren Studien nicht bestätigt werden (FAINE et al., 1999; GOLDSTEIN et al., 2006). Der Körper reagiert mit einer mehr oder weniger starken Antikörperproduktion. Reagiert das Immunsystem nicht früh und/oder stark genug, kommt es ohne adäquate Therapie zum Tod der Tiere. Ansonsten werden die Leptospiren ganz oder teilweise eliminiert. Es ist möglich, dass sie in der Niere persistieren und über Wochen oder Monate mit dem Urin ausgeschieden werden (BAL et al., 1994).

4. Diagnose der caninen Leptospirose

Die Diagnose der Leptospirose basiert nicht auf einem einzigen Test, sondern auf einer Kombination bestimmter klinischer Symptome, Laborergebnissen sowie direkten oder indirekten Erregernachweisen (RENTKO et al., 1992; LEVETT, 2003).

4.1. Direkter Erregernachweis

Obwohl der indirekte Erregernachweis bei der Diagnose der Leptospirose eine große Rolle spielt, ist in manchen Fällen der direkte Erregernachweis von Bedeutung. Besonders bei chronisch infizierten Tieren, bei denen die Antikörpertiter unter die Nachweisgrenze fallen sowie bei Hunden mit Impfantikörpern oder auch in sehr frühen Infektionsstadien ist die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Beispiel oft hilfreich (HARKIN et al., 2003b).

4.1.1. Mikroskopischer Erregernachweis

Leptospiren sind in der „normalen“ Urinuntersuchung im Hellfeldmikroskop ohne spezielle Färbung nur bedingt darstellbar. Für die Betrachtung im Hellfeldmikroskop müssen die Bakterien fixiert und gefärbt werden (KATHE & MOCHMANN, 1967). Im Phasenkontrastmikroskop kann man sie auch nativ sehen (FAINE, 1982). Methode der Wahl für die Lebenddarstellung der Leptospiren ist die Dunkelfeldmikroskopie (KATHE & MOCHMANN, 1967). Sie ist jedoch sehr unsensitiv und es werden mindestens 10^4 Bakterien/ml benötigt, um auf dem Objektträger pro Gesichtsfeld eine Leptospire zu finden (TURNER, 1970; FAINE, 1982).

Als Untersuchungsmaterialien eignen sich Blut, Urin, Liquor, Körperhöhlenflüssigkeiten und Organmaterialien (FAINE, 1982). In der Phase der Leptospirämie sind die Leptospiren nur in Blut und Urin nachzuweisen, in den anderen Materialien erst ab der zweiten Krankheitswoche (SCHÖNBERG et al., 1984). Die Proben sollten möglichst direkt nach Gewinnung untersucht werden (SCHÖNBERG et al., 1984).

Sensitivität und Spezifität der Dunkelfeldmikroskopie sind niedrig. Aufgrund der intermittierenden Ausscheidung von wenigen Leptospiren im frühen Stadium der akuten Phase kommt es häufig zu falsch negativen Ergebnissen (SONGER & THIERMANN, 1988; RENTKO et al., 1992; CHANDRASEKARAN & PANKAJALAKSHMI, 1997). Dies kann teilweise durch Zentrifugation verbessert werden (RENTKO et al., 1992; BOLIN, 1996). Ebenso führt eine Verabreichung von Antibiotika zu falsch negativen Ergebnissen. Durch Verwechslung von Leptospiren mit Fibrin, Zelltrümmern und anderen Artefakten kommt es häufig zu falsch positiven Ergebnissen (SCHÖNBERG et al., 1984). Diese Artefakte lassen sich jedoch durch Zugabe von Streptolysin auflösen, ohne dass eine Schädigung der Leptospiren stattfindet (SCHÖNBERG et al., 1984).

Auch andere Spirochäten, wie z.B. *Borrelia burgdorferi*, sind mit dieser Methode nicht zuverlässig von Leptospiren zu unterscheiden (RENTKO et al., 1992).

Ein Vorteil der Dunkelfeldmikroskopie ist das relativ schnelle Untersuchungsergebnis (SONGER & THIERMANN, 1988; RENTKO et al., 1992; CHANDRASEKARAN & PANKAJALAKSHMI, 1997).

Die Diagnose „Leptostpirose“ sollte, aufgrund der geringen Spezifität und Sensitivität der Dunkelfeldmikroskopie, nicht alleine mit dieser Methode gestellt oder ausgeschlossen, sondern mit Hilfe ergänzender Methoden gesichert werden (TURNER, 1970; FAINE, 1982; FAINE et al., 1999).

4.1.2. Kultureller Nachweis

Leptospiren sind sehr anspruchsvoll und benötigen Spezialmedien zur Kultivierung (LANGSTON & HEUTER, 2003). Es werden flüssige oder halb feste Spezialnährmedien verwendet. JOHNSON und HARRIS (JOHNSON & HARRIS, 1967) modifizierten ein von ELLINGHAUSEN und MC CULLOUGH (ELLINGHAUSEN & MCCULLOUGH, 1965) entwickeltes Medium, das Tween 80 und bovines Serumalbumin enthält und nach den Initialen der Entwickler mit dem Namen „EMJH“ benannt wurde. Andere Wissenschaftler bevorzugen proteinreduzierte oder -freie Nährmedien (BEY & JOHNSON, 1978; SCHONBERG, 1983; MAZZONELLI et al., 1984). Um bakteriellen Kontaminationen vorzubeugen, wurden Selektivmedien entwickelt, die hauptsächlich 5-Fluorouracil – teilweise in Kombination mit anderen Antibiotika – enthalten, die das Wachstum der kontaminierenden Bakterien hemmen (JOHNSON & FAINE, 1984).

Das Ergebnis der Kultur ist unter anderem von der Anzahl der lebens- und vermehrungsfähigen Leptospiren abhängig. Die Bakterien bevorzugen Temperaturen von mindestens 20 °C und pH-Werte von über 8,0. Die Leptospiren sterben bei pH-Werten von unter 6,5, wie zum Beispiel im sauren Fleischfresserurin, ab. Damit die Kontaktzeit der Leptospiren mit dem sauren Fleischfresserurin möglichst kurz ist, sollten die Probenmaterialien so frisch wie möglich verarbeitet werden (SCHÖNBERG et al., 1984). Alternativ kann der Urin auch auf einen pH von 8,0 alkalisiert werden (LANGSTON & HEUTER, 2003). Es ist empfehlenswert, vor dem Sammeln des Urins Furosemid zu verabreichen (NERVIG & GARRETT, 1979). Dies erhöht die glomeruläre Filtrationsrate,

„spült“ mehr Leptospiren in den Urin und verdünnt ihn, wodurch die Überlebenszeit der Leptospiren in ihm verlängert wird (BOLIN, 1996).

Die Leptospiren haben mit einer Generationszeit von sechs bis 16 Stunden ein langsames Wachstum. Die Isolierung dauert je nach Wachstumsgeschwindigkeit zwischen sieben Tagen und sechs Monaten (TURNER, 1970; FAINE, 1982). Deshalb sollten Leptospiren mindestens vier Monate kultiviert werden, bevor die Kultur bei ausbleibendem Wachstum als negativ bezeichnet wird.

Der kulturelle Erregernachweis ist aus Blut, Urin, Liquor und Organmaterial möglich (TURNER, 1970; FAINE, 1982; FAINE et al., 1999). Leptospiren befinden sich in den oben genannten Materialien während der leptospirämischen Phase in den ersten zwei Wochen. Je höher die Antikörper steigen, desto weniger Leptospiren sind vorhanden. In Organen wie Leber und Niere können die Leptospiren länger persistieren (LANGSTON & HEUTER, 2003). Auch im Urin können sie länger ausgeschieden werden. Die Ausscheidung ist jedoch intermittierend (BALDWIN & ATKINS, 1987).

Die Sensitivität des kulturellen Nachweis ist sehr niedrig, während die Spezifität annähernd 100 % beträgt (BOLIN, 1996). Eine Kultur kann jedoch auch bei einem gesunden Leptospirenausscheider positiv sein, d. h. ein positives Kulturergebnis ist nicht gleichzustellen mit einer klinisch manifesten Leptospirose (VAN DEN BROEK et al., 1991; HARKIN et al., 2003b).

Ein falsch negatives Ergebnis kann durch mikrobielle Verunreinigungen des Untersuchungsmaterials auftreten (DURA, 1993). Die kontaminierenden Bakterien können durch die kürzere Generationszeit die Leptospiren sehr schnell überwuchern und das Kulturergebnis verfälschen (FAINE, 1982). Weiterhin können falsch negative Ergebnisse durch vorherige Antibiotikaverabreichung und Absterben der Leptospiren durch ausgiebigen Kontakt mit saurem Urin auftreten (BALDWIN & ATKINS, 1987). Ein deutlicher Nachteil ist, dass es bis zu sechs Monaten dauern kann, bis das Ergebnis der Kultur vorliegt (TURNER, 1970; FAINE, 1982).

Seit dem routinemäßigen Einsatz der PCR rückt der kulturelle Nachweis immer weiter in den Hintergrund, da die PCR bei geringerem Zeitaufwand eine zeitnahe Diagnose ermöglicht.

4.1.3. Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR-Technik wurde von MULLIS und FALOONA (MULLIS & FALOONA, 1987) eingeführt; SAIKI und Mitarbeiter (1985) haben sie erstmals beschrieben und modifiziert (SAIKI et al., 1985). Durch die PCR ist auch bei geringer Erregerzahl ein schneller Leptospirennachweis möglich (VAN EYS et al., 1989). BROWN und Mitarbeiter (1995) entwickelten eine PCR für den Nachweis von Leptospiren beim Menschen (BROWN et al., 1995), die auch erfolgreich aus Urin von Rindern, Schweinen (WAGENAAR et al., 1994) und Hunden (RAMADASS et al., 1997a) angewand wurde.

Die konventionelle PCR ist eine Methode zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten. Es schließt sich immer ein zweiter Schritt zur Visualisierung und Verifizierung des Produktes an (POWLEDGE, 2004). Dies kann mit der Agarosegelelektrophorese oder durch Hybridisierung mit Gensonden erfolgen. Dabei wird die Spezifität durch den Einsatz von Gensonden erhöht. Als Ansatzpunkte für die Primer sind verschiedene Genloci beschrieben. Am häufigsten werden die Gene für die 16S- oder 23S-rRNA verwendet (HOOKEY, 1992; MERIEN et al., 1992; WAGENAAR et al., 1994; WOO et al., 1997; SMYTHE et al., 2002), aber auch repetitive Elemente dienen als Ziel (WOODWARD et al., 1991; SAVIO et al., 1994; BAROCCHI et al., 2001). Daneben wurden weitere Genorte, die für Sekretionsproteine oder Flagellin kodieren, ausgewählt (GRAVEKAMP et al., 1993; KEE et al., 1994). Weiterhin gibt es verschiedene, teilweise quantitative „real time“ PCR, die auf dem Prinzip des „Fluorescence Resonance Energy Transfer“ Systems beruhen (WOO et al., 1997). Dabei entstehen Fluoreszenzsignale, die in direkter Echtzeit („real time“) gemessen werden (ESPY et al., 2006). Die meisten PCR sind nicht serovarspezifisch, sondern erfassen mehrere Serovare (LEVETT, 2001).

Als Untersuchungsmaterialien für die PCR eignen sich Urin, Samen (MASRI et al., 1997; KIM et al., 2006), Blut, Kammerwasser (MERIEN et al., 1992; KEE et al., 1994), Liquor oder Organmaterial, insbesondere der Niere (SAVIO et al., 1994).

Mit der PCR ist es möglich, die Leptospirose in einem sehr frühen Stadium zu diagnostizieren, in dem die Antikörper noch nicht vorhanden oder noch sehr niedrig sind (BAL et al., 1994; OOTEMAN et al., 2006). Leptospiren sind schon in den ersten sieben Tagen im Urin nachweisbar und werden in der Regel vier bis sechs Wochen, selten auch über Jahre ausgeschieden (BAL et al., 1994).

Die Spezifität der PCR ist sehr gut und beträgt annähernd 100 %. In seltenen Fällen kann es durch Kontamination von Puffern, Geräten oder dem Arbeitsplatz zu falsch positiven Ergebnissen kommen (HARKIN et al., 2003a; WHO, 2003). Die Sensitivität ist deutlich niedriger und schwankt je nach Literaturangabe zwischen 32 % und 100 % (BAL et al., 1994; KEE et al., 1994; BROWN et al., 1995; MERIEN et al., 1995; BABURAJ et al., 2006; DE ABREU FONSECA et al., 2006; NIZAMUDDIN et al., 2006; OOTEMAN et al., 2006).

Aus verschiedenen Gründen treten relativ häufig falsch negative Ergebnisse auf. Zum einen werden in einem sehr frühen Stadium der Infektion noch keine Leptospiren ausgeschieden (OOTEMAN et al., 2006). Zum anderen werden die Leptospiren intermittierend im Urin ausgeschieden, weshalb sie dort nicht immer nachweisbar sind. Ferner können Störfaktoren, wie z. B. PCR-Inhibitoren, die Untersuchung negativ beeinflussen, da die PCR ein sehr empfindliches Verfahren ist (WHO, 2003).

Die PCR-Analyse aus Urin ist sensitiver als die aus Serum. Dies liegt wahrscheinlich an der geringeren Erregerdichte im Blut. Urin hat den Vorteil, dass man ihn in großen Mengen gewinnen und anschließend zentrifugieren kann (BAL et al., 1994). Die PCR ist sensitiver als die Kultur. Eine mögliche Ursache dafür könnte sein, dass die Leptospiren im Urin nicht lange überleben und für die PCR im Gegensatz zur Kultur keine lebenden Bakterien notwendig sind. Weiterhin werden die Ergebnisse der PCR im Gegensatz zu denen der Kultur durch Verabreichung von Antibiotika nicht falsch negativ (BAL et al., 1994). Die PCR ist deutlich sensitiver als die Dunkelfeldmikroskopie (RAMADASS et al., 1997a), die Immunfluoreszenz und die Kultur (MASRI et al., 1997).

Ein weiterer Vorteil der PCR ist, dass auch Langzeitausscheider mit dieser Methode identifiziert werden können (RAMADASS et al., 1997b; HARKIN et al., 2003b). Dies heißt auf der anderen Seite, dass eine positive PCR nicht diagnostisch für eine klinisch manifeste Leptospirose ist.

4.2. Indirekte Nachweismethoden

Da der direkte Erregernachweis teilweise eine niedrige Sensitivität hat und sehr lange dauert, haben die serologischen Untersuchungen eine große Bedeutung in der Diagnose der Leptospirose. Ungefähr eine Woche nach Infektion treten die ersten Antikörper im Blut auf. Die Titer erreichen ihren Höhepunkt etwa drei bis

vier Wochen nach Infektion und sinken langsam über Wochen bis Monate ab. (SCHÖNBERG et al., 1984).

4.2.1. Mikroagglutinationstest

Der MAT gilt heute als Referenzmethode für den indirekten Erregernachweis. Andere Methoden werden in der Regel an ihm evaluiert (RIBOTTA et al., 2000a; WHO, 2003; BHARADWAJ, 2004; SESSIONS & GREENE, 2004; AHMAD et al., 2005; OOTEMAN et al., 2006). Er ist das am häufigsten genutzte Verfahren zur Diagnose der Leptospirose (FAINE et al., 1999; WAGENAAR et al., 2000; SURUJBALLI & MALLORY, 2001).

Grundlage des MAT ist die Bildung von Agglutinaten, die durch Reaktionen zwischen Antikörpern des Serums und Antigenen entstehen. An der Agglutination sind IgG- und IgM-Antikörper beteiligt, es ist jedoch keine Unterscheidung zwischen beiden möglich. (DURA, 1993). Zur Durchführung des MAT werden Antigene benötigt, die in der Regel aus lebenden Leptospiren bestehen. Dies bedeutet, dass die erforderlichen Serovare kultiviert werden müssen (HARTMAN, 1984; SELBITZ, 2006). Da der Test serovarspezifisch ist, werden Antigene der in der geographischen Region epidemiologischen Serovare benötigt, um die verschiedenen Serovare zu identifizieren. Die ständige Weiterzucht der Kulturen ist sehr aufwändig und birgt darüberhinaus Risiken für das Laborpersonal. Alternativ können die Leptospirenstämme mit Formalin abgetötet werden. Diese inaktivierten Kulturen besitzen eine niedrigere Spezifität, jedoch eine höhere Sensitivität (PALMER et al., 1987).

Die Beurteilung der Agglutination erfolgt im Dunkelfeldmikroskop bei 100-facher Vergrößerung. Bei einer positiven Reaktion wird mit dem reagierenden Serovar eine Verdünnungsreihe des Serums getestet (FAINE, 1982; SCHÖNBERG et al., 1984). Die Seren werden meist mit folgenden Verdünnungen untersucht: 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1.600, 1:3.200, 1:6.400, 1:12.800, 1:25.600, 1:51.200, 1:102.400 und 1:240.800. Seren, die gar keine oder nur bei einer Verdünnung von 1:100 eine Agglutination zeigen, werden als negativ bewertet. Solche, bei denen bei stärkeren Verdünnungen mindestens eine 50%-ige Agglutination der Leptospiren auftritt, sind MAT-positiv. Der Antikörpertiter einer Probe entspricht der Verdünnung, bei der die Reaktion gerade noch positiv ist. Dabei können Reaktionen gegen ein oder mehrere Serovare abgelesen werden. Der MAT kann nicht unterscheiden, ob es sich um Antikörper einer aktuellen oder einer alten Infektion

oder ob es sich um Impfantikörper handelt. Deshalb wäre es ideal, zwei Serumproben im Abstand von etwa zwei Wochen zu untersuchen. Ein mindestens vierfacher Titeranstieg ist diagnostisch. Weiterhin ist ein hoher MAT-Titer gegen ein nicht geimpftes Serovar hinweisend auf eine Infektion (WHO, 2003).

Als Untersuchungsmaterial dient meist Serum; es können aber auch andere Körperflüssigkeiten, die Antikörper gegen Leptospiren enthalten, wie Liquor und Glaskörper- oder Kammerwasser, verwendet werden (SCHÖNBERG et al., 1984). Im Verlauf der Leptospirose treten zwischen dem sechsten und zehnten Tag IgM-Antikörper im Serum auf. Ab diesem Zeitpunkt kann der MAT positiv reagieren. Er weist IgM- und IgG-Antikörper nach. Die IgM-Antikörper steigen in der zweiten Woche deutlich an und erreichen in der dritten bis fünften Woche ihr Maximum (SCHÖNBERG et al., 1984; FAINE et al., 1999). Nach überstandener Infektion nimmt der MAT-Titer über Wochen bis zu sechs Monaten langsam ab. In Ausnahmefällen können beim Tier und auch beim Menschen nach überstandenen Infektionen Antikörper bis zu zwei bis zehn Jahre nachgewiesen werden. Dies gilt allerdings nicht für die als Reservoirwirte des entsprechenden Serovars fungierenden Spezies, da bei diesen eine humorale Immunantwort in der Regel nur schwach oder überhaupt nicht ausgeprägt ist (FAINE et al., 1999; SMITS et al., 2000).

Der MAT hat im frühen Krankheitsstadium (\leq sieben Tage) eine niedrige Sensitivität (29 % bis 69 %). In der Konvalenzphase ist sie deutlich höher (\geq 15 Tage bis 93,8 %). Die Angaben zur Spezifität bewegen sich um die 95 % bis 98 % (SMITS et al., 2000; LEVETT & BRANCH, 2002; BAJANI et al., 2003; DE ABREU FONSECA et al., 2006; PALANIAPPAN et al., 2007).

