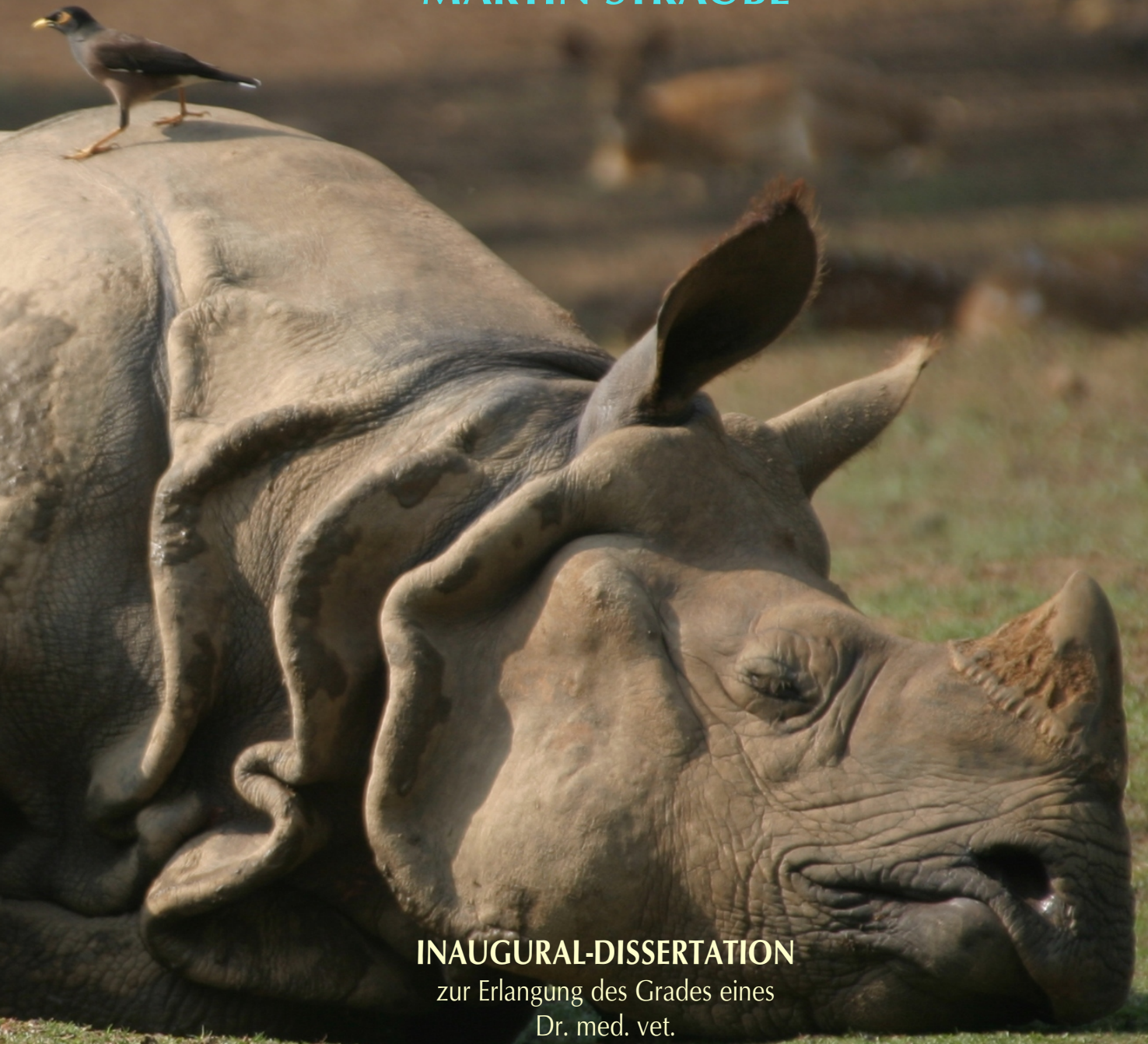


VORKOMMEN VON LEPTOSPIREN IN TIERBESTÄNDEN ZOOLOGISCHER GÄRTEN

MARTIN STRAUBE



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2007

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus-Liebig-Universität Gießen

und

dem Zoologisch-botanischen Garten Wilhelma, Stuttgart

Betreuer: Prof. Dr. R. Bauerfeind

Vorkommen von Leptospiren in Tierbeständen zoologischer Gärten

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

MARTIN STRAUBE

Tierarzt aus Groß-Gerau

Gießen, 2007

**Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter: Prof. Dr. R. Bauerfeind
HD Dr. N. Tautz

Tag der Disputation: 19. April 2007

Meinen Eltern

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Straube, M .

Erste Ergebnisse der Untersuchung zum Vorkommen von Leptospiren in Tierbeständen zoologischer Gärten. Vortrag anlässlich der 22. Arbeitstagung der Zootierärzte im Deutschsprachigen Raum, München 2002

Straube, M., Rietschel, W., Bauerfeind, R.

Epidemiology of leptospirosis in zoo-animals. Examinations in Central European zoological gardens. Verh. ber. Erkr. Zootiere (2003) 41: 419

Straube, M., Bauerfeind, R., Friedrich, K., Rietschel, W.

Epidemiologie und Diagnostik von Leptospiren in Tierparks und Zoologischen Gärten. Vortrag anlässlich der 2. Jahrestagung der DVG-Fachgruppe Zootiere, Wildtiere und exotische Heimtiere, Göttingen 2004

Diese Arbeit wurde gefördert durch ein Stipendium der
Grimminger-Stiftung für Zoonosenforschung, Stuttgart

INHALTSVERZEICHNIS

	VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	III
1	EINLEITUNG	1
2	SCHRIFTTUM	3
2.1	Die Gattung <i>Leptospira</i>	3
2.1.1	Morphologische und andere Eigenschaften	3
2.1.2	Taxonomische Stellung und Einteilung	4
2.1.3	Tenazität	10
2.2	Epidemiologie der Leptospirose	11
2.2.1	Wirtsspektrum	13
2.2.2	Erregerausscheidung, Eintrittspforten und Übertragungswege	15
2.2.3	Pathogenese und Klinik	15
2.2.4	Geographische Verbreitung und Häufigkeit	17
2.2.5	Labordiagnostische Nachweismethoden für <i>Leptospira</i> - Infektionen bei Tieren	21
2.3	Leptospiren in zoologischen Gärten	23
2.3.1	<i>Leptospira</i> -Infektionen im Tierbestand zoologischer Gärten	23
2.3.2	Ansteckungsmöglichkeiten von Zootieren	25
2.3.3	Gesundheitliche Bedeutung von Leptospiren für Zootiere	26
2.3.4	Zootiere als Ansteckungsquelle für den Menschen	29
2.3.5	Voruntersuchungen im Zoologisch-Botanischen Garten Wilhelma	30
3	MATERIAL UND METHODEN	37
3.1	Verbrauchsmaterialien und Puffer	37
3.2	Bakterienstämme	37
3.3	Zoologische Gärten und Tierparks	37
3.4	Tiere	38
3.4.1	Blutserumproben	40
3.4.2	Nierengewebsproben	40
3.5	Bakteriologische Methoden	44
3.5.1	Medien	44
3.5.2	Anzucht und Haltung von Leptospiren	45
3.5.3	Bestimmung der Leptospiren-Keimzahl	45
3.5.4	Anzüchtung von Leptospiren aus Nierengewebsproben	45
3.6	Serologische Methoden	46
3.6.1	Mikroagglutinationstest	46
3.7	Molekularbiologische Methoden	47
3.7.1	Probenvorbereitung	47
3.7.2	Agarosegelelektrophorese	49
3.7.3	Polymerase-Kettenreaktion	51
3.7.3.1	Leptospiren-Screening-PCR	51
3.7.3.2	Auswertung der PCR	52
3.7.4	Sequenzierung von PCR-Produkten	52
3.7.4.1	Aufreinigung der Amplifikate	54
3.7.4.2	Sequenzierungsreaktion	54

3.8	Umfrage zum Vorkommen von Leptospiren in zoologischen Gärten	55
3.9	Datenerhaltung und Auswertung	57
3.9.1	Bilddokumentation und Auswertung	57
3.9.2	Statistische Auswertung	57
4.	ERGEBNISSE	58
4.1	Auswertung der Umfrage zum Vorkommen von Leptospiren in zoologischen Gärten	58
4.2	Artenspektrum und Häufigkeit von wildlebenden Tieren in zoologischen Gärten	60
4.3	Nachweis von <i>Leptospira</i>-Infektionen bei Tieren in zoologischen Gärten	63
4.3.1	Indirekter Nachweis mittels Mikroagglutinationstest	63
4.3.1.1	Nachweis bei Zootieren	63
4.3.1.2	Nachweis bei Futtertieren	77
4.3.1.3	Nachweis bei wildlebenden Tieren und Haushunden	77
4.3.2	Direkter Nachweis mittels PCR	77
4.3.2.1	Evaluierung der verwendeten PCR-Tests	77
4.3.2.1.1	Reaktion der Primerpaare LP1 / LP2 und LeptoR / LeptoF mit DNS von Mäusen	77
4.3.2.1.2	Nachweisgrenzen der Leptospiren-Screening-PCR	78
4.3.2.2	Nachweis von Leptospiren-DNS in Nierengewabsproben von Wirbeltieren	84
4.3.3	Direkter Nachweis mittels Anzucht	89
4.3.4	Korrelation zwischen den mittels PCR und MAT erhobenen Befunden	89
4.3.5	Räumliche Verteilung der PCR- oder seropositiven Tiere auf dem Gelände der Wilhelma	91
5	BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE	94
5.1	<i>Leptospira</i>-Infektionen bei den Zootieren	94
5.2	<i>Leptospira</i>-Infektionen bei Futtertieren und wildlebenden Tieren	99
5.3	Qualität der verwendeten Testverfahren	102
6	Zusammenfassung	107
7	Literaturverzeichnis	111
	Anhang	133
	Danksagung	143

Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärwesen
bidest.	bidestillata = bidestilliert
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
CVUA	Chemisches-und-Veterinär-Untersuchungsamt
ddNTP	Didesoxy-Nucleosidtriphosphat
dGTP	Desoxy-Guanosintriphosphat
dITP	Desoxy-Inosinphosphat
DNA	DesoxyriboNukleinsäure (englisch)
DNS	DesoxyriboNukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nucleosidtriphosphat
dsDNS	Doppelstrang DNS
dTTP	Desoxy-Thymindiphosphat
dUTP	Desoxy-Uraciltriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
	Firma
g	Gramm
<i>g</i>	Gravitationskonstante
GH	Giraffenhaus
H ₂ O	Wasser
H ₂ O _{bidest.}	bidestilliertes Wasser
i.v.	intravenös
IgG	Immunglobulin G
l	Liter
<i>L.</i>	<i>Leptospira</i>
LGA	Landesgesundheitsamt
m	Milli-
M	Molar (mol/l)
MAT	Mikroagglutinationstest

mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	millimol(ar)
mRNA	Messenger RNA = Boten-RNS
n	Stichprobenumfang
N	Normal
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoff-Ionen-Konzentration (p = negativer Potenzexponent)
pmol	Pikomol
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute (Umdrehungsgeschwindigkeit)
SDS	Dodecylsulfat-Natriumsalz
sec	Sekunde(n)
SiO ₂	Silicium-Oxid (Silica-Pulver)
spec.	Spezies, Art
spp.	Spezies, Arten
STUA	Staatliches Tierärztliches Untersuchungsamt
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydromethyl)aminomethan
U	Unit (Einheit)
usw.	und so weiter
UV	ultraviolett
V	Volt
V.	Vena
μ	Mikro-
μl	Mikroliter
μg	Mikrogramm
μm	Mikrometer
z.B.	zum Beispiel

1 EINLEITUNG

Die Leptospirose ist eine weltweit verbreitete, fieberhafte Infektionskrankheit, die durch pathogene Arten der Bakteriengattung *Leptospira* verursacht wird und warmblütige Wildtierarten befallen kann (Dedie *et al.*, 1993, Faine *et al.*, 1999, Levett, 2001). Menschen können ebenfalls an Leptospirose erkranken, wobei die Infektion auf direktem und indirektem Wege von Tieren auf Menschen übertragbar ist (Zoonose). Eine Leptospireninfektion kann asymptomatisch verlaufen oder aber eine Erkrankung hervorrufen, deren Spektrum an Manifestationen recht breit ist und von unspezifischen, grippeartigen Symptomen bis hin zu schweren Organschäden und Tod reicht (Levett, 2001; Plank and Dean, 2000).

Die Tierbestände in zoologischen Gärten haben einen hohen finanziellen und ideellen Wert. Auch im Artenschutz spielen Zootiere heute eine wichtige Rolle. So wird in Erhaltungszuchtprogrammen versucht, im Freiland vom Aussterben bedrohte Arten zu erhalten. Bei manchen ist mittlerweile jedes einzelne Individuum genetisch bedeutsam (Poley, 1993). Neben der direkten Bedrohung von Gesundheit und Leben eines wertvollen Zuchttieres können Infektionen mit Leptospiren auch gerade den Erfolg einer Erhaltungszucht durch ihren negativen Einfluss auf die Fruchtbarkeit in Frage stellen (Black *et al.*, 2001; Guitian *et al.*, 2001, Smyth *et al.*, 1999). Als offenes System sind Zoos ständig der Gefahr des Einschleppens von Krankheiten ausgesetzt. Leptospirose als Todesursache bei Zootieren wird in der Fachliteratur regelmäßig erwähnt. Untersuchungen zur tatsächlichen Häufigkeit und Verbreitung des Erregers in Zoologischen Gärten sind jedoch selten (Hänichen *et al.*, 1992). Die Krankheit ist schwierig und nur mit Hilfe spezieller Untersuchungsverfahren nachweisbar. Bei Routineuntersuchungen werden Leptospiren nicht erfasst und auch in der Pathologie oftmals übersehen. Daher dürfte die Leptospirose als Ursache von Erkrankungen und Todesfällen erheblich unterschätzt werden (Deutz *et al.*, 1996; McNamara *et al.*, 1999; Schröder, 1975; Steffen *et al.*, 2000; Weber, 1987). Für eine solche Einschätzung spricht auch, dass die Yersiniose, die wie die Leptospirose vor allem wildlebende Nagetiere als Erregerreservoir hat, verhältnismäßig häufig in zoologischen Gärten Probleme bereitet (Eskens *et al.*, 1999; Rietschel, 2002; Schröder, 1999; Wesche *et al.*, 2002).

Im Jahr 2000 erkrankte ein Tierpfleger aus einem kleinen Zoo nahe Stuttgart an einer schweren Leptospirose, die durch einen Stamm des Serovars Icterohaemorrhagiae verursacht wurde und eine stationäre Behandlung erforderte (Gessmann, 2002; Straube, 2003). In einer epidemiologischen Untersuchung zur Ansteckungsquelle wurde durch das Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg eine aus diesem Zoo stammende Wanderratte (*Rattus norvegicus*) als Leptospirenträger festgestellt

(Kimmig, 2002; Oehme, 2002). Der Fall veranlasste den Zootierarzt des Zoologisch-Botanischen Gartens Wilhelma in Stuttgart, einige Zootiere serologisch zu untersuchen, und auch hierbei konnten Antikörper gegen *Leptospira* festgestellt werden (Rietschel, 2002).

Ziele der vorliegenden Arbeit waren es, Erregerreservoir unter den auf dem Gelände zoologischer Gärten wild lebenden Tieren ausfindig zu machen und die Häufigkeit zu bestimmen, mit der gegen Leptospiren gerichtete Antikörper bei verschiedenen Zootieren auftraten. Dadurch sollten Risikobereiche und besonders gefährdete Tiergruppen erkannt werden.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Die Gattung *Leptospira*

2.1.1 Morphologische und andere Eigenschaften

Bakterien der Gattung *Leptospira* sind gramnegative, helikal gewundene, flexible und bewegliche Stäbchenbakterien. Gewöhnlich sind sie bei einem Durchmesser von 0,1 – 0,2 µm zwischen sechs und 20 µm lang, einige Zellen können aber bis 250 µm Länge erreichen (Kathe and Mochmann, 1967; Levett, 2001; Plank and Dean, 2000; Zuelzer, 1918). Leptospiren lassen sich mit den meisten Standardverfahren nur schwer oder überhaupt nicht anfärben (Faine *et al.*, 1999). Als Verfahren zur Sichtbarmachung im histologischen Präparat wird die Silberimprägnierung verwendet (Faine *et al.*, 1999; Krieg and Holt, 1984; OIE-Manual, 2000). Recht gut lassen sich die Bakterien auch im Nativpräparat mittels Dunkelfeldmikroskopie darstellen (Faine *et al.*, 1999). Typischerweise sind sie an beiden Enden gebogen oder knopfartig aufgetrieben, so dass die Bakterien kleiderbügelartig erscheinen. Auch der Arname *L. interrogans* ist von der eigentümlichen Zellform abgeleitet und bezieht sich auf die fragezeichenartige Form einiger Bakterienzellen (Faine *et al.*, 1999; Faine, 1994). Leptospiren vermehren sich unter aeroben Bedingungen mit einer optimalen Wachstumstemperatur zwischen 28 und 30 °C (Faine *et al.*, 1999). Vermehrung ist aber von 13 bis 40 °C möglich. Für das Überleben in der Umwelt wurde eine Mindesttemperatur von 18 °C ermittelt (Kathe und Mochmann, 1967; Levett, 2001; Faine *et al.*, 1999). Leptospiren gedeihen in einem leicht alkalischen bis neutralen Milieu mit einem pH-Wert von (6,8-) 7,2 – 7,8 (Plank *et al.*, 2000; Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001; Okazaki and Ringen, 1957). Die Bakterien können langkettige Fettsäuren nicht selbstständig synthetisieren und sind daher auf deren Zufuhr aus ihrer Umgebung angewiesen (Faine *et al.*, 1999; Plank *et al.*, 2000; Levett, 2001). Spirochäten, zu denen die Leptospiren zählen, kommen freilebend in einer Vielzahl unterschiedlicher Lebensräume vor. Sie schraubenförmig um ihre Längsachse drehend, sind sie sehr beweglich und schieben sich durch Flüssigkeiten und wasserhaltige Matrices wie Schleim, Schlamm usw. (Levett, 2001; Margulis and Sagan, 1999). Eventuell gehörten frühe Spirochäten zu den ersten Endosymbionten, die zur Entstehung der Protisten führten. Eucaryotische Zilien und Geißeln könnten entwicklungsgeschichtlich dann auf diese Symbionten zurückgehen. Alle höheren Lebewesen hätten demnach Anteile früher Spirochäten in ihren Zellen (Margulis and Sagan, 1999; Smith, 1979).

2.1.2 Taxonomische Stellung und Einteilung

Die Gattung *Leptospira* gehört zur Familie der *Leptospiraceae* in der Ordnung der Schraubenbakterien (*Spirochaetales*). In der selben Ordnung finden sich (tier-)medizinisch relevante Bakterien wie die Erreger der Borreliosen (*Borrelia spec.*), der Schweinedysenterie (*Brachyspira hyodysenteriae*), der Syphilis (*Treponema pallidum*) bzw. der Frambösie (*Treponema pertenue*) und der Kaninchensyphilis (*Treponema paraluis-cuniculi*) (Abdussalam, 1965; Johnson and Faine, 1984; Krieg and Holt, 1984; Stallmann, 1984). Die Klassifizierung der Leptospiren hat sich in den letzten Jahren gewandelt. Bis 1989 folgte die taxonomische Einteilung den Ergebnissen der Serologie. Es wurden zwei Leptospiren-Arten unterschieden: Zu *Leptospira biflexa* rechnete man etwa 60 apathogene Serovare, die allesamt eine saprophytische Lebensweise zeigen (Abdussalam, 1965; Johnson and Faine, 1984; Stallmann, 1984). Die zweite Art war *Leptospira interrogans*, der mehr als 200 pathogene Serovare zugerechnet wurden (Johnson and Faine, 1984; Stallmann, 1984). Die Unterscheidung der Arten erfolgte aufgrund des Wachstumsvermögens bei 13 °C bzw. in Gegenwart von 225 µg/ml 8-Azaguanin (Levett, 2001). Außerdem bildete *L. interrogans* in einer 1M NaCl-Lösung sphärische Zellen, wozu *L. biflexa* nicht in der Lage ist (Levett, 2001). Die Unterscheidung der Serovare erfolgte serologisch nach deren Agglutinationsverhalten durch Bindung an homologe Antikörper (Dikken und Kmety, 1978; Kmety *et al.*, 1993; Johnson and Mörter, 1984). Traditionsgemäß wurden Serovare in Serogruppen zusammengefasst (Kmety *et al.*, 1993). Für die Zuordnung zu so einer Gruppe ist die antigenetische Ähnlichkeit bzw. das Vorhandensein gemeinsamer Antigene ausschlaggebend. Obwohl Serogruppen keine offizielle taxonomische Bedeutung haben, erwies sich eine solche Einteilung für das Verständnis der Epidemiologie als sinnvoll (Levett, 2001). Für *L. interrogans* werden 24 Serogruppen aufgeführt (**Tabelle 1**). Genetische Untersuchungen indes zeigten, dass die tatsächliche Artenfülle weit größer ist, als es aufgrund phänotypischer Merkmale bisher angenommen wurde (Levett, 2001). An der Einteilung in nur zwei Arten kann daher nicht mehr festgehalten werden. Heute sind 19 genetisch unterscheidbare Arten beschrieben und es ist mit der Entdeckung weiterer zu rechnen (**Tabelle 2**). Überraschenderweise stimmt die genotypische Einteilung mit der serologischen nicht immer überein (Brenner *et al.*, 1999; Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001). So findet man pathogene und apathogene Leptospiren sowohl in der bisherigen Spezies *L. biflexa* als auch bei *L. interrogans* (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001). Stämme, die in ihren antigenen Eigenschaften identisch sind und deshalb demselben Serovar zugeordnet werden, gehören nach neuen Erkenntnissen zu verschiedenen Spezies, und umgekehrt, Stämme, die aufgrund ihrer antigenen Eigenschaften verschiedenen

Serogruppen angehören, sind genetisch derselben Spezies zuzuordnen, wobei innerhalb einer Serogruppe stets mehrere Spezies vertreten sind (**Tabellen 1,2 und 3**; Marschall 1992; Levett 2001; Arzouni *et al.*, 2002; Perolat *et al.*, 1998; Rama *et al.*, 1992; Yasuda *et al.*, 1987). Für Fragen der klinischen Mikrobiologie und Epidemiologie ist die Einteilung in Serovare aber immer noch üblich (Faine *et al.*, 1999; Plank and Dean, 2000). Aus praktischen Gründen folgt auch die vorliegende Arbeit diesem Klassifikationssystem.

Tabelle 1:

Klassische *Leptospira*-Serogruppen, deren Stämme mehreren der neuen genetischen Spezies zugeordnet werden (nach Levett, 2001)

Serogruppe	Spezies, denen Stämme dieser Serogruppe zugeordnet werden
Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. inadai</i> , <i>L. kirschneri</i>
Hebdomadis	<i>L. interrogans</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. kirschneri</i> , <i>L. alexanderi</i>
Autumnalis	<i>L. interrogans</i> , <i>L. nogouchii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. kirschneri</i>
Pyrogenes	<i>L. interrogans</i> , <i>L. nogouchii</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i>
Bataviae	<i>L. interrogans</i> , <i>L. nogouchii</i> , <i>L. santarosai</i> <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. kirschneri</i>
Grippotyphosa	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. kirschneri</i>
Canicola	<i>L. interrogans</i> , <i>L. inadai</i> , <i>L. kirschneri</i>
Australis	<i>L. interrogans</i> , <i>L. nogouchii</i> , <i>L. borgpetersenii</i> <i>L. kirschneri</i>
Pomona	<i>L. interrogans</i> , <i>L. nogouchii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. kirschneri</i>
Javanica	<i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. meyeri</i> , <i>L. inadai</i> , <i>L. alexanderi</i>
Sejroe	<i>L. interrogans</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. meyeri</i>

Fortsetzung **Tabelle 1** auf der nächsten Seite

Fortsetzung **Tabelle 1**

Serogruppe	Spezies, denen Stämme dieser Serogruppe zugeordnet werden
Panama	<i>L. nogouchii</i> , <i>L. indai</i>
Cynopteri	<i>L. santarosai</i> , <i>L. kirschneri</i>
Djasiman	<i>L. interrogans</i> , <i>L. nogouchii</i> , <i>L. kirschneri</i>
Sarmin	<i>L. interrogans</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i>
Mini	<i>L. interrogans</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. meyeri</i> , <i>L. alexanderi</i>
Tarassovi	<i>L. nogouchii</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. inadai</i>
Celledoni	<i>L. weilii</i> , <i>L. borgpetersenii</i>
Louisiana	<i>L. interrogans</i> , <i>L. nogouchii</i>
Ranarum	<i>L. interrogans</i> , <i>L. meyeri</i>
Manhao	<i>L. weilii</i> , <i>L. inadai</i> , <i>L. alexanderi</i>
Shermani	<i>L. nogouchii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. inadai</i>

Tabelle 2:

Antigenvariabilität innerhalb der derzeit genetisch unterscheidbaren Leptospiren-Arten
(nach Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001)

Art	Anzahl der vertretenen	
	Serogruppen	Serovare
<i>L. interrogans</i>	19	82
<i>L. nogouchii</i>	9	21
<i>L. santarosai</i>	21	64
<i>L. meyeri</i>	5	5
<i>L. wolbachii</i>	1	2
<i>L. biflexa</i>	2	4
<i>L. fainei</i>	1	1
<i>L. borgpetersenii</i>	6	7
<i>L. kirschneri</i>	9	27
<i>L. weilii</i>	9	15
<i>L. inadai</i>	7	9
<i>L. parva</i>	1	1
<i>L. alexanderi</i>	4	6
<i>L. genomospecies 1</i>	2	2
<i>L. genomospecies 2</i>	4	4
<i>L. genomospecies 3</i>	1	1
<i>L. genomospecies 4</i>	1	1
<i>L. genomospecies 5</i>	1	1
<i>L. illini</i>	3	3

Tabelle 3:

Leptospiren-Serovare, deren Vertreter sich unterschiedlichen Arten zuordnen lassen
(nach Levett, 2001)

Serovar	Spezies
Bataviae	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i>
Bulgarica	<i>L. interrogans</i> , <i>L. kirschneri</i>
Grippopyphosa	<i>L. kirschneri</i> , <i>L. interrogans</i>
Hardjo	<i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. interrogans</i> , <i>L. meyeri</i>
Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i> , <i>L. indai</i>
Kremastos	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i>
Mwogolo	<i>L. kirschneri</i> , <i>L. interrogans</i>
Paidjan	<i>L. kirschneri</i> , <i>L. interrogans</i>
Pomona	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i>
Pyrogenes	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i>
Szwajizak	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i>
Valbuzzi	<i>L. interrogans</i> , <i>L. kirschneri</i>

2.1.3 Tenazität

Die Tenazität der Leptospiren ist insgesamt recht gering. Bei entsprechender Temperatur und Feuchte sowie einem günstigen pH-Wert und genügendem Gehalt an organischen Stoffen können sie jedoch im Boden bis zu sechs und in Wasser mindestens drei Monate überleben und infektiös bleiben (Kuriakose *et al.*, 1997; Horsch, 1980; Simpson *et al.*, 1998; Ward and Turner, 1949; Reinhard, 1953; Okazaki and Ringen, 1957). Leptospiren sind hitzelabil und werden bei 76-96 °C sofort, bei 56 °C innerhalb von 10-35 min abgetötet (Dedie *et al.*, 1993). Gegen Kälte sind sie hingegen recht unempfindlich. Bei Austrocknung, einem pH-Wert von weniger als 6 oder mehr als 8,4 oder bei direkter Sonneneinstrahlung sowie in Salzwasser sterben sie innerhalb weniger Minuten ab. Dasselbe gilt in der Gegenwart von Detergenzien und Desinfektionsmitteln. 2 %ige Salzsäure, 0,5 %iges Phenol, 0,025 %iger Chlorkalk oder 0,25 %ige Formalinlösung töten die Bakterien innerhalb von 5 min (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001). Auch die freie Salzsäure im Magensaft wirkt innerhalb von 5-30 min bakterizid (Levett, 2001). Leptospiren sind außerdem galleempfindlich (Levett, 2001; Freudiger *et al.*, 1997). In stark mit anderen Keimen besiedelten Medien sind sie recht bald nicht mehr nachweisbar (Okazaki and Ringen, 1957, Faine *et al.*, 1994; Dedek, 1994). Auch in Wasser von Flüssen und Seen, das wenig organische Substanzen enthält, halten sie sich nur etwa eine Woche (Dedie *et al.*, 1993). In Milch gehen sie durch die Einwirkung des Milchfettes und der natürlichen Säuerung bald zugrunde (Dedie *et al.*, 1993). Eine Vermehrung pathogener Leptospiren findet normalerweise nur im Wirt statt (Planc *et al.*, 2000). Hier befinden sie sich über längere Zeiträume vor allem auch in den Nierentubuli und gelangen mit dem Harn in die Außenwelt. Aufgrund der Abhängigkeit von leicht alkalischen bis neutralen pH-Werten spielt der saure Harn von Fleischfressern oder auch Menschen eine epidemiologisch weniger bedeutsame Rolle. Hier sterben die Bakterien rasch ab (Dedie *et al.*, 1993). Der alkalische Pflanzenfresserharn bietet dem Erreger dagegen bessere Überlebensbedingungen, so dass lebende Leptospiren in solchem Harn außerhalb des Körpers für mindestens 24 Stunden nachweisbar sind (Dedek, 1994). Dennoch können Leptospiren auch über sauren Harn übertragen werden. Das Serovar Canicola etwa hat sein Hauptreservoir in Hundartigen (Dedie *et al.*, 1993; Freudiger *et al.*, 1997). Gelangt der erregerhaltige, saure Harn dieser Tiere in Wasser oder feuchtes Erdreich, so wird er rasch verdünnt, und die Bedingungen für die Bakterien verbessern sich (Faine *et al.*, 1999; Plank and Dean, 2000). Der Wassergehalt des Bodens spielt eine bedeutende Rolle für das Überleben der Leptospiren außerhalb des Wirtes und damit auch für die Möglichkeit einer Infektion neuer Wirte (Dedie *et al.*, 1993). In silvatischen Herden stellten Twigg *et al.*, 1969 folgenden Zusammenhang fest: Bei einem

Wassergehalt des Bodens von 26,3 % waren 4,4 % der untersuchten Mäuse befallen. Die Befallsrate stieg bei zunehmender Bodenfeuchte und erreichte schließlich 69,7 % der Mäuse bei 42,7 % Wassergehalt des Bodens.