Negative Ergebnisse trotz Infektion können auftreten, wenn der Test zu früh im Infektionsgeschehen, d. h. zu einem Zeitpunkt, an dem noch keine Antikörper vorhanden sind, durchgeführt wird. Weiterhin kann ein Ergebnis „falsch negativ“ sein, wenn es sich bei dem ätiologischen Serovar um ein Serovar handelt, gegen das nicht getestet wurde. Es ist nie auszuschließen, dass ein neues, noch nicht identifiziertes oder nicht getestetes Serovar die Krankheit verursacht. Deshalb ist es sinnvoll, zusätzlich einen genusspezifischen Test, wie z. B. einen Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA) durchzuführen (WHO, 2003).

Weitere Fehlerquellen, die beim MAT auftreten können, sind Pseudoagglutinationen und unspezifische Agglutinationen, die durch einen schwach sauren pH-Wert der Suspensionen bedingt sind. Pseudoagglutinationen

können bei sehr schnell gewachsenen Kulturen auftreten. Typischerweise sieht man dabei Leptospirenhaufen, die aus Hunderten von Bakterien bestehen und ein strahlenförmiges Aussehen haben. Da diese so genannten „Brutnester“ mit echter Agglutination verwechselt werden können, sind solche schnell gewachsenen Leptospirenkulturen nicht für die Agglutinationsreaktion geeignet (KATHE & MOCHMANN, 1967). Mangelnde Erfahrung des Laborpersonals birgt Fehlermöglichkeiten bei der Auswertung des Tests (AHMAD et al., 2005).

Antigengemeinschaften verschiedener Leptospiren-Serovare derselben Serogruppe können zu Kreuzreaktionen führen (BREM et al., 1999; SELBITZ, 2006). Bei Hunden mit Antikörpern gegen mehrere Serovare liegen wahrscheinlich Kreuzreaktionen vor. Das Serovar mit dem höchsten Titer wird als das auslösende Serovar interpretiert, während die Serovare mit den niedrigeren Titern wahrscheinlich Kreuzreaktionen zwischen den Serovaren repräsentieren (BOLIN, 1996). Brown und Mitarbeiter (1996) beschreiben, dass Hunde, die mit dem Serovar *grippotyphosa* infiziert wurden, meist gegen dieses Serovar den höchsten Titer hatten. Gegen die Serovare *bratislava* und *pomona* waren bei diesen Tieren deutlich niedrigere Titer vorhanden, welche wahrscheinlich auf Kreuzreaktivitäten zurückzuführen waren (BROWN et al., 1996). In einer neueren Publikation wird jedoch beschrieben, dass in der Humanmedizin bei nur etwa 50 % das Serovar mit dem höchsten Titer mit dem infektiösen Serovar übereinstimmt (LEVETT, 2003). Gerade zum frühen Infektionszeitpunkt können Antikörper gegen Serovare, die kreuzreagieren, höher sein als die gegen das infektiöse Serovar (WHO, 2003). Weiterhin wird die Interpretation von Antikörpertestergebnissen durch subklinische Infektionen sowie durch Impftiter erschwert. Die konventionellen Impfstoffe induzieren hauptsächlich Titer gegen die Serovare *copenhageni* und *canicola*. Folglich ist davon auszugehen, dass ein hoher MAT-Titer gegen ein nicht in der Impfung enthaltenes Serovar im Zusammenhang mit klinischen Symptomen sehr verdächtig für eine Leptospirose ist (BALDWIN & ATKINS, 1987; RENTKO et al., 1992; GREENE et al., 2006). Alte Infektionen oder länger zurück liegende Impfungen haben in der Regel einen Titer von kleiner als 1:800. Höhere Impftiter ($\geq 1:800$) gegen die geimpften Serovare *copenhageni* und *canicola* bleiben in der Regel nicht länger als drei Monate bestehen (BOLIN, 1996). In seltenen Fällen können Impfstoffe jedoch auch Titer bis 1:3.200 und 1:12.800 hervorrufen und in Einzelfällen sogar höhere Titer gegen Serovare, die nicht in der Impfung enthalten sind, als gegen

Impfserovare (BARR et al., 2005). Ein großer Nachteil des MAT ist die Notwendigkeit, frische Kulturen mehrerer Leptospirenstämme vorrätig zu halten. Obwohl die Virulenz dieser Laborstämme als gering eingestuft wird, birgt der tägliche Umgang mit den Bakterien ein gewisses Risiko. Zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen ist unbedingt darauf zu achten, dass die Leptospirenstämme nicht verunreinigt werden und keine Mischkulturen entstehen. Eine regelmäßige Kontrolle der Stämme ist notwendig (WHO, 2003; AHMAD et al., 2005).

4.2.2. Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay

Der ELISA gewinnt in der Diagnostik immer mehr an Bedeutung und ist zur Zeit der sensitivste Test für die indirekte Leptospirose diagnostik (WHO, 2003). Unter Verwendung eines genusspezifischen Antigens können IgM- und IgG-Antikörper verschiedener Serovare gleichzeitig erfasst werden. Auch eine serovarspezifische Erfassung ist zum Teil möglich, wird aber nicht routinemäßig eingesetzt (TERPSTRA et al., 1980; ADLER et al., 1982; SURUJBALLI & MALLORY, 2001).

Anfänglich wurden häufig Ganzzellpräparationen als Testantigene verwendet, die meist keiner weiteren Behandlung unterzogen wurden (HELLMANN & ASCHENBRENNER, 1987). Eine Modifikation stellte die vorherige Behandlung mit Hitze (TERPSTRA et al., 1980; SURUJBALLI et al., 1997a; RIBOTTA et al., 2000b) oder Ultraschall (CHAMPAGNE et al., 1991; SURUJBALLI & MALLORY, 2001) dar. Seit einiger Zeit besteht nun die Möglichkeit rekombinante Antigene, wie äußere Membranproteine (OmpL1), Lipoproteine (LipL32, LipL36, LipL41) und Hitzeschockproteine (Hsp58) pathogener Leptospiren zu produzieren und diese im ELISA als Antigene einzusetzen (FLANNERY et al., 2001; BHARADWAJ, 2004; DEY et al., 2004; BOMFIM et al., 2005; CRODA et al., 2007). Ein großer Nachteil des MAT und der bisherigen ELISA ist, dass man nicht zwischen Antikörpern aufgrund einer Impfung oder Infektion unterscheiden kann. Deshalb suchte man nach Antigenen, die nur während einer Infektion auftreten und fand die „immunglobulin-like proteins“ LigA und LigB (PALANIAPPAN et al., 2002; PALANIAPPAN et al., 2004).

Ribotta und Mitarbeiter (RIBOTTA et al., 2000b) entwickelten einen indirekten ELISA, in dem sie eine genuspezifische, hitzestabile Antigenpräparation von *Leptospira interrogans* serovar *pomona* verwendeten. Damit konnten die Serovare

bratislava, *autumnalis*, *copenhageni*, *pomona* und *grippotyphosa* nachgewiesen werden. Der Test hatte eine Spezifität von 95,6 % und eine Sensitivität von 100 %. Ein Vorteil der hitzeextrahierten Antigene sind ihre Stabilität. Sie können bis zu vier Monaten aufbewahrt werden. Der Test ist sensitiv sowie schnell und einfach durchführbar (RIBOTTA et al., 2000b).

Außerdem gibt es einige rekombinante ELISA, wie z. B. einen ELISA mit rekombinantem Lipoprotein L32 (rLipL32) als Antigen (DEY et al., 2004). Das LipL32 ist in großen Mengen in pathogenen Leptospiren vorhanden (HAAKE et al., 2000). Die Sensitivität und Spezifität des Test liegen jeweils bei 97 % im Vergleich zum MAT (DEY et al., 2004). Dieser Test wurde weiterentwickelt zu einem „Dipstick“-ELISA zur Schnelldiagnostik in der Praxis. Auch hier sind Sensitivität mit 95,9 % und Spezifität mit 93,8 % bei einem einfach durchzuführenden Test gut (DEY et al., 2007). Bei einem anderen rekombinanten ELISA wird rekombinantes „outer membrane protein L1“ (rOmpL1) als Antigen verwendet (OKUDA et al., 2005). Omp sind an der Immunantwort beteiligt und werden ausschließlich von pathogenen Leptospiren exprimiert (HAAKE et al., 1993; HAAKE et al., 1999; ZUERNER et al., 2000; HAAKE et al., 2004). Das OmpL1 von Serovar *copenhageni* reagiert nicht nur mit Antikörpern des Serovars *copenhageni*, sondern auch mit Antikörpern von vier anderen Serovaren. Es ist aber keine Kreuzreaktivität mit *Borrelia burgdorferi* vorhanden (OKUDA et al., 2005). Beim Einsatz der „immunglobulin-like proteins“ LigA und LigB als Antigene war in einer Studie eine Unterscheidung zwischen Impfantikörpern und Antikörpern aufgrund einer Infektion möglich. Dieser Test befindet sich jedoch gerade in der Entwicklung und weitere Untersuchungen werden benötigt (PALANIAPPAN et al., 2004).

ELISA werden aus Serum durchgeführt. Die Erfassung der IgM-Antikörper mittels ELISA ist ab dem dritten bis zehnten Tag nach Auftreten der klinischen Symptome möglich (CUMBERLAND et al., 1999). Der IgM-Titer steigt innerhalb der ersten Woche an, entwickelt sein Maximum in den ersten 14 Tagen und fällt dann langsam wieder ab. Der IgG-Titer entwickelt sich innerhalb von zwei bis drei Wochen nach Infektion mit einem maximalen Titer nach einem Monat. Die Differenzierung der verschiedenen Immunglobulinklassen macht einen Rückschluss auf den Infektionszeitpunkt möglich (ADLER et al., 1980; ADLER et al., 1982; SMITH et al., 1994). IgM- und IgG-Titer in Kombination sind bei einer einmaligen Probe besser als der MAT, um einen Impftiter von einer

akuten Infektion zu unterscheiden. Ein hoher IgM-Titer in Kombination mit einem niedrigen IgG-Titer ist sehr verdächtig für eine akute Infektion (HARTMAN et al., 1986). Ein Impftiter ist gekennzeichnet durch einen niedrigen oder negativen IgM- und einen hohen IgG-Titer (ADLER et al., 1980).

Sensitivität und Spezifität variieren je nach Art des ELISA, sind jedoch beide relativ gut. Vergleichende Untersuchungen von ELISA und MAT ergaben, dass Sensitivität und Spezifität des ELISA mit denen des MAT übereinstimmen oder oftmals diese sogar übertreffen (MENDOZA & PRESCOTT, 1992; DURA, 1993; SURUJBALLI & MALLORY, 2001). Da der ELISA sowohl agglutinierende als auch nicht agglutinierende Antikörper erfasst, hat er besonders im frühen Infektionsstadium eine höhere Sensitivität als der MAT (ADLER et al., 1980; SURUJBALLI et al., 1997a; RIBOTTA et al., 2000b).

Vorteile gegenüber dem MAT sind die deutlich einfachere Testablesung, die photometrisch erfolgt und somit wesentlich objektiver ist als die Interpretation des MAT, und die Möglichkeit der Standardisierung. Darüberhinaus ist eine Unterscheidung der verschiedenen Immunglobulinklassen möglich (CUMBERLAND et al., 1999). Ein weiterer Vorteil des ELISA gegenüber dem MAT ist die Stabilität der Antigenpräparation, die eine Lagerung der beschichteten Mikrotiterplatten über mehrere Monate ermöglicht. Die ständige Kultivierung von Leptospiren ist somit überflüssig, wodurch die Risiken für das Laborpersonal erheblich reduziert werden (MILNER et al., 1985; WHO, 2003).

Ein Nachteil ist, dass man keinen Hinweis auf das infektiöse Serovar bekommt, da die meisten ELISA genusspezifische Antigene besitzen. Einige ELISA haben eine niedrigere Spezifität als der MAT. Deshalb empfiehlt es sich, ein positives ELISA-Ergebnis mit einem MAT zu verifizieren (WHO, 2003).

III. Kapitel I

Canine leptospirosis infections – clinical signs and outcome with different suspected *Leptospira* serogroups (42 cases)

Vera Geisen

Department of Small Animal Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität Munich,
Veterinärstrasse 13, 80539 Munich, Germany

Christiane Stengel, Dr. med. vet.

Tierklinik Hofheim, Im Langgewann 9, 65719 Hofheim, Germany

Siegfried Brem, Dr. med.vet

Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit Südbayern,
Veterinärstrasse 2, 85764 Oberschleißheim, Germany

Werner Müller, Dr. med.vet

Analytisches Labor, Öschlestraße 77, 78315 Radolfzell-Böhringen, Germany

Craig Greene, Prof., Dr. med vet., Dipl. ACVIM

Department of Small Animal Medicine, College of Veterinary Medicine,
University of Georgia, Athens, GA 30601, USA

Katrin Hartmann, Prof., Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Dipl. ECVIM-CA

Department of Small Animal Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität Munich,
Veterinärstrasse 13, 80539 Munich, Germany

Im Journal of Small Animal Practice publiziert.

PAPER

Canine leptospirosis infections – clinical signs and outcome with different suspected *Leptospira* serogroups (42 cases)

OBJECTIVES: The aim of the study was to investigate the presence of serum antibodies to different *Leptospira* serogroups in dogs with a clinical diagnosis of leptospirosis in southern Germany and to compare seroreactivity to different serogroups with history, clinical signs, laboratory findings and survival rate.

METHODS: In this study, the data of 42 dogs with the diagnosis of leptospirosis were evaluated retrospectively. Dogs were presented to the Small Animal Medicine Teaching Hospital (Medizinische Kleintierklinik) of the Ludwig Maximilians University Munich, Germany, between 1990 to 2003.

RESULTS: Reactivity to the serogroup grippityphosa (13/42) was most frequently present, followed by reactivity to the serogroup saxkoebing (10/42). There was no difference in the clinical picture and the laboratory changes between dogs whose sera were reactive to different serogroups.

CLINICAL SIGNIFICANCE: Most of the dogs with leptospirosis in southern Germany had sera reacting to serogroups other than icterohaemorrhagiae and canicola, which are contained in the vaccine. Thus, currently available vaccines in Europe do not protect against the most common *Leptospira* organisms associated with clinical disease.

V. GEISEN, C. STENGEL, S. BREM*,
W. MÜLLER†, C. GREENE‡ AND
K. HARTMANN

Journal of Small Animal Practice (2007)
48, 324-328
DOI:10.1111/j.1748-5827.2007.00324.x

Medizinischen Kleintierklinik, Ludwig
Maximilians University Munich, Veterinärstraße
13, 80539 Munich, Germany

*Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit Südbayern, Veterinärstraße 2, 85764 Oberschleißheim, Germany

†Alomed, Analytisches Labor, Öschlestraße 77,
78315 Radolfzell-Böhringen, Germany

‡Department of Small Animal Medicine, College
of Veterinary Medicine, University of Georgia,
Athens, GA 30601, USA

INTRODUCTION

Leptospirosis is a zoonotic disease caused by molecular distinct *Leptospira* serogroups, spirochaetal bacteria that can persist in dogs and in wildlife reservoirs, which shed organisms contaminating the environment. In all surveys of domestic animals, antibody prevalence in sera is much more common than clinical illness, suggesting that subclinical infections occur (Songer and Thiermann 1988). Of the more than 200 different serovars that have been identified in the *Leptospira interrogans* complex (Levett 2001), the pathogenic importance of most serovars

is unknown (Baldwin and Atkins 1987, Friedland and Warrell 1991, Adin and Cowgill 2000). A primary host exists for each serovar, which maintains the survival of the organism and its dissemination in the environment (Heath and Johnson 1994).

Before 1960, icterohaemorrhagiae and canicola infections were incriminated in most cases of canine leptospirosis typically characterised by acute or subacute hepatic and renal failure (Brown and others 1996). Since that time, a bivalent serogroup-specific vaccine against icterohaemorrhagiae and canicola was used in Europe and the USA. This is likely to be the reason for the apparent decrease in the prevalence of canine leptospirosis caused by these serogroups (Steger-Lieb and others 1999). These vaccines, however, do not induce immunity against most serovars belonging to other serogroups. This may have led to a subsequent alteration in the infection rate caused by various *Leptospira* serogroups currently associated with canine leptospirosis. In the USA mainly Grippityphosa, Bratislava and Pomona have been identified today, based on seroreactivity in clinically ill dogs (Nielsen and others 1991, Anderson and others 1993, Scanziani and others 1994, Brown and others 1996, Harkin and Gartrell 1996, Birnbaum and others 1998, Goldstein and others 2006).

The purpose of the study was to characterise clinical, haematological and biochemical features associated with infection caused by different *Leptospira* serogroups.

MATERIAL AND METHODS

Medical records of 316 dogs that were tested for the presence of antibodies in the serum against eight different *Leptospira* serogroups were reviewed. Dogs had been presented at the Small Animal

Canine leptospirosis infections

Medicine Teaching Hospital (Medizinische Kleintierklinik) of the Ludwig Maximilians University Munich, Germany, between January 1990 and December 2003, for clinical findings compatible with leptospirosis. Leptospirosis was suspected if dogs had acute renal failure, if there were acutely increased liver enzyme activity (alanine aminotransferase [ALT] and alkaline phosphatase [ALP]) and renal values in combination or if there were elevated liver enzymes or renal values in combination with leucocytosis and/or disseminated intravascular coagulation (DIC) and/or fever. Dogs in which no serum microagglutination test (MAT) was performed were excluded from the study.

Dogs were considered to have DIC if at least four of the following criteria were met (Couto 1999): thrombocytopenia (<150,000 cells/ μ l), prolongation in prothrombin time, activated partial thromboplastin time or thrombin time, reduced antithrombin III activity, abnormally high fibrin degradation products or D-dimer concentrations.

Criteria for the diagnosis of leptospirosis consisted of clinical findings associated with one or more of the following criteria:

1. A high immunoglobulin M (IgM) (≥ 320) in combination with a low immunoglobulin G (IgG) (less than IgM or negative) titre in a dog in which the last vaccination against leptospirosis had occurred at least three months ago.
2. A fourfold rise in sequential serum MAT titres (animals whose initial sera was non-reactive but whose subsequent titres were of greater than or equal to 400 were also considered infected).
3. A single serum MAT titre of greater than or equal to 1:1600 to a non-vaccinal serogroup in combination with a titre of <1:800 to serogroups canicola and icterohaemorrhagiae or a titre of greater than or equal to 1:1600 to serogroups canicola and icterohaemorrhagiae in a dog that never had been vaccinated against leptospirosis.
4. A positive PCR that detects *Leptospira interrogans* sensu lato strains in the urine.

The medical records were reviewed for signalment, month of presentation,

history, physical examination findings, haematological and serum biochemical analysis, urinalysis, time to resolution of clinical signs and outcome. Examinations had been performed by different clinicians. Examination findings always resulted from the day of presentation.

MAT was performed (Brem and others 1990) to detect antibodies against eight serogroups (icterohaemorrhagiae, canicola, grippotyphosa, bratislava, pomona, saxkoebing, sejroe, hardjo). Copenhageni is a serovar of the serogroup icterohaemorrhagiae. Cross-reactivity between some serogroups (icterohaemorrhagiae with canicola, grippotyphosa with bratislava and pomona, saxkoebing with sejroe and hardjo) can be observed with this method (Brem and others 1999). The serogroup that induced the highest titre was defined as the aetiological agent. If titres against two serogroups were greater than or equal to 1:1600, the aetiology was defined as infection with an unknown serogroup. Sera were tested at dilutions of 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12,800, 1:25,600, 1:51,200, 1:102,400 and 1:204,800. Those reactive only at 1:100 were considered negative.

IgM and IgG determination in serum was performed by indirect immunofluorescence assay (IFA) using slides coated with *Leptospira* serovar Grippotyphosa (ATCC-No. 23469; Bios GmbH). As conjugates, fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-dog IgM (μ number 02-19-03 and fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-dog IgG (γ) number 02-19-02 (KPL) were used. The IFA detects IgM and IgG antibodies against all serovars.

PCR was performed according to the method described by Kee and others (1994).

RESULTS

Forty-two of the 316 dogs tested (13 per cent) met the criteria for the diagnosis of leptospirosis. Diagnostic criterion number 4 was obtained in two dogs, numbers 1 and 3 in 15 dogs each and number 2 in 10 dogs, from which five dogs had no measurable antibodies in the first and high antibodies in the second sample. Urine

PCR detecting *Leptospira* was performed in 49 of the 316 tested dogs and was positive in two dogs. Two other dogs that met the other criteria for the diagnosis of leptospirosis had negative results in the urine PCR.

The predominant serogroup identified in the 42 dogs with leptospirosis was grippotyphosa (13/42; 31 per cent), followed by saxkoebing (10/42; 24 per cent), icterohaemorrhagiae (seven of 42; 17 per cent), canicola (five of 42; 12 per cent) and bratislava (three of 42; 7 per cent). Three dogs' sera showed a mixed reactivity (two dogs grippotyphosa and bratislava, one dog icterohaemorrhagiae and canicola). In these three dogs and in one additional dog (diagnosed by PCR), the aetiological serogroup could not be defined.

The mean age of affected dogs was 4.8 years (0.2 to 14 years). Thirty-one dogs were purebreds of 24 different breeds, and 11 dogs were crossbreeds. The most commonly represented breeds were Bernese mountain dogs (five) and dachshunds (four). Twenty-five dogs (60 per cent) were male and 17 female (40 per cent), with seven males and two females being neutered. Bodyweight ranged from 2.2 to 46.0 kg (mean bodyweight 20.7 kg). Twenty-five dogs (60 per cent) had been vaccinated regularly and in the past 12 months against icterohaemorrhagiae and canicola infection, six dogs (14 per cent) were not regularly vaccinated and six (14 per cent) had never been vaccinated. In five dogs, no vaccination history was available.

The majority (32/42; 76 per cent) lived in Southern Germany and had never been outside of this area. Ten dogs (24 per cent) had a travel history, with nine dogs having been to Southern Europe and one dog to Northern Europe (Denmark).

Most common presenting clinical signs included lethargy (81 per cent), anorexia (76 per cent), vomiting (57 per cent), weakness (52 per cent), diarrhoea (40 per cent) and weight loss (17 per cent). Physical examination abnormalities included icterus (45 per cent), dehydration (31 per cent), red- to brownish-coloured urine (31 per cent) and abdominal pain (19 per cent). Only 15 dogs (36 per cent) were febrile (>39.0°C) and seven (17 per cent) suffered from hypothermia.

V. Geisen and others

A complete blood cell count was performed (blood drawn on presentation) in all 42 dogs (Table 1), of which 19 (45 per cent) showed anaemia with a haematocrit of less than 0.33 l/l. The white blood cell count ranged from 3 to $110 \times 10^9/l$ and was increased ($>16 \times 10^9/l$) in 34 dogs (81 per cent). The leucogram was characterised by neutrophilia with left shift in 25 dogs ($>1 \times 10^9/l$ banded neutrophils). Thrombocyte counts were available in 40 dogs, of which 21 (53 per cent) showed a thrombocytopenia ranging between 8 and $167,000 \times 10^9/l$. In 18 of 40 (45 per cent) dogs, DIC was diagnosed.

Thirty-three dogs (81 per cent) had increased serum ALP activity (>100 iu/l) ranging from 115 to 7480 iu/l. In 25 dogs (60 per cent), ALP activity was initially higher than 300 iu/l in three dogs, a marked increase in activity developed during hospitalisation. Serum ALT activity was increased (>60 iu/l) in 31 dogs (74 per cent; 63 to 4653 iu/l). Eight of these dogs had an ALT activity of greater than 500 iu/l. Hyperbilirubinaemia (>3.4 $\mu\text{mol/l}$) was found in 34 dogs (79 per cent; 4.5 to 1214.4 $\mu\text{mol/l}$). Azotemia was present in 24 dogs (57 per cent). Serum urea concentration (>8.3 mmol/l) in these dogs ranged from 9.2 to 88.6 mmol/l and serum creatinine concentration (>106 $\mu\text{mol/l}$) from 123 to 1477 $\mu\text{mol/l}$. Azotemia resolved in 10 of the 24 affected dogs within eight to 19 days. A urinalysis prior to fluid therapy was available in 21 dogs. Fourteen (71 per cent) of these dogs showed haematuria and proteinuria.

Twenty-two (52 per cent) of the 42 dogs survived. Six dogs (14 per cent)

died after two to eight days, 14 (33 per cent) were euthanised within one to 14 days.

DISCUSSION

Detection of serum antibodies using MAT is the most commonly used diagnostic method for leptospirosis in dogs (Baldwin and Atkins 1987, Songer and Thiermann 1988, Goldstein 2005). A high single MAT titre in combination with clinical signs was diagnostic in 15 dogs in this study. The problem in interpretation of antibody test results is the high prevalence of subclinical infections and the persistence of antibodies (Songer and Thiermann 1988). Another problem is that vaccines can induce very high titres to other serogroups, which can be even higher than the titre against the vaccinal serogroups (Barr and others 2005). Referring to Levett (2003), the accuracy of guessing a serogroup based on MAT titres is poor (approximately 50 per cent in human studies). Other studies show, however, that vaccines generally do not induce high levels of agglutinating antibodies for more than several weeks, if at all (Brem and others 1990, Kölbl and others 1995, Steger-Lieb and others 1999); therefore, a high MAT titre to a non-vaccinal serogroup and no (or only low) titres against vaccinal serogroups accompanied by clinical signs of leptospirosis must be considered highly suggestive of active infection (Baldwin and others 1987). Unfortunately, laboratory variation and differences in host-specific humoral immune

responses sometimes make correct assignment of reactive antibody test results to a given serogroup even more difficult.

Another diagnostic criteria is a fourfold increase in MAT titres as observed in 10 dogs in this study. Interestingly, five dogs had negative titres for all serogroups at the time of initial presentation and developed antibodies during the convalescent phase. The negative antibody titre results can be explained by the seven to nine day period required before MAT antibodies are detected. MAT titres become positive approximately after one week, peak at three to four weeks, and can remain positive for months after both natural infection and vaccination in some animals; however, they decline within one month (Harkin and Gartrell 1996). Therefore, ideally, to confirm current infection *versus* previous infection or vaccination, a rising titre should be demonstrated. However, a single high ($\geq 1:800$) titre to a non-vaccine serogroup is generally considered to be because of a recent or active infection. The titre during acute illness should increase at least fourfold. The MAT cannot distinguish between IgM and IgG antibodies, but its advantage is the indication of the serogroup.

Beside the widely used MAT, a combined IgM/IgG IFA (Torten and others 1966) or ELISA (Terpstra and others 1985, Brem and others 1999, Ribotta and others 2000) can be used to measure anti-leptospiral antibodies. The IgM titre becomes increased within the first week of infection (before the MAT titre), and the maximum titre develops within 14 days. The IgG titre turns positive two to three weeks after infection and persists for months (Gussenhoven and others 1997). Using combined IgM/IgG tests is better suited to distinguish between natural infection and vaccine-induced immunity from a single sampling than is the MAT. Dogs that have been vaccinated show a high IgG titre but a low or negative IgM titre. A high IgM in combination with a low IgG titre was diagnostic in 15 dogs in this study. This combination is highly suggestive of an acute infection (Hartmann and others 1986). The IFA is, however, not able to distinguish between different serogroups.

Table 1. Haematological and biochemical findings in 42 dogs with leptospirosis

Parameter	RR	Outside RR	Median	Range
PCV (l/l)	0.35-0.58	19/42*	0.35	0.07-0.63
WBC ($\times 10^9/l$)	5-16	34/42†	19	3-110
Platelets ($\times 10^9/l$)	150-500	21/40*	154	8-167
ALP (iu/l)	<100	29/42†	642	30-7480
ALT (iu/l)	<60	31/42†	661	10-4653
AST (iu/l)	<40	22/36†	491	12-1628
Total bilirubin ($\mu\text{mol/l}$)	<3.4	34/42†	41.7	1.7-1214.4
Urea (mmol/l)	3.3-8.3	26/42†	15.6	3.3-88.6
Creatinine ($\mu\text{mol/l}$)	35-106	24/42†	132	35-1477
P (mmol/l)	0.7-1.6	18/40†	2.2	0.8-8.7
K (mmol/l)	3.5-5.1	5/41†	4.1	3.1-7.7

RR Reference range, PCV Packed cell volume, WBC White blood cells, ALP Alkaline phosphatase, ALT Alanine aminotransferase, AST Aspartate aminotransferase, P Phosphorus, K Potassium

*Below reference range

†Over reference range

Canine leptospirosis infections

Definitive identification of aetiological serovars could be accomplished using bacteriologic culture, which is not possible in most of the naturally occurring cases, or with some PCR tests. Single PCR is not yet specific enough, and methods like restriction digests are needed. Consequently, in field cases, determination of the infecting serovar usually has to be inferred from the MAT titre, and it has to be assumed that the highest titre reflects the suspected serogroup. In this study, the infecting serogroup could be suspected in most dogs because of MAT results, apart from three dogs in which titres were equally high against two serogroups and in one case in which PCR was positive. It was a young dog with acute clinical signs, high IgM in combination with low IgG titre, but all of the tested serogroups showed only a low MAT titre. Either early infection or infection with another serogroup that was not tested for could be potential reasons.

In the present study, it has been shown that the predominant serogroups in dogs with leptospirosis in Germany belong to grippotyphosa and sejroe serogroups and so are different from those used in conventional vaccines. Earlier surveys suggested that canicola infection is mainly associated with renal disease (Baldwin and others 1987) and gastroenteritis (Andre-Fontaine and Ganiere 1990), while hepatic disease (Baldwin and others 1987) and a haemorrhagic syndrome (Andre-Fontaine and Ganiere 1990) were mainly attributed to icterohaemorrhagiae infection. The clinical picture in dogs infected with grippotyphosa may differ because dogs can show acute or chronic renal disease or failure in the absence of other multi-systemic manifestations (Carlos and others 1971, Bishop and others 1979, Cole and others

1982, Baldwin and others 1987, Harkin and others 1996) (Table 2).

Because of the limited number of dogs in this study, it was not possible to accomplish statistical tests, although certain tendencies became evident. Copenhageni (serogroup icterohaemorrhagiae) antibody reactivity in dog sera was associated with possible renal and liver damage in six of seven dogs. Canicola antibody reactivity was also associated with possible renal and/or liver damage in most of the infected dogs. In infections with canicola, mortality seemed higher (four of five; 80 per cent) than in infections with other serovars, but unfortunately, as mentioned before, no statistical analysis was performed because of low number of cases. Grippotyphosa antibody reactivity was mainly associated with possible liver damage (10/13), which corresponds to the findings in other studies (Baldwin and others 1987, Harkin and others 1996). Renal disease was present only in five of the 13 cases. Saxkoebing infection has only been described in a case report of a dog from Germany so far, but seroreactivity was seen in many cases in this study. In the present study, saxkoebing antibody reactivity was associated with possible liver damage in most cases (nine of 10) and with renal damage in six of the 10 cases. DIC was seen in about the half of the cases, independent of the serogroup.

The survival rate (52 per cent) in this study was low compared with other studies in which survival rates of 78 to 83 per cent are discussed (Birnbaum and others 1998, Adin and Cowgill 2000, Goldstein and others 2006). One reason could be a different pathogenicity of the *Leptospira* strains in different geographic regions. Another possible explanation is a difference in the hospital populations. Veterinary

university teaching hospitals in the USA are usually secondary or tertiary referral centres, while the Teaching Hospital in Munich also sees primary cases especially in the emergency service. In many of these cases, owners might be less willing to pay for expensive intensive care procedures.

It has been suggested in the literature that the change in aetiological serogroups would be accompanied by a change in the clinical syndrome detected, with the preponderance of clinical signs now related to acute renal failure rather than to liver disease or coagulation abnormalities (Harkin and others 1996). This theory, however, could not be confirmed in this study. Distinct clinical patterns could not be appreciated among dogs infected with different serogroups. In a recent study of Goldstein and others (2006) in which influence of serovars on clinical signs and outcome was investigated in 55 dogs with Leptospirosis in the USA, also no differences in clinical signs and outcome was seen when the serovars were compared. That was also found in our study in Germany. Goldstein and others (2006), however, found a difference in dogs infected with the serovar Pomona, which had significantly more renal disease and a worse prognosis. This serovar, however, was not identified in Germany. This might explain why in our population no differences were observed.

As shown in this study, icterohaemorrhagiae and canicola infection still occur in unvaccinated animals indicating that these agents are not eradicated in Germany. The vaccines are not cross-protective against other serogroups. A recently developed vaccine, licensed in the USA, contains grippotyphosa and pomona strains, either as bivalent or quadrivalent product with the other two agents (Duramune®

Table 2. Disease manifestation and outcome in 42 dogs with leptospirosis infected with different *Leptospira* serogroups

<i>Leptospira</i> serogroup	n	Fever	Increased liver enzymes	Increased renal values	DIC	Leucocytosis	Survival
Icterohaemorrhagiae	7	1/7	6/7	6/7	3/7	6/7	5/7
Canicola	5	2/5	4/5	3/5	2/4*	5/5	1/5
Grippotyphosa	13	6/13	10/13	5/13	6/13	10/13	7/13
Bratislava	3	1/3	2/3	2/3	1/2*	1/3	1/3
Saxkoebing	10	3/10	9/10	6/10	5/10	10/10	6/10
Infection with unknown serovar	4	2/4	1/4	1/4	1/4	2/4	2/4
Complete	42	15/42	32/42	23/42	18/40	34/42	22/42

DIC Disseminated intravascular coagulation

*In one dog, data not available

LGP or Duramune® LCI-GP, respectively; Fort Dodge Animal Health). Use of multi-strain vaccines adapted to situation in different countries should be used and may reduce disease prevalence in the future (Masuzawa and others 1991).

References

- ADIN, C. A. & COWGILL, L. D. X. (2000) Treatment and outcome of dogs with leptospirosis: 36 cases (1990-1998). *Journal of the American Veterinary Medicine Association* **216**, 371-375
- ANDERSON, J. F., MILLER, D. A., POST, J. E., JOHNSON, R. C., MAGNARELLI, L. A. & ANDREADIS, T. G. (1993) Isolation of *Leptospira interrogans* serovar grippityphosa from the skin of a dog. *Journal of the American Veterinary Medicine Association* **203**, 1550-1551
- ANDRE-FONTAINE, G. & GANIÈRE, J. P. (1990) New topics on leptospirosis. *Compendium of Immunology and Microbiology Infectious Disease* **1**, 163-168
- BALDWIN, C. J. & ATKINS, C. E. (1987) Leptospirosis in dogs. *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian* **9**, 499-507
- BARR, S. C., Mc DONOUGH, P. L., SCIPIONI-BALL, R. L. & STARR, J. K. (2005) Serologic responses of dogs given a commercial vaccine against *Leptospira interrogans* serovar Pomona and *Leptospira kirschneri* serovar grippityphosa. *American Journal of Veterinary Research* **66**, 1780-1784
- BIRNBAUM, N., BARR, S. C., CENTER, S. A., SCHERMERHORN, T., RANDOLPH, J. F. & SIMPSON, K. W. (1998) Naturally acquired leptospirosis in 36 dogs: serological and clinicopathological features. *Journal of Small Animal Practice* **39**, 231-236
- BISHOP, L., STRANDBERG, J. D., ADAMS, R. J., BROWNSTEIN, D. G. & PATTERSON, R. (1979) Chronic active hepatitis in dogs associated with leptospires. *American Journal of Veterinary Research* **40**, 839-844
- BREM, S., KOPP, H. & MEYER, P. (1990) *Leptospira* antibody detection in dog serum in the years 1985 to 1988. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* **103**, 6-8
- BREM, S., STAAK, E., SCHÖNBERG, A., KOPP, H. & MEYER, P. (1999) Beitrag zur Leptospiren-Serologie des Hundes. Vergleich von MAT- und ELISA-Ergebnissen. *Tierärztliche Umschau* **54**, 83-87
- BROWN, C. A., ROBERTS, A. W., MILLER, M. A., DAVIS, D. A., BROWN, S. A., BOLIN, C. A., JARECKI-BLACK, J., GREENE, C. E. & MILLER-LIEBL, D. (1996) *Leptospira interrogans* serovar grippityphosa infection in dogs. *Journal of the American Veterinary Medicine Association* **209**, 1265-1267
- CARLOS, E. R., KUNDIN, W. D., WATTEN, R. H., TSAI, C. C., IRVING, G. S., CARLOS, E. T. & DIRECTO, A. C. (1971) Leptospirosis in the Philippines: canine studies. *American Journal of Veterinary Research* **32**, 1451-1454
- COLE, J. R., JR., SANGSTER, L. T., SULZER, C. R., PURSELL, A. R. & ELLINGHAUSEN, H. C. (1982) Infections with *Encephalitozoon cuniculi* and *Leptospira interrogans*, serovars grippityphosa and ballum, in a kennel of foxhounds. *Journal of American Veterinary Medicine Association* **180**, 435-437
- COUTO, C. G. (1999) Disseminated intravascular coagulation in dogs and cats. *Veterinary Medicine* **6**, 547-553
- FRIEDLAND, J. S. & WARRELL, D. A. (1991) The Jarisch-Herxheimer reaction in leptospirosis: possible pathogenesis and review. *Review of Infectious Diseases* **13**, 207-210
- GOLDSTEIN, R. E. (2005) Canine leptospirosis. Proceeding of the 15th ECVIM-CA Congress, Glasgow 2005; pp 84-86
- GOLDSTEIN, R. E., LIN, R. C., LANGSTON, C. E., SCRIVANI P. V., ERB, H. N. & BARR, S. C. (2006) Influence of infecting serogroup on clinical features of leptospirosis in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **20**, 489-494
- GUSSENHOVEN, G. C., VAN DER HOORN, M. A. W. G., GORIS, M. G. A., TERPSTRA, W. J., HARTSKEERL, R. A., MOL, B. W., VAN INGEN, C. W. & SMITS, H. L. (1997) LEPTO dipstick, a dipstick assay for detection of *Leptospira* specific immunoglobulin M antibodies in human sera. *Journal of Clinical Microbiology* **35**, 92-97
- HARKIN, K. R. & GARTRELL, C. L. (1996) Canine leptospirosis in New Jersey and Michigan: 17 cases (1990-1995). *Journal of the American Animal Hospital Association* **32**, 495-501
- HARTMANN, E. G., VAN DEN INGH, T. S. G. A. M. & ROTHUIZEN, J. (1986) Clinical, pathological and serological features of spontaneous canine Leptospirosis. An evaluation of the IgM- and IgG - specific ELISA. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **13**, 261-271
- HEATH, S. E. & JOHNSON, R. (1994) Leptospirosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **205**, 1518-1523
- KEE, S. H., KIM, I. S., CHOI, M. S. & CHANG, W. H. (1994) Detection of leptospiral DNA by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **32**, 1035-1039
- KÖLBL, S., TSCHABRUN, S., SCHULLER, W. & MÜLLER, M. (1995) Untersuchungen zur humoralen Immunantwort bei Junghunden nach Grundimmunisierung mit verschiedenen Kombinationsimpfstoffen. IV. Komponente gegen Leptospirose. *Kleintierpraxis* **4**, 929-933
- LEVETT, P. N. (2001) Leptospirosis. *Clinical Microbiology Review* **14**, 296-326
- LEVETT, P. N. (2003) Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. *Clinical Infectious Diseases* **4**, 447-452
- MASUZAWA, T., SUZUKI, R. & YANAGIHARA, Y. (1991) Comparison of protective effects with tetra-valent glycolipid antigens and whole cell-inactivated vaccine in experimental infection of *Leptospira*. *Microbiology and Immunology* **35**, 199-208
- NIELSEN, J. N., COCHRAN, G. K., CASSELLS, J. A. & HANSON, L. E. (1991) *Leptospira interrogans* serovar bratislava infection in two dogs. *Journal of the American Veterinary Medicine Association* **199**, 351-352
- RIBOTTA, M. J., HIGGINS, R., GOTTSCHALK, M. & LALLIER, R. (2000) Development of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of leptospiral antibodies in dogs. *Canadian Journal of Veterinary Research* **60**, 32-37
- SCANZIANI, E., CALCATERRA, S., TAGLIABUE, S., LUINI, M., GIUSTI, A. M. & TOMBA, M. (1994) Serological findings in cases of acute leptospirosis in the dog. *Journal of Small Animal Practise* **35**, 257-260
- SONGER, J. G. & THIERMANN, A. B. (1988) Leptospirosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **193**, 1250-1254
- STEGER-LIEB, A., GERBER, B. & GASCHEN, F. (1999) Eine alte Krankheit mit neuem Gesicht: Die Leptospirose verliert nicht an Aktualität. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* **141**, 499-507
- TERPSTRA, W. J., LIGTHART, G. S. & SCHOONE, G. J. (1985) ELISA for the detection of specific IgM and IgG in human leptospirosis. *Journal of Genetic and Microbiology* **131**, 377-385
- TORTEN, M., SHENBERG, E. & VAN DER HOEDEN, J. (1966) The use of immunofluorescence in the diagnosis of human leptospirosis by a genus-specific antigen. *Journal of Infectious Disease* **116**, 537-543

IV. Kapitel II**Epidemiologische Situation der Leptospirose beim Hund in Süddeutschland****Vera Geisen**

Department of Small Animal Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität Munich,
Veterinärstrasse 13, 80539 Munich, Germany

Christiane Stengel, Dr. med. vet.