2.2 Epidemiologie der Leptospirose

Die Leptospirose ist eine weltweit vorkommende Zoonose. Leptospiren-Infektionen beim Menschen und vielen anderen Spezies gehen stets von wildlebenden Tieren oder Haustieren aus, die als Erregerreservoir fungieren (Faine *et al.*, 1999; Plank and Dean, 2000) (**Abbildung 1**). Schwerpunkt der Verbreitung sind die tropischen Regionen der Erde, wo die Leptospirose zu den „emerging diseases“ zählt, und Epidemien regelmäßig zu Todesfällen unter der menschlichen Bevölkerung führen (Everard *et al.*, 1993; Ratnam, 1984).

Menschliche Erkrankungen sind zum Beispiel in Südostasien und Indonesien häufig, denn dort kann eine Übertragung leicht während der Bewirtschaftung bewässerter Reisfelder erfolgen (Dedie *et al.*, 1993). Gleiches gilt für die Zuckerrohr- und Reisanbaugebiete in Mittel- und Südamerika (Dedie *et al.*, 1993; Stalheim, 1985). Alleine in Salvador, Brasilien, werden jährlich über 300 Fälle gemeldet, von denen ca. 15 % tödlich enden (Ko *et al.*, 1999). Entsprechend des Feuchtigkeitsbedürfnisses der Keime treten Epidemien in tropischen Entwicklungsländern oft nach starken Regenfällen bzw. Überschwemmungen auf (Barcellos and Sabroza, 2001; Ko *et al.*, 1999). In solchen Ländern zeigen sich deutliche Unterschiede in der Seroprävalenz von Antikörpern gegen Leptospiren in den unterschiedlichen Gesellschaftsschichten, wobei sozial benachteiligte Gruppen weit häufiger humorale Reaktionen zeigen. Gründe dafür liegen in der allgemeinen Hygiene und besonders in der Häufigkeit des Kontakts mit Nagetieren - vor allem mit Ratten (Ko *et al.*, 1999). Auch Vieh, wie zum Beispiel Wasserbüffel (*Bubalus bubalus*), kann als Leptospirenreservoir und Ausscheider bedeutsam sein (Legel, 1990). Ottolenghi, 2003 erwähnt für Ecuador das Waten der Hirten im Wasser als eine der Hauptinfektionsquellen. In Korea konnte die Anzahl der menschlichen Erkrankungsfälle erst durch ein Impfprogramm zwischen 1988 und 1998 deutlich verringert werden (Cho *et al.*, 1998). In unseren Breiten können Erkrankungen des Menschen oft mit Tätigkeiten in Naturräumen in Verbindung gebracht werden, bei denen es zu Haut- oder Schleimhautkontakt mit Oberflächengewässern kommt. Dazu gehören Schwimmen und andere Arten von Wassersport wie Segeln und Kanufahren in stehenden oder auch fließenden Gewässern, die durch erregerhaltigen Urin verunreinigt wurden (Levett, 2001; Plank and Dean 2000; Stephan *et al.*, 2000; Wenz *et al.*, 2001). Neben einer solchen

Assoziation zu Freizeitaktivitäten ist die Leptospirose bei einigen Berufsgruppen mit erhöhtem Infektionsrisiko auch als Berufskrankheit anerkannt. Solche Berufsgruppen sind z.B. Bergbau- und Kanalarbeiter, Fleischer, Landwirte, Tierpfleger und Tierärzte (Deutz *et al.*, 1996; Pete *et al.*, 2000; Simon *et al.*, 1999; Weber, 1987). Entsprechend den Verhältnissen in tropischen Ländern können auch in den gemäßigten Breiten Überschwemmungen mit erhöhtem Ansteckungsrisiko einhergehen (Haditsch, 2002). Menschliche Leptospirosen treten in den gemäßigten Breiten vor allem im Spätsommer und Herbst auf, denn hier ist, anders als in den Tropen, weniger die Feuchtigkeit, eher die Temperatur ausschlaggebend für das Überleben der Bakterien in der Außenwelt (Dedie *et al.*, 1993).

2.2.1 Wirtsspektrum

Leptospiren besitzen ein sehr breites Wirtsspektrum, das neben Säugetieren auch Reptilien, ferner Amphibien, Vögel und experimentell auch Fische umfasst (Diesch *et al.*, 1966, 1967; Hoag *et al.*, 1953; Minette, 1983; Faine *et al.*, 1999; Van der Hoeden, 1966). Alle Arten von Säugetieren können Leptospiren beherbergen, wobei in der überwiegenden Zahl der Fälle subklinische oder latente Infektionen auftreten (Diesch *et al.*, 1966, 1967; Hoag *et al.*, 1953; Minette, 1983; Faine *et al.*, 1999; Van der Hoeden, 1966). Bei den für Leptospiren empfänglichen Spezies muss zwischen den Haupt- oder Reservoirwirten der verschiedenen Serovare auf der einen und Neben- bzw. Gelegenheitswirten auf der anderen Seite unterschieden werden (Chernucka *et al.*, 1974; Emanuel *et al.*, 1967). Der Hauptwirt kann unter Umständen nach einer Infektion über viele Jahre bis zeitlebens Ausscheider bleiben, ohne selbst eine Krankheitssymptomatik zu zeigen (Bolin, 2003; Dedie *et al.*, 1993; Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001). Auch im Gelegenheits- bzw. Nebenwirt kann sich eine Leptospiren-Infektion nach einer von einem Reservoirwirt ausgehenden Übertragung symptomlos abspielen. Es gibt bei Tier und Mensch aber auch ernsthafte Erkrankungen. Die Bindung der einzelnen Serovare an bestimmte Hauptwirt-Arten ist nicht zwingend und variiert unter Umständen von Jahr zu Jahr und von Region zu Region (Torten, 1979; Bolin, 2003). Das Serovar Canicola etwa hat als Reservoir verschiedene Raubtiere, vor allem Hundartige, während Hardjo an Wiederkäuer wie Schafe und vor allem Rinder adaptiert ist (Ellis *et al.*, 1981; Gerritsen *et al.*, 1994; Bolin and Alt, 2001). Die bedeutsamsten Reservoirs für Leptospiren sind kleine Säugetiere (Adler *et al.*, 2002; Dedie *et al.*, 1993; Plank and Dean, 2000; Faine *et al.*, 1999). In der Literatur finden sich zahlreiche Berichte über eine Ausscheidung der Keime durch verschiedene Arten von Nagetieren (Adler *et al.*, 2002; Kmety, 1955; Sebek und Rosicky, 1975). Das Serovar Grippotyphosa ist typischerweise mit Wühlmäusen (*Arvicolidae*) assoziiert (Kmety, 1955; Sebek und Rosicky, 1975). Cho *et al.*, 1998 stellten bei Brandmäusen (*Apodemus agrarius*) bei 12,6 % der untersuchten Tiere Leptospiren-DNS in den Nierengewebsproben fest, bei 9,9 % wurden die Bakterien selbst gefunden. Eine deutliche Assoziation des Serovars Icterohaemorrhagiae mit Ratten (*Rattus* spp.) wurde mehrfach beschrieben (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001; Plank, 2000). Da daneben eine Vielzahl weiterer Serovare diese Nagetiere als Reservoirwirt nutzen, spielen Ratten (*Rattus* spp.) als Ansteckungsquelle insgesamt die größte Rolle. Vinetz *et al.*, 1996 fanden bei einer Untersuchung in Baltimore in 19 der 21 untersuchten Ratten Leptospiren. Sunbul *et al.*, 2001 fanden Leptospiren-DNS in ihrer Untersuchung in der Türkei bei 27,1 % der untersuchten Wanderratten (*Rattus norvegicus*) in den Nieren und bei 16,9 % in Gehirnproben. Laut Dedie *et al.*, 1993 kann der Anteil

infizierter Wanderratten (*Rattus norvegicus*) je nach Jahreszeit zwischen 10 und 90 % schwanken. Auch Insektenfresser wie Spitzmäuse und Igel können zu einem hohen Prozentsatz Leptospirenträger sein (Parnas, 1958; Babudieri und Farina, 1964; Fennestad und Borg-Petersen, 1972). Herweg und Küpper, 1998 sprechen Igel (*Erinaceus europeus*) in menschlicher Obhut ein beachtliches Infektionspotential für den Pfleger zu.

Die Rolle des europäischen jagdbaren Wildes als Wirt für Leptospiren wird insgesamt als gering eingestuft, wobei das Wildschwein (*Sus scrofa*) offenbar häufiger Leptospirenträger und auch Ausscheider ist (Parnas und Weber, 1989; Deutz und Köfer, 1999; Twigg *et al.*, 1969). Es wurden gleichwohl bei entsprechenden Untersuchungen positive Antikörpertiter bei 1,8 bis 3,6 % der untersuchten Rehe (*Capreolus capreolus*), 2,1 bis 3,5 % der Rothirsche (*Cervus elaphus*) und 13,4 bis 18,6 % der Wildschweine festgestellt (Hübner und Horsch, 1977; Weber *et al.*, 1978; Weber und Christoph, 1981; Horsch *et al.*, 1970). Feldhasen (*Lepus europaeus*) zeigten in mehreren Untersuchungen einen hohen Anteil seropositiver Reagenten. Dabei schwankte der Anteil jahreszeitlich und zwischen verschiedenen Revieren beträchtlich zwischen 5 und fast 50 % (Ebani *et al.*, 2003; Hübner und Horsch, 1977; Horsch *et al.*, 1970; Hartmann und Broekhuizen, 1980).

Wechselwarme Tiere wie Eidechsen, Schildkröten oder Schlangen wurden ebenfalls als Reservoirwirte beschrieben (Plesko *et al.*, 1964; White, 1963; Dedie, 1993; Marcus, 1983). Bei Vögeln werden Leptospiren nur selten gefunden (Diesch *et al.*, 1966, 1967; Hoag *et al.*, 1953; Kadlec *et al.*, 1983; Kmety, 1955; Minette, 1983; Van der Hoeden, 1966). Laut Dedie *et al.*, 1993 sind sie wohl nur passager befallen. Wasservögel können aber nach dem selben Autor den Erreger wochenlang ausscheiden und so für seine Verbreitung sorgen. Erkrankungen sind bei Vögeln nicht bekannt, es wurden aber bei entsprechenden Untersuchungen Antikörper festgestellt (Kadlec *et al.*, 1983; Kmety, 1955). Experimentell lassen sich auch Goldfische infizieren (Dedie *et al.*, 1993). Eine Reservoirfunktion kommt Fischen aber wohl nicht zu, sie können allenfalls als Vektoren eine Rolle spielen, wenn sie aus verunreinigten Gewässern stammen (Eulenberger, 2002). Pavlovski, 1966 beschreibt eine horizontale Übertragung von Leptospiren durch *Ornithodoros*-Zecken bei Zieselmäusen (*Rhombomys*) und Steppenschildkröten in Trockengebieten Zentralasiens (in Dedie *et al.*, 1993).

2.2.2 Erregerausscheidung, Eintrittspforten und Übertragungswege

Zwischen Individuen des Hauptwirts erfolgen Leptospiren-Infektionen meist vertikal-konnatal (Hathaway *et al.*, 1983). So sind beim infizierten Rind adaptierte Serovare unter Umständen dauerhaft im männlichen und weiblichen Genitale zu finden (Ellis *et al.*, 1986). Leonard *et al.*, 1992 fanden, dass Rinder das an sie adaptierte Serovar Hardjo bis zu 60 Wochen *post infectionem* ausscheiden. Eine Übertragung während des Geschlechtsakts bzw. mit Tiefgefriersperma infizierter Tiere ist möglich (Geßler *et al.*, 1987; Heinemann *et al.*, 2000). Diaplazentare Infektionen des Fetus im Mutterleib gehen zumeist mit Aborten einher (Dedie *et al.*, 1993). Die Versuche von Stahlheim, 1985 zeigten, daß die Nachkommen seropositiver Mäusemütter durch Antikörper lebenslang gegen eine renale Infektion und Ausscheidung geschützt sind. Die Nachkommen nicht infizierter Mütter werden aber zu immuntoleranten lebenslangen Dauerausscheidern, wenn sie in den ersten Lebenstagen horizontal infiziert werden (Birnbaum *et al.*, 1972; Torten, 1979). Gelegenheitswirte spielen für die Aufrechterhaltung von Infektionszyklen in den Tierpopulationen nur eine untergeordnete Rolle. Dies liegt unter anderem in der bei infizierten Gelegenheitswirten im Vergleich zu infizierten Reservoirwirten nur kurzfristigen Ausscheidungsdauer, die meist nur wenige Tage und nur in Ausnahmefällen mehrere Wochen anhält (Alston and Broom, 1958; Bolin, 2003; Faine, 1994; Kathe, 1949; Seblitz und Bisping, 1995). Die horizontale Ausbreitung hängt von den Umweltverhältnissen außerhalb des Wirts ab und ist vor allem bei gemäßigten bis warmen Temperaturen und ausreichender Feuchtigkeit erfolgreich. Infektionen bei Tier und Mensch erfolgen zumeist über den Kontakt von Hautwunden oder Schleimhäuten mit erregerhaltigem Harn oder auch mit damit verunreinigten Flüssigkeiten (Faine *et al.*, 1999; Hahn *et al.*, 1999; Levett, 2001). Freudiger, 1997 nennt für den Hund die Schleimhäute von Nase, Maul und Konjunktiven als Haupteintrittspforten, ferner Mikroläsionen der Zwischenzehenhaut. Der Magen-Darmtrakt dürfte nach seiner Einschätzung keine Rolle spielen, da die Erreger die freie Salzsäure im Magen und auch die Einwirkung der Galle nicht überstehen würden.

2.2.3 Pathogenese und Klinik

Die einzelnen Leptospiren-Serovare zeigen eine unterschiedliche Virulenz (Faine *et al.*, 1999). Serovare aus der Serogruppe Icterohaemorrhagiae gelten als die Verursacher der heftigsten Erkrankungen des Menschen, die sich im Morbus Weil äußern können (Plank and Dean, 2000; Rudland, 1989; Sperber und Schleupener, 1989). Eine klare

Zuordnung von determinierten Krankheitsbildern zu bestimmten Serovaren ist aber nicht möglich (Faine *et al.*, 1999). Nach der aktiven Penetration durch die Schleimhaut bzw. verletzte Haut dringen die Leptospiren in die Blutbahn ein. Die Erkrankung ist deutlich zweiphasig (Levett, 2002; Planc and Dean, 2000). Zunächst tritt die akute oder septikämische Phase ein, die ca. zwei Wochen andauert (Levett, 2002). Die Leptospiren sind während dieser Zeit im Blut nachweisbar, aber noch keine gegen sie gerichteten Antikörper. Dann folgt die Immunphase, bei der durch die humorale Abwehrreaktion hohe Antikörpertiter aber keine Erreger mehr im Blut gefunden werden (Krauss *et al.*, 1997; Faine *et al.*, 1999; Planc and Dean, 2000). Die Bakterien überdauern jedoch in parenchymatösen Organen (Dedie *et al.*, 1993; Dahme und Weiß, 1999; Horsch, 1980; Levett, 2002). In dieser Phase kann bei Nierenbesiedelung eine Ausscheidung in die Außenwelt erfolgen, indem die Leptospiren mit dem Urin ins Freie gelangen (Levett, 2002; Dedie *et al.*, 1993; Faine *et al.*, 1999). Die meisten Krankheitserscheinungen treten in der Immunphase auf und sind deshalb etwa ab der zweiten Woche *post infectionem* feststellbar (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2002). Die Erscheinungsformen der Erkrankung sind unspezifisch und sehr vielgestaltig (Faine *et al.*, 2002; Rolle und Mayr, 2002). Sie reichen von grippeartigen Symptomen mit einem oft zweiphasigen hohen Fieber bis zu schweren Erkrankungen mit Leber- und Nierenversagen. Ein tödlicher Ausgang kommt bei Mensch und Tier vor (Dedie *et al.*, 1993; Faine *et al.*, 1999; Ko *et al.*, 1999). Bisweilen manifestieren sich Leptospirosen bei Tier und Mensch auch okular (Costa *et al.*, 2000; Knorr und Weber, 1992) oder im zentralen oder peripheren Nervensystem (Costa *et al.*, 2001; Planc and Dean, 2000; Romero *et al.*, 1998). Aseptische Meningitiden sowie eine ein- oder beidseitige Uveitis als Spätfolgen einer überstandenen Leptospirose sind beim Menschen beschrieben (Faine *et al.*, 1999; Planc and Dean, 2000; Rathinam *et al.*, 2000). Verantwortlich scheint eine Autoimmunreaktion zu sein (Brem *et al.*, 1998; Faber *et al.*, 2000; Planc and Dean, 2000; Lucchesi *et al.*, 2002). Auch die rezidivierende Iridocyclitis des Pferdes (Mondblindheit) wird unter anderem mit einer vorangegangenen Infektion mit Leptospiren in Zusammenhang gebracht (Faber *et al.*, 2000). Bei tragenden Tieren zeigen Leptospiren eine deutliche Fetotropie (Faine *et al.*, 1999). Bei Haustieren kann daher unter Umständen das einzige Symptom für ein Leptospirosegeschehen im Bestand die erhöhte Rate an Aborten bzw. Fehlgeburten sein (Alexander, 1985; Black *et al.*, 2001; Geßler *et al.*, 1987; Guitan *et al.*, 1999; Guitian *et al.*, 2001; Smyth *et al.*, 1999; Waldmann und Wendt, 2001).

2.2.4 Geographische Verbreitung und Häufigkeit

Leptospiren sind weltweit verbreitet. Meldungen über *Leptospira*-verursachte Erkrankungen gehen beim internationalen Tierseuchenamt in Paris jährlich von fast allen Kontinenten ein (OIE, 2006). In Mitteleuropa ist aber nur eine kleine Auswahl der insgesamt beschriebenen Serovare von Bedeutung, viele kommen hier wegen fehlender Reservoirwirte oder aus klimatischen Gründen nicht vor (Schönberg *et al.*, 1987). Auch in anderen geographischen Regionen wird stets nur eine beschränkte Anzahl von Serovaren gefunden (Baldwin und Atkins, 1987). Dabei können sich Serovarspektrum und -häufigkeit abhängig von der Verbreitung der Reservoirwirte selbst sehr kleinräumig unterscheiden und auch kurzfristig wechseln (Ebani *et al.*, 2003; Mochmann, 1983; Schwarz, 1960; Torten, 1979). Twigg *et al.*, 1969 sprechen von einer von Biotop zu Biotop wechselnden Serovarverteilung. Laut Dedie *et al.* (1993) ist in feuchteren Lebensräumen Grippotyphosa gemeinsam mit Wühlmäusen (*Arvicolidae*) als seinen Erhaltungswirten typisch. Die Serogruppe Sejroe soll nach denselben Autoren gemeinsam mit den Echten Mäusen (*Muridae*) eher in trockenen Biotopen vorherrschen. Diese Einteilung dürfte aber etwas zu sehr vereinfacht und die tatsächliche Verteilung komplexer sein, da z. B. Brandmäuse (*Apodemus agrarius*) und gerade Wanderratten (*Rattus rattus*) als Echte Mäuse Hauptwirte der Serogruppe Sejroe sind (Dedie *et al.*, 1993). Gleichzeitig bevorzugen diese Arten aber eindeutig feuchte Lebensräume (Becker, 1978; Böhme, 1978). Auch sind laut Niethammer und Krapp (1982) Wühlmäuse wie Feldhamster (*Cricetus cricetus*), Feld- (*Microtus arvalis*) und Erdmaus (*Microtus agrestis*), die Dedie *et al.* (1993) wiederum als Reservoirwirte der Serogruppe Grippotyphosa nennen, eher in trockenen Lebensräumen zu finden. Neben der regional unterschiedlichen Verteilung der Reservoirwirte ist auch bedeutsam, dass in gewissem Rahmen für ein Serovar räumlich und zeitlich wechselnde Wildtierarten als Reservoirwirt fungieren können (Torten, 1979).

Auch in Deutschland lassen sich Leptospirosen und *Leptospira*-Infektionen regelmäßig bei Menschen und vor allem bei Tieren nachweisen. Nach dem Infektionsschutzgesetz sind Ärzte verpflichtet, den direkten oder indirekten *Leptospira*-Nachweis bei Menschen an die Gesundheitsämter zu melden. Auf diese Weise wurden in den letzten Jahren jährlich zwischen 24 und 58 Fälle registriert (**Tabelle 4**; Kraus, 2004; Anonym, 2006a; Anonym, 2006b). Labordiagnostisch gesicherte Leptospirosen und *Leptospira*-Infektionen bei Tieren sind von Tierärzten und Laborleitern aufgrund der im Tierseuchengesetz verankerten Meldepflicht den dafür zuständigen Behörden unverzüglich mitzuteilen. Im Zeitraum 1997 bis 2004 gingen bei den Veterinärämtern deshalb jährlich zwischen ca. 60 und 260 Meldungen ein (**Tabelle 4**; OIE, 2006; BMELV, 2005). Experten nehmen allerdings an, dass die tatsächlichen Inzidenzen

meldepflichtiger Tierkrankheiten erheblich größer sind, als es die über die Meldepflicht erfassten Daten vermuten lassen (Bauerfeind, 2006).

Auf eine erhebliche Dunkelziffer bei der Erfassung von *Leptospira*-Infektionen deuten auch die Ergebnisse serologischer Untersuchungen hin, die in Deutschland von verschiedenen Forschergruppen durchgeführt worden sind. Aus Baden-Württemberg gibt es mehrere Untersuchungen an Rindern zur Verbreitung humoraler Reaktionen gegen Leptospiren-Antigen. Da auch die meisten untersuchten zoologischen Gärten und Tierparks in diesem Gebiet liegen und unter den Probanden eine große Anzahl von Wiederkäuern vorkommt, sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen für die vorliegende Arbeit von besonderem Interesse. Geßler *et al.* (1987) untersuchten 18.762 Tiere aus 688 Beständen Südwürttembergs. Dabei fanden sie positive Titer von $\geq 1:400$ bei 3,4 % der Tiere bzw. in 8,4 % der Bestände. Interessanterweise wurden dabei positive Reagenten ausschließlich für die Serovare Grippotyphosa und Hardjo ausgemacht, obwohl auf das Vorkommen von 12 verschiedenen Serovaren untersucht wurde. Am Staatlichen Tierärztlichen Untersuchungsamt (STUA) Stuttgart (heutiges CVUA) wurden in den Jahren 1983 bis 1984 509 Blutproben aus dem Regierungsbezirk Nordwürttemberg, die 0,1 % des gesamten Rinderbestandes dieser Region entsprachen, auf Antikörper gegen 11 Serovare getestet. Antikörper ab einem Titer von 1:100 konnten bei 3,9 % der Tiere festgestellt werden, 1,6 % wiesen sogar einen Titer von $\geq 1:400$ auf. Positive humorale Reaktionen wurden nur gegen die Serovare Grippotyphosa und Hardjo gefunden. Drei Tiere (0,6 %) zeigten zudem zweifelhafte Titer für Batavia (CVUA Stuttgart, unveröffentl. Befunde). Im Jahr 1984 wurden nochmals 517 Rinder aus Nordwürttemberg im STUA Stuttgart auf Antikörper gegen 11 Serovare getestet. Insgesamt reagierten 0,6 % der Proben serologisch positiv, während weitere 1,0 % der Proben einen fraglichen Titer aufwiesen. Am häufigsten wurden Reaktionen mit dem Serovar Grippotyphosa ermittelt. Im Regierungsbezirk Freiburg wurden in dem selben Jahr 409 Rinder untersucht, von denen 3,7 % eine humorale Reaktion zeigten (3 % positiv und 0,7 % fraglich). Auch hier war Grippotyphosa dasjenige Serovar, gegen das am häufigsten Antikörper vorhanden waren. Im Regierungsbezirk Aulendorf wurden in einer entsprechenden Untersuchung von 776 Rindern 2,2 % positive Reagenten festgestellt (1,7 % positiv und 0,5 % fraglich). Bundesweit wurden in dieser Untersuchung 23.093 Rinder getestet. Bei 5,5 % wurden Titer gefunden (1,6 % positiv, 3,9 % fraglich). Neben Hardjo und Grippotyphosa zählte das Serovar Saxkoebing zu den häufigeren von den Seren erkannten Serovaren (Schönberg *et al.*, 1987). Aus derselben Untersuchung liegen auch Daten für andere Nutztiere vor. So wurden bei 14,4 % der 3.040 im Jahr 1984 bundesweit untersuchten Schafe Titer von $\geq 1:400$ festgestellt, ebenso bei 0,3 %

der 694 Ziegen, 4,5 % der 2.002 untersuchten Pferde, 1,2 % der 1.835 untersuchten Schweine und 8,4 % der 299 untersuchten Hunde. Insgesamt konnten die Autoren bei 3,1 % der 30.963 bundesweit untersuchten Tiere positive Titer feststellen. Mit 53,5 % war Hardjo das am häufigsten erkannte Serovar und die gesamte Serogruppe Sejroe stellte mit 64,2 % die Hauptmasse der serologisch erkannten Serovare. Zweithäufigstes Serovar war Grippotyphosa mit 22,6 %. Alle anderen Serovare zusammen erreichten nur 10 %. Nur 3 % der Proben enthielten gegen das Serovar Copenhageni gerichtete Antikörper. Die bei den Rindern gefundene Verteilung der spezifischen Antikörper ist nicht speziesspezifisch, wie die Untersuchung von Espi *et al.*, 2000 aus Nordspanien zeigt. Die Autoren fanden dort mit 5,6 % der 3.578 untersuchten Rindern am häufigsten Reaktionen gegen das Serovar Pomona. Seren mit gegen Grippotyphosa gerichteten Antikörpern waren mit 2,4 % am zweithäufigsten, während die Reaktionen gegen die übrigen Serovare nur selten festgestellt wurden. Antikörper gegen Hardjo wurden bei 0,7 % der Tiere gefunden.