Tierklinik Hofheim, Im Langgewann 9, 65719 Hofheim, Germany

Katrin Hartmann, Prof., Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Dipl. ECVIM-CA

Department of Small Animal Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität Munich,
Veterinärstrasse 13, 80539 Munich, Germany

In der Tierärztlichen Praxis publiziert.

Epidemiologische Situation der Leptospirose beim Hund in Süddeutschland

V. Geisen, Ch. Stengel, K. Hartmann

Medizinische Kleintierklinik (Vorstand: Prof. Dr. K. Hartmann) der Ludwig-Maximilians-Universität München

Schlüsselwörter:

Leptospirose, Hund, Serovare, Antikörper, Berner Sennenhunde

Zusammenfassung:

Gegenstand: Da in den letzten Jahren Leptospirose bei Mensch und Hund in Deutschland wieder häufiger auftritt, wurde diese Studie durchgeführt, um festzustellen, welche Serovare bei Hunden in Süddeutschland vorwiegend vorkommen und ob es Rasse-, Geschlechts- oder Altersprädispositionen gibt. **Material und Methoden:** Als Grundlage der Studie wurden Krankenakten von 337 Hunden der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München retrospektiv ausgewertet, die im Zeitraum 1990–2004 mittels Mikroagglutinationstest (MAT) auf Antikörper gegen acht verschiedene Leptospirenserovare getestet worden waren. **Ergebnisse:** 48% (162/337) der Hunde hatten Antikörpertiter gegen mindestens ein Leptospirenserovar. Neben Antikörpern gegen die in der Impfung enthaltenen Serovare *copenhageni* (114) und *canicola* (62) traten am häufigsten Antikörper gegen die Serovare *grippityphosa* (54), *bratislava* (30), *saxkoebing* (16) und *sejroe* (13) auf. 42 der 337 Hunde waren an Leptospirose erkrankt. Das am häufigsten vorkommende Serovar bei den erkrankten Hunden war *grippityphosa* (31%), gefolgt von *saxkoebing* (24%), *copenhageni* (17%), *canicola* (12%) und *bratislava* (7%). Bei vier Hunden konnte das ursächliche Agens nicht bestimmt werden. Berner Sennenhunde waren statistisch signifikant häufiger erkrankt und wiesen statistisch signifikant häufiger Antikörper auf. **Schlussfolgerung und klinische Relevanz:** Bei vielen Hunden lassen sich Antikörper gegen die Serovare *copenhageni* und *canicola* nachweisen, aber Erkrankungen treten vor allem durch die nicht in der Vakzine enthaltenen Serovare *grippityphosa* und *saxkoebing* auf. Deshalb sollten neue Vakzinen produziert werden, die zusätzlich gegen die Serovare *grippityphosa* und *saxkoebing* schützen.

Key words:

Leptospirosis, dog, serovars, antibodies, Bernese mountain dogs

Summary:

Objective: Despite frequent vaccination leptospirosis has become more and more common again in the last years. Therefore, the purpose of this study was to investigate the prevalence of different *Leptospira* serovars in dogs with leptospirosis in Southern Germany. Furthermore, breed, gender, and age predisposition were evaluated. **Material and methods:** Data of 337 dogs that presented to the Clinic of Small Animal Medicine of the Ludwig Maximilians University Munich, Germany, and in which *Leptospira* antibodies against eight different serovars had been determined using a microscopic agglutination test from 1990 to 2004, were evaluated retrospectively. **Results:** 48% (162/337) of the dogs had antibodies against at least one of the tested serovars. Besides antibodies against the serovars *copenhageni* (114) and *canicola* (62) that are included in the vaccine, antibodies against the serovars *grippityphosa* (54), *bratislava* (30), *saxkoebing* (16), and *sejroe* (13) were present. Only a few dogs displayed antibodies against serovars *pomona* (6) and *hardjo* (4). There were 42 dogs with confirmed diagnosis of leptospirosis. In these dogs, the serovar *grippityphosa* (13/42; 31%) was most frequently identified as the etiologic agent, followed by the serovars *saxkoebing* (10/42; 24%), *copenhageni* (7/42; 17%), *canicola* (5/42; 12%), and *bratislava* (3/42; 7%). In four dogs, the etiologic agent could not be determined. Bernese mountain dogs were statistically significantly more often affected by leptospirosis. In addition, they more commonly had antibodies against leptospirosis. **Conclusion and clinical relevance:** The results suggest that many dogs have antibodies against serovars *copenhageni* and *canicola*, but leptospirosis is mostly caused by the serovars *grippityphosa* and *saxkoebing*, which are not contained in the vaccination. Therefore, new vaccines containing serovars *grippityphosa* and *saxkoebing* should be produced.

Epidemiologic situation of leptospirosis in dogs in the Southern states of Germany

Tierärztl Prax 2008; 36 (K): 329–336

Einleitung

Leptospirose ist eine weltweit auftretende Zoonose (10, 16). Sie wird durch Spirochäten des Genus *Leptospira* hervorgerufen, das mehr als 200 Serovare beinhaltet (16). Die pathologische Bedeutung der meisten Serovare ist nicht bekannt (1). Jedes Serovar besitzt einen primären Wirt, der als Reservoir für die Krankheit dient (11, 22). Als Hauptwirte fungieren häufig wild lebende Nager. Diese sind hochempfänglich, zeigen in der Regel nur eine milde Erkrankung und können den Erreger über Monate ausscheiden (1). Im Gegensatz dazu erkranken Nebenwirte meist schwer und scheiden den Erreger nur kurze Zeit aus (4, 17).

Nachdem die Prävalenz der Leptospirose nach den sechziger Jahren zunächst durch den weit verbreiteten Einsatz verschiedener bivalent-serovarspezifischer Impfstoffe gegen die Serovare *copenhageni* und *canicola* stark zurückging (17), tritt die Leptospirose in den letzten 15 Jahren wieder vermehrt auf. Auch in der Humanmedizin wurde sie kürzlich wieder in die Klasse der „Re-emerging infectious diseases“ eingeordnet (16). Es wird diskutiert, ob die Zunahme auf ein wieder häufigeres Vorkommen der Hundeleptospirose zurückzuführen ist (12).

Ziel der Studie war daher herauszufinden, gegen welche Serovare Antikörper in der Hundepopulation in Süddeutschland hauptsächlich vorliegen, ob es diesbezüglich Rasse-, Geschlechts- oder Altersprädispositionen gibt und ob dieselben Serovare auch bei den Hunden vorkommen, die an Leptospirose erkrankt sind.

Material und Methoden

Patientengut

In die retrospektive Auswertung gingen die Krankenakten von 337 Hunden ein, die in einem Zeitraum von 15 Jahren (1990–2004) mit Verdacht auf Leptospirose in der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München vorgestellt worden waren. Einschlusskriterien waren der Verdacht auf Leptospirose (Anamnese, Klinik, Labor) und das Ergebnis eines Tests auf Antikörper gegen acht verschiedene Serovare von *Leptospira interrogans* mittels MAT. Es wurden nur Tiere in die Studie aufgenommen, bei denen eine Serovardifferenzierung vorlag.

Untersuchung auf Antikörper mittels MAT

Bei allen Hunden war ein MAT (6) auf Antikörper gegen acht Serovare aus sechs Serogruppen durchgeführt worden (Serovar *copenhageni* der Serogruppe *Icterohaemorrhagiae*, Serovar *canicola* der Serogruppe *Canicola*, Serovar *grippityphosa* der Serogruppe *Grippityphosa*, Serovar *bratislava* der Serogruppe *Australis*, Serovar *pomona* der Serogruppe *Pomona*, Serovar *saxkoebing* der Serogruppe *Sejroe*, Serovar *sejroe* der Serogruppe *Sejroe*, Serovar *hardjo* der Serogruppe *Sejroe*). Bei dieser Methode können Kreuzreaktionen zwischen einigen Serovaren (z. B. *copenhageni* mit *canicola*, *grippityphosa* mit *bratislava* und *pomona*, *saxkoebing* mit *sejroe* und *hardjo*) auftreten (5). Der MAT wurde im Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit Südbayern, Oberschleißheim, Deutschland und bei Laboklin in Bad Kissingen, Deutschland durchgeführt. Ab einem Titer von $\geq 1:100$ wurde von dem Vorliegen von Antikörpern ausgegangen.

Weitere Untersuchungen

Bei allen Hunden gingen die Parameter Alter, Rasse, Geschlecht, Jahreszeit und Impfanamnese in die Auswertung ein. Bei 17 Hunden waren zusätzlich IgM- und IgG-Titer im Serum über indirekte Immunfluoreszenz (IFA) mithilfe von

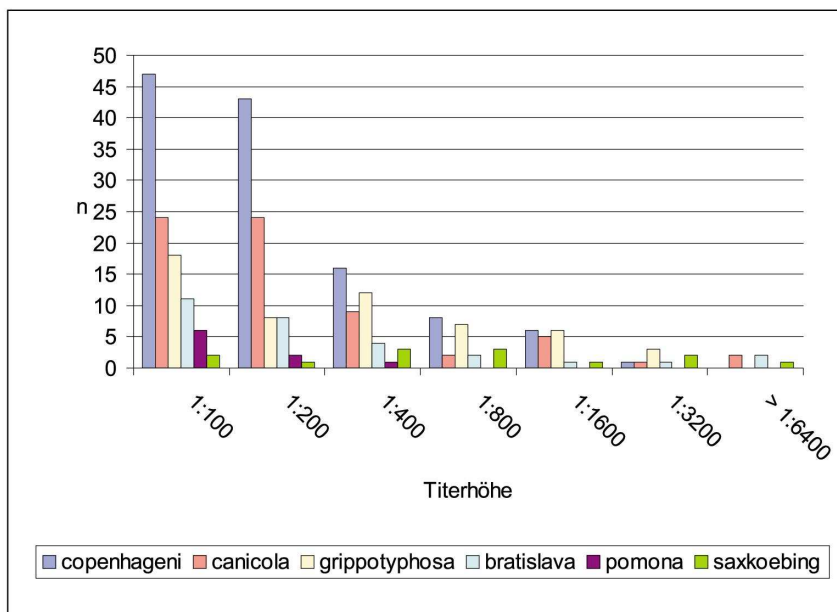


Abb. 1
Titerverteilung und -höhe bei 162 Hunden mit Antikörpern gegen Leptospirose

mit dem Leptospiren-Serovar *grippityphosa* (ATCC-No. 23469; Bios GmbH, Gräfelting, Deutschland) beschichteten Platten bestimmt worden. Als Konjugate hatten Fluorescein-Isothiocyanat-konjugierte Ziegenantikörper IgM (μ) Nr. 02-19-03 und Fluorescein-Isothiocyanat-konjugierte Ziegenantikörper IgG (γ) Nr. 02-19-02 (KPL, Gaithersburg, USA) gedient. Des Weiteren war bei drei Hunden eine Polymerasekettenreaktion (PCR) aus dem Urin nach der Methode von Kee et al. (13) durchgeführt worden. Diese PCR weist *Leptospira interrogans sensu lato* nach. Die Immunfluoreszenz sowie die PCR hatte das Labor Alomed in Radolfzell-Böhringen, Deutschland durchgeführt.

Vergleichspopulation

Das Patientengut wurde bezüglich Rasse, Alter und Geschlecht mit 6005 Hunden verglichen, die im Zeitraum zwischen 1991 und 1997 an der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München stationär behandelt worden waren (19).

Definition der Diagnose Leptospirose

Die Krankheit Leptospirose war definiert als das Vorliegen klinischer Symptome einer Leptospirose in Kombination mit mindestens einem der folgenden Kriterien:

1. ein hoher IgM-Titer (≥ 320) in Kombination mit einem niedrigerem IgG-Titer ($< \text{IgM}$ oder negativ) bei einem Hund, bei dem die letzte Impfung gegen Leptospirose mindestens 3 Monate zurücklag
2. ein vierfacher Anstieg des MAT-Titers in Serumpaaren, die im Abstand von 2–3 Wochen entnommen wurden
3. ein einmalig hoher MAT-Titer von $> 1:1600$ gegen ein Serovar, gegen das nicht geimpft wurde, bei gleichzeitigem Vorhandensein eines Titers von $< 1:800$ gegen die Serovare *canicola* und *icterohaemorrhagiae* oder ein Titer von $> 1:1600$ gegen die Serovare *canicola* oder *icterohaemorrhagiae* bei einem Hund, der niemals gegen Leptospirose geimpft worden war
4. ein Befund der Urin-PCR, der das Vorhandensein von *Leptospira interrogans sensu lato* bestätigte

Statistische Auswertung

Um zu prüfen, ob ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Anteil der Berner Sennenhunde an den erkrankten Hunden und dem Anteil dieser Rasse an der Klinikpopulation sowie zwischen dem Anteil der Berner Sennenhunde mit Antikörpern ohne klinische Erkrankung und dem Anteil der Berner Sennenhunde an der Klinikpopulation vorliegt, wurde ein Binominaltest verwendet. Zur Untersuchung des Verhältnisses der Hunde mit Leptospirose in den verschiede-

nen Monaten diente der Chi-Quadrat-Test. Als statistisch signifikanter Unterschied galt $p \leq 0,050$. Die restlichen Daten wurden deskriptiv ausgewertet.

Ergebnisse

48% (162/337) der Hunde hatten Antikörpertiter gegen mindestens eines der acht getesteten Serovare. Am häufigsten fanden sich Antikörper gegen die Serovare *copenhageni* (114), *canicola* (62), *grippityphosa* (54), *bratislava* (30), *saxkoebing* (16) und *sejroe* (13) (Abb. 1). Nur einzelne Hunde wiesen Antikörper gegen die Serovare *pomona* (6) und *hardjo* (4) auf. 42 Hunde, also 26% der Tiere mit Antikörpern, erfüllten die Kriterien der Diagnose Leptospirose. Das am häufigsten vorkommende Serovar bei den erkrankten Hunden war mit 31% (13/42) *grippityphosa*, gefolgt von *saxkoebing* (10/42; 24%), *copenhageni* (7/42; 17%), *canicola* (5/42; 12%) und *bratislava* (3/42; 7%). Bei vier Hunden konnte die Infektion nicht eindeutig einem Serovar zugeordnet werden. Die Diagnosekriterien 1 und 3 führten jeweils bei 15 Hunden, Kriterium 2 bei zehn und Kriterium 4 bei zwei Hunden zur Diagnose.

Das Verhältnis von nicht erkrankten Hunden mit Antikörpern gegen Leptospiren zu den an Leptospirose erkrankten Hunden betrug bei dem Serovar *bratislava* 10:1, bei *grippityphosa* 4:1 und bei *saxkoebing* 1,6:1. Die Pathogenität des Serovars *saxkoebing* scheint höher zu sein als die der anderen Serovare.

Von 93 der 120 Hunde mit Antikörpern und von den 42 erkrankten Hunden war die Rasse bekannt (Tab. 1). Unter den erkrankten Tieren fanden sich fünf Berner Sennenhunde und vier Dackel. Berner Sennenhunde waren unter den erkrankten Hunden ($p=0,003$) und unter den Hunden mit Antikörpern ($p=0,024$) statistisch signifikant häufiger vertreten als in der Gesamtpopulation der Klinik. Dackel und Deutsche Schäferhunde machten bei den erkrankten Hunden zwar ebenfalls einen größeren Anteil aus (Tab. 1), doch war dieser nicht statistisch signifikant, da beide Rassen in der Klinikpopulation häufig vertreten sind. Bei drei der

Rasse	An Leptospirose - erkrankte Hunde (n = 42)	Hunde mit Antikörpernachweis (n = 93)	Klinikpopulation (nach 19) (n = 6005)
Mischling	10 (23,8%)	22 (23,7%)	1459 (24,3%)
Berner Sennenhund	5 (11,9%)*	6 (6,5%)*	144 (2,4%)
Dackel	4 (9,5%)	6 (6,5%)	655 (10,9%)
Deutscher Schäferhund	1 (2,4%)	10 (10,7%)	522 (8,7%)
Cocker Spaniel	1 (2,4%)	5 (5,4%)	192 (3,2%)
Yorkshire Terrier	1 (2,4%)	3 (3,2%)	366 (6,1%)
Collie	1 (2,4%)	2 (2,1%)	k. A.
Irish Setter	1 (2,4%)	2 (2,1%)	66 (1,1%)
Kleiner Münsterländer	1 (2,4%)	2 (2,1%)	k. A.
Pudel	1 (2,4%)	1 (1,1%)	240 (4%)

* = statistisch signifikant häufiger erkrankt, # = statistisch signifikant häufiger Antikörper, k. A. = keine Angabe

Tab. 1

Hunde mit Leptospirose und Antikörper gegen Leptospiren, aufgeteilt nach Rassen (aufgeführt werden die häufigsten Rassen) im Vergleich zur Klinikpopulation

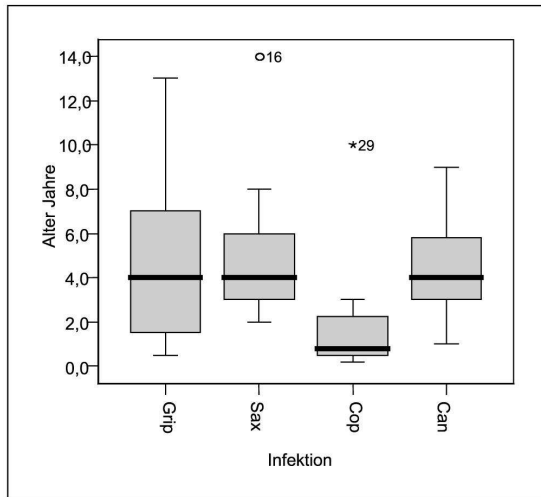


Abb. 2 Alter der mit unterschiedlichen Serovaren erkrankten Hunde

fünf erkrankten Berner Sennenhunde wurde als infektiöses Agens Serovar *grippotyphosa* nachgewiesen und bei jeweils einem Serovar *canicola* bzw. *bratislava*. Alle fünf Hunde waren regelmäßig geimpft worden.