Tabelle 4:

Jährlich aus Deutschland gemeldete Leptosirosen und *Leptospira*-Infektionen bei Mensch und Tier (OIE, 2006)

Jahr	Anzahl gemeldeter Leptospirose-Fälle					
	Mensch	Rind	Hund	Pferd	Schaf	Schwein
2004	58	20	25	1	1	231
2003	38	20	18	0	1	225
2002	58	13	0	1	1	185
2001	47	14	0	0	0	120
2000	45	12	0	1	1	61
1999	45	18	0	2	1	52
1998	40	33	0	1	1	29
1997	24	24	0	0	0	66
Summe	355	154	43	6	6	169

2.3 Labordiagnostische Nachweismethoden für *Leptospira*-Infektionen bei Tieren

Als labordiagnostischer Nachweis von *Leptospira*-Infektionen kommt eine Reihe von Verfahren zur Anwendung. Der direkte Nachweis ist mittels Mikroskopie, Immunfluoreszenztest, kultureller Isolierung oder Polymerase-Kettenreaktion möglich. Indirekte Nachweismethoden sind der Mikroagglutinationstest (MAT), der Objektträger-agglutinations-Schnelltest, die Komplementbindungsreaktion (KBR) und der Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Die besten Ergebnisse im Nachweis von Leptospiren aus klinischem Probenmaterial verspricht die Kombination mehrerer Verfahren (Faine *et al.*, 1999; Luyven und Parvanta, 1988; Thiermann, 1984; Wagenaar *et al.*, 2000).

Der Direktnachweis von Leptospiren aus Blut sowie aus Peritoneal- oder Pleuralflüssigkeit mittels **Dunkelfeldmikroskopie** ist lediglich in der Frühphase bis zum ca. 10. Tag einer Infektion bei Tier und Mensch möglich und mit einiger Unsicherheit behaftet (Faine *et al.*, 1999). In Organpräparaten ist der direkte Nachweis ebenfalls schwierig. Mittels Dunkelfeldmikroskopie sind die Bakterien hier leicht mit Fibrin oder Eiweiß zu verwechseln. Durch Silberimprägnierung können die Ergebnisse verbessert werden (Wagenaar *et al.*, 2000; Faine, 1982; Faine *et al.*, 1999; OIE-Manual, 2003).

Der **Immunfluoreszenztest** kann zum Leptospirennachweis in Geweben und verunreinigten Materialien angewendet werden. Dabei wird die Probe mit Antiseren gegen definierte *Leptospira*-Serovare versetzt, die mit Fluoreszenz-Farbstoffen konjugiert sind. Die Auswertung erfolgt im Fluoreszenz-Mikroskop. Diese Nachweismethode ist serovarspezifisch, Sensitivität und Spezifität sind aber eingeschränkt (Bolin *et al.*, 1989; Faine, 1982; Faine, 1994; OIE-Manual, 2003).

Die **Anzucht** von Leptospiren aus klinischem Probenmaterial erfordert selektive Spezialmedien. Sie ist vergleichsweise langwierig sowie aufwendig und gelingt meist nur aus frischen Organproben und Körperflüssigkeiten (Faine, 1982; Faine *et al.*, 1999; Luyven und Parvanta, 1988; Thiermann, 1984). Wegen des extrem langsamen Wachstums der Leptospiren müssen die Kulturen mindestens 30 Tage lang bei 28 - 30 °C inkubiert werden, bevor sie als negativ gelten können. Es werden aber auch Inkubationszeiten von 90 Tagen oder sogar sechs Monaten angegeben (Faine *et al.*, 1999). Bei Kontamination durch Fremdkeime werden die Leptospiren in der Regel überwuchert (Faine, 1982; Faine *et al.*, 1999).

Der direkte Nachweis von Leptospiren-DNS aus Blut und Geweben gelingt mit verschiedenen Primern in der **Polymerase-Kettenreaktion (PCR)** (OIE-Manual, 2000;

Faine *et al.*, 1999; Wagenaar, 2000). Die erfolgreich amplifizierte DNS kann mit der Agarosegelelektrophorese oder durch Hybridisierung mit Gensonden nachgewiesen werden. Dabei wird durch den Einsatz von Gensonden die Spezifität erhöht. Als Ansatzpunkte für die Primer sind verschiedene Genloci beschrieben. Am häufigsten werden die Gene für die 16S- oder 23S-rRNS verwendet (Hookey, 1992; Merien *et al.*, 1992; Smythe *et al.*, 2002; Wagenaar *et al.*, 1994; Woo *et al.*, 1997), aber auch repetitive Elemente dienen als Ziel (Barrocchi *et al.*, 2001; Savio *et al.*, 1994; Woodward *et al.*, 1991). Daneben wurden weitere Genorte, die für Sekretionsproteine bzw. Flagellin kodieren, ausgewählt (Gravekamp *et al.*, 1993; Kee *et al.*, 1994). Fast alle PCR sind nicht serovarspezifisch, sondern erfassen mehrere Serovare (Levett, 2001; Terpstra, 2003).

Der **Mikroagglutinationstest (MAT)** kommt zum indirekten Leptospirose-Nachweis am häufigsten zum Einsatz (Pappas *et al.*, 1985; OIE-Manual, 2000; Wagenaar *et al.*, 2000; Faine *et al.*, 1999; Surujballi and Mallory, 2001). Dieses Verfahren gilt als Goldstandard und ist den übrigen serologischen Verfahren an Sensitivität und Spezifität überlegen (Dura, 1994). Im MAT wird das zu prüfende Serum mit lebenden Leptospiren definierter Serovare vermischt und die anschließende Agglutination der Bakterien durch die im Serum vorhandenen Antikörper mikroskopisch beurteilt. Derartige Antikörper tauchen im Patientenserum etwa eine Woche *post infectionem* auf und steigen rasch auf hohe Titer an (Faine *et al.*, 1999). Die Titerhöhe ist in einem gewissen Maß vom auslösenden Serovar abhängig. Bei Infektionen mit Serovaren der Serogruppe Icterohaemorrhagiae können bei Mensch und Tier Titer von bis zu 1:30.000 beobachtet werden, während das Serovar Hardjo oft nur einen Titer von bis zu 1:1.600 – 1:3.000 hervorruft (Faine *et al.*, 1999). Nach überstandener Infektion nimmt der Titer zunächst in den folgenden Wochen und Monaten langsam ab, meist sind Titer in geringer Höhe aber noch längere Zeit feststellbar. In menschlichem Serum wurden erhöhte Antikörpertiter über einen Zeitraum von zwei bis 10 Jahren nach einer Infektion nachgewiesen (Blackmore *et al.*, 1984; Everard and Bennett, 1990). Auch bei Tieren können erhöhte Antikörpertiter über vergleichbar lange Zeiträume bestehen (Faine *et al.*, 1999). Dies gilt jedoch nicht für die als Reservoirwirte des entsprechenden Serovars fungierenden Arten, denn in diesen ist eine humorale Immunantwort in der Regel nur schwach oder überhaupt nicht ausgeprägt (Dedie *et al.*, 1993; Faine *et al.*, 1999). In der Diagnostik ist ein Titeranstieg um zwei Stufen in gepaarten Serumproben mit zweiwöchigem Abstand beweisend für eine aktuelle Leptospireninfektion (Faine *et al.*, 1999; OIE-Manual, 2000).

Beim **Objekträgeragglutinationsschnelltest** wird *Leptospira*-Antigen auf dem Objekträger direkt mit den zu prüfenden Seren vermischt und die Agglutination im

Dunkelfeldmikroskop beurteilt. Entweder werden formalinfixierte Pool-Antigene aus mehreren Serovaren eingesetzt oder ein Extrakt aus dem Stamm *Leptospira biflexa* Patoc I. Dieser Screening-Test ist deutlich weniger sensitiv als der MAT (Faine, 1994; Schönberg, 1984; Weber *et al.*, 1984).

In Deutschland steht derzeit kein kommerziell erhältlicher **ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)** für die Veterinärmedizin zur Verfügung. Die meisten beschriebenen ELISAs sind experimenteller Natur und haben bis auf Ausnahmen (Brem *et al.*, 1999) keinen Eingang in die veterinärmedizinische Routinediagnostik gefunden (Dura, 1994). Das Verfahren vermag entweder IgG- oder IgM-Antikörper zu detektieren und kann so im Unterschied zum MAT zwischen einer aktuell ablaufenden und einer länger zurückliegenden Infektion unterscheiden (Cumberland *et al.*, 1999). Unter Verwendung eines genusspezifischen Antigens können verschiedene Serovare gleichzeitig erfaßt werden. Auch eine serovarspezifische Erfassung ist möglich (Terpstra *et al.*, 1980; Adler *et al.*, 1982; Surujballi und Mallory, 2001). Die verwendeten Antigene können durch Hitzeextraktion, Ultraschallbehandlung, Salzlösung, organische Lösungsmittel oder Detergenzien erhalten werden (Dura, 1994). Hinsichtlich der Spezifität sind die bisher beschriebenen ELISAs dem MAT unterlegen (Terpstra, 2003; Faine, 1994).

Ebenfalls weniger sensitiv als der MAT ist die **Komplementbindungsreaktion (KBR)** (Ellis *et al.*, 1982). Da jedoch komplementbindende Antikörper im Verlauf einer Infektion frühzeitig auftauchen, kann dieses Verfahren bei frischen Infektionen schon ab dem vierten Tag *post infectionem* und damit früher als der MAT zu einem positiven Befund führen (Hodges und Reis, 1974; Ellis, 1984; Schönberg, 1984).

2.3 Leptospiren in zoologischen Gärten

2.3.1 *Leptospira*-Infektionen im Tierbestand zoologischer Gärten

Leptospiren-Infektionen bei Zootieren sind in der Literatur mehrfach belegt. **Tabelle 5** enthält eine Zusammenstellung der in der Fachliteratur publizierten Nachweise. Ferner berichtet Richter, 1957 in einer Zusammenstellung der Todesursachen bei Zootieren von 16 Leptospirosefällen – hauptsächlich bei Carnivoren (in Hänichen *et al.*, 1992). Dennoch scheint die Leptospirose als gesundheitliche Gefahr für Zootiere nicht überall erkannt zu sein. So erwähnt Montali, 1999 die Leptospirose in seiner Abhandlung über Zoonosen bei Zootieren nicht. Ebenso wird sie in einer thematisch ähnlichen Arbeit

über Zoo-Primaten von Rietschel, 1998 nicht genannt, und sie fehlt auch gänzlich in einer Übersicht über Zoonosen bei nicht menschlichen Primaten (Brack, 1998).

Gezielte serologische Untersuchungen zur Leptospirose in zoologischen Gärten führten Sebek *et al.*, 1986 im Ostböhmischen Zoologischen Garten durch. Sie fanden bei 8,7 % ihrer 378 untersuchten Zootiere positive Titer, wobei die Untersucher erst Titer von $\geq 1:800$ als positiv werteten. Unpaarhufer und Antilopen/Gazellen stellten die meisten Seropositiven. Gegen das Serovar Grippotyphosa gerichtete Antikörper wurden mit Abstand am häufigsten gefunden. Auch bei der Untersuchung von 1.038 Zootieren aus verschiedenen zoologischen Gärten der DDR konnten Kadlec *et al.*, 1983 solche Antikörper am häufigsten ausmachen. Insgesamt zeigten in dieser Untersuchung 4,5 % der untersuchten Seren Titer von $\geq 1:100$ und 0,02 % der Tiere einen Titer von $\geq 1:800$. Wiederkäuer und Carnivoren waren am häufigsten betroffen.

Die Ergebnisse aus den seroepidemiologischen Untersuchungen legen die Vermutung nahe, dass inapparente *Leptospira*-Infektionen und auch regelrechte Leptospiroseausbrüche bei Tieren, die in zoologischen Gärten gehalten werden, weit häufiger vorkommen, als es die insgesamt eher spärlichen Berichte über Leptospiren-Nachweise wiedergeben. Auch eine retrospektive Untersuchung im Bronx Zoo, New York, weist auf eine beträchtliche Anzahl übersehener Leptospiren-Infektionen bei Zootieren hin. Nach dem Verlust eines Katzenbären durch eine serologisch nicht nachweisbare Leptospirose wurde dort eine histologische Untersuchung des im Department of Pathology archivierten Untersuchungsgutes der vorangegangenen zehn Jahre durchgeführt. Dabei unterzog man die Organe aller Tiere, die mit dem Vorbericht „plötzlicher Tod“ eingeliefert worden waren, einer Untersuchung mittels Silberimprägnation. Auf diese Weise gelang es nachträglich, Leptospiren bei 19 weiteren Zootieren aus 16 Arten festzustellen (McNamara, *et al.* 1999, **Tabelle 5**).

Ursachen für diese offensichtliche Unterschätzung der wahren epidemiologischen Bedeutung dürften vor allem in den wenig charakteristischen Krankheitssymptomen, den besonderen Bedingungen der Zootierhaltung sowie den methodischen Problemen der Leptospiren-Diagnostik zu suchen sein (Hänichen *et al.*, 1992; Hänichen *et al.*, 2001; Schröder, 1975; Steger-Lieb *et al.*, 1999). Die Diagnose Leptospirose kann nur bei positivem Ergebnis einer erregerspezifischen, direkten oder indirekten labordiagnostischen Untersuchung gestellt werden (Schröder, 1975). Beim Menschen wird davon ausgegangen, dass aufgrund der unspezifischen Symptomatik die meisten Leptospirosefälle nicht erkannt werden (Deutz *et al.*, 1996; Steffen *et al.*, 2000; Weber, 1987). McNamara *et al.*, 1999 weisen außerdem darauf hin, dass sich eine Leptospirose bei einer exotischen Tierart anders äußern kann, als es der Kliniker und der Pathologe gewohnt sind, und sie differentialdiagnostisch dann auch nicht

berücksichtigt wird. Hinzu kommt das grundsätzliche Problem, dass tierärztliche Untersuchungen bei Zootieren erheblich schwieriger durchzuführen und labordiagnostische Proben nur mit größerem Aufwand zu nehmen sind als bei Haustieren. Eine tierärztliche Untersuchung ist meist nur nach riskanten Einfangaktionen und unter Zwang, bei einer Vielzahl der Arten sogar erst in Narkose, möglich (Göltenboth und Klös, 1995; Rietschel, 1991). Dies trifft insbesondere auch für die zur Leptospirose diagnostik benötigten Blut- und Harnproben zu. Die Entnahme gepaarter Serumproben wird in den allerwenigsten Fällen durchführbar sein (McNamara *et al.*, 1999). Nach eigenen Beobachtungen mögen Leptospirosen bei Zootieren vielfach auch deshalb übersehen werden, weil diese Tiere *post mortem* entweder überhaupt keiner pathologischen Untersuchung zugeführt werden. Oder sie gelangen im tiefgefrorenem oder teilweise autolytischem Zustand dorthin, was den Leptospirennachweis mittels Anzuchtverfahren nahezu unmöglich macht. Bei der Leptospiren-Infektion von trächtigen Muttertieren sind Geburten lebensschwacher Jungtiere oder Aborte nicht selten. Wenn das Muttertier selbst meist keinerlei sonstige Krankheitssymptome zeigt (Dahme und Weiß, 1999), werden die abortierten Feten oder lebensschwach geborenen Jungtiere postmortal oft nicht untersucht. Und wenn doch, wird die Leptospirose als mögliche Abortursache meist nicht abgeklärt (McNamara *et al.*, 1999).

2.3.2. Ansteckungsmöglichkeiten von Zootieren

Die Infektionswege für Zootiere sind kaum bekannt. Friedrich, 2004 berichtet über eine Leptospirose als Bestandsproblem bei Japanmakaken im Bioparco, Roma, die durch Rattenbekämpfung und Sanierung des Bodenbelags, in dessen Unebenheiten sich zuvor Wasser ansammelte, beherrscht werden konnte.

Eine Infektion fleischfressender Zootierarten kann durch die direkte Aufnahme infizierter Tiere erfolgen. Haben Wildnager die Möglichkeit, mit Zuchten von als Futtertieren gehaltenen Nagetieren in Kontakt zu treten oder deren Futter bzw. Wasser zu kontaminieren, so können sich auch innerhalb der Zuchtstämme Ausscheider bzw. Träger der Bakterien etablieren. So berichtete Schröder (1975) über serologisch positive Laborratten, die als Futter für Zootiere dienen sollten. Im Krefelder Zoo wurden gegen *Leptospira* gerichtete Antikörper bei als Futtertiere gezüchteten Meerschweinchen gefunden, nachdem ein Löffelhund an einer Leptospirose gestorben war (Straube, 2006). Zwart und Treiber (1998) sowie Sassenburg (1988) nennen die Leptospirose als seltene Erkrankung von als Heimtieren gehaltenen Degus und Gerbilen, bezeichnen diese bei Kontakt sogar als sehr empfänglich. Degus und Gerbile

werden in zoologischen Gärten sehr häufig als Futtertiere gezüchtet oder als solche genutzt und stellen damit ein potentiell Infektionsrisiko für fleischfressende Zootiere dar.

2.3.3 Gesundheitliche Bedeutung von Leptospiren für Zootiere

Die tatsächliche Gefährdung des Tierbestandes zoologischer Gärten durch Infektionen mit Leptospiren ist nur schwer einschätzbar. Bei in der Literatur beschriebenen Ausbrüchen von Leptospirosen bei Zootieren handelt es sich oft um Einzeltierkrankungen (Neiffer *et al.*, 2001; McNarama *et al.*, 1999; Kohm, 1988; Kadlec *et al.*, 1983; Schröder, 1975). Nicht selten waren auch Gruppen betroffen, die aus einer oder mehreren Arten bestanden und dasselbe Gehege bewohnten. Die Tierverluste bei solchen Ausbrüchen können durchaus hoch sein und nahezu alle Bewohner der entsprechenden Anlage betreffen (Wilbert and Delorme, 1928; Johnson and Morter, 1969; Fear *et al.*, 1968; Hänichen *et al.*, 1992; Maltzan, 2002; Eulenberger *et al.*, 2002; Friedrich, 2004). So verstarben im Züricher Zoo in einem Zeitraum von 3,5 Jahren 16 Kanadische Biber (*Castor canadensis*) an Leptospirose. Die Tiere erkrankten jeweils akut, zeigten Hämorrhagien, Skelettmuskeldegenerationen sowie Hepatitis und Nephritis (Mettler und Weilenmann, 1974).

Über eine weitere verlustreiche Epizootie unter Nagetieren berichteten Hänichen *et al.* (1992). So verstarben in München innerhalb von neun Wochen zehn Maras (*Dolichotis patagonum*). Die meisten Tiere wurden ohne vorherige Symptome tot aufgefunden, bei drei wurde am Tag vor dem Tod Apathie und Muskelzittern beobachtet, drei weitere zeigten zusätzlich zu diesen Symptomen noch Augenausfluss und schleimigen Ausfluss im Genitalbereich. Fünf Wochen nach den letzten Todesfällen bei den Maras verstarben fünf im Nachbargehege gehaltene Jungwölfe. Hier wurden als Krankheitssymptome Apathie und Hinterhandschwäche sowie Konjunktivitis beobachtet (Hänichen *et al.*, 1992).

Ein Eisbär verstarb im Karlsruher Zoo im Alter von 98 Tagen sechs Tage nach dem Auftreten erster Krankheitsanzeichen (Kohm, 1988). Das Jungtier zeigte Apathie und verminderte Futteraufnahme bis hin zu Anorexie. Hinzu kamen Ausbleiben des Harn- und Kotabsatzes, schmerzhaftes Abdomen sowie Schluckbeschwerden. Anorexie, Apathie und Schmerzen im Bauchraum waren auch die beobachteten Symptome bei zwei Baikal-Ringelrobben (*Phoca sibirica*), die im Leipziger Zoo trotz eingeleiteter Therapiemaßnahmen jeweils ein bis zwei Tage nach dem Auftreten erster Anzeichen einer Leptospiren-Infektion erlagen (Eulenberger *et al.*, 2002).

Zwei Spitzmaulnashörner (*Diceros bicornis*) erkrankten im Pittsburgh Zoo (Neiffer *et al.*, 2001). Ein Tier starb 12 Stunden nach den ersten Symptomen, die sich in

ausbleibendem Kot- und vermindertem Urinabsatz sowie Anorexie zeigten. Das zweite Tier überlebte dank intensiver tierärztlicher Bemühungen. Dieses Tier zeigte neben einer Apathie Kolihsymptomatik und eine konjunktivale Hyperaemie. Auffallend war auch eine Photophobie. Miller und Boever, 1982 nennen *Leptospira*-Infektionen als Ursache der hämolytischen Anämie der Spitzmaul-Nashörner, wie sie auch für Pferde beschrieben ist (Brem *et al.*, 1992; Miller, 2003).

Über verlustreiche Leptospirosen bei Primaten gibt es mehrere Berichte. Bei einem Ausbruch der Krankheit im Schimpansenflügel des Pasteur Institute in Kindia, Französisch Guayana starben innerhalb von fünf Monaten insgesamt 25 Tiere (Wilbert und Delorme, 1927). Aus einer Gruppe von 26 Bartaffen (*Macaca silena*) starben drei im Washington Zoo (Shive *et al.*, 1969). Die Tiere waren alle klinisch unauffällig, postmortal wurden aber ein ausgeprägter Ikterus sowie Blutungen, die von isolierten Petechien in den Herzkranzfurchen bis zu Ekchymosen der Haut, Lymphknoten und aller visceraler Organe reichten, festgestellt. Bei allen Tieren war die Leber vergrößert und brüchig. Im Tiergarten Hoyerswerda erkrankten zwei Bärenmakaken (*Macaca arctoides*) innerhalb einer Gruppe von fünf Tieren (Tschirch und Jorga, 1986). Eines der Tiere verstarb. Symptome der erkrankten Affen waren eine anfängliche Gesichtsschwellung, häufiges Erbrechen, Apathie und Ikterus. Bis auf die Gesichtsschwellung wurden diese Symptome auch von Johnson und Morter (1969) bei einem Leptospirose-Ausbruch bei vier Affenarten (*Lagothrix lagotricha*, *Cebus capucinus*, *Saimiri sciurus* und *Erythrocebus patas*) in der Indianapolis Zoological Society beobachtet. Bei einem Tier kam noch deutliche Atemnot hinzu. Dagegen fanden Fear *et al.*, 1968 bei einer Kolonie von 500 Pavianen als einzige Symptome während eines Leptospirose-Ausbruchs einen Anstieg der Abortraten und Totgeburten. Viele Tiere hatten gleichzeitig auch Durchfall. Auch Friedrich (2004) stellte bei einer Gruppe von Japanmakaken neben Ikterus vor allem eine Häufung von Aborten und Totgeburten fest.

Bei serologischen Screening-Untersuchungen von Zootieren wurde immer wieder auch ein hoher Prozentsatz von Tieren mit Antikörpertitern gefunden, die aber niemals als krank aufgefallen sind (Füzi und Csoka, 1963; Kadlec *et al.*, 1983; Minette, 1966; Sebek *et al.*, 1986). Bei solchen Untersuchungen zeigt sich eine gewisse Häufung von Nachweisen bei Raubtieren und auch bei Unpaarhufern (Kadlec *et al.*, 1983; Sebek *et al.*, 1986; Schröder, 1990).

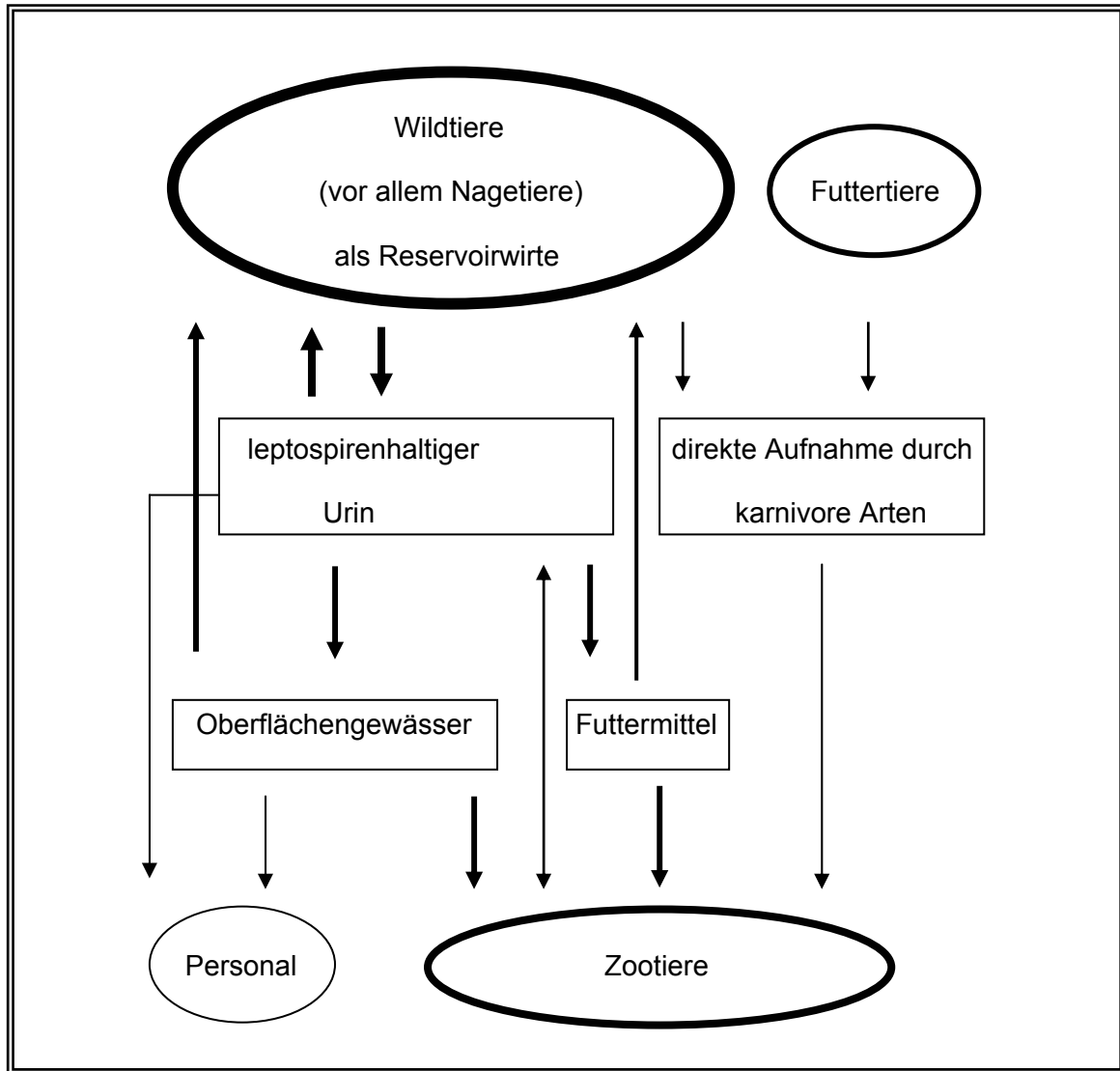


Abbildung 1:
Mögliche Übertragungswege von Leptospiren in zoologischen Gärten

2.3.4 Zootiere als Ansteckungsquelle für den Menschen

Personengruppen, die beruflich oder privat regelmäßig direkt mit Tieren umgehen, haben ein erhöhtes Risiko, mit Leptospiren in Kontakt zu kommen (Evarard and Evarard, 1993; Faine *et al.*, 2000; Fischer *et al.*, 1982; Herweg und Küpper, 1998; Planc and Dean, 2000; Simon *et al.*, 1999). Bei serologischen Untersuchungen solcher Personengruppen werden regelmäßig Antikörpertiter gefunden. So berichten Parnas und Weber (1989) bei Jägern, Parnas (1959) sowie Herweg *et al.* (1998) und Robertson *et al.* (1981) bei Tierhaltern und weitere Autoren bei Tierärzten von Erkrankungen bzw. von Antikörpertitern gegen Leptospiren (Deutz *et al.*, 1996; Kingscote, 1985; Morse *et al.*, 1955; Schnurrenberger, 1978). Die prozentuale Häufigkeit gegen Leptospiren gerichteter Antikörper muß aber nicht unbedingt höher als beim Bevölkerungsdurchschnitt liegen (Elbers *et al.*, 1999). Regelmäßig wird über Leptospirosen und ein überdurchschnittlich häufiges Auftreten von Antikörpern gegen *Leptospira* spp. im Serum von Schlachthofangestellten berichtet (Arambulo *et al.*, 1972; Braun *et al.*, 1964; Fischer *et al.*, 1982; Plesko *et al.*, 1966; Schallibaum, 1967).