Bei 83 der 120 Hunde mit Nachweis von Antikörpern lag eine Geschlechts- und Altersanamnese vor. Von den 83 Hunden waren 43 (51,8%) männlich (davon sieben kastriert) und 40 (48,2%) weiblich (davon 17 kastriert). Bei den 42 erkrankten Hunden handelte es sich um 25 (60%) Rüden (davon sieben kastriert) und 17 (40%) Hündinnen (davon zwei kastriert).

Das durchschnittliche Alter der Hunde mit Antikörpern betrug 6,9 Jahren, das der erkrankten Tiere 4,8 Jahre. Bei Letzgenannten ließ sich das Serovar *copenhageni* meist bei Hunden

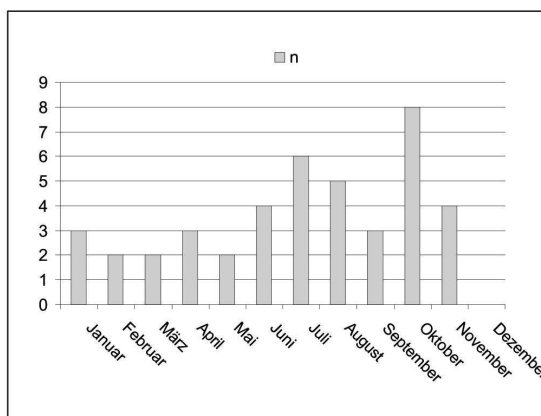


Abb. 3 Anzahl der an Leptospirose erkrankten Hunde in den Monaten Januar bis Dezember im Zeitraum von 1990–2004 (n = 42)

nachweisen, die deutlich jünger als ein Jahr waren (Abb. 2). Im Gegensatz dazu traten die Serovare *grippotyphosa*, *saxkoebing* und *canicola* bei Hunden mit einem durchschnittlichen Alter von etwa 5,3 Jahren auf.

Von den Hunden mit Antikörpern, die nicht an Leptospirose erkrankt waren, hatten 72 (60%) in den letzten 12 Monaten eine Impfung gegen die Serogruppen *icterohaemorrhagiae* und *canicola* erhalten. Von den erkrankten Hunden waren 25 (60%) in den letzten 12 Monaten gegen die Serogruppen *icterohaemorrhagiae* und *canicola* geimpft worden. Bei je sechs Hunden (14%) war die Impfung nicht regelmäßig bzw. nie durchgeführt worden. Bei fünf der erkrankten Hunde (12%) lag keine Impfanamnese vor. Die meisten erkrankten Hunde (69%) wurden im Sommer und Herbst vorgestellt. In der Monatsübersicht (Abb. 3) bilden sich zwei Gipfel im Juli und im Oktober. Die Zahl der erkrankten Hunde in den verschiedenen Monaten war jedoch nicht statistisch signifikant.

Diskussion

Der MAT ist der meist genutzte Test zur Diagnostik der Leptospirose (1, 10, 21), doch hat er einige Limitationen. Er kann nicht zwischen natürlichen Infektionen und Impftitern unterscheiden. Aufgrund der hohen Prävalenz von subklinischen Infektionen und der Persistenz von Antikörpern gestaltet sich die Interpretation schwierig (6, 21, 22). Nach Levett (15) beträgt die Übereinstimmung zwischen dem anhand des MAT vermuteten Serovar und dem tatsächlich infektiösen Serovar in der Humanmedizin nur etwa 50%. Trotz dieser Limitationen ist der MAT in der Praxis im Moment noch das Verfahren der Wahl zur Diagnose einer Leptospirose. Außerdem stellt der MAT den einzigen Test dar, der Serovare differenziert.

Berücksichtigt werden muss, dass in der vorliegenden Studie nur Seren von Hunden untersucht wurden, die aufgrund klinischer Symptome leptospiroseverdächtig waren. Damit handelt es sich um eine Selektion, und die Prävalenz von Antikörpern bei der Gesamtpopulation ist wahrscheinlich niedriger. Hunde können bis zu 1–3 Monate nach einer Impfung Titer von einer Höhe von 1:100 bis 1:400 aufweisen (4). In seltenen Fällen treten sogar Titer bis zu 1:3200 auf, die dann über 6 Monate oder einen längeren Zeitraum absinken (3, 4). Weiterhin können Impfstoffe Antikörper gegen nicht in der Vakzine enthaltene Serovare hervorrufen, deren Titer höher sind als die Titer der Antikörper gegen die Impferovare selbst (2). Nach Bolin (4) dagegen induziert die Impfung in der Regel nur Antikörper gegen die Serovare *copenhageni* und *canicola* und führt nur selten zu Kreuzreaktionen mit anderen Serovaren, die dann aber auch nur niedrige Titern von < 1:100 hervorrufen. Anderen Untersuchungen zufolge liegen nach einer Impfung häufig keine Antikörpertiter vor (14, 22). Bei vielen Hunden waren die Antikörpertiter gegen die Serovare *copenhageni* und *canicola* mit Sicherheit Impftiter. Definiert man Impftiter als einen Titer $\leq 1:1600$ gegen die Serovare *copen-*

hageni und *canicola* bei Hunden, die in den letzten 12 Monaten gegen Leptospirose geimpft wurden, handelte es sich bei den Tieren vieler Hunde um Impftiter. Bei sieben Hunden war das Serovar *copenhageni* krankheitsauslösendes Agens, bei fünf Hunden das Serovar *canicola*. Bei wie vielen Hunden die Titer gegen die Serovare *copenhageni* und *canicola* durch subklinische Infektionen, alte Infektionen oder Kreuzreaktionen gegen nicht in die Untersuchung einbezogene Serovare bedingt waren, lässt sich retrospektiv nicht feststellen. Da es sich jedoch größtenteils um niedrige Titer handelt (Abb. 1), wird es sich bei den meisten Tieren um Impftiter handeln.

Das Serovar *saxkoebing* trat bisher in Deutschland nicht häufig auf. In der Literatur findet sich ein Fallbericht über eine natürliche Infektion (20). Das Serovar *saxkoebing* erscheint in dieser Studie pathogener als die anderen Serovare, doch reichte die Fallzahl für eine statistische Auswertung nicht aus. Sent et al. (20) beschreiben einen Fall mit einer *Leptospira-saxkoebing*-Infektion, die hochakut verlief und tödlich endete. In der Studie von Ruhl-Fehlert (18) entwickelten dagegen mit dem Serovar *saxkoebing* experimentell infizierte Beagle keine klinischen Symptome. Bei natürlichen Infektionen sind allerdings die Erreger durch Mutationen oft pathogener. In dieser Studie trat bei drei von 10 mit Serovar *saxkoebing* infizierten Hunden Fieber auf, bei neun fanden sich erhöhte Leberenzymwerte, bei sechs erhöhte Nierenparameter, bei allen eine Leukozytose und bei fünf eine disseminierte intravasale Koagulopathie. Sechs Hunde überlebten.

Auf den ersten Blick erscheint die Anzahl an Schäferhunden (10/93; 10,7%) und Dackeln (6/93; 6,5%) mit Antikörpern sowie die Zahl der erkrankten Dackel (4/42; 9,5%) hoch. Dies entspricht aber etwa der Rasseverteilung der Klinikpopulation (Tab. 1) (19). Auffällig ist jedoch die hohe Zahl an Berner Sennenhunden mit Antikörpern (6/93; 6,5%) und die häufigere Erkrankung an Leptospirose bei diesen Hunden (5/42; 11,9%) im Vergleich zu anderen Rassen. Die Klinikpopulation besteht nur zu 2,4% aus Berner Sennenhunden (19). Demnach erkrankten Berner Sennenhunde statistisch signifikant häufiger an Leptospirose ($p = 0,003$) und haben statistisch signifikant häufiger Antikörper gegen Leptospiren ($p = 0,024$) als andere Rassen. Die Ursache dafür ist nicht bekannt. Möglicherweise reagiert das Immunsystem der Berner Sennenhunde relativ stark auf bestimmte Antigene. Bekanntheitsmaß entwickeln Berner Sennenhunde im Vergleich zu anderen Hunderassen auch häufig nach Borrelieninfektionen einen sehr hohen Antikörpertiter (8, 23).

Es erkrankten mehr größere Hunde (51% wogen über 22 kg) an Leptospirose. Dies könnte damit zusammenhängen, dass diese aktiver sind, sich mehr in Wald und Feld aufhalten und somit häufiger mit verunreinigtem Wasser in Berührung kommen. Bei Hunden mit Antikörpern, die aber nicht an einer Leptospirose erkrankt waren, ergab sich eine der Klinikpopulation (52,6% männlich, 47,4% weiblich) ähnliche Geschlechtsverteilung (19), während bei erkrankten Hunden männliche Tiere (60%) überwogen. Dies könnte sich durch das Sexualverhalten der Rüden erklären lassen. So kann es beispielsweise durch das Lecken an der Vulva der Hündin zur Übertragung der Leptospiren kommen (24).

Auch der Altersdurchschnitt der Hunde mit Antikörpern ohne Krankheit (6,9 Jahre) entspricht in etwa dem der Klinikpopulation von 6,8 Jahren (19). Der Altersdurchschnitt der erkrankten Hunde, die mit dem Serovar *copenhageni* infiziert waren, lag jedoch meist deutlich unter einem Jahr. Grund dafür könnte sein, dass diese Tiere noch keine vollständige Grundimmunisierung hatten. Da die meisten Hunde in Deutschland geimpft sind, tritt dieses Serovar kaum bei älteren Hunden auf.

Im jahreszeitlichen Verlauf ergab sich für die an Leptospirose erkrankten Hunde ein zweigipfeliges Diagramm mit dem ersten Gipfel im Juli und dem zweiten größeren Gipfel im Oktober (Abb. 2). Vergleichbare Ergebnisse erbrachten eine Untersuchung von Birnbaum et al. (3) über einen Zeitraum von 15 Jahren aus den USA sowie zwei Studien in Deutschland (7, 9). Das saisonal gehäufte Auftreten der Erkrankung im Sommer und Herbst ist durch die Vorliebe der Erreger für Wärme und Feuchtigkeit zu erklären (17), ferner durch den Infektionsweg über Gewässer, in denen sich die Hunde vorwiegend in den wärmeren Jahreszeiten aufhalten.

Fazit für die Praxis

Da sehr viele Hunde Antikörper gegen Leptospiren aufweisen ohne an Leptospirose erkrankt zu sein, ist der einmalige Antikörpernachweis bei der Diagnosestellung sehr vorsichtig zu interpretieren. Auffallend war die hohe Anzahl an Infektionen mit den Serovaren *grippotyphosa* und *saxkoebing*, gegen die die Impfung nicht wirksam ist. Das Impfspektrum sollte gegen diese Serovare erweitert werden. Da Hunde ohne vollständigen Impfschutz an den Serovaren *copenhageni* und *canicola* erkrankten, sollte gegen diese Serovare trotzdem weiterhin geimpft werden. Die Besonderheit der hohen Prävalenz der Leptospirose bei Berner Sennenhunden bedarf weiterer Untersuchungen.

Literatur

- Baldwin CJ, Atkins CE. Leptospirosis in dogs. *Compend Contin Educ* 1987; 9: 499–507.
- Barr SC, Mc Donough PL, Scipioni-Ball RL, Starr JK. Serologic responses of dogs given a commercial vaccine against *leptospira interrogans* serovar *pomona* and *leptospira kirschneri* serovar *grippotyphosa*. *Am J Vet Res* 2005; 66: 1780–1784.
- Birnbaum N, Barr S, Center SA, Schermerhorn T, Randolph JF, Simpson KW. Naturally acquired leptospirosis in 36 dogs: serological and clinicopathological features. *J Small Anim Pract* 1998; 39: 231–236.
- Bolin C. Diagnosis of leptospirosis: A reemerging disease of companion animals. *Sem Vet Med Surg* 1996; 11: 166–171.
- Brem S, Staak E, Schönberg A, Kopp H, Meyer P. Beitrag zur Leptospiren-Serologie des Hundes. Vergleich von MAT- und ELISA-Ergebnissen. *Tierärztl Umsch* 1999; 54: 83–87.
- Brem S, Kopp H, Meyer P. *Leptospira* antibody detection in dog serum in the years 1985 to 1988. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 1990; 103: 6–8.
- Geier-Dömling D, Heil-Franke G, Müller E. Nachweis von Leptospirenantikörpern bei Hunden. *Kleintierprax* 2003; 48: 755–758.
- Gerber B, Eichenberger S, Wittenbrink MM, Reusch CE. Antibodies against *Borrelia burgdorferi* in Bernese Mountain dogs in Switzerland. *Proc 14th ECVIM-CA, Barcelona* 2004; 200.

Epidemiologische Situation der Leptospirose beim Hund in Süddeutschland
V. Geisen, Ch. Stengel, K. Hartmann

9. Gerlach T, Stephan I. Epidemiologische Situation der kaninen Leptospirose in Norddeutschland in den Jahren 2003–2006. *Tierärztl Praxis* 2007; 35 (K): 421–429.
10. 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 Int Med* 2006; 20: 489–494.
11. Heath SE, Johnson R. Leptospirosis. *JAVMA* 1994; 205: 1518–1523.
12. Jansen A, Schöneberg I, Frank C, Alpers K, Schneider T, Stark K. Leptospirosis in Germany 1962–2003. *Emerg Inf Dis* 2005; 11: 1048–1054.
13. Kee SH, Kim IS, Choi MS, Chang WH. Detection of leptospiral DNA by PCR. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1035–1039.
14. Kölbl S, Tschabrun S, Schuller W, Müller M. Untersuchungen zur humoralen Immunantwort bei Junghunden nach Grundimmunisierung mit verschiedenen Kombinationsimpfstoffen IV. Komponente gegen Leptospirose. *Kleintierprax* 1995; 40: 929–933.
15. Levett PN. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. *Clin Inf Dis* 2003; 4: 447–452.
16. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 296–326.
17. Rentko VT, Clark N, Ross LA, Schelling SH. Canine leptospirosis. A retrospective study of 17 cases. *J Vet Int Med* 1992; 6: 235–244.
18. Ruhl-Fehlert C, Brem S, Feller W, Kopp H, Meyer P, Rinke M. Clinical, microbiological and pathological observations in laboratory beagle dogs infected with leptospires of the serogroup *sejroe*. *Exp Toxicol Pathol* 2000; 52: 201–207.
19. Salzborn C. Krankheitsinzidenzen des Hundes – Einfluss des Alters sowie von Geschlecht, Größe und Rasse: Ein retrospektiver Überblick über die stationären Patienten der I. Medizinischen Tierklinik München 1991–1997. *Diss med vet, München* 2003.
20. Sent U, Pothmann M. Atypischer klinischer Verlauf einer Infektion mit *L. interrogans* Serovar *saxkoebing* bei einem Hund. *Kleintierprax* 1995; 40: 143–147.
21. Songer JG, Thiermann AB. Leptospirosis. *J Am Vet Med Assoc* 1988; 193: 1250–1254.
22. Steger-Lieb A, Gerber B, Nicolet J, Gaschen F. Eine alte Krankheit mit neuem Gesicht: Die Leptospirose verliert nicht an Aktualität. *Schweiz Arch Tierheilk* 1999; 141: 499–507.
23. Sum S, Müller W, Hartmann K. Antikörperprävalenz gegen *Borrelia burgdorferi* in Süddeutschland. *Tierärztl Prax* 2005; 33 (K): 142 (Abstract).
24. Van den Broek AHM, Thrusfield MV, Dobbie GR, Ellis WA. A serological and bacteriological survey of leptospiral infection in dogs in Edinburgh and Glasgow. *J Small Anim Pract* 1991; 32: 118–124.

Vera Geisen
Medizinische Kleintierklinik
der Ludwig Maximilians Universität München
Veterinärstraße 13
80539 München
E-Mail: vera.geisen@gmx.de

V. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Daten von 337 Hunden ausgewertet. Diese Hunde waren mittels MAT auf Antikörper gegen acht verschiedene Leptospirenserovare getestet worden. Die Arbeit gliedert sich in zwei Teile.

Im ersten Teil der Studie wurden die Daten von 42 an Leptospirose erkrankten Hunden im Zeitraum 1990 bis 2003 retrospektiv ausgewertet. Einschlusskriterien waren klinische Symptome einer Leptospirose in Kombination mit einer akuten Niereninsuffizienz, erhöhten Leberenzymaktivitäten in Kombination mit hohen Nierenwerten oder erhöhte Leberenzymaktivitäten oder Nierenwerte in Kombination mit einer Leukozytose und/oder einer disseminierten intravasalen Koagulopathie. Zudem musste entweder die Serologie diagnostisch für eine Leptospirose oder eine positive Urin PCR vorhanden gewesen sein. Hunde, bei denen kein MAT durchgeführt wurde, wurden von der Studie ausgeschlossen. Zum einen wurde das Vorkommen der verschiedenen Leptospirenserovare in Süddeutschland ausgewertet. Zum anderen wurde untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen den verschiedenen Serovaren und Vorberichten, klinischen Parametern, labordiagnostischen Befunden und der Überlebensrate gibt.

Im zweiten Teil der Studie wurden die Daten von 337 Hunden, unter denen sich Hunde ohne Antikörper gegen Leptospirose, gesunde Hunde mit Antikörpern und an Leptospirose erkrankte Hunde befanden, im Zeitraum von 1990 bis 2004 ausgewertet. Einschlusskriterium war ein MAT gegen acht verschiedene Serovare von *Leptospira interrogans*. Tiere, bei denen keine Serovardifferenzierung vorlag, wurden ausgeschlossen. Es wurde ermittelt, gegen welche Serovare in der Hundepopulation in Süddeutschland Antikörper vorliegen. Ferner wurde untersucht, ob es Rasse-, Geschlechts- oder Altersprädispositionen gibt. Rasse, Alter und Geschlecht des Patientenguts wurden mit einer Vergleichspopulation verglichen. Die Vergleichspopulation bestand aus Patienten, die im Zeitraum zwischen 1991 und 1997 an der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München stationär behandelt worden waren (SALZBORN, 2003).