Die Leptospirose ist als Berufskrankheit bei Schlachthofpersonal und Metzgern, Landwirten, Tierärzten und Tierpflegern anerkannt (Deutz *et al.*, 1996; Pete *et al.*, 2000; Simon *et al.*, 1999; Weber, 1987). Für Angestellte zoologischer Gärten besteht zumindest theoretisch ein erhöhtes Infektionsrisiko (McNamara *et al.*, 1999). Gleichwohl wurden bisher nur sehr selten Leptospiren-Infektionen bei Zooangestellten beschrieben. Die Ansteckungsquellen waren offenbar zumeist wildlebende Nagetiere. 2000 erkrankte ein Tierpfleger in einem kleinen Zoo in der Nähe von Stuttgart an einer Leptospirose (Gessmann, 2002). Für die Behandlung war eine stationäre Aufnahme nötig. Leptospiren-DNS wurde anschließend mittels PCR in einer Nierengewebsprobe einer auf dem Gelände dieses Zoos gefangenen Wanderratte (*Rattus norvegicus*) durch das Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg nachgewiesen (Kimmig und Oehme, unveröffentl. Daten). Auch andere Autoren berichteten über Leptospirosen bei Pflegern von Zootieren. So gab es einen Todesfall bei einem Pfleger in Colchester, wobei aber nicht geklärt werden konnte, wo und wie sich der Mann infiziert hat. Auch in diesem Fall wurde ein Stamm des Serovars Icterohaemorrhagiae identifiziert (Evening Gazette, Colchester, 2003). Lediglich Anderson *et al.* (1978) berichten über einen Fall, bei dem Leptospiren von jungen, selbst klinisch erkrankten Bären auf Pflegepersonal übertragen wurden. Bei einer serologischen Untersuchung des Personals des Wiener Zoos Schönbrunn fanden Jucker-Voss *et al.* (2004) bei 2 % der untersuchten Personen einen Titer gegen die *Leptospira*-Serovare Icterohaemorrhagiae und Copenhageni.

2.3.5 Voruntersuchungen im Zoologisch-Botanischen Garten Wilhelma

In den Jahren 1999 - 2001 wurden serologische Untersuchungen von Zootieren aus dem Zoologisch-Botanischen Garten Wilhelma in Stuttgart im Chemischen und Veterinär-Untersuchungsamt Stuttgart durchgeführt. Alle Tiere stammten aus der Südamerika-Anlage und bewohnten den gleichen Innenstall, die meisten auch die selben Außenanlagen. Alle untersuchten Wasserschweine (*Hydrochoerus hydrochaeris*, n = 3), fünf von 20 untersuchten Halsbandpekaris (*Tayassu tajacu*) und drei von vier Vicuñas (*Lama vicugna*) zeigten einen Antikörper-Titer in der MAT von mindestens 1:400. Ein Titer von 1:200 wurde zusätzlich bei einem von 15 untersuchten Maras (*Dolichotis patagonum*) und zwei von 14 Alpakas (*Lama guanicoe* f. *glama*) gefunden (Rietschel und Sting, unveröffentl. Daten). Diese Befunde waren der Auslöser für die systematische Untersuchung auf Leptospiren, deren Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit präsentiert werden. Bereits im Jahr 2001 waren ein Mährenspringer, zwei Wasserschweine und vier Halsbandpekaris, die in der Wilhelma verstorben waren, sowie ein Igel (*Erinacea europaea*) und vier Feldhasen (*Lepus europaeus*) vom Gelände dieses Zoos mittels einer Polymerase-Kettenreaktion im Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg auf das Vorhandensein von Leptospiren-DNS getestet worden. Dabei erbrachte allerdings keine dieser Proben ein positives Ergebnis (Kimmig, Oehme und Rietschel, unveröffentl. Daten).

Tabelle 5:Nachweis von *Leptospira*-Infektionen bei Zootieren in der Literatur

Ort und Jahr der Untersuchung	betroffene Tiere	Untersuchungs- methode	Quelle
zoologischer Garten in Guinea 1928	Schimpanse (<i>Pan troglodytes</i>)	MAT	Wilbert and Delorme, 1928
Indianapolis Zoo 1963	Wollaffe (<i>Lagothrix lagotricha</i>) Kapuziner (<i>Cebus capucinus</i>) Totenkopffaffe (<i>Saimiri sciureus</i>) Husarenaffe (<i>Erythrocebus patas</i>)	Silberimprägung, MAT	Johnson and Mortier, 1969
Southwest Foundation for Research and Education, USA 1965-66	„Paviane“ (<i>Papio</i> sp.)	MAT, Anzüchtung	Fear <i>et al.</i> , 1968
Tiergarten Berlin 1966	Korsakfüchse (<i>Alopex corsac</i>), Goldschakal (<i>Carnis aureus</i>), Rotwolf (<i>Canis lupus</i>)	MAT	Schröder, 1975 Jentzsch <i>et al.</i> , 1969
13 Institutionen weltweit (ohne Angaben zum Zeitraum)	Sphinxpavian (<i>Papio papio</i>), Steppenpavian (<i>Papio cynocephalus</i>), Schimpanse (<i>Pan troglodytes</i>),	MAT	Minette, 1966

Fortsetzung **Tabelle 5** auf der nächsten Seite

Fortsetzung **Tabelle 5**

Ort und Jahr der Untersuchung	betroffene Tiere	Untersuchungsmethode	Quelle
	Weißhandgibbon <i>(Hylobates lar)</i> , Rhesusaffe (<i>Macaca mulatta</i>), Indischer Hutaffe (<i>Macaca radiata</i>), <i>Macaca speziosa</i> , Haubenmangabe <i>(Cercocebus galaritus)</i> , Grüne Meerkatze <i>(Cercopithecus aethiops)</i> , Husarenaffe <i>(Erythrocebus patas)</i> , Hulman (<i>Presbytis entellus</i>), Lisztaffe <i>(Saguineus oedipus)</i>		
National Zoological Park Washington, DC 1967	Bartaffe (<i>Macaca silena</i>)	Versilberung, Anzüchtung, Hamster-Inokul.	Shive <i>et al.</i> , 1969
Zoologischer Garten Zürich 1972	Kanadischer Biber <i>(Castor canadensis)</i>	Fluoreszenz- serologie, MAT, Anzüchtung	Mettler <i>et al.</i> , 1974
7 Zoos der DDR 1973-79	8 von 434 Vögel und 39 von 604 Säugetiere	MAT	Kadlec <i>et al.</i> , 1983

Fortsetzung **Tabelle 5** auf der nächsten Seite

Fortsetzung **Tabelle 5**

Ort und Jahr der Untersuchung	betroffene Tiere	Untersuchungs- methode	Quelle
National Zoological Park Washington, DC 1975-1986	Waldhund (<i>Speothos venaticus</i>)	Histopathologie, MAT Dunkelfeld- Mikroskopie	Montali and Kelly, 1989
Zoo Karlsruhe 1985	Eisbär (<i>Ursus maritimus</i>)	MAT	Kohm, 1988
Ostböhmischer zoologischer Garten (ohne Angaben zum Zeitraum)	0 von 1 Reptil, 0 von 1 Vogel und 74 von 376 Säugetieren	MAT	Sebek <i>et al.</i> , 1986
Tiergarten Hoyerswerda 1986	Bärenmakak (<i>Makaka arctoides</i>)	Versilberung, MAT	Tschirch <i>et al.</i> , 1987
mehrere zoologische Gärten und Privat- haltungen exotischer Tiere im Einzugsgebiet Berlins 1965-1990	13 (0,26 %) von 5.000 Säugetieren, (8 Raubtiere, 5 Primaten); 0 von 5.000 Vögeln, 0 von 5.000 Reptilien	Fluoreszenz- Serologie, MAT, Levaditi-Färbung	Schröder, 1990
Bronx Zoo, NY USA 1986-1996	Katzenbär (<i>Ailurus fulgens</i>), Flughörnchen (<i>Glaucomys sabinus</i>), Panzernashorn (<i>Rhinoceros unicornis</i>),	MAT, Silberimprägation	McNarama <i>et al.</i> , 1999

Fortsetzung **Tabelle 5** auf der nächsten Seite

Fortsetzung **Tabelle 5**

Ort und Jahr der Untersuchung	betroffene Tiere	Untersuchungs- methode	Quelle
	Pferdehirsch (<i>Cervus unicolor</i>), Senegalgalago (<i>Galago senegalensis</i>), Zwergziege (<i>Capra hircus</i>), Sugar glider (<i>Petaurus breviceps</i>), Hausmaus (<i>Mus musculus</i>), Bisam (<i>Ondatra zibethicus</i>), Wapiti (<i>Cervus elaphus</i>), Milu (<i>Elaphurus davidianus</i>), Zackenhirsch (<i>Cervus duvauceli</i>), Schönhörnchen (<i>Heliosciurus gambianus</i>), Degu (<i>Octodon degus</i>), Okapi (<i>Okapia johnstoni</i>), Dünengazelle (<i>Gazella leptoceros</i>), Leierhirsch (<i>Cervus eldi</i>)		
Tierpark Hellabrunn München 1991	Mara (<i>Dolichotis patagonium</i>), Wolf (<i>Canis lupus</i>)	Silberimprägung, Anzüchtung, MAT	Hänichen et al., 1992
Bioparco Roma ca. 1995	Japanmakak (<i>Macaca fuscata</i>),	MAT	Friedrich, 2004

Fortsetzung **Tabelle 5** auf der nächsten Seite

Fortsetzung **Tabelle 5**

Ort und Jahr der Untersuchung	betroffene Tiere	Untersuchungs- methode	Quelle
Zoo Leipzig 1996	Baikal-Ringelrobben (<i>Phoca sibirica</i>)	MAT	Eulenberger <i>et al.</i> , 2002
Pittsburg Zoo, Pennsylvania, USA 2000	Spitzmaulnashorn (<i>Diceros bicornis</i>)	MAT	Neiffer <i>et al.</i> , 2001
Tierpark Hellabrunn München 2002	Nutria (<i>Myocastor coypus</i>), Kanadische Biber (<i>Castor canadensis</i>)	MAT	Maltzan, pers. Mitteilung, 2002
Rio de Janeiro Zoo 2002	Lama (<i>Lama glama</i>), Waldfuchs (<i>Cerdocyon thous</i>), Mähnenwolf (<i>Chrysocyon brachyurus</i>) Tayra (<i>Eira barbara</i>), Nasenbär (<i>Nasua nasua</i>), Wickelbär (<i>Potos flavus</i>), Krabbenwaschbär (<i>Procyon cancrivorus</i>), Brillenbär (<i>Tremarctus ornatus</i>), Tamandua (<i>Tamandua tetradactyla</i>), Großer Ameisenbär (<i>Myrmephaga tridactyla</i>), Zebra (<i>Equus b. antiquorum</i>), Goldstirnklammeraffe (<i>Ateles belzebuth</i>), Schwarzer Klammeraffe (<i>Atheles paniscus</i>),	MAT	Lilenbaum <i>et al.</i> , 2002

Fortsetzung **Tabelle 5** auf der nächsten Seite

Fortsetzung **Tabelle 5**

Ort und Jahr der Untersuchung	betroffene Tiere	Untersuchungs- methode	Quelle
	Japanmakak (<i>Macaca fuscata</i>), Bärenpavian (<i>Papio ursinus</i>), Greifstachler (<i>Sphiggurus villosus</i>)		
Krefelder Zoo 2006	Löffelhund (<i>Otocyon megalotis</i>), Meer- schweinchen (<i>Cavia aperea</i>)	MAT	Straube, 2006

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Verbrauchsmaterialien und Puffer

In dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien und Puffer sind im Anhang aufgelistet.

3.2 Bakterienstämme

Es wurden Leptospiren-Stämme eingesetzt, die bereits seit mehreren Jahren in der Routinediagnostik des Chemischen-und-Veterinär-Untersuchungsamtes (CVUA) Stuttgart verwendet werden. Sie stammten ursprünglich vom früheren Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV), Berlin. Im CVUA werden die Arbeitsstämme alle 4 Wochen durch einen sterilen Filter mit Porengröße 0,45 µm (FP 30/0,45 CA-S Schleicher & Schuell) filtriert, um eventuell kontaminierende Fremdkeime zu eliminieren. Jährlich einmal wird die Identität der Arbeitsstämme durch Mikroagglutination mit Referenzseren überprüft. Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme sind in **Tabelle 6** aufgeführt. Sie wurden ausgewählt, da sie nach der Erfahrung des Chemischen-und-Veterinär-Untersuchungsamtes Stuttgart (CVUA) die im Großraum Stuttgart vorkommenden Serovare abdecken. Aufgrund der Kreuzreaktion der Serovare Icterohaemorrhagiae und Copenhageni wurde ein Icterohaemorrhagiae-Stamm nicht eigens mitgeführt.

3.3 Zoologische Gärten und Tierparks

Das Probenmaterial wurde in den folgenden Zoos gesammelt: Tierpark im Leintal, Tierpark Göppingen, Tierpark Pforzheim, Tierpark Ulm, Schwabenpark Welzheim, Nyphaea Esslingen und Zoologisch-Botanischer Garten Wilhelma, Stuttgart, in Baden-Württemberg sowie im Zoo Landau/Pfalz in Rheinland Pfalz und im Naturzoo Rheine in Nordrhein-Westfalen.

Eine Umfrage zum Vorkommen von Leptospiren und Nagetieren wurde an folgende zoologische Gärten verschickt: Allwetterzoo Münster, Nürnberger Zoo, Opel-Zoo, Kronberg, Ruhrzoo Gelsenkirchen, Serengeti Safaripark Hodenhagen, Tiergarten Heidelberg, Tiergarten Schönbrunn, Wien, Tierpark Berlin-Friedrichsfelde, Tierpark Dahlhölzli, Bern, Tierpark Hagenbeck, Hamburg, Tierpark Hellabrunn, München, Tierpark im Leintal, Leintal, Wilhelma, Stuttgart, Zoo Basel, Zoo Dortmund, Zoo

Duisburg, Zoo Hannover, Zoo Frankfurt, Zoo Karlsruhe, Zoo Köln, Zoo Landau in der Pfalz, Zoo Leipzig, Zoologischer Garten Augsburg, Zoologischer Garten Berlin, Zoologischer Garten Magdeburg, Zoo Osnabrück, Zoo Salzburg, Zoo Zürich.

3.4 Tiere

Es wurde eine Gesamtzahl von 1751 Tieren untersucht. Zum Spektrum der untersuchten Zootiere, Futtertiere und wildlebenden Tiere siehe **Tabellen 7** sowie zur Systematik der untersuchten Tiere **Tabelle 25** (Anhang).

Zootiere

Das verwendete Untersuchungsgut umfasste Proben von 854 Zootieren. Als Zootiere wurden Tiere definiert, die in den entsprechenden Zoos zum Zwecke der Präsentation oder Nachzucht zur Arterhaltung gehalten wurden.

Futtertiere

Das verwendete Untersuchungsgut umfasste Proben von 40 Futtertieren. Als Futtertiere wurden Vögel und Säugetiere definiert, die dazu dienten, zur Ernährung von Zootieren der untersuchten Zoos geschlachtet und verfüttert zu werden. Diese Futtertiere wurden entweder innerhalb der Zoos gezüchtet (Hausmäuse, Meer-schweinchen, Kaninchen) oder von privaten Haltern und Züchtern lebend bezogen und in den Futterküchen der Zoos geschlachtet.

Wildlebende Tiere

Das verwendete Untersuchungsgut umfasste Proben von 857 wildlebenden Tieren. Als wildlebende Tiere wurden Wirbeltiere definiert, die auf dem Gelände der untersuchten Zoos vorkamen, ohne dort gehalten zu werden.

Tabelle 6:Verwendete Stämme von *Leptospira interrogans*

Serogruppe	Serovar	Stamm
Australis	Australis	ST1
Autumnalis	Autumnalis	ST2
Canicola	Canicola	ST3
Grippotyphosa	Grippotyphosa	ST4
Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	ST5
Pomona	Pomona	ST6
Sejroe	Hardjo	ST7
Sejroe	Saxkoebing	ST8
Sejroe	Sejroe	ST9
Tarassovi	Tarassovi	ST10

3.4.1 Blutserumproben

Bei der Untersuchung wurde auf die Sammlung von 927 Zootier-Serumproben (in Einzelfällen auch –Plasmaproben) des Stuttgarter Zoos Wilhelma zurückgegriffen. Sie beinhaltet vor allem Proben von Tieren aus diesem Zoo, die seit dem Jahr 1996 gesammelt und ständig ergänzt werden, aber auch in geringem Umfang Proben aus anderen deutschen zoologischen Gärten und Tierparks. Die bis zum Beginn dieser Arbeit am 01.01.02 bestehende Sammlung von 339 Seren konnte bis zum 31.12.03 um 588 Proben erweitert werden, die entweder vom Verfasser oder vom Zootierarzt Dr. W. Rietschel in der Wilhelma sowie in sieben weiteren zoologischen Gärten und Tierparks, vorwiegend in Baden-Württemberg, genommen wurden. Aus fünf der weiteren Tierhaltungen wurden parallel auch Nierengewebsproben auf Leptospiren-DNS untersucht. Es wurden ausschließlich Tiere untersucht, die nicht gegen Leptospirose geimpft waren. Die Entnahme einer Blutprobe fand nur statt, sofern eine tiergärtnerische oder tierärztliche Indikation, das entsprechende Tier zu greifen oder zu narkotisieren, vorlag (z.B. Umstallaktionen, Transport, Untersuchungen oder Behandlungen). Kleinere bzw. harmlose Tiere wurden mit der Hand oder dem Kescher gefangen, während größere und wehrhafte Tiere in der Regel mit dem Blasrohr narkotisiert wurden. Je nach Tierart kamen verschiedene Narkotika zum Einsatz. Venöses Blut wurde steril gewonnen. Meist wurde dazu die Vena jugularis, die Vena cephalica antebrachii, die Vena femoralis, die V. brachialis oder die V. saphena punktiert, je nach Tierart aber auch andere Gefäße. Anschließend wurde das Blut bei Raumtemperatur für mindestens eine Stunde und höchstens zwei Tage inkubiert und danach für 10 min bei 1300 x g zentrifugiert. Das Serum wurde dann portioniert in Reaktionsgefäße pipettiert und bei –20 °C tiefgefroren. **Tabelle 7** gibt einen Überblick über Umfang und Herkunft der Proben.

3.4.2 Nierengewebsproben

Es wurden 1003 Nierengewebsproben auf das Vorhandensein von Leptospiren-DNS untersucht. Die Proben stammten von Tieren aus der Wilhelma sowie aus den Tierparks im Leintal, Göppingen, Pforzheim und Ulm, aus der Nyphaea in Esslingen aus Baden Württemberg, aus dem Zoo Landau/Pfalz in Rheinland-Pfalz und aus dem Naturzoo Rheine in Nordrhein-Westfalen. Aus sechs dieser Tierhaltungen wurden auch Serumproben untersucht. Sie setzen sich wie folgt zusammen: je eine Probe von 684 wildlebenden Tieren aus der Wilhelma und 167 wildlebenden Tieren aus den anderen Tierhaltungen, 100 Zootieren aus der Wilhelma bzw. 12 Zootieren aus den anderen Tierhaltungen sowie je eine Probe von 40 Futtertieren, die in der Wilhelma verfüttert

wurden (siehe **Tabelle 7**). Bei den wildlebenden Tieren handelte es sich vorwiegend um Mäuse und Ratten (n = 703), die im Rahmen der normalen Schädlingsbekämpfung auf den Zoogeländen mit Schlag- oder Lebendfallen gefangen bzw. vergiftet und eingesammelt wurden. In den anderen Tierhaltungen wurden Ratten auch gezielt geschossen. Die Tiere wurden von den Tierpflegern der einzelnen Reviere aufgesammelt und möglichst frisch in die Krankenstation der Wilhelma gebracht, wo ihnen die Nieren entnommen wurden, die dann in toto in Reaktionsgefäßen bei – 20 °C tiefgefroren wurden. Aus praktischen Gründen wurden die meisten Tierkörper aus den anderen Tierhaltungen vor der Entnahme der Nieren zunächst für einige Zeit in toto bei – 20 °C tiefgefroren bevor sie zur weiteren Verarbeitung in die Wilhelma gelangten. Auch mit den Nieren von 25 Feldhasen (*Lepus europaeus*) und 14 Rotfüchsen (*Vulpes vulpes*), die auf dem Gelände der Wilhelma geschossen wurden, wurde entsprechend verfahren. Daneben flossen auch die Nierengewebsproben von 63 weiteren im Zoobereich wildlebenden Tieren aus 14 Arten in die Untersuchung mit ein. Diese Tiere wurden entweder tot oder in wenigen Fällen krank aufgefunden. Sofern letztere starben oder aus Tierschutzgründen eingeschläfert werden mussten, wurden auch von ihnen Nierengewebsproben genommen. Bei den untersuchten Zootieren handelte es sich um solche Exemplare, die während des Untersuchungszeitraumes aus verschiedenen Gründen verstorben waren. Die Systematik der untersuchten Tierarten ist in **Tabelle 25** im Anhang aufgeführt. Auch hier wurden Kadaver aus den anderen Tierhaltungen vor der Organentnahme in der Wilhelma aus praktischen Gründen zunächst in toto eingefroren (-20 °C). Den Futtertieren (40 Tiere aus 6 Arten) wurde gleich nach deren tierschutzgerechter Tötung eine Niere entnommen und tiefgefroren. Möglichst rasch wurden die Organproben zum Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg transportiert und bei –70 °C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

Tabelle 7:

In dieser Studie auf *Leptospira*-DNS oder Antikörper getestete Tiere in zoologischen Gärten und Tierparks

Ordnung	Anzahl der Arten	Anzahl der beprobt	Anzahl der Tiere			
			Art der Probe		Ort der Beprobung	
			Blut	Niere	Wilhelma	Andere
Wildlebende Tiere						
Rallenvögel	2	2	0	2	2	0
Schreitvögel	1	2	2	0	2	0
Entenvögel	1	2	2	0	2	0
Taubenvögel	1	58	58	58	58	0
Singvögel	2	7	2	7	7	0
Insektenfresser	3	5	0	5	4	1
Fledertiere	5	15	1	15	15	0
Nagetiere	9	725	22	725	559	166
Hasenartige	1	25	2	25	25	0
Raubtiere	3	16	2	14	16	0
Futtertiere						
Nagetiere	2	13	11	13	13	0
Unpaarhufer	1	1	0	1	1	0
Paarhufer	2	25	0	25	25	0
Hasenartige	1	1	0	1	1	0
Zootiere						
Amphibien						
Frösche	1	1	0	1	1	0
Reptilien						
Schildkröten	2	13	13	0	13	0
Krokodile	1	1	1	1	1	0
Echsen	1	1	1	0	1	0
Schlangen	2	2	2	0	2	0
Vögel						
Straußenvögel	1	3	3	0	2	1
Pinguine	1	5	5	0	5	0
Schreitvögel	4	7	7	0	7	0
Flamingos	1	4	4	0	4	0
Entenvögel	3	4	4	0	4	0
Hühnervögel	3	11	11	0	11	0
Kranichvögel	2	2	2	0	2	0
Taubenvögel	1	10	10	10	10	0

Fortsetzung **Tabelle 7** nächste Seite

Fortsetzung **Tabelle 7**

Ordnung	Anzahl der Arten	Anzahl der beprobt	Anzahl der Tiere			
			Art der Probe		Ort der Beprobung	
			Blut	Niere	Wilhelma	Andere
Säugetiere						
Beuteltiere	2	14	14	0	11	3
Insektenfresser	1	1	0	1	1	0
Rüsselspringer	1	3	0	3	3	0
Fledertiere	3	11	2	11	11	0
Spitzhörnchen	1	1	1	0	1	0
Herrentiere	3	118	118	6	95	23
Nagetiere	9	81	70	24	80	1
Raubtiere	18	51	51	15	41	10
Rüsseltiere	1	8	8	0	8	0
Schliefer	1	2	2	0	2	0
Unpaarhufer	11	80	79	2	69	11
Paarhufer	33	420	417	38	356	64
Summe	143	1751	927	1003	1471	326

zur Systematik siehe **Tabelle 25** (Anhang)

3.5 Bakteriologische Methoden

Die bakteriologischen Untersuchungen wurden in den Laboren der Abteilung Serologie des Chemischen-und-Veterinär-Untersuchungsamts (CVUA) Stuttgart durchgeführt.

3.5.1 Medien

Kulturmedium der Referenzstämme

Das Kulturmedium für Leptospiren wurde hergestellt, indem zweimal autoklaviertes Leptospiren-Grundmedium (Leptospira Medium Base EMJH, Difco Laboratories, Augsburg) im Volumenverhältnis 9:1 mit *Leptospira*-Enrichment-Medium (Baco *Leptospira* Enrichment EMJH, Difco Laboratories, Augsburg) gemischt wurde. Diesem gebrauchsfertigen EMJH-Medium wurde für die Anzucht der Leptospiren-Arbeitsstämme kein Hemmstoff zugesetzt, da durch steriles Arbeiten eine Verunreinigung durch Fremdkeime vermieden werden konnte.

Anzuchtmedium

Für die Anzucht der Leptospiren aus Nierengewebsproben wurde in Anlehnung an das OIE-Manual (2000) und an Faine *et al.* (2000) das bereits beschriebene EMJH-Medium verwendet. Um die Überwucherung der Leptospiren durch Kontaminationskeime zu vermeiden, musste ein Hemmstoff zugesetzt werden. Als dieser fungierte 5-Fluorouracil (Fa. Sigma F6627), mit dem zwei Medien mit unterschiedlicher Konzentration hergestellt wurden. Dazu wurde das gebrauchsfertige EMJH-Medium einmal mit 100 µg/ml 5-Fluorouracil und einmal mit 200 µg/ml supplementiert. Um 300 ml Medium herzustellen, wurden 30 bzw. 60 mg 5-Fluorouracil zu 5 ml Aqua bidest. gegeben und bei 55 °C im Wasserbad gelöst. Anschließend wurde die Lösung unter Zuhilfenahme eines Sterilaufsatzes für Spritzen (0,2 µm Porendurchmesser) den 300 ml des gebrauchsfertigen EMJH-Mediums zugegeben.