Leptospirose wurde in der vorliegenden Arbeit definiert als das Vorliegen klinischer Symptome einer Leptospirose in Kombination mit mindestens einem der folgenden Kriterien:

- 1) ein hoher IgM-Titer ($\geq 1:320$) in Kombination mit einem niedrigen IgG-Titer (IgG < IgM oder negativ) bei einem Hund, bei dem die letzte Impfung gegen Leptospirose mindestens drei Monate zurücklag
- 2) ein vierfacher Anstieg des MAT-Titers bei Serumpaaren, die im Abstand von zwei bis drei Wochen entnommen wurden
- 3) ein einmalig hoher MAT-Titer von $> 1:1.600$ gegen ein Serovar, gegen das nicht geimpft worden war, bei gleichzeitigem Vorhandensein eines Titers von $< 1:800$ gegen die Serovare *canicola* und *copenhageni* oder ein Titer von $> 1:1.600$ gegen die Serovare *canicola* oder *copenhageni*, bei einem Hund, der niemals gegen Leptospirose geimpft worden war
- 4) eine positive Urin-PCR, die das Vorhandensein von *Leptospira interrogans sensu lato* bestätigte

Ein hoher IgM- in Kombination mit einem niedrigen IgG-Titer ist sehr sensitiv und spezifisch für die Diagnose Leptospirose (MENDOZA & PRESCOTT, 1992; DURA, 1993; SURUJBALLI & MALLORY, 2001). Insbesondere im frühen Infektionsstadium scheint diese Kombination sensitiver und spezifischer als der MAT zu sein, da der ELISA, im Gegensatz zum MAT, sowohl agglutinierende als auch nicht agglutinierende Antikörper erfasst. Dennoch kann es in einem sehr frühen Infektionsstadium zu falsch negativen Ergebnissen kommen, da der Titer erst nach etwa einer Woche ansteigt (ADLER et al., 1980; TERPSTRA et al., 1980; SURUJBALLI et al., 1997a; RIBOTTA et al., 2000b). Ein vierfacher Anstieg des MAT-Titers bei Serumpaaren, die im Abstand von zwei bis drei Wochen entnommen wurden, ist ebenfalls ein sensitiver und spezifischer Test zur Diagnose. Eine Antibiotikagabe kann jedoch zum relativen Abfall des Titers führen, so dass eine Infektion vorhanden sein kann, ohne dass es zu einem vierfachen Titeranstieg kommt (LANGSTON & HEUTER, 2003).

Der MAT ist die Referenzmethode zur Diagnose der Leptospirose (BALDWIN & ATKINS, 1987; SONGER & THIERMANN, 1988; RENTKO et al., 1992; SURUJBALLI et al., 1997b; RIBOTTA et al., 2000a; WHO, 2003; BHARADWAJ, 2004; SESSIONS & GREENE, 2004; AHMAD et al., 2005; OOTEMAN et al., 2006). Dennoch gibt es einige diagnostische Limitationen, die auch die Interpretation der Studienergebnisse erschweren. Der MAT kann nicht zwischen Impftitern und natürlichen Infektionen unterscheiden. Außerdem gestaltet sich die Interpretation aufgrund der hohen Prävalenz von subklinischen Infektionen als schwierig (SONGER & THIERMANN, 1988; BREM et al., 1990;

STEGER-LIEB et al., 1999). Nach LEVETT (2003) beträgt die Übereinstimmung zwischen dem anhand des MAT vermuteten Serovars und dem tatsächlich infektiösen Serovar in der Humanmedizin nur etwa 50 % (LEVETT, 2003). Nach einer Impfung können Hunde bis zu ein bis drei Monate Titer von einer Höhe von 1:100 bis 1:400 aufweisen. Die Impfung induziert in der Regel nur Antikörper gegen die Serovare *copenhageni* und *canicola* und führt nur selten zu Kreuzreaktionen mit anderen Serovaren, die dann aber auch nur niedrige Titer verursachen (BOLIN, 1996). Andere Wissenschaftler berichten, dass nach Impfungen häufig gar keine Antikörpertiter vorliegen (KÖLBL et al., 1995; STEGER-LIEB et al., 1999). In seltenen Einzelfällen treten jedoch Titer bis zu 1:3.200 auf, die über mehrere Monate absinken (BOLIN, 1996; BIRNBAUM et al., 1998). Darüberhinaus können Impfstoffe Antikörper, gegen nicht in der Vakzine enthaltene Serovare induzieren, deren Titer höher sind als die Titer der Antikörper gegen die Impferovare selbst (BARR et al., 2005).

Eine positive PCR ist nicht diagnostisch für eine klinisch manifeste Leptospirose. Es kann sich bei dem getesteten Tier auch um einen Langzeitausscheider handeln. Der Hund, der in der ersten Studie PCR-positiv getestet wurde, hatte klinische Symptome einer Leptospirose sowie zusätzlich hohe IgM- und niedrige IgG-Antikörper. Mit dieser Kombination ist eine klinisch manifeste Leptospirose sehr sicher und eine reine Langzeitausscheidung mit großer Wahrscheinlichkeit auszuschließen.

Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass es sich bei dem Patientengut in den vorliegenden Studien um eine selektierte Gruppe von Patienten handelt, da nur Tiere getestet wurden, bei denen Verdacht auf Leptospirose bestand. Deshalb ist davon auszugehen, dass die Prävalenz der Antikörper in der Gesamtpopulation niedriger ist. Trotz den oben genannten Limitationen ist der MAT derzeit in der Praxis das Verfahren der Wahl zur Diagnose der Leptospirose. Außerdem ist er der einzig routinemäßig eingesetzte Test, der Serovare differenziert.

Insgesamt hatten 48 % (162/337) der Hunde Antikörper gegen mindestens eines der acht getesteten Serovare. Am häufigsten lagen Antikörper gegen die Serovare *copenhageni* (114), *canicola* (62), *grippotyphosa* (54), *bratislava* (30), *saxkoebing* (16) und *sejroe* (13) vor. Die hohen prozentualen Anteile an Antikörpern gegen die Serovare *copenhageni* und *canicola* sind wahrscheinlich hauptsächlich Impftiter. Nur sieben der Hunde waren durch das Serovar *copenhageni* und fünf durch das Serovar *canicola* erkrankt. Bei wie vielen Tieren die Antikörper gegen

die Serovare *copenhageni* und *canicola* durch subklinische Infektionen, alte Infektionen oder Kreuzreaktionen gegen nicht in die Untersuchung einbezogene Serovare bedingt waren, lässt sich retrospektiv nicht feststellen.

26 % (42/162) der Hunde mit Antikörpern erfüllten die Kriterien für die Diagnose Leptospirose. Bei diesen war das häufigste Serovar *grippothyphosa* (13/42; 31 %), gefolgt von *saxkoebing* (10/42; 24 %), *copenhageni* (7/42; 17 %), *canicola* (5/42; 12 %) und *bratislava* (3/42; 7 %). Damit waren in dieser Studie die häufigsten Serovare nicht die in der Impfung enthaltenen Serovare *copenhageni* und *canicola*, sondern die Serovare *grippothyphosa* und *saxkoebing*. Die Tatsache, dass die in der Impfung enthaltenen Serovare jedoch beide noch bei nicht oder nicht vollständig geimpften Hunden vorkommen, zeigt, dass diese Serovare in Deutschland nicht ausgestorben sind.

Vergleicht man das Verhältnis von nicht an Leptospirose erkrankten Hunden mit Antikörpern gegen Leptospirose zu den an Leptospirose erkrankten Hunden ist dies bei Serovar *saxkoebing* (1,6:1) deutlich niedriger als bei *bratislava* (10:1) und *grippothyphosa* (4:1). Dies lässt vermuten, dass die Pathogenität des Serovars *saxkoebing* wahrscheinlich höher ist als die der anderen Serovare.

In Deutschland sind Infektionen mit dem Serovar *saxkoebing* bisher nicht häufig beschrieben. In der Literatur findet sich nur ein Fallbericht über eine natürliche *saxkoebing*-Infektion (SENT & POTHMANN, 1995). Diese verlief hochakut und endete tödlich. In einer experimentellen Studie dagegen entwickelten mit dem Serovar *saxkoebing* experimentell infizierte Beagle keine klinischen Symptome (RUHL-FEHLERT et al., 2000). Bei natürlichen Infektionen sind die Erreger durch Mutationen oft pathogener. In der ersten Studie trat bei drei von zehn mit Serovar *saxkoebing* infizierten Hunden Fieber auf, bei neun fanden sich erhöhte Leberenzymaktivitäten, bei sechs erhöhte Nierenparameter, bei fünf eine disseminierte intravasale Koagulopathie und bei allen eine Leukozytose. Sechs von zehn Hunden überlebten.

In früheren Studien wurde eine Infektion mit dem Serovar *canicola* hauptsächlich mit akuter Niereninsuffizienz (BALDWIN & ATKINS, 1987) und Gastroenteritis (ANDRE-FONTAINE & GANIERE, 1990) assoziiert, während Lebererkrankungen (BALDWIN & ATKINS, 1987) und das hämorrhagische Syndrom (ANDRE-FONTAINE & GANIERE, 1990) eher durch das Serovar *copenhageni* hervorgerufen wurde. Das Bild einer Infektion mit dem Serovar *grippothyphosa* wurde nicht immer einheitlich beschrieben. Es wurden sowohl

Fälle mit akuten als auch mit chronischen Nierenerkrankungen oder -versagen dokumentiert, ohne dass Anzeichen einer multisystemischen Manifestation vorhanden waren (CARLOS et al., 1971; BISHOP et al., 1979; COLE et al., 1982; BALDWIN & ATKINS, 1987; HARKIN & GARTRELL, 1996).

Aufgrund der niedrigen Fallzahl war in dieser Studie eine statistische Auswertung nicht möglich. Bei Infektionen mit dem Serovar *copenhageni* waren Leber- und Nierenbeteiligung bei je sechs von sieben Patienten vorhanden. Bei *canicola*-Infektionen schien die Mortalität mit 80 % (4/5) höher als bei den anderen Serovaren. *Grippityphosa*-Infektionen traten hauptsächlich mit Leberbeteiligung (10/13) auf. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in anderen Studien gefunden (BALDWIN & ATKINS, 1987; HARKIN & GARTRELL, 1996). Bei den *grippityphosa*-Infektionen war nur bei fünf von 13 Fällen eine Nierenbeteiligung vorhanden.

In der Literatur wird beschrieben, dass mit einem Wechsel des ätiologischen Serovars auch eine Änderung der klinischen Symptome verbunden ist. Demnach wären bei einer Infektion mit dem Serovar *grippityphosa* eher Symptome einer akuten Niereninsuffizienz als Leberprobleme oder das hämorrhagische Syndrom zu erwarten (HARKIN & GARTRELL, 1996). Diese Theorie konnte in der vorliegenden Studie, in der keine wesentlichen Unterschiede der Symptomatik zwischen Hunden, die mit den einzelnen Serovaren infiziert waren, festgestellt wurde, nicht bestätigt werden. In einer Studie von GOLDSTEIN und Mitarbeitern (2006), in welcher der Einfluss der verschiedenen Serovare auf klinische Symptome und die Überlebensrate bei 55 Hunden mit Leptospirose in den USA untersucht wurde, konnten ebenfalls zwischen den verschiedenen Serovaren keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (GOLDSTEIN et al., 2006). Goldstein fand jedoch, dass Hunde, die mit dem Serovar *pomona* infiziert waren, im Vergleich zu Infizierten mit anderen Serovaren signifikant häufiger Nierenerkrankungen und eine schlechtere Prognose hatten. Dieses Serovar wurde in dieser Studie in Deutschland nicht identifiziert.

Verglichen mit anderen Studien, in denen die Überlebensraten zwischen 78 % und 83 % lagen (BIRNBAUM et al., 1998; ADIN & COWGILL, 2000; GOLDSTEIN et al., 2006), war die Überlebensrate mit 52 % in dieser Studie, sehr niedrig. Eine mögliche Ursache für diese Differenz kann ein Unterschied in der Pathogenität der einzelnen Leptospirenstämme in den verschiedenen geographischen Regionen darstellen. Eine andere mögliche Erklärung ist ein Unterschied in der

Zusammensetzung der Klinikpopulation. Universitäten in den USA sind hauptsächlich Überweisungscentren, während in der Medizinischen Kleintierklinik in München speziell im Notdienst auch nicht überwiesene Patienten vorgestellt werden. In vielen dieser Fälle sind die Besitzer finanziell limitiert und nicht willens, teure Intensivmedizin zu zahlen.

Das durchschnittliche Alter der Hunde mit Antikörpern gegen Leptospiren betrug 6,9 Jahre; dies entspricht in etwa dem der Klinikpopulation (6,8 Jahre) (SALZBORN, 2003). Das Alter der an Leptospirose erkrankten Tieren lag bei 4,8 Jahren. Bei Hunden mit Leptospirose waren die Hunde, die mit dem Serovar *copenhageni* infiziert waren, deutlich jünger als ein Jahr und damit deutlich jünger als der Durchschnitt. Infektionen mit den Serovaren *grippotyphosa*, *saxkoebing* und *canicola* traten bei einem durchschnittlichen Alter von 5,3 Jahren auf. Eine mögliche Erklärung für den niedrigen Altersdurchschnitt bei Infektionen mit dem Serovar *copenhageni* könnte sein, dass die meisten adulten Hunde in Deutschland gegen Leptospirose geimpft sind und das Serovar deshalb bei älteren Hunden nicht auftrat. Vermutlich ist es Zufall, dass Serovar *canicola* auch bei älteren Hunden vorhanden war und dass gerade diese Hunde nicht ausreichend durch eine Impfung geschützt waren.

Die Anzahl an Schäferhunden (10/93; 10,7 %) und Dackeln (6/93; 6,5 %) mit Antikörpern sowie die Zahl der erkrankten Dackel (4/42; 9,5 %) scheint auf den ersten Blick hoch. Dies entspricht aber etwa der Rasseverteilung der Klinikpopulation. Die Zahl der Berner Sennenhunde, die Antikörper gegen Leptospirose haben ohne erkrankt zu sein (6/93; 6,5 %), und die Zahl der Berner Sennenhunde, die an Leptospirose erkrankt waren (5/42; 11,9 %), ist jedoch deutlich höher als ihr Anteil an der Klinikpopulation (2,4 %) (SALZBORN, 2003). Demnach erkrankten Berner Sennenhunde statistisch signifikant häufiger an Leptospirose ($p = 0,003$) und haben statistisch signifikant häufiger Antikörper gegen Leptospiren ($p = 0,024$) als andere Rassen. Die Ursache dafür ist nicht bekannt. Möglicherweise reagiert das Immunsystem der Berner Sennenhunde relativ stark auf bestimmte Antigene. Bekanntermaßen entwickeln Berner Sennenhunde im Vergleich zu anderen Hunderassen auch nach Borrelieninfektionen häufig sehr hohe Antikörpertiter (GERBER et al., 2004; SUM et al., 2005).

Von den 83 Hunden mit Antikörpern, bei denen eine Geschlechtsanamnese vorlag, waren 51,8 % männlich (davon sieben kastriert) und 48,2 % weiblich

(davon 17 kastriert). Dies ist eine der Klinikpopulation (52,6 % männlich, 47,4 % weiblich) sehr ähnliche Geschlechtsverteilung (SALZBORN, 2003).

Von den 42 an Leptospirose erkrankten Hunden waren 60 % Rüden (davon sieben kastriert) und 40 % Hündinnen (davon zwei kastriert). Eine mögliche Erklärung für das Überwiegen der Rüden bei den an Leptospirose erkrankten Tieren ist das Sexualverhalten der männlichen Tiere. Durch das Lecken an der Vulva der Hündin kann es beispielsweise zur Übertragung der Leptospiren kommen (VAN DEN BROEK et al., 1991).

Die Mehrzahl der an Leptospirose erkrankten Hunde waren große Hunde (51 % wogen über 22 kg). Eine mögliche Ursache dafür könnte sein, dass größere Hunde aktiver sind, sich mehr in der freien Natur, in Wald und Feld aufhalten und somit häufiger mit verunreinigtem Wasser oder auch mit übertragenden Nagern in Berührung kommen.

VI. Zusammenfassung

Vera Geisen

Leptospirose bei Hunden in Süddeutschland

In der vorliegenden Arbeit wurden Daten von 337 Hunden mit klinischem Verdacht auf Leptospirose erfasst, bei denen im Zeitraum 1990 bis 2004 an der Medizinische Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität in München eine Mikroagglutinationsreaktion durchgeführt wurde. Ziel der ersten Studie der Dissertation war es, bei 42 Hunden, bei denen die Diagnose Leptospirose gestellt wurde, zu ermitteln, welche Serovare vertreten waren und herauszufinden, ob eine Korrelation zwischen den einzelnen Serovaren und klinischen Symptomen, Laborbefunden oder der Überlebensrate vorhanden war. In der zweiten Studie wurde untersucht, gegen welche *Leptospiren*-Serovare bei Hunden in Süddeutschland Antikörper vorliegen und welche Serovare hauptsächlich zur Erkrankung führen. Weiterhin wurde untersucht, ob es Rasse-, Geschlechts- oder Altersprädispositionen gibt.

48 % (162) der 337 getesteten Hunde hatten Antikörper gegen mindestens ein Leptospiren-Serovar. Neben Antikörpern gegen die in der Impfung enthaltenen Serovare *copenhageni* (70 %) und *canicola* (38 %) traten am häufigsten Antikörper gegen die Serovare *grippotyphosa* (33 %), *bratislava* (19 %) *saxkoebing* (10 %) und *sejroe* (8 %) auf. 42 (und damit 26 %) der Hunde mit Antikörpern waren an Leptospirose erkrankt. Das am häufigsten vorkommende Serovar bei den an Leptospirose erkrankten Hunden war *grippotyphosa* (31 %) gefolgt von *saxkoebing* (24 %), *copenhageni* (17 %), *canicola* (12 %) und *bratislava* (7 %). Bei vielen Hunden ließen sich Antikörper gegen die Serovare *copenhageni* und *canicola* nachweisen, Erkrankungen wurden jedoch meist nicht von diesen in der Impfung enthaltenen Serovaren, sondern von den Serovaren *grippotyphosa* und *saxkoebing* hervorgerufen. In älterer Literatur sind Korrelationen zwischen den einzelnen Serovaren und verschiedenen klinischen Symptomen und Laborbefunden beschrieben worden. Dies konnte in dieser Studie nicht bestätigt werden.

Das Verhältnis von nicht erkrankten Hunden mit Antikörpern gegen Leptospirose zu den an Leptospirose erkrankten Hunden, war bei dem Serovar *saxkoebing* (1,6:1) deutlich niedriger als bei anderen Serovaren (*bratislava* 10:1,

grippotyphosa 4:1). Dies lässt vermuten, dass die Pathogenität des Serovars *saxkoebing* höher ist als die der anderen Serovare.

Berner Sennenhunde waren statistisch signifikant häufiger erkrankt als andere Rassen. Zudem wiesen sie statistisch signifikant häufiger Antikörper auf.

Da sich die Serovare in den letzten Jahren geändert haben und die Impfungen gegen Leptospirose nicht kreuzprotektiv sind, schützen die momentan in Europa erhältlichen Leptospiroseimpfstoffe nicht gegen die am häufigsten vorkommenden Serovare *grippotyphosa* und *saxkoebing*. Eine kürzlich entwickelte Vakzine, die in den USA zugelassen ist, enthält *grippotyphosa*- und *pomona*-Stämme entweder als bivalenten oder mit den beiden Stämmen *copenhageni* und *canicola* als quadrivalenten Impfstoff. Für Deutschland wäre es wünschenswert, dass der Impfung *grippotyphosa*- und *saxkoebing*-Stämme zugefügt werden.

VII. Summary

Vera Geisen

Canine Leptospirosis in Southern Germany

In this study, data of 337 dogs with clinically suspected leptospirosis was evaluated. The dogs were presented to the Clinic for Small Animal Medicine (Medizinische Kleintierklinik) of the Ludwig Maximilians University Munich, Germany, between 1990 and 2004. In all dogs, a microagglutination test used to detect leptospiral antibodies against eight different *Leptospira* serovars was performed. The aim of the first study was to determine the presence of antibodies against various *Leptospira* serovars in dogs with clinical leptospirosis in Southern Germany and to compare serovars in regard to history, clinical signs, laboratory findings and survival rate. The purpose of the second study was to identify the *Leptospira* serovars predominantly inducing antibodies in dogs in Southern Germany and to determine which serovars mainly cause disease. Furthermore, possible predisposition in respect to breed, sex, and age was investigated.

48 % (162) of 337 dogs had antibodies against at least one *Leptospira* serovar. With the exception of antibodies against the vaccinal serovars *copenhageni* (70 %) and *canicola* (38 %), antibodies against *grippotyphosa* (33 %), *bratislava* (19 %) *saxkoebing* (10 %) and *sejroe* (8 %) were detected most frequently.

Of the dogs with antibodies, 26 % (42) had the disease leptospirosis. These dogs most frequently tested positive for antibodies against *grippotyphosa* (31 %), followed by antibodies against *saxkoebing* (24 %), *copenhageni* (17 %), *canicola* (12 %) and *bratislava* (7 %). Thus, while antibody titers against vaccinal serovars were found in many dogs, the disease leptospirosis was mainly caused by the serovars *grippotyphosa* and *saxkoebing*.

Previous studies have suggested that certain serovars are commonly associated with particular clinical symptoms and laboratory findings. However, this was not confirmed in the current study.

The ratio of dogs having antibodies against leptospirosis without clinical leptospirosis to dogs with the disease leptospirosis was considerably lower in the serovar *saxkoebing* (1.6:1) than in other serovars (*bratislava* 10:1, *grippotyphosa* 4:1). This may be indicative of a higher pathogenicity of *saxkoebing* compared to other serovars.

Presence of antibodies was diagnosed significantly more often in Bernese Mountain dogs than in other breeds. Also, the disease leptospirosis was significantly more often in this breed.

Increasingly, nonvaccinal serovars are the cause of the disease leptospirosis. Leptospirosis vaccines currently available in Europe only contain *copenhageni* and *canicola* strains. Since these vaccines are not cross-protective against other serovars, they offer no protection against *grippotyphosa* and *saxkoebing*, the serovars most commonly associated with clinically manifest leptospirosis in Germany. A recently developed vaccine, licensed in the USA, contains *grippotyphosa* and *pomona* strains, either as a bivalent or as a quadrivalent product in combination with *copenhageni* and *canicola*. This study suggests that serovars *grippotyphosa* and *saxkoebing* should be added to leptospirosis vaccines available in Germany.

VIII. Literaturverzeichnis

- Abdu MT, Sleight SD. Pathology of Experimental *Leptospira Pamona* Infection in Hamsters. *Cornell Vet* 1965; 55: 74-86.
- Abdussalam MA, Alexander D, Babudieri B, Borg-Petersen C, Eichhorn EA, Galton MM, Kaplan MM, Stableforth AW, Turner LH, Van Der Hoeden J, Wolff JW, Yager RH. Classification of leptospires and recent advances in leptospirosis. *Bull Wrld Hlth Org* 1965; 32: 881-91.
- Adamus C, Buggin-Daubie M, Izembart A, Sonrier-Pierre C, Guigand L, Masson MT, Andre-Fontaine G, Wyers M. Chronic hepatitis associated with leptospiral infection in vaccinated beagles. *J Comp Pathol* 1997; 117: 311-28.
- Adin CA, Cowgill LD. Treatment and outcome of dogs with leptospirosis: 36 cases (1990-1998). *J Am Vet Med Assoc* 2000; 216: 371-5.
- 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: 452-7.
- Adler B, Cousins DV, Faine S, Robertson GM. Bovine IgM and IgG response to *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* as measured by enzyme immunoassay. *Vet Microbiol* 1982; 7: 577-85.
- Adler H, Vonstein S, Deplazes P, Stieger C, Frei R. Prevalence of *Leptospira* spp. in various species of small mammals caught in an inner-city area in Switzerland. *Epidemiol Infect* 2002; 128: 107-9.
- Agunloye CA, Nash AS. Investigation of possible leptospiral infection in cats in Scotland. *J Small Anim Pract* 1996; 37: 126-9.
- Ahmad SN, Shah S, Ahmad FM. Laboratory diagnosis of leptospirosis. *J Postgrad Med* 2005; 51: 195-200.
- Andre-Fontaine G, Ganiere JP. New topics on leptospirosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1990; 13: 163-8.
- Arimitsu Y, Kobayashi S, Akama K, Matuhasi T. Development of a simple serological method for diagnosing leptospirosis: a microcapsule agglutination test. *J Clin Microbiol* 1982; 15: 835-41.
- Babudieri B. Animal reservoirs of leptospirosis. *Ann N Y Acad Sci* 1958; 70: 393-413.
- Baburaj P, Nandkumar VS, Khanna L. Polymerase chain reaction in the diagnosis of *leptospiral* infection. *J Assoc Physicians India* 2006; 54: 339-40.
- 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: 803-9.
- 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: 1894-8.
- Baldwin CJ, Atkins CE. Leptospirosis in dogs. *Compend Contin Educ Pract Vet* 1987; 9: 499-507.
- 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: 6356-64.
- Barocchi MA, Ko AI, Ferrer SR, Faria MT, Reis MG, Riley LW. Identification of new repetitive element in *Leptospira interrogans* serovar *copenhageni* and its application to PCR-based differentiation of *Leptospira* serogroups. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 191-5.
- Barr SC, McDonough PL, Scipioni-Ball RL, Starr JK. Serologic responses of dogs given a commercial vaccine against *Leptospira interrogans* serovar *pomona* and *Leptospira kirschneri* serovar *grippotyphosa*. *Am J Vet Res* 2005; 66: 1780-4.
- Bernheimer AW, Bey RF. Copurification of *Leptospira interrogans* serovar *pomona* hemolysin and sphingomyelinase C. *Infect Immun* 1986; 54: 262-4.
- Bey RF, Johnson RC. Protein-free and low-protein media for the cultivation of *Leptospira*. *Infect Immun* 1978; 19: 562-9.
- Bharadwaj R. Leptospirosis - a reemerging disease? *Indian J Med Res* 2004; 120: 136-8.
- Birch-Anderson A, Hovind-Hougen K, Borg-Petersen C. Electron microscopy of *Leptospira*. 1. *Leptospira* strain *Pomona*. *Acta Pathol Microbiol Scand Sect B* 1973; 81: 665-76.
- Birnbaum N, Barr SC, Center SA, Schermerhorn T, Randolph JF, Simpson KW. Naturally acquired leptospirosis in 36 dogs: serological and clinicopathological features. *J Small Anim Pract* 1998; 39: 231-6.
- Bishop L, Strandberg JD, Adams RJ, Brownstein DG, Patterson R. Chronic active hepatitis in dogs associated with leptospires. *Am J Vet Res* 1979; 40: 839-44.
- Bolin CA, Koellner P. Human-to-human transmission of *Leptospira interrogans* by milk. *J Infect Dis* 1988; 158: 246-7.
- Bolin CA. Diagnosis of leptospirosis: a reemerging disease of companion animals. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 1996; 11: 166-71.

- 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.
- Bolin CA. Finds fault with implications of PCR assay conclusions. J Am Vet Med Assoc 2003; 223: 178-9.
- Bomfim MR, Ko A, Koury MC. Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. Vet Microbiol 2005; 109: 89-94.
- Boutillier P, Carr A, Schulman RL. Leptospirosis in dogs: a serologic survey and case series 1996 to 2001. Vet Ther 2003; 4: 178-87.
- Brem S, Kopp H, Meyer P. *Leptospira* antibody detection in dog serum in the years 1985 to 1988. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 1990; 103: 6-8.
- Brem S, Staak E, Schönberg A, Kopp H, Meyer P. Beitrag zur Leptospiren-Serologie des Hundes. Vergleich von MAT- und ELISA-Ergebnissen. Tierärztl Umschau 1999; 54: 83-7.
- Brown CA, Roberts AW, Miller MA, Davis DA, Brown SA, Bolin CA, Jarecki-Black J, Greene CE, Miller-Liebl D. *Leptospira interrogans* serovar *grippotyphosa* infection in dogs. J Am Vet Med Assoc 1996; 209: 1265-7.
- 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: 110-4.
- Bryson DG, Ellis WA. Leptospirosis in a British domestic cat. J Small Anim Pract 1976; 17: 459-65.
- Burgdorfer W. The possible role of ticks as vectors of leptospirae. I. Transmission of *Leptospira pomona* by the argasid tick, *Ornithodoros turicata*, and the persistence of this organism in its tissues. Exp Parasitol 1956; 5: 571-9.
- Campagnolo ER, Warwick MC, Marx HL, Jr., Cowart RP, Donnell HD, Jr., Bajani MD, Bragg SL, Esteban JE, Alt DP, Tappero JW, Bolin CA, Ashford DA. Analysis of the 1998 outbreak of leptospirosis in Missouri in humans exposed to infected swine. J Am Vet Med Assoc 2000; 216: 676-82.
- Carlos ER, Kundin WD, Watten RH, Tsai CC, Irving GS, Carlos ET, Directo AC. Leptospirosis in the Philippines: canine studies. Am J Vet Res 1971; 32: 1451-4.
- Cerri D, Ebani VV, Fratini F, Pinzauti P, Andreani E. Epidemiology of leptospirosis: observations on serological data obtained by a "diagnostic laboratory for leptospirosis" from 1995 to 2001. New Microbiol 2003; 26: 383-9.

- Champagne MJ, Higgins R, Fairbrother JM, Dubreuil D. Detection and characterization of leptospiral antigens using a biotin/avidin double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot. *Can J Vet Res* 1991; 55: 239-45.
- Chandrasekaran S, Pankajalakshmi VV. Usefulness of dark field microscopy after differential centrifugation in the early diagnosis of leptospirosis in dog and its human contacts. *Indian J Med Sci* 1997; 51: 1-4.
- Chapman AJ, Adler B, Faine S. Antigens recognised by the human immune response to infection with *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. *J Med Microbiol* 1988; 25: 269-78.
- 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: 211-4.
- Cole JR, Jr., Sangster LT, Sulzer CR, Pursell AR, Ellinghausen HC. Infections with *Encephalitozoon cuniculi* and *Leptospira interrogans*, serovars *grippotyphosa* and *ballum*, in a kennel of foxhounds. *J Am Vet Med Assoc* 1982; 180: 435-7.
- 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: 1528-34.
- 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: 731-4.
- Czekalowski JW, Eaves G. The structure of *Leptospira* as revealed by electron microscopy. *J Pathol Bacteriol* 1955; 69: 129-32.
- De Abreu Fonseca C, 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 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: 633-42.
- Dedie K, Bockemühl J, Kühn H, Volkmer K, Weinke T. Leptospirosen. In: Bakterielle Zoonosen bei Tier und Mensch, 1. edn Stuttgart: Enke Verlag 1993:
- Del Real G, Segers RP, Vad der Zeijst VA, Gaastra W. Cloning of a hemolysin gene from *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. *Infect Immun* 1989; 57: 2588-90.

- Dey S, Mohan CM, 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. Recombinant antigen-based dipstick ELISA for the diagnosis of leptospirosis in dogs. *Vet Rec* 2007; 160: 186-8.
- Dhaliwal GS, Murray RD, Dobson H, Montgomery J, Ellis WA. Effect of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* infection on milk yield in endemically infected dairy herds. *Vet Rec* 1996; 139: 319-20.
- Dickeson D, Love DN. A serological survey of dogs, cats and horses in south-eastern Australia for *leptospiral* antibodies. *Aust Vet J* 1993; 70: 389-90.
- Dikken H, Kmety E. Serological typing methods of leptospire. *Meth in Microbiol* 1978; 11: 260-307.
- Dolhnikoff M, Mauad T, Bethlem EP, Carvalho CR. Pathology and pathophysiology of pulmonary manifestations in leptospirosis. *Braz J Infect Dis* 2007; 11: 142-8.
- Dura EU. Vergleichende Untersuchungen von Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Mikroagglutinationsreaktion und Immunofluoreszenztest zum Nachweis von Antikörper gegen Leptospiren [Dissertation]. München: Ludwig-Maximilians Universität; 1993.
- Dutta TK, Christopher M. Leptospirosis - an overview. *J Assoc Physicians India* 2005; 53: 545-51.
- Ebani V, Cerri D, Fratini F, Rizzo E, Poli A, Andreani E. *Leptospira* and *brucella* seroprevalence in hares (*Lepus europaeus*, Pallas) in district of Pisa (Italy). *Verh Ber Erkg Zootiere* 2003; 41: 221-3.
- Ellinghausen HC, Jr., 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* 1965; 26: 45-51.
- Ellis WA, O'Brien JJ, Pearson JK, Collins DS. Bovine leptospirosis: infection by the *Hebdomadis* serogroup and mastitis. *Vet Rec* 1976; 99: 368-70.
- Ellis WA. Leptospirosis. *J Small Anim Pract* 1986; 27: 683-92.
- Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JD, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill FR, 3rd, Smith TF. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 165-256.
- Eulenberger K, Bernhard A, Schüppel K. Leptospirosis in Baikal Seals (*Phoca sibirica*). *European Association of Zoo- and Wildlife Veterinarians*. Heidelberg, Germany: 2002: 271-4.

- Everard CO, Fraser-Chanpong GM, Bhagwandin LJ, Race MW, James AC. Leptospire in wildlife from Trinidad and Grenada. *J Wildl Dis* 1983; 19: 192-9.
- Everard JD, Everard CO. Leptospirosis in the Caribbean. *Rev Med Microbiol* 1993; 4: 114-22.
- Faine S. Guidelines for the control of leptospirosis. In: Offset Publication No. 67, Geneva, Switzerland: World Health Organization. 1982. 1-171.
- Faine S, Valentine R. Leptospirosis *Hardjo* in pregnancy. *Med J Aust* 1984; 140: 311-2.
- Faine S, Adler B, Bolin CA, Perolat P. *Leptospira* and Leptospirosis, 2nd edn. MedSci, Melbourne, Australia. 1999. 68-85.
- Farr RW. Leptospirosis. *Clin Infect Dis* 1995; 21: 1-6.
- Fiedler A. Zur Weilschen Krankheit. *Dtsch Arch f Klin Med* 1988; 42: 261.
- 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 assays for the serodiagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3303-10.
- Freudiger U. Leptospirose. In: Klinik der Hundekrankheiten. Grünbaum EG, Schimke E, eds. Stuttgart: Enke 1997: 1094-6.
- Gerber B, Eichenberger S, Wittenbrink MM, Reuch CE. Antibodies against *Borrelia burgdorferi* in Bernese Mountain dogs in Switzerland. *Proc 14th ECVIM-CA*. Barcelona: 2004: 200.
- Gerritsen MJ, Koopmans MJ, Peterse D, Olyhoek T. Sheep as maintenance host for *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* subtype *hardjobovis*. *Am J Vet Res* 1994; 55: 1232-7.
- 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.
- Gilad J, Borer A. Treatment of acute lung injury attributed to leptospirosis. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 844.
- Glosser JW, Sulzer CR, Eberhardt M, Winkler WG. Cultural and serologic evidence of *Leptospira interrogans* serotype Tarassovi infection in turtles. *J Wildl Dis* 1974; 10: 429-35.
- Goldstein RE. Canine Leptospirosis. 15th ECVIM-CA Congress. Glasgow: 2005: 84-7.

- 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: 489-94.
- 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: 1691-700.
- Greene CE, Sykes J, Brown CA, Hartmann K. Leptospirosis. In: *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 3rd edn. Greene CE, ed. Philadelphia: WB Saunders 2006: 402-17.
- 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: 4225-34.
- 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: 6572-82.
- Haake DA. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiology* 2000; 146 (Pt 7): 1491-504.
- Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, Matsunaga J, Levett PN, Bolin CA. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun* 2000; 68: 2276-85.
- 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: 2818-28.
- Harkin KR, Gartrell CL. Canine leptospirosis in New Jersey and Michigan: 17 cases (1990-1995). *J Am Anim Hosp Assoc* 1996; 32: 495-501.
- 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: 1224-9.
- 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: 1230-3.
- Hartman EG, Broekhuizen U. Antibodies to *Leptospira* in European Hares (*Lepus europaeus Pallas*) in the Netherlands. *Zbl Vet Med B* 1980; 27: 640-9.
- Hartman EG. Epidemiological aspects of canine leptospirosis in the Netherlands. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]* 1984; 258: 350-9.

- Hartman EG, van den Ingh TS, Rothuizen J. Clinical, pathological and serological features of spontaneous canine leptospirosis. An evaluation of the IgM- and IgG-specific ELISA. *Vet Immunol Immunopathol* 1986; 13: 261-71.
- Heath SE, Johnson R. Leptospirosis. *J Am Vet Med Assoc* 1994; 205: 1518-23.
- Hellmann E, Aschenbrenner E. Untersuchungen über die Eignung des ELISA für den Nachweis von Antikörpern gegen Leptospiren beim Hund. *Tierärztl. Umschau* 1987; 42: 634-8.
- Hookey JV. Detection of *Leptospiraceae* by amplification of 16S ribosomal DNA. *FEMS Microbiol Lett* 1992; 69: 267-74.
- Howarth JA, Reina-Guerra M. Comparative studies on experimental avian leptospirosis. *J Infect Dis* 1958; 102: 268-74.
- Isogai E, Isogai H, Fujii N, Oguma K. Macrophage activation by leptospiral lipopolysaccharide. *Zentralbl bakteriol* 1990; 273: 200-8.
- Isogai E, Hirose K, Kimura K, Hayashi S, Kubota T, Fujii N, Isogai H. Role of platelet-activating-factor (PAF) on cellular responses after stimulation with leptospire lipopolysaccharide. *Microbiol Immunol* 1997; 41: 271-5.
- Jansen A, Schoneberg I, Frank C, Alpers K, Schneider T, Stark K. Leptospirosis in Germany, 1962-2003. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1048-54.
- Jansen A, Luge E, Guerra B, Wittschen P, Gruber AD, Loddenkemper C, Schneider T, Lierz M, Ehlert D, Appel B, Stark K, Nockler K. Leptospirosis in urban wild boars, Berlin, Germany. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 739-42.
- Jevon TR, Knudson MP, Smith PA, Whitecar PS, Blake RL, Jr. A point-source epidemic of leptospirosis. Description of cases, cause, and prevention. *Postgrad Med* 1986; 80: 121-9.
- 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: 1016-22.
- Johnson RC, Harris VG. Differentiation of pathogenic and saprophytic letospire. I. Growth at low temperatures. *J Bacteriol* 1967; 94: 27-31.
- Johnson RC, Faine S. Order I. *Spirochaetales*: Family II *Leptospiraceae* Hovind-Hougen 1979. In: *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*, 1st edn. Krieg NR, Holt JG, eds. Baltimore-London: Williams and Wilkins 1984: 62-70.
- Jung BY, Song YK, Choi JS, Lee KW, Ha TY, Yoon SS, Kweon CH, Park CK. Seroprevalence of leptospirosis in animals in Korea. *Vet Rec* 2008; 163: 28-9.