3.5.2 Anzucht und Haltung von Leptospiren

Anzucht und Haltung der Leptospiren-Referenzstämme

Zur Anzucht der Leptospiren wurde je 1 ml aus der jeweiligen Leptospiren-Kultur in 5 ml steriles, in Reagenzgläser abgefülltes EMJH-Medium übertragen und 3-5 Tage im Brutschrank bei 30 °C bebrütet. Danach konnte mit der Kultur gearbeitet werden, sofern die Kontrolle eines Tropfens bei 100facher Vergrößerung im Dunkelfeld-Mikroskop (Fa. Carl Zeiss, Wetzlar) das Vorhandensein von beweglichen, nicht verklumpten Leptospiren ergab. Die Aufbewahrung der Leptospiren im Anschluss an die Bebrütung erfolgte im Brutschrank bei 28 °C. Um die Bakterien vital zu halten und nicht zu dicht wachsen zu lassen, wurden sie zweimal wöchentlich in frischem Medium subkultiviert. Hierzu wurde jeweils 1 ml aus der alten Kultur in 5 ml neues EMJH-Leptospirenmedium übertragen.

3.5.3. Bestimmung der Leptospiren-Keimzahl

Die Leptospiren-Keimzahl in flüssigen Medien wurde halbquantitativ gemäß der mikroskopischen Neubauer-Zählkammer-Schätzmethode nach folgender Formel bestimmt: Keimdichte [Zellzahl / μ l] = $(n \times 400) / q$, wobei n = Anzahl gezählter Leptospiren und q = Anzahl ausgezählter Quadrate.

3.5.4. Anzucht von Leptospiren aus Nierengewebsproben

Anzüchtungsansatz

Mit den Nierengewebsproben, in denen durch PCR und Sequenzierung Leptospiren-DNS nachgewiesen werden konnte, wurde eine Anzucht der Bakterien versucht. Ca. 140 mg der Probe (1 Mäuseniere) wurden dazu in einem sterilen Keramik-Tiegel zermörsert, in 2 ml sterilem gebrauchsfertigen EMJH-Medium mit Zusatz von 100 μ g/ml 5-Fluorouracil suspensiert und in ein steriles Reagenzglas pipettiert. Anschließend wurde die Suspension für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, so dass die festen Bestandteile sedimentieren konnten. Vom Überstand wurden je 0,5 ml in ein Reagenzglas mit 5 ml gebrauchsfertigem EMJH-Medium mit Zusatz von 100 μ g/ml bzw. 200 μ g/ml 5-Fluorouracil überführt. Das so beimpfte Anzuchtmedium wurde im Anschluss im Brutschrank für 10,5 Wochen bei 29 °C bebrütet. Als Positivkontrollen dienten die Stämme ST5 und ST9 der Serovare Copenhageni und Sejroe. Von diesen wurden jeweils 0,5 ml Stammkultur in je 3 Reagenzgläser mit 5 ml EMJH-Medium

überführt. Die Reagenzgläser enthielten je einmal einen Zusatz von 100 µg/ml oder 200 µg/ml 5-Fluorouracil oder keinen Hemmstoffzusatz. Als Negativkontrollen dienten je 2 Reagenzgläser mit 5 ml gebrauchsfertigem EMJH-Mediums mit Zusatz von 100 µg/ml oder 200 µg/ml 5-Fluorouracil.

Kontrolle und weitere Behandlung der Kulturen

Im Abstand von ein bis höchstens zwei Wochen wurden die Kulturen kontrolliert. Zeigte sich makroskopisch Anhaltspunkte für Bakterienwachstum (Trübung, Schlierenbildung), so wurden Nativpräparate und Gram-gefärbte Präparate angefertigt und mittels Dunkelfeld- und Hellfeldmikroskopie näher untersucht. Bei Wachstum von Kontaminationskeimen wurden die Kulturen durch einen sterilen Filter mit dem Porendurchmesser 0,45 µm (Schleicher & Schuell) filtriert. Von Kulturen, bei denen das Wachstum von Leptospiren vermutet wurde, wurde 1 ml abgenommen, 5 min gekocht und anschließend in der PCR überprüft.

3.6 Serologische Methoden

Die serologischen Untersuchungen wurden in den Laboren der Abteilung Serologie des Chemischen-und-Veterinär-Untersuchungsamts (CVUA) Stuttgart durchgeführt.

3.6.1 Mikroagglutinationstest

Alle Serumproben wurden im Mikroagglutinationstest gemäß den Angaben der O.I.E. (O.I.E. Manual 2000) auf Antikörper gegen Leptospiren getestet. Sie wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, in Verhältnis 1:100 mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnt und pro Test in einem Volumen von 25 µl in eine Kavität einer 96-Loch-Mikrotiterplatte (Fa. Schütt Labortechnik, Göttingen) pipettiert. Anschließend wurden 25 µl der gut bewachsenen Leptospiren-Kultur in die Kavität pipettiert. Jede Serumprobe wurde in dieser Weise mit allen zehn *Leptospira*-Stämmen getestet. Als Kontrollen wurden ein Negativserum (Negativkontrolle) in der Verdünnung 1:100 sowie 25 µl gepufferte physiologische NaCl-Lösung (Pufferkontrolle) mitgeführt. Als Positivkontrolle diente jeweils eine Serumprobe von einem Haushund mit bekanntem Titer. Nach kurzer Durchmischung des Reaktionsansatzes durch Rütteln der Testplatte erfolgte eine Inkubation bei 28 °C für 1,5 Stunden. Eventuelle Zusammenballungen von

Leptospiren, die nicht durch Agglutination zustande gekommen sind, wurden im Anschluss an die Inkubation durch leichtes Schütteln der Testplatte aufgelöst. Befanden sich im Serum Antikörper gegen das getestete Serovar, so banden diese an der Oberfläche der Bakterien und es entstanden Agglutinate der Leptospiren. Die Beurteilung der Agglutinate erfolgte bei 1.000facher Vergrößerung mittels eines Dunkelfeldmikroskops. Hierzu wurde von jedem Reaktionsansatz ein Tropfen mit einer sterilen Metallöse entnommen und auf einen mit 95 %igem Alkohol entfetteten Objektträger aufgetragen. Die Agglutinationsreaktion wurde als positiv gewertet, wenn mindestens 50 % der Leptospiren agglutiniert oder aufgrund der Agglutination sedimentiert waren. Bei positiven Seren wurden im Anschluss durch Tests mit Probenverdünnungen in den Stufen 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 usw. Endpunkt-titrations durchgeführt. Als Titer wurde die höchste Serumverdünnung definiert, bei der noch 50 % der Bakterien agglutinierten.

3.7 Molekularbiologische Methoden

Die molekularbiologischen Untersuchungen wurden in den Räumen der Abteilung Molekularbiologie des Landesgesundheitsamtes (LGA) Baden-Württemberg, Stuttgart durchgeführt.

3.7.1 Probenvorbereitung

Enzymatischer Aufschluss

Nach dem Auftauen der Proben wurden ca. 45 - 50 mg Nierengewebe enzymatisch verdaut. Bei Organen von der Größe der Niere einer ausgewachsenen Maus wurde eine Scheibe quer durch alle Schichten aus der Mitte des Organs herausgeschnitten. Bei größeren Proben wurde der auszuschneidende Bereich so gewählt, dass er den Tubulusbereich umfasste und nach Möglichkeit außerdem einen Teil des Nierenbeckens. Bei Organen von der Größe der Nieren junger Mäuse wurde ein Organ in toto belassen. Diese Organe bzw. Organstücke wurden in Eppendorfgefäßen mit 200 µl Digestpuffer und 80 µl Proteinase K (Fa. Roche Diagnostik GmbH) gegeben und über Nacht bei 56 °C im Hybridisierungsofen verdaut. Anschließend wurden die Proben im Wasserbad für 5 min aufgeköcht, um die Proteinase und andere Enzyme zu

deaktivieren, und zur weiteren Bearbeitung entweder bei 5 °C aufbewahrt oder, wenn sich die weitere Aufreinigung nicht in den folgenden Tagen anschloss, bei -20 °C eingefroren.

Nukleinsäureextraktion mittels Silica-Matrix

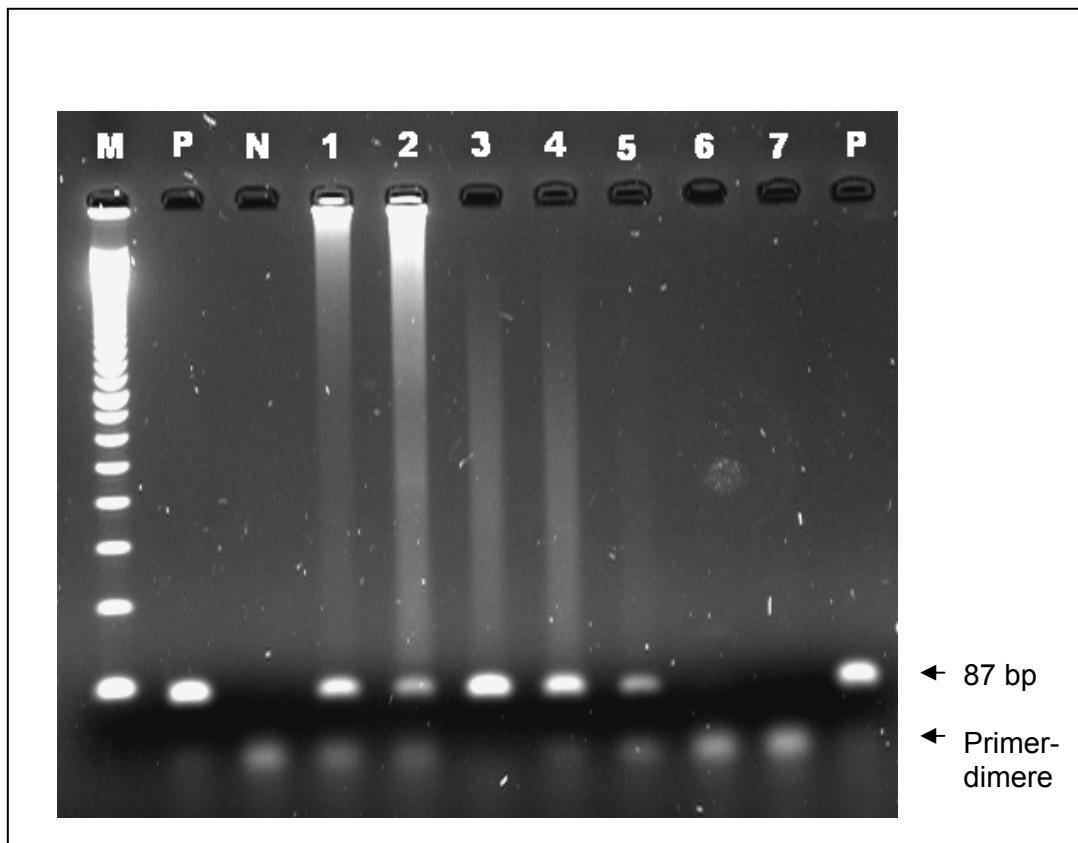
Die Aufreinigung der im Verdau freigesetzten DNS erfolgte mittels einer Absorption an Siliciumoxid - Pulver (Fa. Sigma) und anschließender mehrmaliger Waschung (Silica-Extraktion). Dazu wurden in einem 1,5 µl Eppendorf-Reaktionsgefäß 40 µl Silica, 900 µl Lysepuffer und die verdaute Proben-Suspension gut durchmischt (vortexen) und anschließend bei Raumtemperatur 10 min inkubiert. Während der Inkubation wurde ebenfalls mehrmals gevortext. Nach Zentrifugation (15 sec bei 16.000 x g) wurde der Überstand verworfen. Das Silica-DNS-Gemisch wurde nun zweimal mit je 1.000 µl Waschpuffer und Ethanol (70%) sowie einmal mit 1.000 µl Aceton gewaschen, indem es im Vortexer resuspendiert und anschließend erneut zentrifugiert (15 sec, 16.000 x g) wurde. Der Überstand wurde jeweils verworfen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Aceton abgezogen und das zurückbleibende Silica-Pulver im Brutschrank für 10 min bei 56 °C getrocknet. Bei der anschließenden Elution wurde das Pulver mit 50 µl H₂O resuspendiert, gründlich gevortext und anschließend im Brutschrank für 15 min inkubiert. Nach erneutem Vortexen wurde die Suspension 3 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgezogen und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Um sicherzustellen, dass das Silica-Pulver vollständig entfernt war, wurde der Vorgang des Zentrifugierens und Überführens des Überstands in ein neues Gefäß zweimal wiederholt.

Bestimmung der DNS-Menge

Die durch die Aufreinigung erhaltene Menge an DNS wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurden aus der DNS-Lösung 10 µl entnommen und mit 990 µl Reinstwasser verdünnt. Die optische Dichte dieser Lösung wurde im Photometer (GeneQuant RNA/DNA Calculator, Fa. Pharmacia Biotech) bei einer Testwellenlänge von 320 nm bestimmt. Die Konzentration der DNS-Präparate an dsDNS wurde von diesem Gerät automatisch berechnet. Da die DNS-Menge im PCR-Ansatz zwischen 0,1 und 0,5 µg pro Ansatz liegen sollte, wurden die DNS-Präparate im Bedarfsfall mit nucleasefreiem Wasser (Fa. Promega) entsprechend verdünnt.

3.7.2 Agarosegelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten erfolgte in horizontalen Flachbettgelen mit einem Volumen von 50 ml, 2 % w/v Agarose (Fa. Peqlab), 1 µg Ethidiumbromid und TBE als Laufpuffer. 8 µl des Reaktionsansatzes wurden mit 2 µl Ladepuffer vermischt und in die Vertiefungen des Gels pipettiert. Es wurde eine Spannung von 7,5 V für 30 bis 45 Minuten angelegt. Als Molekulargewichtsmarker wurde der *Standard „100 bp-Ladder“* (Fa. Amersham Biosciences) mitgeführt. Danach wurden die Gele in ein Geldokumentationssystem (Modell K-65 HM; Fa. LTF, Wasserburg / Bodensee) überführt, wo die DNS mit UV-Licht der Wellenlänge 312 nm sichtbar gemacht wurde (siehe **Abbildung 2**).

**Abbildung 2:**

Nachweis von *Leptospira*-DNS in Nierengewebsproben von Tieren mittels LeptoF / LeptoR-PCR. Analyse der PCR-Produkte durch Elektrophorese im 2 %-igen Agarosegel und Ethidiumbromid-Färbung.

M: Marker / 100 Base-Pair Ladder

P: Positivkontrolle(n), Kultur des Serovars Sejroe Stamm ST9

(DNS von 3×10^4 Bakterien pro PCR-Ansatz)

N: Negativkontrolle, H₂O

1: Probe Nr. 512, Hausmaus

2: Probe Nr. 157, Gelbhalsmaus

3: Probe Nr. 885, Wanderratte

4: Probe Nr. 688, Igel

5: Probe Nr. 320, Zwergfledermaus

6: Probe Nr. 155, Gelbhalsmaus

7: Probe Nr. 125, Gelbhalsmaus

3.7.3 Polymerase-Kettenreaktion

Oligodesoxyribonucleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligodesoxyribonucleotide wurden von der Fa. Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe bezogen. Sie wurden in Aqua dest. gelöst, so dass eine Gebrauchslösung mit einer Konzentration von 5 µM entstand, und anschließend bei – 20 °C gelagert. Die Sequenzen der Primer sind in **Tabelle 8** aufgeführt.

Positiv- und Negativkontrollen

Als Positivkontrolle diente die Kultur des Stammes ST9 von Serovar Sejroe, die auch im Rahmen der Serologie zum Einsatz kam. Die Konzentration der Kultur lag bei 10^7 Bakterienzellen/ml. Die DNS wurde durch 10minütige Inkubation bei 100 °C im Wasserbad freigesetzt, und anschließend mit nucleasefreiem Wasser im Verhältnis 1:100 verdünnt. 3 µl dieser Verdünnung wurden in jedem PCR-Lauf parallel zu den Silica-aufgereinigten DNS-Proben amplifiziert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit 3 µl H₂O.

3.7.3.1 Leptospiren-Screening-PCR

Leptospiren-Screening-PCR mit dem Primerpaar LeptoF / LeptoR

Die Screening-PCR auf DNS pathogener *Leptospira* spp. wurde mit dem Primerpaar LeptoF und LeptoR (Smythe *et al.* 2002) durchgeführt. Die Primer binden zwischen Position 171 und 258 des 16S-RNS-Gens (*rrs*). Das PCR-Produkt hat eine Länge von 87 bp. Es wurden pro Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 µl 3 µl Probe (0,1 bis 0,5 µg DNS) mit 5 µl 10x Puffer (Perkin Elmer), 2,5 mM MgCl₂ (Perkin Elmer), 200 µM dNTP, je 0,5 µM LeptoF und LeptoR, 6,7 µl Tris-Puffer, 1,5 U *Taq*-DNA-Polymerase (Perkin Elmer) und 10 µl H₂O eingesetzt. Die Kettenreaktion wurde nach folgendem Programm durchgeführt: Denaturierung bei 94 °C (2 min), dann 42 Zyklen mit je 30 sec Denaturierung bei 94 °C, 30 sec Annealing bei 55 °C und 30 sec Elongation bei 72 °C. Daran schloss sich die Extension an (5 min bei 72 °C). Danach wurden die Proben auf 4 °C heruntergekühlt. Dabei wurde der Thermocycler GeneAmp PCR System 2400 benutzt (Perkin Elmer).

Leptospiren-Screening-PCR mit dem Primerpaar LP1 / LP2

Vier Proben wurden zusätzlich mit dem Primerpaar LP1 und LP2 (Kee *et al.*, 1994) auf Leptospiren-DNS getestet. Die Primer binden im pLP4-Gen. Das PCR-Produkt hatte eine Länge von 274 bp. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes und das PCR-Programm entsprachen dem der Leptospiren-Screening-PCR mit den Primern LeptoF und LeptoR.

3.7.3.2 Auswertung der PCR

Ein PCR-Ergebnis wurde als positiv gewertet, wenn die Negativkontrolle keine, die Positivkontrollen deutliche Banden ergaben und sich bei der Probe eine Bande zeigte, die dieselbe elektrophoretische Mobilität wie die Positivkontrolle zeigte. Auch schwache Banden wurden als positiv gewertet. Proben, die mehrere Banden zeigten, wurden als fraglich gewertet, wenn eine Bande dieselbe elektrophoretische Mobilität wie die Positivkontrolle zeigte.

3.7.4 Sequenzierung von PCR-Produkten

Bei Proben, die bei der Auswertung mittels Agarosegelelektrophorese positiv oder zweifelhaft reagiert hatten, wurde das fragliche Amplikon einer anschließenden Sequenzierung im ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer (Fa. Applied Biosystems) unterzogen, um seine Identität zu prüfen. Alle durch die Vorwärtsprimer LeptoF bzw. LP1 und die durch die Rückwärtsprimer LeptoR bzw. LP2 erhaltenen Amplikons wurden sequenziert. Bei Proben, bei denen für beide Primerpaare Ergebnisse vorlagen, wurden die Ergebnisse anschließend verglichen. Der Nachweis von leptospiraler DNS galt als erbracht, wenn der Vorwärts- oder der Rückwärtsprimer oder beide als Sequenzierungsergebnis Leptospiren-DNS ergab.

Tabelle 8:
Verwendete Oligodesoxyribonucleotide.

Primer	Sequenz (5' → 3')	Organismus	Gen / Region	Referenz
LeptoF	CCCGCGTCCGATTAG	<i>L. spp.</i>	<i>rrs</i> (16S-RNS-Gen)	Smythe <i>et al.</i> (2002)
LeptoR	TCCATTGTGGCCG(AG)ACAC	<i>L. spp.</i>	<i>rrs</i> (16S-RNS-Gen)	Smythe <i>et al.</i> (2002)
LP1	ATACAACCTTAGGAAGGCAT	<i>L. spp.</i>	LA3521 LIC10673	Kee <i>et al.</i> (1994)
LP2	GCTTCITTTGATATAGATCAA	<i>L. spp.</i>	LA2521 LIC10673	Kee <i>et al.</i> (1994)

L. = Leptospira

3.7.4.1 Aufreinigung der Amplifikate

Die Amplifikationsprodukte wurden zunächst mit Hilfe des QIAquick® PCR Purification Kits (Fa. Qiagen) aufgereinigt. 150 µl PB-Puffer, der eine hohe Salzkonzentration sowie einen pH-Wert von $\leq 7,5$ aufwies, wurden mit 30 µl des PCR-Reaktionsansatzes gemischt, auf die Säule gegeben und für 1 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Dabei erfolgte die Adsorption der DNA-Fragmente an die Silica-Gel-Matrix der Säulen. Der Durchfluss wurde verworfen. Der sich anschließende Waschschrift wurde mit 750 µl PE-Puffer (1:5 mit Ethanol verdünnt, Endvolumen 500 ml) durchgeführt, um Verunreinigungen wie Salze, Enzym, ungebundene Primer und freie Nukleotide, die nicht an die Silica-Matrix gebunden haben, zu eliminieren. Nach zweimaliger Zentrifugation für jeweils 1 min bei 16.000 x g wurde der Durchfluss erneut verworfen, und die Silica-Gel-Matrix für ca. 10 min im Hybridisierungssofen bei 56 °C getrocknet, um den restlichen Alkohol zu entfernen, da er nachfolgende enzymatische Reaktionen beeinträchtigt. Die Elution lief unter basischen Bedingungen (pH 7,0-8,5) und geringer Salzkonzentration ab. Dazu wurden 100 µl Elutionspuffer (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) auf die Säule gegeben und diese dann nochmals bei 16.000 x g für 1 min zentrifugiert. Das Eluat wurde für die Sequenzierungsreaktion weiterverwandt.

3.7.4.2 Sequenzierungsreaktion

Die Sequenzierung erfolgte nach dem „Cycle Sequencing“-Prinzip unter Verwendung des ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Fa. Applied Biosystems). Sie wurde mit dem Big Dye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit von Applied Biosystems durchgeführt, der sich aus dem Stoffel-Fragment der *Ampli Taq* (diese besitzt keine 5'→3'-Exonukleaseaktivität), den Big Dye Terminatoren, den dNTP's mit dITP anstatt dGTP und dUTP anstatt dTTP, der *rTth*-Pyrophosphatase, MgCl₂ und Puffer zusammensetzt. Sie dient dazu, das Amplifikat zu vermehren und gleichzeitig die Abbruchbasen für die Sequenzierung einzubauen. Der 20 µl Ansatz für die Sequenzreaktion beinhaltete folgende Komponenten: 0,5 x Big Dye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, 0,5 x BigDye Sequencing Buffer, 0,5 µM Primer LeptoF bzw. LeptoR, 2 µl des Produkts der vorangegangenen Aufreinigung. Folgendes Temperaturprofil kam zum Einsatz: Denaturierung für 10 sec bei 96 °C, 5 sec Annealing bei 60 °C, Elongation bei 60 °C für 4 min, dann erneute Denaturierung. An 25 solcher Zyklen schloss sich die Extension bei 4 °C an. Zur Verringerung der Hintergrundfluoreszenz wurden die Ansätze der Sequenzierungsreaktion im Anschluss mit 2 µl einer 2,2 %igen SDS-Lösung (w/v) versetzt, für 3 min bei 94 °C denaturiert und

anschließend auf Eis gestellt. Die Behandlung mit SDS diente der Trennung von sogenannten „Dye blobs“, die durch das Aneinanderlagern ungebundener ddNTP's entstehen können. Im nächsten Schritt wurden die Produkte der Sequenzreaktion mit Hilfe des DyeEx™ 2.0 Spin Kits (Qiagen) aufgereinigt. Dabei handelt es sich um eine Gelfiltration im Säulenformat, bei der die im Überschuss vorhandenen BigDye Terminatoren im Gel zurückgehalten werden, während sich DNS-Fragmente im Durchfluss befinden. Zur Vorbereitung des Gels wurden die fertigen Säulen jeweils gemischt (Vortex), um das Gelfiltrationsmaterial zu resuspendieren und anschließend für 3 min bei 7 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und das Sequenzreaktions-Produkt auf das Gel gegeben. Nach dem Zentrifugieren für 3 min bei 7 x g wurden 4 µl des Eluats, das die gereinigte DNA enthielt, mit 20 µl TSR (Template Suppression Reagent, Applied Biosystems) versetzt und anschließend in den ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer eingesetzt.

3.8 Umfrage zum Vorkommen von Leptospiren in zoologischen Gärten

Zu Beginn der Arbeit wurde ein Fragebogen an 28 zoologische Gärten in Deutschland, Österreich und der Schweiz verschickt. Damit sollte der Wissensstand um Vorkommen und Verbreitung von Leptospiren-Erkrankungen in Zootier-Beständen abgefragt und die Bereitschaft zur Mitarbeit ergründet werden. Die Zoos wurden aufgefordert, Angaben zum Auftreten von Leptospiren in Ihren Tierbeständen und zur Schadnager-Situation zu machen. Der Fragebogen ist in **Abbildung 3** wiedergegeben.

Name des Zoos / Ansprechpartner _____

Wo lassen Sie verstorbene Tiere pathologisch untersuchen?

Haben Sie dabei die Möglichkeit, speziell auf Leptospiren-Infektionen untersuchen zu lassen?

Ja Nein

Wurden Leptospiren-Infektionen in Ihrem Zoo nachgewiesen? Ja Nein

Welche Tierarten waren betroffen? _____

Liegen Sektionsprotokolle vor, bei denen eine Leptospirose vermutet wird?

Ja Nein

Gibt es in Ihrem Zoo Probleme mit Schädigern? Ja Nein

Wer führt in Ihrem Zoo die Schädigernbekämpfung durch?

Fremdfirma Pfleger Sonstige _____

Wurden Untersuchungen zum Erregerreservoir durchgeführt? Ja Nein

Sind Leptospiren-Erkrankungen beim Personal bekannt geworden?

Ja Nein

Wären Sie bereit, Schädigern (Ratten, Mäuse; tiefgefroren) aus Ihrem Zoo zur Verfügung zu stellen?

Ja Nein

Wären Sie bereit, Zootier-Seren zur Untersuchung zur Verfügung zu stellen?

Ja Nein

Abbildung 3:

Fragebogen zur Epidemiologie der Leptospirose in zoologischen Gärten

3.9 Datenhaltung und Auswertung

3.9.1 Bilddokumentation und Auswertung

Die Ergebnisse der Gelelektrophorese wurden nach der Auswertung durch das Geldokumentationssystem (LTF) mit dem Programm „BioCapt“ betrachtet und auf Fotopapier ausgedruckt. Einige Bilder wurden zusätzlich digitalisiert und im TIFF-Format gespeichert. Die Sequenz-Rohdaten wurden mit Hilfe des Software-Pakets DNA Sequencing Analysis Software™ Version 3.7 aufgearbeitet und analysiert. Zur Dokumentation wurden Elektropherogramme abgebildet. Diese Elektropherogramme wurden begutachtet und Sequenzen, wenn nötig manuell editiert. Danach wurden die gefundenen Sequenzen unter der Internet-Adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> auf der NCBI-homepage eingegeben und mit den Sequenzen der GenDatenbank GenBank (Stand Februar `04) in BLAST abgeglichen.