- Kasarov LB. Degradation of the erythrocyte phospholipids and haemolysis of the erythrocytes of different animal species by leptospirae. *J Med Microbiol* 1970; 3: 29-37.
- Kathe J, Mochmann H. Leptospiren und Leptospirosen. In: Infektionskrankheiten und ihre Erreger. Bieling R, Kathe J, Köhler W, Mayr A, eds. Jena: Fischer 1967: 110-47.
- Kee SH, Kim IS, Choi MS, Chang WH. Detection of leptospiral DNA by PCR. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1035-9.
- Keenan KP, Alexander AD, Montgomery CA, Jr. Pathogenesis of experimental *Leptospira interrogans*, serovar *bataviae*, infection in the dog: microbiological, clinical, hematologic, and biochemical studies. *Am J Vet Res* 1978; 39: 449-54.
- 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: 615-8.
- Kmety E. Leptospiroseherde in der Slowakei. *Zbl Bakt I Orig* 1955; 163: 464-76.
- Kmety E, Dikken H. Classification of the species *Leptospira interrogans* and history of its serovars. University Press, Gronngen, Netherlands 1993: 15-37.
- Kölbl S, Tschabrun S, Schuller W, Müller M. Untersuchungen zur humoralen Immunantwort bei Junghunden nach Grundimmunisierung mit verschiedenen Kombinationsimpfstoffen IV. Komponente gegen Leptospirose. *Kleintierprax* 1995; 40: 929-33.
- Krawczyk M. Serological evidence of leptospirosis in animals in northern Poland. *Vet Rec* 2005; 156: 88-9.
- Langston CE, Heuter KJ. Leptospirosis. A re-emerging zoonotic disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2003; 33: 791-807.
- 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: 766-9.
- 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: 315-22.
- Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 296-326.
- 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: 745-8.

- Levett PN. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 447-52.
- Marcus LC. Infectious diseases of reptiles. *J Am Vet Med Assoc* 1971; 159: 1626-31.
- Marshall RB. International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of *Leptospira*. Minutes of the Meetings, 13 and 15 September 1990. *Int J Syst Bacteriol* 1992; 42: 330-4.
- Mason RW, King SJ, McLachlan NM. Suspected leptospirosis in two cats. *Aust Vet J* 1972; 48: 622-3.
- 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.
- Mazzonelli J, Dorta de Mazzonelli G, Mailloux M. Evaluation of the leptospiral protein-free medium. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]* 1984; 258: 27-31.
- Mendoza L, Prescott JF. Serodiagnosis of leptospirosis in pigs using an axial filament enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Microbiol* 1992; 31: 55-70.
- Merien 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: 2219-24.
- Merien F, Baranton G, Perolat P. Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. *J Infect Dis* 1995; 172: 281-5.
- Meslin FX. Global aspects of emerging and potential zoonoses: a WHO perspective. *Emerg Infect Dis* 1997; 3: 223-8.
- Michna SW. Leptospirosis. *Vet Rec* 1970; 86: 484-96.
- Miller NG, Froehling RC, White RJ. Activity of leptospire and their products on L cell monolayers. *Am J Vet Res* 1970; 31: 371-7.
- Miller RI, Ross SP, Sullivan ND, Perkins NR. Clinical and epidemiological features of canine leptospirosis in North Queensland. *Aust Vet J* 2007; 85: 13-9.
- Milner AR, Jackson KB, Woodruff K, Smart IJ. Enzyme-linked immunosorbent assay for determining specific immunoglobulin M in infections caused by *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *J Clin Microbiol* 1985; 22: 539-42.
- Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155: 335-50.

- Mumford CJ. Leptospirosis and water sports. *Br J Hosp Med* 1989; 41: 519.
- Mylonakis ME, Bourtzi-Hatzopoulou E, Koutinas AF, Petridou E, Saridomichelakis MN, Leontides L, Siochu A. Leptospiral seroepidemiology in a feline hospital population in Greece. *Vet Rec* 2005; 156: 615-6.
- Navarro CE, Kociba GJ. Hemostatic changes in dogs with experimental *Leptospira interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae* infection. *Am J Vet Res* 1982; 43: 904-6.
- Nervig RM, Garrett LA. Use of furosemide to obtain bovine urine samples for leptospiral isolation. *Am J Vet Res* 1979; 40: 1197-200.
- Nielsen JN, Cochran GK, Cassells JA, Hanson LE. *Leptospira interrogans* serovar *bratislava* infection in two dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 199: 351-2.
- 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: 342-5.
- Odontsetseg N, Sakoda Y, Kida H. Serological surveillance of canine leptospirosis in Mongolia. *Vet Rec* 2005; 157: 120-1.
- 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: 249-54.
- 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: 247-57.
- 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: 5924-30.
- Palaniappan RU, Chang YF, 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: 975-84.
- Palaniappan RU, Ramanujam S, Chang YF. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. *Curr Opin Infect Dis* 2007; 20: 284-92.
- Palmer MF, Waitkins SA, Fitzgeorge RB, Baskerville A. Experimental infection of monkeys with *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. *Epidemiol Infect* 1987; 98: 191-7.

- 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: 159-71.
- Perolat P, Chappel RJ, Adler B, Baranton G, Bulach DM, Billingham ML, Letocart M, Merien F, Serrano MS. *Leptospira fainei* sp. nov., isolated from pigs in Australia. Int J Syst Bacteriol 1998; 48: 851-8.
- Planc R, Dean D. Overview of the epidemiology, microbiology and pathogenesis of *Leptospira* in humans. Microbes and Infection 2000; 2: 1265-76.
- Plesko I, Janovicova E, Lac J. Beitrag zur Bedeutung von Kaltblütern für die Zirkulation der Leptospiren in der Natur. Zbl Bakt I Orig 1964; 192: 482-4.
- Poncelet L, Fontaine M, Balligand M. Polymyositis associated with *Leptospira australis* infection in a dog. Vet Rec 1991; 129: 40.
- Powledge TM. The polymerase chain reaction. Adv Physiol Educ 2004; 28: 44-50.
- Prescott JF, Ferrier RL, Nicholson VM, Johnston KM, Hoff B. Is canine leptospirosis underdiagnosed in southern Ontario? A case report and serological survey. Can Vet J 1991; 32: 481-6.
- Prescott JF, Key D, Osuch M. Leptospirosis in dogs. Can Vet J 1999; 40: 430-1.
- 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: 955-61.
- Radeke K, Kaser-Hotz B, Arndt B, Gruber AD, Guerra B, Janssen A, Lotz F, Luge E, Nöckler K, Kohn B. Lungenmanifestation bei Hunden mit Leptospirose. In: Jahrestagung der FG Innere Medizin und klinische Labordiagnostik der DVG. Tierärztliche Praxis, Berlin.2009. 8.
- Ramadass P, Jarvis BD, Corner RJ, Cinco M, Marshall RB. DNA relatedness among strains of *Leptospira biflexa*. Int J Syst Bacteriol 1990; 40: 231-5.
- Ramadass P, Jarvis BD, Corner RJ, Penny D, Marshall RB. Genetic characterization of pathogenic *Leptospira* species by DNA hybridization. Int J Syst Bacteriol 1992; 42: 215-9.
- Ramadass P, Meerarani S, Kumar AS, Venkathesha MD, Nachimuthu K. Rapid diagnosis of leptospirosis by polymerase chain reaction. Indian Vet J 1997a; 74: 457-60.
- Ramadass P, Meerarani S, Venkatesha MD, Senthilkumar A, Nachimuthu K. Characterization of leptospiral serovars by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting. Int J Syst Bacteriol 1997b; 47: 575-6.

- Ratnam S. Leptospirosis: an Indian perspective. *Indian J Med Microbiol* 1994; 12: 228-39.
- Rees HG. Leptospirosis in a cat. *Vet J* 1964; 12: 64.
- Reilly GA, Bailie NC, Morrow WT, McDowell SW, Ellis WA. Feline stillbirths associated with mixed *Salmonella typhimurium* and *leptospira* infection. *Vet Rec* 1994; 135: 608.
- Rentko VT, Clark N, Ross LA, Schelling SH. Canine leptospirosis. A retrospective study of 17 cases. *J Vet Intern Med* 1992; 6: 235-44.
- Ribotta M, Fortin M, Higgins R, Beaudin S. Canine leptospirosis: serology. *Can Vet J* 2000a; 41: 494-5.
- 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* 2000b; 64: 32-7.
- Rolle M. Leptospira. In: *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. Mayr A, ed. Stuttgart: Enke Verlag 2006: 399-403.
- Ruhl-Fehlert CI, Brem S, Feller W, Kopp H, Meyer P, Rinke M. Clinical, microbiological and pathological observations in laboratory beagle dogs infected with leptospire of the serogroup *Sejroe*. *Exp Toxicol Pathol* 2000; 52: 201-7.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230: 1350-4.
- Salzborn C. Krankheitsinzidenzen des Hundes - Einfluss des Alters sowie von Geschlecht, Größe und Rasse: Ein retrospektiver Überblick über die stationären Patienten der I. Medizinischen Tierklinik München 1991 - 1997 [Dissertation]. München: Ludwig-Maximilians Universität; 2003.
- Sarkar U, Nascimento SF, Barbosa R, Martins R, Nuevo H, Kalafanos I, Grunstein I, Flannery B, Dias J, Riley LW, Reis MG, Ko AI. Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 66: 605-10.
- 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: 935-41.
- Schonberg A. Growth of 10 *Leptospira interrogans* serovars using polyvinylpyrrolidone(PVP)-treated Tween in protein-free medium. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]* 1983; 254: 540-4.

- Schönberg A, Müller F, Weber A, Fingscheidt E, Brehm S, Seelinger H, Schaal E. Diagnostik bei Leptospirosen. Zentralbl Bakteriol Hyg [A] 1984; 258: 480-91.
- Schwarz E. Classification, origin and distribution of commensal rats. Bull World Health Organ 1960; 23: 411-6.
- Segura ER, Ganoza CA, Campos K, Ricaldi JN, Torres S, Silva H, Cespedes MJ, Matthias MA, Swancutt MA, Lopez Linan R, 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: 343-51.
- Sehgal SC. Epidemiological patterns of leptospirosis. Indian J Med Microbiol 2008; 24: 310-1.
- Selbitz HJ. Bakterielle Krankheiten der Tiere. In: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 8th edn. Mayr A, ed. Stuttgart: Enke Verlag 2006: 393-403.
- Sent U, Pothmann M. Atypischer klinischer Verlauf einer Infektion mit *L. interrogans* Serovar *saxkoebing* bei einem Hund. Kleintierprax 1995; 40: 143-7.
- Sessions JK, Greene C. Canine Leptospirosis: Epidemiology, Pathogenesis, and Diagnosis. Compend Contin Educ Pract Vet 2004; 26: 606-21.
- Shaw RD. Kayaking as a risk factor for leptospirosis. Mo Med 1992; 89: 354-7.
- Simpson FG, Green KA, Haug GJ, Brooks DL. Leptospirosis associated with severe pulmonary haemorrhage in far North Queensland. Med J Aust 1998; 169: 151-3.
- Smith CR, Ketterer PJ, McGowan MR, Corney BG. A review of laboratory techniques and their use in the diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* infection in cattle. Aust Vet J 1994; 71: 290-4.
- Smits HL, van der Hoorn MA, Goris MG, Gussenhoven GC, Yersin C, Sasaki DM, Terpstra WJ, Hartskeerl RA. Simple latex agglutination assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. J Clin Microbiol 2000; 38: 1272-5.
- 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 2002; 2: 13-20.
- Songer JG, Thiermann AB. Leptospirosis. J Am Vet Med Assoc 1988; 193: 1250-4.
- Sperber SJ, Schlepner CJ. Leptospirosis: a forgotten cause of aseptic meningitis and multisystem febrile illness. South Med J 1989; 82: 1285-8.

- Spradbrow PB, Seawright AA. *Leptospira Pomona* infection in calves. Austr Vet J 1963; 39: 423-33.
- Stallman NIC. Subcommittee on the Taxonomy of *Leptospira*. Minutes of the meeting, 6 to 10 August 1982, Boston, Massachusetts. Int J Syst Bacteriol 1984; 34: 258-9.
- Steger-Lieb A, Gerber B, Nicolet J, Gaschen F. An old disease with a new face: canine leptospirosis does not lose its relevance. Schweiz Arch Tierheilkd 1999; 141: 499-507.
- Sum S, Müller W, Hartmann K. Antikörperprävalenz gegen *Borrelia burgdorferi* in Süddeutschland. Tierarztl Prax 2005; 33: 142.
- 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: 896-8.
- Surujballi O, Henning D, Marenger R, Howlett C. Development of a monoclonal antibody-based competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Leptospira borgpetersenii* serovar *hardjo* type *hardjobovis* antibodies in bovine sera. Can J Vet Res 1997a; 61: 267-74.
- Surujballi O, Mallory M. Competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Leptospira interrogans* serovar *pomona* antibodies in bovine sera. Clin Diagn Lab Immunol 2001; 8: 40-3.
- Surujballi OP, Marenger RM, Eaglesome MD, Sugden EA. Development and initial evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* antibodies in bovine sera. Can J Vet Res 1997b; 61: 260-6.
- 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: 1177-8.
- Terpstra WJ, Ligthart GS, Schoone GJ. Serodiagnosis of human leptospirosis by enzyme-linked immunosorbent-assay (ELISA). Zentralbl Bakteriol A 1980; 247: 400-5.
- Thiermann AB. Canine leptospirosis in Detroit. Am J Vet Res 1980; 41: 1659-61.
- Thomas HC. Immunologic aspects of liver disease. In: Diseases of the Liver, 7th edn. Schiff L, Schiff ER, eds. Philadelphia: Lippincott Company 1993: 638-58.
- Thompson JC, Manktelow BW. Pathogenesis and red blood cell destruction in haemoglobinaemic leptospirosis. J Comp Pathol 1986; 96: 529-40.
- Torten M, Shenberg E, van der Hoeden J. The role of birds in the epidemiology of leptospirosis. Trop Geogr Med 1965; 17: 353-8.

- Townsend WM, Stiles J, Krohne SG. Leptospirosis and panuveitis in a dog. *Vet Ophthalmol* 2006; 9: 169-73.
- Trowbridge AA, Green JB, 3rd, Bonnett JD, Shohet SB, Ponnappa BD, McCombs WB, 3rd. Hemolytic anemia associated with leptospirosis. Morphologic and lipid studies. *Am J Clin Pathol* 1981; 76: 493-8.
- Turner LH. Leptospirosis III. Maintenance, isolation and demonstration of leptospire. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1970; 64: 623-46.
- Twigg GI, Cuerden CM, Hughes DM, Medhurst P. The leptospirosis reservoir in British wild mammals. *Vet Rec* 1969; 84: 424-6.
- Van den Broek AHM, Thrusfield MV, Dobbie GR. A serological and bacteriological survey of leptospiral infection in dogs in Edinburgh and Glasgow. *J Small Anim Pract* 1991; 32: 118-24.
- Van der Hoeden J. Leptospiral antibodies in cold blooded animals. *Ann Soc Belg Med Trop* 1966; 46: 171-2.
- Van der Hoeden J, Shenberg E, Torten M. The epidemiological complexity of *Leptospira canicola* infection of man and animals in Israel. *Isr J Med Sci* 1967; 3: 880-4.
- 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: 2258-62.
- Vicente J, Leon-Vizcaino L, Gortazar C, Jose Cubero M, Gonzalez M, Martin-Atance P. Antibodies to selected viral and bacterial pathogens in European wild boars from southcentral Spain. *J Wildl Dis* 2002; 38: 649-52.
- Vinetz JM, Glass GE, Flexner CE, Mueller P, Kaslow CD. Sporadic urban leptospirosis. *Ann Intern Med* 1996; 125: 794-8.
- Vinetz JM. Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis* 2001; 14: 527-38.
- Vinh T, Adler B, Faine S. Glycolipoprotein cytotoxin from *Leptospira interrogans* serovar *copenhageni*. *J Gen Microbiol* 1986; 132: 111-23.
- 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: 316-20.
- 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.

- 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: 72-7.
- Weil A. Über eine eigentümliche, mit Milztumor, Ikterus und Nephritis einhergehende akute Infektionskrankheit. *Dtsch Arch f Klin Med* 1886; 39: 209-19.
- White FH. *Leptospiral* agglutinins in snake serums. *Am J Vet Res* 1963; 24: 179-82.
- WHO. Leptospirosis worldwide. *Wkly Epidemiol Rec* 1999; 74: 237-42.
- WHO. Human leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control. International Leptospirosis Society. World Health Organization, Geneva.2003. 9-17.
- Winkelmayer R, M. V, Paulsen P, Gansterer A, Tremel F. Explorative study on the seroprevalence of *Brucella*-, *Francisella*- and *Leptospira* antibodies in the European hare (*Lepus europaeus Pallas*) of the Austrian-Czech border region. *Vet Med Austria* 2005; 92: 131-5.
- Wohl JS. Canine Leptospirosis. *Compend Contin Educ Pract* 1996; 18: 1215-25.
- 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* 1997; 35: 3140-6.
- Woodward MJ, Sullivan GJ, Palmer NM, Woolley JC, Redstone JS. Development of a PCR test specific for *Leptospira hardjo* genotype *bovis*. *Vet Rec* 1991; 128: 282-3.
- 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: 2270-2.
- Zuelzer M. Beiträge zur Morphologie und Entwicklung der Weilschen *Spirochaete*. *Arbeiten der Kaiserlichen Gesellschaft* 1918; A 51: 159-79.
- Zuerner R, Haake D, Adler B, Segers R. Technological advances in the molecular biology of *Leptospira*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2000; 2: 455-62.

IX. Anhang

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Vera Geisen
Geburtstag: 02.08.1974
Geburtsort: Mayen
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: ledig
Eltern: Vater: Ernst Geisen, Landwirt
Mutter: Helga Geisen, geb. Geisen, Hausfrau
Geschwister: Bärbel Geisen, Ärztin
Peter Geisen, Landwirt
Carla Geisen, Erzieherin

Ausbildung

1980 - 1986 Grund- und Hauptschule St. Martin, Mertloch
1986 - 1993 Kurfürst-Balduin-Gymnasium, Münstermaifeld
1993 Abitur
1993 - 1994 Lehre als Tierarzhelferin, Dr. Rettig,
Praktischer Tierarzt, Großmaiseid, Gemischtpraxis
1994 – 2000 Studium der Veterinärmedizin an Justus-Liebig-Universität
zu Gießen
April 2000 Tierärztliche Approbation

Beruflicher Werdegang

2001 – 2003 Assistenzärztin in der Gemischtpraxis Dr. Frentzen, Dr.
Mundt-Adam, Dedenbach
2003 – 2004 Internship in der tierärztliche Gemeinschaftspraxis Dres.
Gödde und Steger, Piding, Spezialisierung auf Innere
Medizin, Chirurgie und Neurologie
Jan. – Juni 2004 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Medizinischen
Kleintierklinik der LMU München

seit Juli 2004	Doktorandin an der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München
2005 - 2009	Residency in Innerer Medizin in der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München
Jan.-März 2009	Oberärztin Intensivstation/Notfallmedizin in der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München
ab April 2009	Oberärztin (Spezialgebiet Endoskopie) in der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München

Danksagung

Sehr herzlich möchte ich mich bei Prof. Dr. Katrin Hartmann für die Bereitstellung dieses interessanten Themas bedanken und für die jederzeit gewährte Hilfe und Unterstützung sowie die gute und freundliche Zusammenarbeit während der Verfassung dieser Arbeit.

Prof. Dr. Küchenhoff und Deborah Keys möchte ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung danken.

Bianca Stützer und Kirsten Kuehner haben sich die Mühe gemacht, diese Arbeit Korrektur zu lesen. Dafür herzlichen Dank!

Daneben möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Medizinischen Kleintierklinik für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie für die moralische Unterstützung, ohne die mir diese Arbeit weitaus schwerer gefallen wäre.

Mein besonderer Dank geht an meinen Freund für die Hilfe bei der Stressbewältigung und für die allzeit gewährte Hilfe bei EDV-Fragen.