3.9.2 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung des Vergleichs der serologischen Ergebnisse aus den verschiedenen Zoos sowie des Vergleichs der Ergebnisse des Nachweises von *Leptospira*-DNS aus den Nieren verschiedener Tierarten erfolgte durch Anwendung des Chi²-Homogenitätstests. Die Unterschiede wurden als signifikant gewertet, wenn $p \leq 0,05$ betrug, oder als hoch signifikant, wenn $p \leq 0,01$ betrug, das heißt wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit bei höchstens 5 % bzw. höchstens 1 % lag. Das war gegeben, wenn der für Chi² ermittelte Wert den kritischen Wert auf dem 95 %igen bzw. 99 %igen Signifikanzniveau erreichte oder überschritt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Auswertung der Umfrage zum Vorkommen von Leptospiren in zoologischen Gärten

Um Anhaltspunkte für Infektionsrisiken durch Leptospiren in Zoos und Partner für die Einsendung von Probenmaterial zu gewinnen, wurde eine systematische Befragung an 28 Zoos im deutschsprachigen Raum durchgeführt. Dazu wurde ein einfacher Fragebogen entworfen (siehe **Abbildung 3**) und mit der Bitte um Antwort an die verschiedenen Zoos verschickt. Die Antworten wurden statistisch ausgewertet. Die Beteiligung der angeschriebenen Zoos an dieser Umfrage war hoch, denn 23 von 28 angeschriebenen Zoos antworteten (**Tabelle 9**). Auch signalisierten alle bis auf einen Zoo ihre Bereitschaft zur Zusammenarbeit, indem sie Serumproben oder Nagetiere zur Verfügung stellen wollten. Nicht alle hatten nach eigenen Angaben die Möglichkeit, speziell auf Leptospiren untersuchen zu lassen, so dass in den entsprechenden Einrichtungen natürlich auch ein Nachweis des Erregers nicht möglich war. Immerhin waren in acht (35 %) Zoos Leptospiren festgestellt worden. Sektionsprotokolle mit dem Verdacht einer Leptospiren-Infektion lagen bei vier (17 %) Zoos vor. In sechs Zoos waren darüber hinaus Untersuchungen zum Erregerreservoir durchgeführt worden. Betroffen von Leptospiren waren Primaten (Bart- und Berberaffe), Nagetiere (Wanderratte, Nutria, Biber und Wasserschwein), Raubtiere (Kodiakbär, Wolf) und Paarhufer (Pinseloherschwein, Halsbandpekari, Vicugna und Thar). Außer dem bereits im Literaturteil erwähnten Erkrankungsfall bei einem Tierpfleger in einem kleinen Zoo in der Nähe von Stuttgart wurden keine weiteren Fälle von Leptospirose beim Zoopersonal gemeldet. 20 (87 %) der zoologischen Gärten gaben an, Probleme mit Schadnagern zu haben. Mehr als die Hälfte der Institutionen (56,5 %) hatten Fremdfirmen beauftragt, die Bekämpfung durchzuführen. Lediglich 10 zoologische Gärten (43,5 %) ließen die Bekämpfung allein durch Tierpfleger ausführen.

Tabelle 9:

Ergebnisse der Umfrage über Leptospiren und Probleme mit wildlebenden Nagetieren in zoologischen Gärten in Deutschland, Österreich und der Schweiz

(von 28 angeschriebenen zoologischen Gärten beteiligten sich 23)

Frage	Anzahl der zoologischen Gärten		
	Ja	Nein	keine Angaben / unbekannt
Möglichkeit zur Untersuchung auf Leptospiren?	19	2	2
Sektionsprotokolle mit Leptospiren-Verdacht?	4	18	1
Leptospiren-Nachweise vorhanden?	8*	14	1
Probleme mit Schadnagern?	20	3	
Nagerbekämpfung allein durch Tierpfleger	13	10**	
Untersuchungen zum Erregerreservoir?	6	17	
Leptospiren-Erkrankungen beim Personal?	1	22	
Bereitschaft zur Zusammenarbeit			
bereit, Zootier-Seren zur Verfügung zu stellen?	22	1	
bereit, Nagetiere zur Verfügung zu stellen?	21	1	1

*Bartaffen, Berberaffen, Wanderratte, Nutria, Biber, Wasserschweine, Kodiakbär, Wölfe, Pinselohrschwein, Halsbandpekaris, Vicuñas, (Wiederkäuer), Thar

**statt dessen Nagerbekämpfung durch Fremdfirma

4.2 Artenspektrum und Häufigkeiten von wildlebenden Tieren in zoologischen Gärten

Um einen Einblick in das Spektrum der auf dem Gelände der untersuchten Zoos als mögliche Ausscheider von Leptospiren vorkommenden wildlebenden Tiere zu bekommen, wurden alle im Untersuchungszeitraum (01.01.02 bis 31.12.03) beobachteten, gefangenen oder tot aufgefundenen Wirbeltiere systematisch registriert (**Tabelle 10**). Dabei handelte es sich um drei Arten von Reptilien, diverse Vogelarten und 25 Arten von Säugetieren. Nierengewebsproben von 19 Säugetierarten (das entspricht 73 % der nachgewiesenen Arten) konnten in mindestens einem Individuum auf das Vorhandensein von Leptospiren-DNS getestet werden. Blutproben von 28 wildlebenden Säugetieren aus der Wilhelma, die zu sieben Arten gehören, wurden serologisch auf Antikörper gegen Leptospiren getestet, ebenso 61 Vögel aus vier Arten. Verschiedene Nagetiere wie Mäuse und Ratten waren sehr zahlreich und am häufigsten in unmittelbarer Nähe zu Tieren und Futtermitteln zu finden. Wühlmäuse wurden nur sehr vereinzelt festgestellt. In der Wilhelma tauchen fast alle Vertreter dieser Gruppe im Zusammenhang mit von außen gebrachtem Futter, Gras und Heu auf. Die beiden Arten der Echten Mäuse (*Muridae*) Gelbhalsmaus und Hausmaus waren die dominierenden Nagetiere der Wilhelma. So umfasste die Untersuchung 221 Gelbhalsmäuse und 285 Hausmäuse aus der Wilhelma, wohingegen Wanderratten nur sporadisch auftraten, und beginnende Ansiedlungen durch gezielte Bekämpfungen offenbar stets erfolgreich vereitelt wurden. Im gesamten Untersuchungszeitraum konnten lediglich 25 aus der Wilhelma stammende Ratten in die Untersuchung aufgenommen werden. Während des Untersuchungszeitraums scheint die Verbreitung der Gelbhals- und Hausmäuse innerhalb der einzelnen Reviere weitgehend konstant geblieben zu sein. Diese Situation unterschied sich offenbar von der in den anderen zoologischen Gärten und Tierparks, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurden. Dort war die Wanderratte ein vertrautes Bild und das am häufigsten festgestellte Nagetier. Während zwei Tagen konnten in einem dieser Zoos 34 Ratten erlegt werden, in einem anderen gelang der Fang von acht Exemplaren an einem Abend. Insgesamt wurden aus diesen Tierhaltungen 152 Wanderratten, aber nur 13 Haus- und eine Gelbhalsmaus untersucht. Erwähnenswert ist das starke Vorkommen von Feldhasen auf dem Zoogebiet der Wilhelma. Von 25 dieser Tiere konnten Nierengewebsproben und von zwei zusätzlich Serumproben untersucht werden.

Tabelle 10:

Auf dem Gelände zoologischer Gärten zwischen dem 01.01.2002 und dem 31.12.2003 festgestellte wildlebende Tiere

Klasse Ordnung Art	Anzahl der Tiere			
	Wilhelma		andere Zoos	
	beobachtet	beprob ¹	beobachtet	beprob ¹
Reptilien				
Blindschleiche	+	0	+	0
Waldeidechse	+	0	-	0
Ringelnatter	+	0	-	0
Vögel				
Schreitvögel	+	2	+	0
Entenvögel	+	2	+	0
Greifvögel	+	0	+	0
Rallenvögel	+	2	+	0
Watvögel	+	0	+	0
Tauben	+	54	+	0
Papageien	+	0	-	0
Eulen	+	0	-	0
Segler	+	0	+	0
Rakenvögel	+	0	-	0
Spechtvögel	+	0	+	0
Singvögel	+	7	+	0
Säugetiere				
Insektenfresser				
Maulwurf	+	0	+	0
Igel	+	3	+	0
Waldspitzmaus	+	0	+	1
Hausspitzmaus	+	1	-	0
Fledermäuse				
Großes Mausohr	+	0	-	0
Großer Abendsegler	+	3	-	0
Zweifarbfloderm Maus	+	3	-	0
Zwergfledermaus	+	7	-	0
Rauhhaufledermaus	+	1	-	0
Braunes Langohr	+	1	-	0
Nagetiere				
Gelbhalsmaus	+	221	+	1
Waldmaus	+	7	+	0
Wanderratte	+	25	+	152
Hausmaus	+	285	+	13
Feldmaus	+	2	+	0
Rötelmaus	+	1	-	0
Bisam	-	0	+	0
Nutria	-	0	+	10
Siebenschläfer	+	12	+	0
Eichhörnchen	+	4	+	0

Fortsetzung **Tabelle 10** auf der nächsten Seite

Fortsetzung **Tabelle 10:**

Klasse Ordnung	Anzahl der Tiere				
	Art	Wilhelma		andere Zoos	
		beobachtet	beprobt ¹	beobachtet	beprobt ¹
Raubtiere					
Fuchs	+	14	+	0	
Katze	+	0	+	0	
Steinmarder	+	2	+	0	
Hermelin	+	0	-	0	
Mauswiesel	+	0	-	0	
Hasenartige					
Feldhase	+	25	-	0	
Summe		684		177	

1 Serum- und/oder Nierengewebsproben von gefangenen oder tot aufgefundenen Tieren
+ Beobachtung
- keine Beobachtung

4.3 Nachweis von *Leptospira*-Infektionen bei Tieren in zoologischen Gärten

Um die Verbreitung von Leptospiren in Zoos zu bestimmen, wurden Zootiere, Futtertiere und wildlebende Tiere in Zoos serologisch mittels des Mikroagglutinationstests sowie Nierengewebsproben solcher Tiere mittels PCR auf *Leptospira*-DNS untersucht.

4.3.1 Indirekter Nachweis mittels Mikroagglutinationstest

4.3.1.1 Nachweis bei Zootieren

838 von Zootieren stammende Serum- und Plasmaproben wurden mittels des Mikroagglutinationstests auf Antikörper gegen zehn Leptospiren-Serovare getestet.

Relative Häufigkeit seropositiver Tiere in der Wilhelma und den übrigen Zoos

In allen untersuchten Zoos wurden Reagenten festgestellt. Es gab allerdings einen hochsignifikanten Unterschied hinsichtlich der Häufigkeit humoraler Reaktionen gegen Leptospiren-Antigen zwischen den Zootieren aus der Wilhelma und denen aus den anderen Tierhaltungen (**Tabellen 11 und 12**, $p < 0,01$). Während in der Wilhelma 10,7 % der untersuchten Zootiere einen Titer von $\geq 1:100$ gegen mindestens eines der 10 untersuchten Serovare aufwiesen, waren es in den anderen Tierhaltungen 25,0 % der Zootiere. Ein zweifelhafter Titer von 1:100 bis 1:200 war bei 6,5 % der Tiere aus der Wilhelma und bei 15,5 % der Tiere aus den anderen Tierhaltungen feststellbar, 4,1 % der Zootiere aus der Wilhelma bzw. 9,5 % der Tiere aus anderen Haltungen wiesen einen Titer von $\geq 1:400$ auf. Die höchsten Titer wurden bei drei Wasserschweinen und einem Halsbandpekari mit je 1:3200 für das Serovar Copenhageni gefunden.

Relative Häufigkeit humoraler Reaktionen innerhalb der untersuchten Tiergruppen

Der Anteil der Reagenten war in den untersuchten Tiergruppen unterschiedlich hoch. In der Wilhelma waren die Raubtiere mit 23,2 % und die Unpaarhufer mit 18,8 % am häufigsten seropositiv. Die Herrentiere zeigten mit 1 % Reagenten nur selten Antikörper gegen Leptospiren. 12,3 % der Nagetier- und 10,7 % der Paarhufer-Seren hatten einen Titer. Dabei waren innerhalb der Paarhufer die Schweine und Nabelschweine mit etwa einem Drittel der Tiere am stärksten betroffen. Die Verteilung der Seropositiven in den

anderen Zoos zeigte ein ähnliches Bild. Fünf der 17 untersuchten Reptilien und einer von 46 untersuchten Vögeln wiesen einen Antikörpertiter auf.

Tabelle 11:

Nachweis von Antikörpern gegen Leptospiren bei Zootieren in der Wilhelma mittels MAT

Klasse	Anzahl der Arten	Anzahl der Tiere	Reagenten		
			1:100 bis 1:200	≥ 1:400	insgesamt
Ordnung Familie					
Reptilien	6	17	5 (29,4 %)	0	5 (29,4 %)
Schildkröten	2	13	5 (38,5 %)	0	5 (38,5 %)
Krokodile	1	1	0	0	0
Echsen	1	1	0	0	0
Schlangen	2	2	0	0	0
Vögel	16	45	1 (2,2 %)	0	1 (2,2 %)
Straußenvögel	1	2	0	0	0
Pinguine	1	5	0	0	0
Schreitvögel	4	7	0	0	0
Flamingos	1	4	0	0	0
Entenvögel	3	4	0	0	0
Hühnervögel	3	11	1 (9 %)	0	1 (9 %)
Kranichvögel	2	2	0	0	0
Taubenvögel	1	10	0	0	0
Säugetiere	86	660	39 (5,9 %)	23 (3,5 %)	71 (10,7 %)
<i>Beuteltiere</i>	<i>1</i>	<i>11</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
Kängurus	1	11	0	0	0
<i>Placentalia</i>	<i>85</i>	<i>649</i>	<i>39 (6,0 %)</i>	<i>23 (3,5 %)</i>	<i>71 (10,9 %)</i>
Fledertiere	2	2	0	0	0
Flughunde	1	1	0	0	0
Neuweltblattnasen	1	1	0	0	0
Spitzhörnchen	1	1	0	0	0
Spitzhörnchen	1	1	0	0	0

Fortsetzung **Tabelle 11** auf der nächsten Seite

Fortsetzung **Tabelle 11**

Klasse	Anzahl der Arten	Anzahl der Tiere	Reagenten			
			1:100 bis 1:200	≥ 1:400	insgesamt	
Ordnung Familie						
Herrentiere	16	95	0	1 1	1 1	
Lemuren	1	1	0	0	0	-
Loris	1	2	0	0	0	-
Kapuzinerartige	3	8	0	1 (12,5 %)	1 (12,5 %)	
Meerkatzenartige	5	48	0	0	0	-
Schlankaffen	1	5	0	0	0	-
Kl. Menschenaff.*	1	1	0	0	0	-
Menschenaffen	4	30	0	0	0	-
Nagetiere	8	73	3 (4,1 %)	6 (8,2 %)	9 (12,3 %)	
Gerbile	1	12	1 (8,3 %)	0	1 (8,3 %)	
Echte Mäuse	1	11	0	0	0	
Stachelschweine	1	1	0	0	0	
Baumstachler	1	1	0	0	0	
Meerschweinchen	1	39	2 (5,1 %)	0	2 (5,1 %)	
Wasserschweine	1	5	0	5 (100 %)	5 (100 %)	
Agoutis	1	2	0	1 (50 %)	1 (50 %)	
Ferkelratten	1	2	0	0	0	
Raubtiere	18	43	8 (18,6 %)	2 (4,6 %)	10 (23,2 %)	
Hundartige	2	5	3 (60 %)	1 (20 %)	4 (80 %)	
Bären	4	10	3 (30 %)	1 (10 %)	4 (40 %)	
Schleichkatzen	2	2	0	0	0	
Katzen	8	20	2 (10 %)	0	2 (10 %)	
Ohrenrobber	1	5	0	0	0	
Hundsrobber	1	1	0	0	0	
Rüsseltiere	1	8	0	0	0	
Elefanten	1	8	0	0	0	
Schliefer	1	2	0	0	0	
Schliefer	1	2	0	0	0	

Fortsetzung **Tabelle 11** auf der nächsten Seite

Fortsetzung **Tabelle 11**

Klasse Ordnung Familie	Anzahl der Arten	Anzahl der Tiere	Reagenten		
			1:100 bis 1:200	≥ 1:400	insgesamt
Unpaarhufer	8	69	7 10,1	6 8,7	13 18,8
Pferdeartige	6	61	6 (9,8 %)	5 (8,2 %)	11 (18,0 %)
Tapire	2	3	1 (33,3 %)	0	1 (33,3 %)
Nashörner	1	5	0	1 (20 %)	1 (20 %)
Paarhufer	30	356	22 (6,2 %)	11 (3,1 %)	38 (10,7 %)
Schweine	3	18	4 (22,2 %)	1 (5,5 %)	5 (27,8 %)
Nabelschweine	1	32	4 (12,5 %)	8 (25 %)	12 (37,5 %)
Kamele	2	30	1 (3,3 %)	3 (10 %)	4 (13,3 %)
Hirsche	2	22	2 (9,1 %)	0	2 (9,1 %)
Giraffen	2	6	0	0	0
Hornträger	20	248	12 (4,8 %)	3 (1,2 %)	15 (6,0 %)
Summe	116	722	47 (6,5 %)	30 (4,1 %)	77 (10,7 %)

* Kleine Menschenaffen

Tabelle 12:

Nachweis von Antikörpern gegen Leptospiren bei Zootieren in anderen zoologischen Gärten (TP im Leintal, TP Göppingen, TP Pforzheim, TP Ulm, Schwabenpark, Nyphaea, Zoo Landau) mittels MAT

Klasse Ordnung Familie	Anzahl der Arten	Anzahl der Tiere	Reagenten		
			1:100 bis 1:200	≥ 1:400	insgesamt
Vögel	1	1	0	0	0
Straußenvögel	1	1	0	0	0
Säugetiere	14	115	18 (15,6 %)	11 (9,6 %)	29 (25,2 %)
<i>Beuteltiere</i>	1	3	1 (33,3 %)	0	1 (33,3 %)
Kängurus	1	3	1 (33,3 %)	0	1 (33,3 %)
<i>Placentalia</i>	13	112	17 (15,2 %)	11 (9,8 %)	28 (25,0 %)
Herrentiere	3	23	0	1 (4,3 %)	1 (4,3 %)
Meerkatzenartige	1	1	0	1	1
Kl. Menschenaff.*	1	2	0	0	0
Menschenaffen	1	20	0	0	0
Nagetiere	1	8	0	0	0
Meerschweinchen	1	8	0	0	0
Raubtiere	3	7	2 (28,6 %)	3 (42,8 %)	5 (71,4 %)
Bären	1	4	2 (50 %)	1 (25 %)	3 (75 %)
Katzen	2	3	0	2 (66,6 %)	2 (66,6 %)
Unpaarhufer	2	10	0	6 (60 %)	6 (60 %)
Pferde	2	10	0	6 (60 %)	6 (60 %)
Paarhufer	4	64	10 (23,4 %)	1 (1,6 %)	16 (25 %)
Kamele	1	9	0	0	0
Hirsche	2	3	1 (33,3 %)	0	1 (33,3 %)
Hornträger	1	52	14 (26,9 %)	1 (1,9 %)	15 (28,8 %)
Summe	15	116	18 (15,5 %)	11 (9,5 %)	29 (25,0 %)

*Kleine Menschenaffen

Geschlechtsabhängige Unterschiede der relativen Häufigkeit seropositiver Tiere

Es gab keinen signifikanten Unterschied in der Häufigkeit von Reagenten zwischen männlichen und weiblichen Tiere (**Tabelle 13**). Von den 860 Tieren, bei denen das Geschlecht bekannt war, waren 323 männlich und 537 weiblich. 12,1 % der männlichen und 13,4 % der weiblichen Tiere waren seropositiv.

Zeitliche Verteilung der relativen Häufigkeit seropositiver Tiere in der Wilhelma

Der Anteil serologisch positiver Befunde schwankte im Laufe der Jahre im Untersuchungszeitraum ohne erkennbare Tendenz zwischen 7,6 % und 15 % (**Tabelle 14**).

Tabelle 13:

Häufigkeit von Antikörpern gegen Leptospiren nach dem Geschlecht der Tiere

Geschlecht	getestet	Anzahl der Tiere		
		Antikörper-Titer		
		zweifelhaft (1:100 bis 1:200)	positiv ≥ 1:400	insgesamt ≥ 1:100
männlich	323	25 (7,7 %)	22 (6,8 %)	39 (12,1 %)
weiblich	537	43 (8,0 %)	29 (5,4 %)	72 (13,4 %)
gesamt	860	68 (7,9 %)	51 (5,9 %)	111 (12,9 %)

Tabelle 14:

Häufigkeit von Antikörpern gegen Leptospiren in der Wilhelma nach dem Zeitpunkt der Beprobung

Jahre	getestet	Anzahl der Tiere		
		Antikörper-Titer		
		zweifelhaft (1:100 bis 1:200)	positiv ≥ 1:400	insgesamt ≥ 1:100
1996 - 1997	112	8 (7,1 %)	4 (3,6 %)	12 (10,7 %)
1998 - 1999	93	3 (3,2 %)	5 (5,4 %)	8 (8,6 %)
2000 - 2001	114	5 (4,4 %)	11 (9,6 %)	16 (14,0 %)
2002	263	18 (6,8 %)	2 (0,8 %)	20 (7,6 %)
2003	140	13 (9,3 %)	8 (5,7 %)	21 (15,0 %)
Summe	722	47 (6,5 %)	30 (4,1 %)	77 (10,7 %)

Serovarspezifität der nachgewiesenen Antikörper

Das Serovar, gegen das am häufigsten Antikörper festgestellt werden konnten, war in allen Tierhaltungen Copenhageni. Dieses Serovar stellte 63,8 % der serologischen Leptospiren-Nachweise in der Wilhelma und 31,8 % in den anderen Tierhaltungen. In der Wilhelma stimmten alle Säugetierordnungen darin überein, dass sie am häufigsten einen Titer gegen dieses Serovar zeigten. Eine Ausnahme bildeten einzig die Paarhufer. Bei ihnen waren die humoralen Reaktionen gegen Autumnalis etwa doppelt so häufig wie gegen Copenhageni. In der Häufigkeit folgten auf Copenhageni in der Wilhelma Sejroe mit einem Anteil von 8,5 % und Autumnalis mit 7,4 % aller Seropositiven. Canicola und Grippotyphosa brachten es auf je 5,1 %, Saxkoebing auf 4,2 %, während Australis mit 2,1 % und Pomona, Hardjo und Tarassovi mit je 1,1 % der serologischen Reaktionen beteiligt waren. In den anderen Tierhaltungen war Autumnalis mit 29,5 % zweithäufigstes Serovar, gefolgt von Australis, Grippotyphosa, und Saxkoebing mit je 6,8 %, Hardjo, Sejroe und Tarassovi mit je 4,5 % und Canicola sowie Pomona mit je 2,3 % der serologischen Reaktionen. Die Hälfte der Serumproben mit Antikörpern gegen Serovare aus der Serogruppe Sejroe (Hardjo, Saxkoebing und Sejroe) stammten von Paarhufern (exklusive Schweine). Obwohl Antikörper gegen das Serovar Canicola bei Tieren der Wilhelma (n = 3 Nagetiere und 2 Paarhufer) und in anderen zoologischen Gärten (n = 1 Unpaarhufer) vorkamen, waren solche Antikörper bei den Raubtieren nicht nachweisbar. Während die positiven Reagenten unter den Unpaarhufern der Wilhelma zu 81 % gegen das Serovar Copenhageni reagierten und daneben bei dieser Säugetierordnung lediglich einzelne Reaktionen gegen die Serovare Autumnalis, Grippotyphosa und Saxkoebing vorlagen, waren bei den Unpaarhufern in den anderen Tierhaltungen Antikörper gegen alle 10 untersuchten Serovare vorhanden. Allerdings waren Reaktionen gegen das Serovar Copenhageni auch hier am häufigsten (23,5 % der seropositiven Unpaarhufer), gefolgt von Reaktionen gegen Australis und Autumnalis (je 11,8 %). Bei den Paarhufern in den anderen zoologischen Gärten reagierte ca. ein Viertel der Seropositiven gegen die verwendeten Serovare der Gruppe Sejroe (**Tabellen 15 und 16**). 88 der untersuchten Serum- bzw. Plasmaproben (83 % der 106 positiven Proben) enthielten Antikörper gegen nur ein Serovar, bei acht Proben (7,5 %) wurden Reaktionen gegen zwei Serovare, bei sieben (6,6 %) gegen drei, bei zwei (1,9 %) gegen vier und in einem Fall (0,9 %) gegen sieben Serovare festgestellt. Zur Verteilung dieser Mehrfachreaktionen siehe **Tabelle 17**.

Tabelle 15:
Verteilung der Zootiere in der Wilhelma nach der Reaktivität mit *Leptospira*-Serovaren im MAT

Serovar	Anzahl der Reagenten										Insgesamt
	Reptilien		Vögel		Säugetiere						
	Schildkröten	Hörnervögel	Herrentiere	Netetiere	Raubtiere	Unpaarhufer	Paarhufer				
	(n = 5)	(n = 1)	(n = 1)	(n = 9)	(n = 10)	(n = 13)	Schweine (n = 17)	Andere (n = 21)			
Australis		1 (100 %)		1 (5,9 %)						2 (2,1 %)	
Autumnalis				1 (5,9 %)	1 (9,1 %)	1 (6,2 %)	1 (5,3 %)	3 (11,3 %)		7 (7,4 %)	
Canicola				3 (17,6 %)				2 (7,7 %)		5 (5,1 %)	
Grippoty*				4 (23,5 %)	1 (6,2 %)					5 (5,1 %)	
Copenha**	4 (80 %)		1 (100 %)	6 (35,3 %)	8 (72,7 %)	13 (81,2 %)	17 (89,5 %)	13 (50,0 %)		60 (63,8 %)	
Pomona					1 (9,1 %)					1 (1,1 %)	
Hardjo								1 (3,8 %)		1 (1,1 %)	
Saxkoebing	1 (20 %)			1 (5,9 %)		1 (6,2 %)		1 (3,8 %)		4 (4,2 %)	
Sejroe				1 (5,9 %)	1 (9,1 %)			6 (23,1 %)		8 (8,5 %)	
Tarassovi							1 (5,3 %)			1 (1,1 %)	
Summe***	5	1	1	17	11	16	19	26		94	

* Grippityphosa, ** Copenhageni

***Reaktion einer Serumprobe mit mehreren Serovaren möglich

Tabelle 16:
Verteilung der Zootiere in anderen Zoos (TP im Leintal, TP Göppingen, TP Pforzheim, TP Schwabenpark, Nyphaea, Zoo Landau) nach der Reaktivität mit *Leptospira*-Serovaren im MAT

Serovar	Anzahl der Reagenten						Insgesamt
	Säugetiere						
	Beuteltiere (n = 1)	Herrentiere (n = 1)	Raubtiere (n = 5)	Unpaarhufer (n = 6)	Paarhufer (keine Schweine) (n = 16)		
Australis			1 (14,3 %)	2 (11,8 %)		3 (6,8 %)	
Autumnalis			1 (14,3 %)	2 (11,8 %)	10 (55,5 %)	13 (29,5 %)	
Canicola				1 (5,9 %)		1 (2,3 %)	
Grippotyphosa				3 (17,6 %)		3 (6,8 %)	
Copenhageni		1 (100 %)	5 (71,2 %)	4 (23,5 %)	4 (22,2 %)	14 (31,8 %)	
Pomona				1 (5,9 %)		1 (2,3 %)	
Hardjo				1 (5,9 %)	1 (5,5 %)	2 (4,5 %)	
Saxkoebing				1 (5,9 %)	2 (11,1 %)	3 (6,8 %)	
Sejroe	1 (100 %)			1 (5,9 %)		2 (4,5 %)	
Tarassovi				1 (5,9 %)	1 (5,5 %)	2 (4,5 %)	
Summe *	1	1	7	17	18	44	

* Reaktion einer Serumprobe mit mehreren Serovaren möglich

Tabelle 17:

Reaktionsmuster der Tiere, deren Serumproben im Mikroagglutinationstest mit mindestens einem *Leptospira*-Serovar positiv reagiert hatte

Reaktionsmuster	Anzahl der Seren
Australis	1
Autumnalis	12
Grippotyphosa	3
Copenhageni	61
Saxkoebing	3
Sejroe	7
Tarassovi	1
Autumnalis, Pomona	1
Autumnalis, Copenhageni	2
Canicola, Copenhageni	4
Copenhageni, Tarassovi	1
Australis, Autumnalis, Copenhageni	1
Australis, Canicola, Copenhageni	1
Australis, Hardjo, Saxkoebing	1
Canicola, Grippotyphosa, Copenhageni, Saxkoebing	2
Grippotyphosa, Copenhageni, Saxkoebing	1
Hardjo, Saxkoebing, Sejroe	1
Australis, Autumnalis, Copenhageni, Pomona	1
Australis, Grippotyphosa, Copenhageni, Sejroe	1
Australis, Grippotyphosa, Copenhageni, Hardjo, Saxkoebing, Sejroe, Tarassovi	1

Titerverläufe

Von insgesamt sechs Tieren lagen mehrere Serumproben für die Untersuchung auf Antikörper gegen *Leptospira* vor. Bei einigen dieser Tiere schwankten die Titer erheblich. So sank der Titer (Copenhageni) beim Grevyzebra „Liane“ innerhalb von 16 Monaten von 1:1600 auf 1:200 und war 2,5 Jahre später gar nicht mehr nachweisbar. Auch beim Grevyzebra „Lisa“ sank ein Titer von 1:800 für Copenhageni innerhalb eines Jahres unter die Nachweisgrenze. Das Limpurger Rind „MIA“ wies am 14.03.03 einen Titer von 1:400 gegen Saxkoebing auf, sieben Monate später konnte bereits kein Titer mehr festgestellt werden. Andererseits blieb der Titer (Copenhageni) bei der Mähnenwölfin „Dolly“ über einen längeren Zeitraum nahezu unverändert: 1996 lag ihr Titer bei 1:200, bei weiteren Proben ein und zwei Jahre später bei jeweils 1:100. Eisbär „Hallensia“ hatte 2000 einen Titer gegen Copenhageni in Höhe von 1:400, zwei Jahre später lag er bei 1:200 (**Tabelle 18**).

Tabelle 18:

Nachweis von Antikörpern gegen Leptospiren mittels MAT bei mehrfach untersuchten Zootieren in der Wilhelma

Tier	Datum der Blutentnahme	Titer	serologisch erkannte Serovar
Mähnenwolf	10.07.1996	1:200	Copenhageni
DOLLY	24.06.1997	1:100	Copenhageni
	23.07.1998	1:100	Copenhageni
Eisbär	15.12.2000	1:400	Copenhageni
HALLENSIA	18.11.2002	1:200	Copenhageni
Grantzebra	30.05.1996	< 1:100	alle Serovare
NIATI	26.07.1996	< 1:100	alle Serovare
	13.10.1998	< 1:100	alle Serovare
	12.04.2002	< 1:100	alle Serovare
	30.04.2002	1:200	Copenhageni
Grevyzebra	30.07.1996	< 1:100	alle Serovare
LIANE	19.03.1998	1:1600	Copenhageni
	09.07.1999	1:200	Copenhageni
	24.01.2002	< 1:100	alle Serovare
	04.07.2003	< 1:100	alle Serovare
Grevyzebra	17.05.2002	1:800	Copenhageni
LISA	17.06.2003	< 1:100	alle Serovare
Limpurger Rind	14.03.2003	1:400	Saxkoebing
MIA	15.10.2003	< 1:100	alle Serovare

4.3.1.2 Nachweis bei Futtertieren

Alle untersuchten Serumproben, die von Futtertieren stammten, reagierten im MAT mit *Leptospira*-Antigenen stets negativ.

4.3.1.3 Nachweis bei wildlebenden Tieren und Haushunden

Bei keinem der 89 untersuchten wildlebenden Tiere aus der Wilhelma konnten Antikörper gegen *Leptospira* festgestellt werden. Bei zwei auf dem Betriebsgelände gehaltenen Haushunden wurden dagegen Antikörper nachgewiesen. Die Titer lagen für ein Tier bei je 1:400 für die Serovare Copenhageni und Canicola bzw. bei 1:200 für Canicola und bei 1:100 für Copenhageni. Nach Rücksprache mit dem Besitzer ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich dabei um Impftiter handelte, da die Tiere jährlich mit kommerziellen Impfstoffen gegen Leptospirose geimpft worden waren.

4.3.2 Direkter Nachweis mittels PCR

4.3.2.1 Evaluierung der verwendeten PCR-Tests

4.3.2.1.1 Reaktion der Primerpaare LP1 / LP2 und LeptoR / LeptoF mit DNS von Mäusen

Nierengewebsproben von zwei Haus- und zwei Gelbhalsmäusen wurden jeweils sowohl mit dem Primerpaar LP1 / LP2 als auch mit LeptoF / LeptoR in der PCR getestet. Das Primerpaar LP1/ LP2 (Kee *et al.* 1994) erwies sich für die Untersuchung von Organproben solcher Mäuse als nicht geeignet. Alle vier damit untersuchten Organproben erbrachten in der PCR ein Amplikon der für *Leptospira*-DNS erwarteten Größe. Die Sequenzierung der Amplikons ergab aber, dass es sich dabei um die Kopie eines Abschnittes im Genom der Maus handelte (Gen für das „cystin cilia-associated protein“ von *Mus musculus*). Damit war die Bindung dieses Primerpaares zu unspezifisch, um sie in der vorliegenden Arbeit verwenden zu können, zumal die Mehrzahl der untersuchten Nierengewebsproben von Mäusen stammten. Aus dieser Erfahrung wurden alle anderen Nierengewebsproben in der Screening-PCR ausschließlich mit dem Primerpaar LeptoR / LeptoF getestet.

4.3.2.1.2 Nachweisgrenzen der Leptospiren-Screening-PCR

Die Nachweisgrenze der mit dem Primerpaar LeptoF/LeptoR durchgeführten PCR wurde durch Endpunkttitration ermittelt. Hierzu wurden Keimsuspensionen mit einer definierten Anzahl vermehrungsfähiger Leptospiren in Zehnerschritten verdünnt. Ein Aliquot jeder Verdünnungsstufe wurde entweder direkt in der PCR eingesetzt (Nachweisgrenze in wässriger Suspension) oder dem Nukleinsäureextrakt aus Nierengewebe oder der Nierengewebsprobe einer Maus zugemischt. Diese Probe wurde dann der PCR zugeführt bzw. im letztgenannten Fall dem Nukleinsäureextraktionsverfahren mit anschließender PCR-Untersuchung unterzogen. Als Nachweisgrenze wurde diejenige Keimzahl definiert, die bei Auswertung der PCR mittels Agarosegelelektrophorese noch eine deutlich sichtbare Bande von 87 bp erzeugte.

Nachweisgrenze für Leptospiren in wässriger Suspension

Von allen zehn in der Serologie verwendeten *Leptospira*-Referenzstämmen wurden log₁₀-Verdünnungsreihen mit 10⁰ bis 10⁷ Keimen pro ml Kultur angelegt. Die Verdünnungen wurden anschließend für 5 min aufgekocht, und 3 µl davon in der PCR mit den Primern LeptoR und LeptoF eingesetzt. Je nach Stamm ergaben sich verschiedene Nachweisgrenzen. So führten Keimzahlen ab 10⁵ Bakterien/ml (Serovar Autumnalis), ab 10³ Bakterien/ml (Canicola) bzw. ab 10⁴ Bakterien/ml (andere Serovare) zu positiven PCR-Resultaten. Dies entsprach einer Keimzahl von 3 Bakterien pro PCR-Ansatz (Canicola) bzw. 300 (Autumnalis) bzw. 30 (andere Serovare).

Nachweisgrenze für Leptospiren in wässriger Suspension mit einem Zusatz von Nukleinsäureextrakt aus murinem Nierengewebe

Von *Leptospira*-Referenzstamm ST9 (Serovar Sejroe) wurde eine log₁₀-Verdünnungsreihe mit 10⁰ bis 10⁷ Keimen pro ml Suspension angelegt. Die Verdünnungen wurden anschließend für 10 min aufgekocht; 10 µl dieser Verdünnungen wurden mit jeweils 2 µl von Nukleinsäureextrakten versetzt, die mittels Silica-Matrix aus dem Nierengewebe von zwei Hausmäusen (*Mus musculus*) und zwei Gelbhalsmäusen (*Apodemus flavicollis*) gewonnen worden waren. Von den mit Nukleinsäureextrakt versetzten Suspensionen wurde jeweils eine 3 µl-Stichprobe in der LeptoR/LeptoF-PCR eingesetzt. Die Nukleinsäureextrakte reagierten in der LeptoR/LeptoF-PCR selbst negativ. Die Ergebnisse sind in der **Abbildung 5** und in der **Tabelle 19** zusammengefasst. Die

minimale Anzahl von Leptospiren, die in diesem Test zu einem positiven Ergebnis führte, lag bei 25 Bakterien pro PCR-Ansatz.

Nachweisgrenze für Leptospiren in murinem Nierengewebe

Von *Leptospira*-Referenzstamm ST9 (Serovar Sejroe) wurde eine log₁₀-Verdünnungsreihe mit 10⁵ bis 10⁸ Keimen pro ml Suspension angelegt. Von diesen Verdünnungen wurden 100 µl (Verdünnung mit 10⁸ Keimen/ml) bzw. 10 µl (Verdünnung mit 10⁵ bis 10⁸ Keimen/ml) zu 50 mg Nierengewebsproben der obengenannten, zuvor negativ getesteten beiden Hausmäuse und beiden Gelbhalsmäuse (*Apodemus flavicollis*) zugegeben. Die derart versetzten Proben wurden einem Probenaufbereitungsverfahren unterzogen, das aus einem enzymatischen Gewebeaufschluss und der Nukleinsäureextraktion mittels Silica-Matrix bestand. Von diesen Extrakten wurden jeweils 3 µl in die LeptoR/LeptoF-PCR eingesetzt. Die Nukleinsäureextrakte aus Proben ohne vorherige Zumischung von Leptospiren reagierten in der LeptoR/LeptoF-PCR stets negativ. Die Ergebnisse sind in der **Abbildung 6** und in der **Tabelle 20** zusammengefasst. Die Untersuchung ergab für alle vier Nierengewebsproben einheitlich eine Nachweisgrenze von 6.000 Leptospiren pro PCR-Ansatz. Das bedeutete, dass mit der PCR nach Smythe *et al.* (2002) Leptospiren nachweisbar waren, wenn ihre Anzahl im Nierengewebe bei mindestens 2.000 Bakterien pro mg Gewebe lag.

Tabelle 19:

Bestimmung der Nachweisgrenze für *Leptospira-Sejroe* in wässriger Suspension unter Zusatz von Nukleinsäureextrakten aus dem Nierengewebe von Mäusen

Herkunft des Nukleinsäureextraktes	PCR-Ergebnis									
	Leptospirenanzahl pro ml Suspension									
	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	0*	
	Leptospirenanzahl pro PCR-Ansatz									
2,5 x										
10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	0		
Niere, Hausmaus 1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
Niere, Hausmaus 2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
Niere, Gelbhalsmaus 1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
Niere, Gelbhalsmaus 2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	

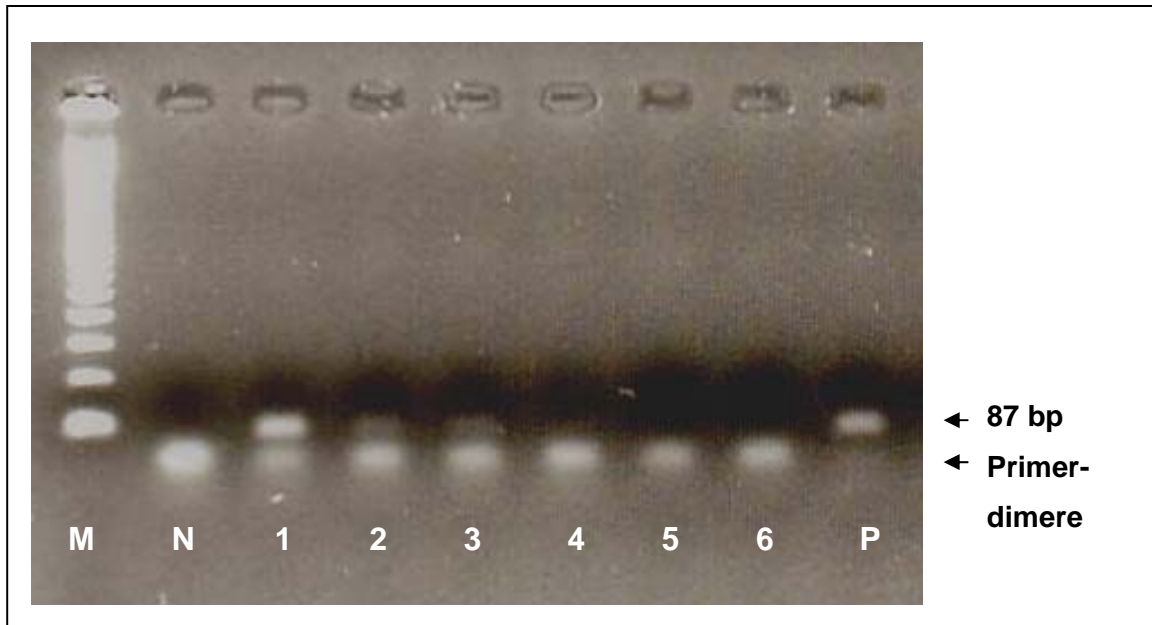
* Kontrolle (Nukleinsäureextrakte ohne Zumischung von *Leptospira*-DNS)

Tabelle 20:

Bestimmung der Nachweisgrenze für *Leptospira-Sejroe* in künstlich kontaminiertem Nierengewebe von Mäusen

Herkunft des Nierengewebes	PCR-Ergebnis						
	Leptospirenanzahl pro g Nierengewebe						
	2 x 10 ⁸	2 x 10 ⁷	2 x 10 ⁶	2 x 10 ⁵	2 x 10 ⁴	0*	
	Leptospirenanzahl pro PCR-Ansatz						
6 x							
10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	0		
Hausmaus 1	+	+	+	-	-	-	
Hausmaus 2	+	+	+	-	-	-	
Gelbhalsmaus 1	+	+	+	-	-	-	
Gelbhalsmaus 2	+	+	+	-	-	-	

* Kontrolle (Nukleinsäureextrakte aus Nierengewebe ohne Zumischung von *Leptospira*-DNS)

**Abbildung 4:**

Nachweisgrenze der Leptospiren-Screening-PCR für den *Leptospira-Canicola*-Stamm ST3 in wässriger Suspension. Elektropherogramm der Ethidiumbromid-gefärbten PCR-Produkte; für die PCR wurden jeweils 3 µl der Bakteriensuspensionen eingesetzt.

M: Marker / 100 Base-Pair Ladder

N: Negativkontrolle, H₂O

1: 10⁵ Bakterien / ml

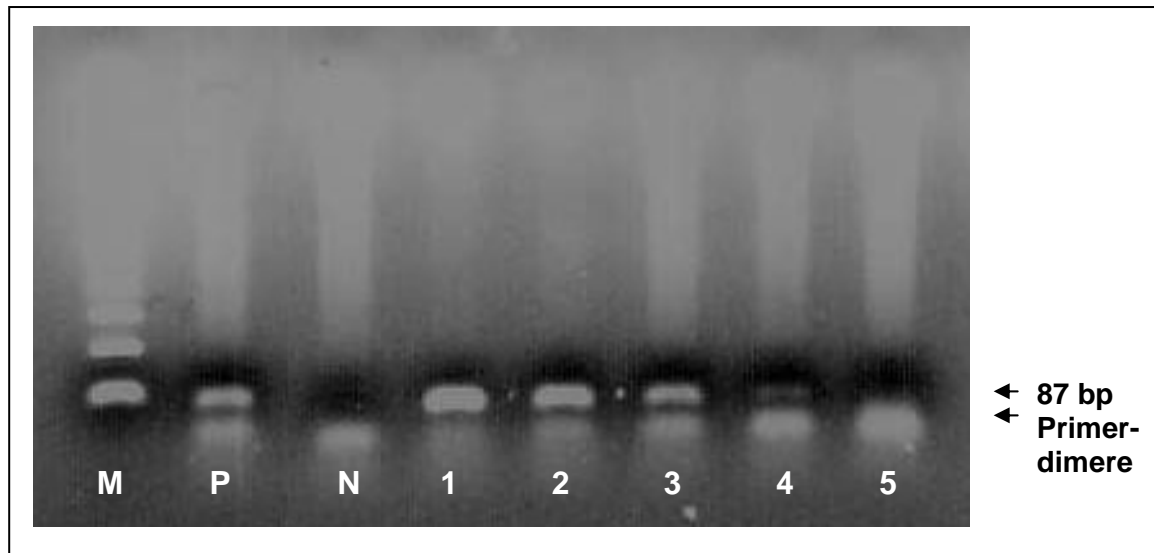
2: 10⁴ Bakterien / ml

3: 10³ Bakterien / ml

4: 10² Bakterien / ml

5: 10¹ Bakterien / ml

P: Positivkontrolle, Kultur des Stammes ST3 (Serovar Canicola; 10⁷ Bakterien / ml)

**Abbildung 5:**

Nachweisgrenze der Leptospiren-Screening-PCR für den *Leptospira*-Sejroe-Stamm ST9 im Nukleinsäureextrakt aus dem Nierengewebe einer Hausmaus (*Mus musculus*). Elektropherogramm der Ethidiumbromid-gefärbten PCR-Produkte; für die PCR wurden jeweils 3 μ l der Bakteriensuspensionen eingesetzt.

M: Marker / 100 Base-Pair Ladder

P: Positivkontrolle; Kultur des Stammes ST9 (Serovars Sejroe; 10^7 Bakterien / ml)

N: Negativkontrolle, H₂O

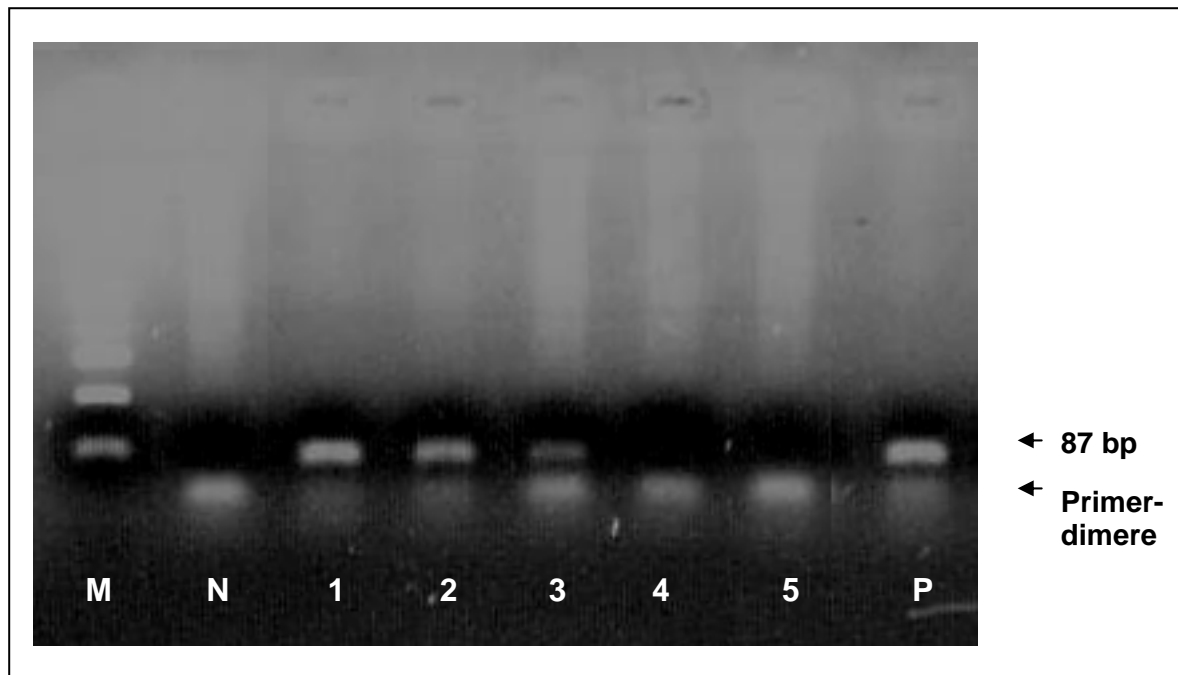
1: 10^7 Bakterien / ml

2: 10^6 Bakterien / ml

3: 10^5 Bakterien / ml

4: 10^4 Bakterien / ml

5: 10^3 Bakterien / ml

**Abbildung 6:**

Nachweisgrenze der Leptospiren-Screening-PCR für den *Leptospira*-Sejroe-Stamm ST9 in der Nierengewebsprobe einer Gelbhalsmaus (*Apodemus flavicollis*). Elektropherogramm der Ethidiumbromid-gefärbten PCR-Produkte; für die PCR wurden jeweils 3 µl des Nukleinsäureextraktes aus der Probe eingesetzt.

M: Marker / 100 Base-Pair Ladder

N: Negativkontrolle, Nukleinsäureextrakt aus Nierengewebe ohne Zumischung von *Leptospira*- DNS

1: 2×10^8 Bakterien / g Nierengewebe

2: 2×10^7 Bakterien / g Nierengewebe

3: 2×10^6 Bakterien / g Nierengewebe

4: 2×10^5 Bakterien / g Nierengewebe

5: 2×10^4 Bakterien / g Nierengewebe

P: Positivkontrolle; Kultur des Stammes ST9 (Serovar Sejroe; 10^7 Bakterien / ml)

4.3.2.2 Nachweis von Leptospiren-DNS in Nierengewebsproben von Wirbeltieren

Wildlebende Tiere im Zoo

861 Nierengewebsproben, die von auf dem Gelände der zoologischen Gärten wildlebenden Tieren stammten, wurden mit der LeptoR/LeptoF - PCR nach Smythe *et al.* (2002) auf *Leptospira*-DNS untersucht. Die Amplikons aller Proben, die bei der Auswertung der PCR mittels Agarosegelelektrophorese positiv oder fraglich reagiert hatten (siehe **Abbildung 7**), wurden im ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) sequenziert. Jedes Amplikon wurde doppelsträngig analysiert, wobei als Sequenzierprimer einmal LeptoF und einmal ReptoR eingesetzt wurde. Anschließend wurden die ermittelten Sequenzen mit dem Programm BLAST (NCBI-homepage <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) mit den Sequenzen der Gendatenbank GenBank abgeglichen, um ihre Identität zu prüfen.

Insgesamt reagierten 43 Proben in der PCR positiv oder fraglich. Durch die Sequenzierung des Amplikons konnte bei 29 dieser 43 Proben Leptospiren-DNS als Herkunft bestätigt werden. Hier waren folgende *Leptospira*-Arten stets mit gleicher Wahrscheinlichkeit der Ursprung der sequenzierten DNS: *L. interrogans*, *L. weilii*, *L. santarosai*, *L. meyeri*, *L. genomospezies 2*, *L. borgpetersenii* und *L. kirschneri*. Für mehrere Proben wurden zusätzlich noch mit gleicher Wahrscheinlichkeit *L. noguchii*, *L. fainei* sowie einmal *L. indai* angegeben. Bei 14 Amplikons handelte es sich laut der Sequenzierung um DNS anderen Ursprungs. Unter den jeweils fünf wahrscheinlichsten Ursprungsarten waren *Homo sapiens* (n = 17), *Mus musculus* (n = 13), *Clostridium spec.* (n = 10) sowie 22 weitere Viren, Bakterien, Pilze, Pflanzen oder Tiere. Bei zwei dieser falsch positiven Proben war das Ergebnis der PCR positiv gewesen, 12 dieser 14 Proben hatten in der PCR ein zweifelhaftes Ergebnis gezeigt, indem sie in der Agarosegelelektrophorese entweder mehrere Banden oder eine sehr schwache Bande im fraglichen Größenbereich von 87 bp ergaben (**Abbildung 7**). Bei den positiven Proben handelte es sich um Nierengewebe von einem Igel, einer Zwergfledermaus, zwei Gelbhalsmäusen, sechzehn Wanderratten und neun Hausmäusen (**Tabelle 22**). Amplikons dieser Proben besaßen nach dem Resultat wenigstens einer der beiden Sequenzierungen eine signifikante Homologie zu *Leptospira*-DNS (**Tabelle 21**). Dabei bestand ein hoch signifikanter Unterschied hinsichtlich der Nachweishäufigkeit von Leptospiren-DNS zwischen der Wilhelma und den anderen untersuchten zoologischen Gärten bzw. Tierparks. Während Leptospiren-DNS in der Wilhelma nur bei 1,9 % der untersuchten wildlebenden Tiere nachgewiesen wurde, gelang dies bei 9,0 % der

wildlebenden Tiere aus anderen Zoos. Dieser Unterschied kam vor allem durch die verschieden hohe Anzahl der untersuchten Vertreter der einzelnen Tierarten zustande. In Nierengewebsproben der in der Wilhelma dominierenden Arten Gelbhalsmaus und Hausmaus wurde zu 0,9 % bzw. 3,0 % Leptospiren-DNS gefunden, wogegen 9,0 % der untersuchten Wanderratten, die in den anderen zoologischen Gärten überwogen, positive PCR-Ergebnisse erzielten (**Tabelle 22**).

Vergleich der jeweils mittels Vorwärts- und Rückwärtsprimer erzielten Sequenzierungsergebnisse

Die Sequenzierung derjenigen Amplikons, die zuvor in der Agargelelektrophorese positiv oder fraglich reagiert hatten, erfolgte jeweils mit dem Vorwärts- und dem Rückwärtsprimer (LeptoF, LeptoR) getrennt. Bei Proben, die im Elektropherogramm lediglich eine Bande bei 87 bp gezeigt hatten, wurden je 2 µl des PCR-Reaktionsansatzes eingesetzt. Bei Proben, deren Auswertung im Elektropherogramm mehrere Banden ergeben hatte, wurde die bei 87 bp liegende Bande zunächst unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert, bevor sie in die Sequenzierreaktion eingesetzt wurde. Bei keiner der untersuchten Proben ergaben die beiden Sequenzierungen mit dem Vorwärts- und dem Rückwärtsprimer identische Ergebnisse. Der Nachweis leptospiraler DNS gelang bei 22 Proben mit dem Vorwärtsprimer LeptoF und bei sieben Proben mit dem Rückwärtsprimer LeptoR. Wegen fehlender signifikanter Übereinstimmung mit den Daten der Gendatenbank waren fünf Proben mit LeptoF und 26 Proben mit LeptoR nicht auswertbar. Für alle untersuchten Proben ergab sich aber mit mindestens einem der beiden Primer eine auswertbare Nukleotidsequenz (siehe **Tabelle 21**).

Futter- und Zootiere

Stichprobenhaft wurden Nierengewebsproben von Tieren, die zur Futtergewinnung dienten, in der PCR auf *Leptospira*-DNS untersucht. Ebenso wurden auch Zootiere, die im Zeitraum zwischen Januar 2002 und Dezember 2003 verstarben, untersucht. Im Untersuchungsmaterial befanden sich ausschließlich Futtertiere, die in der Wilhelma verfüttert wurden. Bei keinem der 123 Tiere, die zur Futtergewinnung geschlachtet wurden, konnte Leptospiren-DNS in den Nierengewebsproben nachgewiesen werden. Auch bei den 63 Nierengewebsproben von Zootieren aus der Wilhelma und den 12 Nierengewebsproben von Zootieren aus den anderen Tierhaltungen wurde in keinem Fall ein positives PCR-Ergebnis ermittelt.

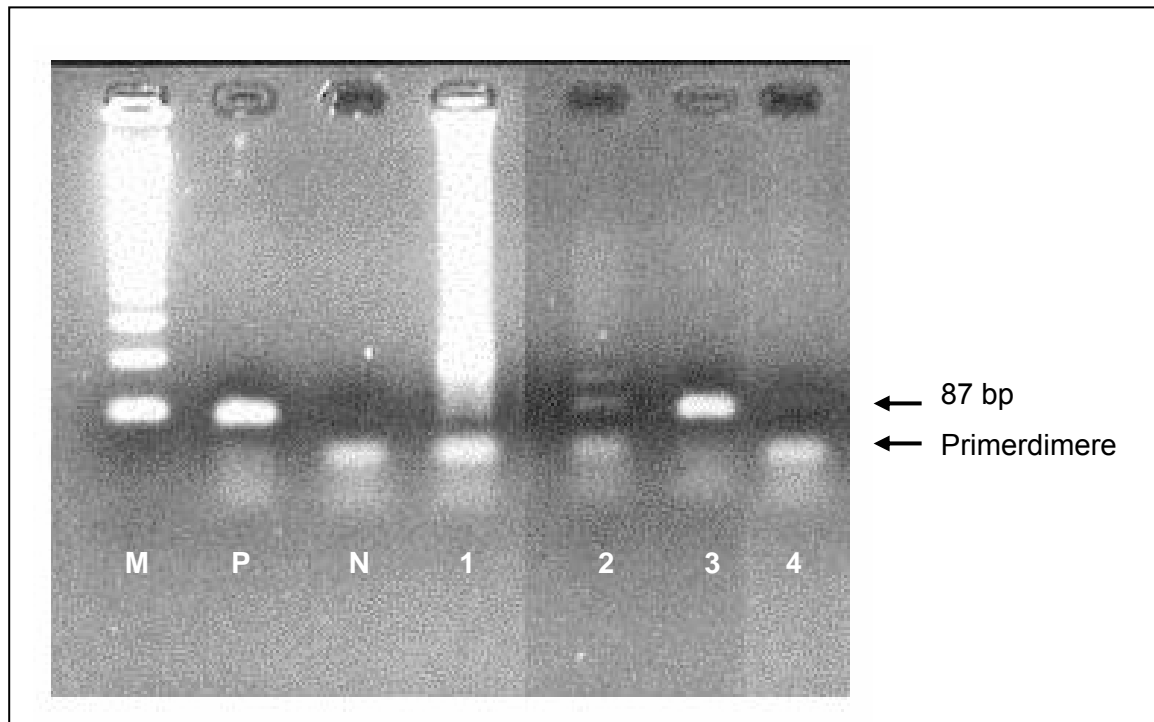
Tabelle 21:

Vergleich der Primer LeptoF und LeptoR hinsichtlich des mit ihnen ermittelten Sequenzierungsergebnisses für PCR-Produkte der Leptospiren-Screening-PCR

Sequenzier- Primer	Anzahl der Nierengewebsproben			untersucht*
	Sequenzhomologie des PCR-Produkts			
	<i>Leptospira</i> spp.	andere Spezies	nicht auswertbar**	
LeptoF	22	16	5	43
LeptoR	7	10	26	43
Summe	29	26		43

* = alle Proben mit positivem oder zweifelhaften PCR- Ergebnis

** = Homologie mit Nukleotidsequenzen der Gendatenbank GenBank < 70 %

**Abbildung 7:**

Beispiele für positive, negative und fragliche Ergebnisse der Leptospiren-Screening-PCR bei der Untersuchung von Nierengewebsproben von Wildtieren. Elektropherogramm der Ethidiumbromid-gefärbten PCR-Produkte.

M = Marker / 100 Base-Pair Ladder

P = Positivkontrolle, Kultur des Stammes ST9 (Serovar Sejroe; 10^7 Bakterien / ml)

N = Negativkontrolle, H₂O

1 = fragliche Probe

2 = fragliche Probe, mehrere Banden

3 = positive Probe

4 = negative Probe

Tabelle 22:
Nachweis von Leptospiren-DNS mittels PCR bei Wildtieren in zoologischen Gärten

Art	Anzahl der Tiere					
	Wilhelma		andere Zoos/Tierparks*		insgesamt	
	untersucht	positiv	untersucht	positiv	untersucht	positiv
Vögel	67	0	0	0	67	0
Säugetiere						
<i>Insektenfresser</i>	4	1 (25 %)	1	0	5	1 (20 %)
<i>Fledermäuse</i>	15	1 (6,7 %)	0	0	15	1 (6,7 %)
<i>Nagetiere</i>	559	11 (2,0 %)	176	16 (9,6 %)	735	27 (3,57%)
Feldmaus	2	0	0	0	2	0
Rötelmaus	1	0	0	0	1	0
Wühlmaus**	2	0	0	0	2	0
Gelbhalsmaus	221	1 (0,4 %)	1	1 (100 %)	222	2 (0,9 %)
Waldmaus	7	0	0	0	7	0
Wanderratte	25	1 (4 %)	152	15 (9,7 %)	177	16 (9,0 %)
Hausmaus	285	9 (3,2 %)	13	0	298	9 (3,0 %)
Nutria	0	-	10	0	10	0
Siebenschläfer	12	0	0	0	12	0
Eichhörnchen	4	0	0	0	4	0
<i>Hasenartige</i>	25	0	0	0	25	0
<i>Raubtiere</i>	14	0	0	0	14	0
Summe	684	13 (2,1 %)	177	16 (9,0 %)	861	29 (3,4 %)

* Naturzoo Rheine, Nyphaea, Esslingen, Schwabenpark, Welzheim, Tierpark Göppingen, Tierpark im Leintal, Zoo Landau/Pfalz

***Microtus* spp.

4.3.3 Direkter Nachweis mittels Anzuchtung

Bei allen 29 Nierengewebsproben, die in der PCR positiv reagiert hatten, wurde eine Anzuchtung der Leptospiren in Spezialmedium versucht. Pro Testdurchgang wurde als Negativkontrolle auch je ein Anzüchtungsversuch mit einer negativ getesteten Nierengewebsprobe unternommen. Leptospiren konnten trotz einer Bebrütungsdauer von 75 Tagen aus keiner einzigen Probe angezüchtet werden. Fast alle Proben waren aber mit anderen Bakterien kontaminiert. Bei 24 Proben wurde schon nach einer Woche starkes Wachstum grampositiver Kokken festgestellt – sowohl bei einer Hemmstoffkonzentration von 100 µg/ml als auch bei 200 µg/ml 5-Fluorouracil. Die Kokken konnten durch Filtration mittels Sterilfilter für Spritzen (FP 30/0,45 CA-S; Fa Schleicher und Schuell) entfernt werden, wobei die Filtration bei mehreren Proben in wöchentlichem Abstand mehrmals wiederholt werden musste, bis kein erneutes Wachstum der Kokken auftrat. In sieben Proben (bis auf eine bei 100 µg/ml Hemmstoffkonzentration) wurde nach der Elimination der Kokken Wachstum gramnegativer Stäbchen beobachtet, die auch durch wiederholte Filtration nicht beherrscht werden konnten. Bei vier Proben wurde Wachstum gramnegativer Stäbchen ohne vorheriges Kokkenwachstum beobachtet. Nur bei einer Probe war über den gesamten Bebrütungszeitraum überhaupt kein Bakterienwachstum nachweisbar.

4.3.4 Korrelation zwischen den mittels PCR und MAT erhobenen Befunden

82 wildlebende Tiere sowie 54 Zootiere waren sowohl serologisch als auch mittels PCR auf *Leptospira*-Infektionen untersucht worden. Die Ergebnisse dieser Tiere sind in der **Tabelle 23** gegenübergestellt. Obwohl 14 Tiere serologisch positiv reagierten, fünf Tiere sogar mit Titern $\geq 1:800$, war *Leptospira*-DNS in Nierengewebsproben von keinem dieser Tiere nachweisbar.

Tabelle 23:

Gegenüberstellung der Ergebnisse aus MAT und PCR bei Tieren, bei denen beide Tests durchgeführt wurden

Art	Anzahl der Tiere getestet	Ergebnis der Serologie**	Anzahl der in der PCR positiven Tiere
Wildtiere	82		
Zweifarbflodermis	1	negativ	0
Rabenkrähe	2	negativ	0
Haustaube	55	negativ	0
Gelbhalsmaus	2	negativ	0
Waldmaus	1	negativ	0
Wanderratte	1	negativ	0
Hausmaus	18	negativ	0
Feldhase	2	negativ	0
Zootiere	54		
Australienkrokodil	1	negativ	0
Nilflughund	1	negativ	0
Brillenblattnase	1	negativ	0
Mandrill	1	Copenh. 1:800	0
Orang-Utan	1	negativ	0
Schimpanse	2	negativ	0
Wüstenrennmaus	11	negativ	0
Wüstenrennmaus	1	Saxkoeb. 1:200	0
Greifstachler	1	negativ	0
Mara	1	negativ	0
Wasserschwein	1	negativ	0
Bergpaka	1	negativ	0
Kuba-Baumratte	1	negativ	0
Braunbär	1	Austr. 1:800, Autumn. 1: 200, Copenh. 1:1600	0
Braunbär	1	Copenh. 1:200	0
Zeboramanguste	1	negativ	
Erdmännchen	1	negativ	
Gepard	1	negativ	0
Löwe	1	negativ	0
Löwe	1	Copenh. 1:400	0
Tiger	1	Copenh. 1:800	0
Schneeleopard	1	negativ	0
Kalifornischer Seelöwe	1	negativ	0
Schabrackentapir	1	Copenh. 1:100	0
Hirscheber	1	Copenh. 1:100, Taras. 1:100	0
Wildschwein	2	negativ	0
Halsbandpekari	6	negativ	0
Halsbandpekari	1	Copenh. 1:100	0
Halsbandpekari	1	Copenh. 1:200	0
Halsbandpekari	3	Copenh. 1:800	0
Halsbandpekari	1	Copenh. 1:1600	0
Mähnspringer	1	negativ	0
Blauducker	1	negativ	0
Schneeziege	2	negativ	0

*Individuen, für die sowohl ein PCR- als auch ein serologisches Ergebnis vorliegt

**negativ = Titer für alle untersuchten Serovare unter 1: 100

4.3.5 Räumliche Verteilung der PCR- oder seropositiven Tiere auf dem Gelände der Wilhelma

Um mögliche Gefahrenquellen bzw. Areale mit erhöhtem Infektionsrisiko ausmachen zu können, wurde die Wilhelma gemäß bestehender Reviere in fünf Bereiche unterteilt. In diesen Bereichen wurden die Häufigkeiten an PCR-positiven wildlebenden Tieren und seropositiven Zootieren miteinander verglichen. Die Nachweise PCR-positiver wildlebender Tiere verteilten sich gleichmäßig über das Gelände der Wilhelma, ohne dass Schwerpunkte ausgemacht werden konnten. Dagegen gab es regionale Häufigkeitsunterschiede seropositiver Zootiere. Im Bereich Bärenanlage / Südamerikaanlage war mit 19,5 % der untersuchten Zootiere der höchste relative Anteil positiver Tiere zu finden. Es folgten die Bereiche Oberer Park mit 13,2 % und Bauernhof mit 8,2 %. Relativ gering war der Anteil seropositiver Tiere in den Bereichen Unterer Park / Felsenanlage mit 4,4 % und Betriebshof / Krankenstation mit 4,8 % der untersuchten Tiere (**Tabelle 24, Abbildung 8**).

Tabelle 24:

Räumliche Verteilung von Zootieren mit Antikörpern gegen Leptospiren und von PCR-positiven, wildlebenden Tieren in der Wilhelma

Revier	Anzahl der Tiere			
	Zootiere		wildlebende Tiere	
	untersucht	Reagenten	untersucht	positiv
Bären-, Südamerikaanlage	174	34 (19,5 %)	45	1 (2,2 %)
Oberer Park	144	19 (13,2 %)	27	0
Bauernhof	159	13 (8,2 %)	21	0
Unterer Park, Felsen- Anlage	182	8 (4,4 %)	428	8 (1,9 %)
Betriebshof / Kranken- Station	63*	3 (4,8 %)	87	2 (2,3 %)
Nicht zuzuordnen **	0	0	76	2 (2,6 %)
gesamt	722	77 (10,7 %)	684	13 (1,9 %)

* Zootiere, die für längere Zeit in der Krankenstation aufgestellt waren

**wildlebende Tiere, die aufgrund der Fundumstände (z.B. in frischen Futtergras / -heu) keinem Parkteil zugeordnet werden konnten

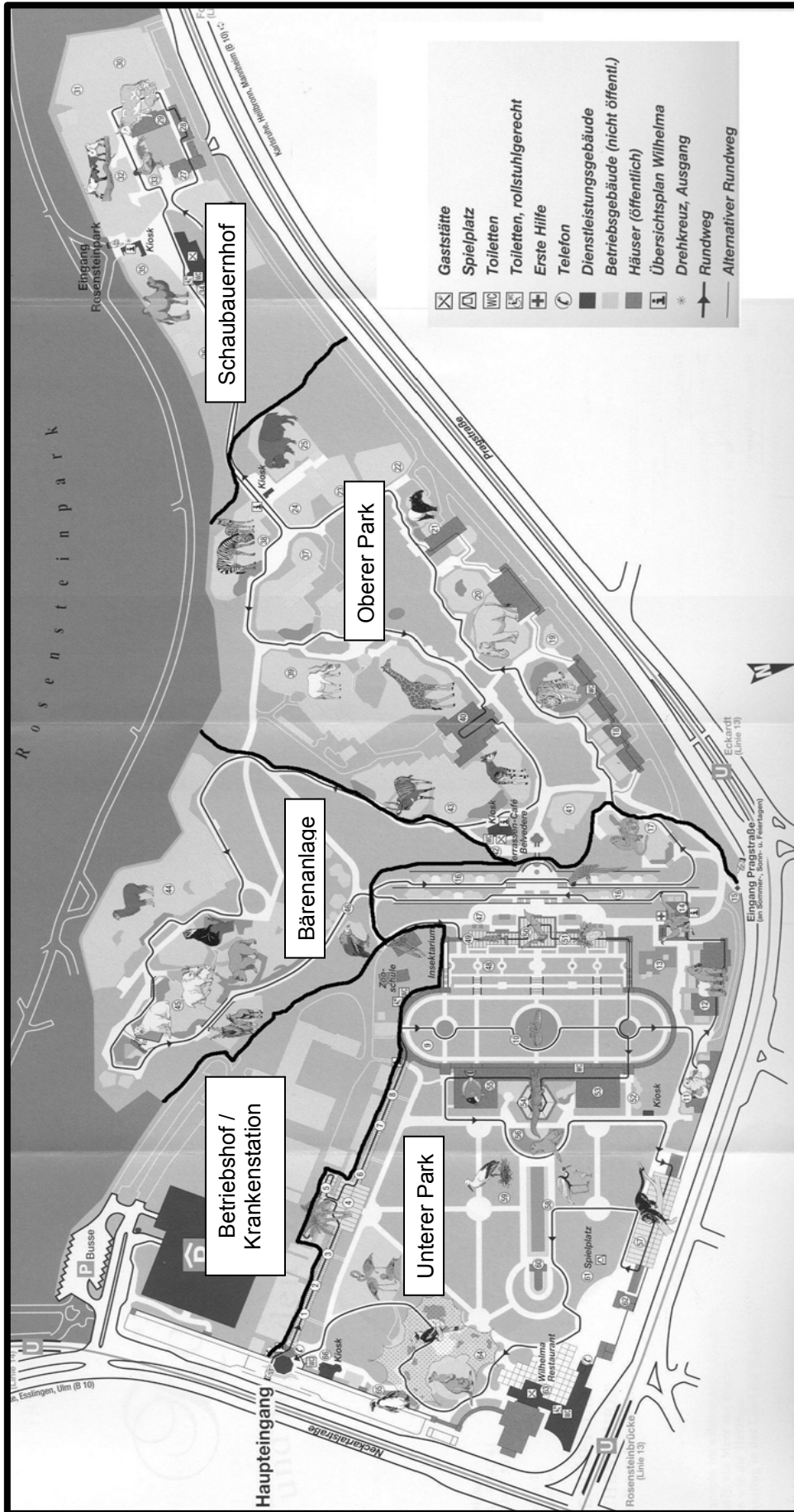


Abbildung 8:
Übersichtsplan der Wilhelma

5 BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

5.1 *Leptospira*-Infektionen bei den Zootieren

Die Ergebnisse der serologischen Untersuchung legen den Schluß nahe, dass Zootiere in Deutschland häufig mit *Leptospiren* in Kontakt kommen. So waren gegen *Leptospira* gerichtete Antikörper in immerhin 12,6 % aller untersuchten Zootierseren nachweisbar. Dabei ist die Seroprävalenz von Zoo zu Zoo offenbar unterschiedlich. In der vorliegenden Untersuchung unterschieden sich Wilhelma und die anderen Zoos hoch signifikant in ihrem Anteil serologisch positiver Tiere. Während in den anderen Zoos 25,0 % der Seren Antikörper aufwiesen, waren es in der Wilhelma nur 10,7 %.

Zur Prüfung der Serumproben auf *Leptospira*-spezifische Antikörper wurde der Mikroagglutinationstest (MAT) verwendet, denn dieser gilt international als Goldstandard-Methode (OIE-Manual, 2002). Als Testantigene dienten Stämme der Serovare Australis, Autumnalis, Canicola, Grippotyphosa, Copenhageni, Pomona, Hardjoe, Sejroe, Saxkoebing und Tarassovi, da diese derzeit in Deutschland als die epidemiologisch wichtigsten Serovare angesehen werden, wie eine entsprechende Rücksprache mit dem Chemischen-und-Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart im Vorfeld der Untersuchungen ergeben hatte (Sting, 2004). Grundsätzlich wurde jedes Zootierserum gegen alle 10 Serovare getestet, obwohl in der Routinediagnostik am genannten Untersuchungsamt in Abhängigkeit von der tierartlichen Herkunft der Probe nur eine Auswahl dieser Serovare zur Untersuchung kommt (Sting, 2004). Eine Erweiterung des Serovarspektrums wurde als nicht sinnvoll erachtet. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Zootierarten sind zwar in den verschiedensten Erdregionen beheimatet, in denen auch völlig andere Spektren an *Leptospira*-Serovaren vorkommen können (Torten, 1979; Bolin, 2003). Jedoch handelte es sich bei den hier untersuchten Vertretern dieser Arten fast ausnahmslos um eigene Nachzuchten der Zoos, die somit selbst nur mit den regional in Deutschland vorkommenden *Leptospira*-Serovaren in Kontakt gekommen sein dürften. In der Regel lebten sogar bereits mehrere Generationen ihrer Ahnen in deutschen Zoos (Rietschel, 2002).

Genau wie in vergleichbaren epidemiologischen Untersuchungen anderer Untersucher (Sebec *et al.*, 1986; Kadlec *et al.*, 1983; Lilenbaum *et al.*, 2002) so wurde auch in der vorliegenden Arbeit eine Serumprobe bereits ab einem Titer von 1:100 als positiv gewertet. Daher ist nicht ganz auszuschließen, dass es sich bei einigen niedrigtitrigen Resultaten um unspezifische Reaktionen handelte (OIE-Manual, 2000). Die Titerverläufe bei mehrfach untersuchten Tieren zeigten aber, dass hohe Antikörpertiter zumindest bei Huftieren

recht schnell wieder in zweifelhafte Bereiche ($\leq 1:400$) oder sogar unter die Nachweisgrenze fallen können. Auch die Antikörpertiter von vier Hunden, die laut Impfbuch jährlich mit dem Combiimpfstoff Virbagen® Carnis SHA₂ PLT (Virbac Tierarzneimittel GmbH, Oldesloe) geimpft worden waren, lagen nur in zwei Fällen im positiven Bereich. Speziell Impftiter erwiesen sich auch in anderen Arbeiten als niedrig (Sting, 2004; Klaasen *et al.*, 2003). Aus diesem Grunde wurden die in dieser Studie als niedrig ermittelten Antikörpertiter nicht als unspezifische bzw. falsch-positive Reaktionen verworfen.

Antikörper gegen Leptospiren bei Zootieren wurden bereits in mehreren früheren Untersuchungen nachgewiesen. Die dabei ermittelten serologischen Reaktionen weisen hinsichtlich Qualität und Quantität erhebliche Unterschiede von Zoo zu Zoo auf, was angesichts der Unterschiede in wichtigen epidemiologischen Faktoren, wie dem Artenspektrum und der Anzahl der je Tierart beprobten Individuen sowie dem Vorkommen, der Populationsdichte und der Durchseuchung von Reservoirentieren nicht überrascht. So sind die Werte von 10,7 % seropositiven Zootieren in der Wilhelma und 25 % in den anderen Tierhaltungen etwas niedriger als entsprechende Werte, die für den Tierbestand des Ostböhmischen zoologischen Gartens ermittelt wurden. Sebec *et al.*, 1986 gaben einen Anteil von 8,7 % an, werteten in dieser Untersuchung eine serologische Reaktion aber erst ab einem Titer von 1:800 als positiv. Legt man diesen Grenzwert an die Serumproben der vorliegenden Untersuchung an, dann liegen die Vergleichsdaten aus der Wilhelma bei 2,6 % und aus den anderen Zoos bei 4,3 %. Kadlec *et al.* (1983) fanden dagegen bei ihrer Untersuchung in mehreren Zoos der DDR lediglich bei 4,5 % der Tiere Antikörpertiter von $\geq 1:100$. In der aktuelleren Untersuchung von Lilenbaum *et al.* (2002) wurden im Zoo von Rio de Janeiro Antikörper mit einer Titerhöhe von $\geq 1:100$ bei 57,2 % der 77 untersuchten Tiere festgestellt. Interessanterweise wurden *Leptospira*-Infektionen auch beim Menschen wiederholt häufiger in der Bevölkerung tropischer Länder gefunden als in der Bevölkerung Mitteleuropas (Stahlheim *et al.*, 1985; Koh *et al.*, 1999). Eine besonders starke Exposition zu infizierten Reservoirwirten könnte zu dieser vergleichsweise hohen Durchseuchung geführt haben. Die Autoren erwähnen das starke Rattenvorkommen in dem von ihnen untersuchten Bestand, ohne sich aber über das gesamte Spektrum an potentiellen Reservoirwirten auszulassen.

Nicht nur zwischen den untersuchten deutschen Zoos, sondern auch zwischen den untersuchten Zootiergruppen innerhalb der Zoos gab es deutliche Unterschiede in der Quote der Seroreagenten. Die festgestellten Unterschiede zwischen den verschiedenen Revieren der Wilhelma hinsichtlich der prozentualen Häufigkeit von Seropositiven spiegeln wohl vor allem die Unterschiede im Besatz mit mehr oder weniger empfänglichen Tierarten wieder. So war die Quote an seropositiven Individuen bei den Raubtieren und Pekaris vergleichsweise hoch. Ein verhaltensbiologischer Erklärungsansatz wäre, dass

diese Tiere aufgrund ihres Jagd- und Freßverhaltens häufiger mit infizierten Nagetieren in direkten Kontakt kommen als andere Zootiere. Bei Gelegenheit erbeuten alle fleischfressenden Zoobewohner kleine wildlebende Tiere, die in ihre Gehege eindringen (Rietschel, 2002; eigene Beobachtungen). Schweine und Pekaris wühlen zusätzlich gerne und intensiv in schlammigem Untergrund ihrer Gehege, der prinzipiell ein gutes Milieu für das Überleben von in die Umwelt ausgeschiedenen Leptospiren bietet. Sollten diese Feuchtstellen mit Leptospiren kontaminiert worden sein, ist eine Aufnahme des Erregers über Schleimhäute oder Hautverletzungen bei dieser Gelegenheit gut möglich. Unerklärlich erscheint jedoch der verhältnismäßig hohe Prozentsatz seropositiver Unpaarhufer. Auch andere Autoren geben für Raubtiere und Schweine sowie Unpaarhufer vergleichsweise hohe Seroprävalenzen an (Hänichen *et al.*, 1992; Lilenbaum *et al.*, 2002; Neiffer *et al.*, 2001; Sebek *et al.*, 1986; Kadlec, 1983; Weber und Christoph, 1981). Es gibt aber auch Unterschiede. So waren bei Sebek *et al.* (1986) als häufigste Tiergruppen neben den Zebras (22,9 %) vor allem Antilopen und Gazellen (3,6 %) betroffen. Auch bei Kadlec *et al.* (1983) waren nach den Raubtieren vor allem Wiederkäuer verhältnismäßig stark durchseucht. Dagegen wurden in der vorliegenden Untersuchung alle 34 Antilopen- und Gazellenserren aus der Wilhelma negativ getestet und die 276 untersuchten Wiederkäuer waren mit 6,5 % Seropositiven im Verhältnis zu anderen Tiergruppen eher selten betroffen. Eine Erklärung dieses Unterschiedes könnte in der unterschiedlichen Exposition zu *Leptospira*-infizierten Wühlmäusen liegen. Wühlmäuse sind die bevorzugten Reservoir- und Erhaltungswirte für Leptospiren des Serovars Grippotyphosa. In der Wilhelma wurden Wühlmäuse in den Außenanlagen für Zoowiederkäuer nicht beobachtet, was gut mit dem serologischen Befund korreliert, dass Antikörper gegen Grippotyphosa in der Wilhelma überhaupt selten waren. Dagegen waren sowohl die von Kadlec *et al.* (1983) als auch die Sebek *et al.* (1986) gefundenen Antikörper bei ihren Tieren am häufigsten gegen Grippotyphosa gerichtet.

Bemerkenswert ist der seltene Nachweis von Leptospiren-Antikörpern bei Primaten in der vorliegenden Untersuchung. Nur ein einziges Tier dieser Ordnung aus der Wilhelma (das entspricht 1 % der Untersuchten) reagierte positiv. Bei der Untersuchung von 23 Pavianen (*Papio hamadryas*) aus dem Augsburger Zoo konnten ebenfalls keine gegen Leptospiren gerichteten Antikörper gefunden werden (Straube, 2004). Auch Lilenbaum *et al.* (2002) fanden bei ihrer systematischen Untersuchung im Zoo von Rio de Janeiro vergleichsweise selten humorale Reaktionen gegen Leptospiren in den Serumproben von Primaten. Im Gegensatz dazu wird in der Fachliteratur über Leptospiren bei Primaten häufig berichtet (Fear *et al.*, 1968; Füzi und Csoka, 1963, Johnson und Morter, 1969; Minette, 1966; Tschirch und Jorga, 1986). Der seltene Nachweis in der vorliegenden Arbeit lässt sich zum einen durch die sehr hohen Hygienestandards in der Affenhaltung der Wilhelma

erklären. Daneben ist zu bedenken, dass Affen von den Zootierärzten häufiger als andere Tiergruppen auf Zoonosen untersucht werden, so dass *Leptospira*-Infektionen bei dieser Ordnung häufiger entdeckt und wohl auch häufiger publik werden als bei anderen Tierarten.

Die Ergebnisse hinsichtlich der Serovarspezifität der nachgewiesenen humoralen Reaktionen unterschieden sich von vergleichbaren Werten in der Literatur. Diese Unterschiede betrafen weniger das Spektrum der insgesamt erkannten Serovare als die Häufigkeit, mit der die zehn verwendeten Serovare von den Serumproben erkannt wurden. Dabei legten die ermittelten Spezifitäten und Häufigkeitsverteilungen die Vermutung nahe, dass viele *Leptospira*-Infektionen der Zootiere von infizierten Nagetieren ausgegangen waren und weniger auf der Zirkulation von Leptospiren unter den Zootieren beruhten. So dominierten sowohl in Wilhelma als auch in den anderen Zoos serologische Reaktionen gegen das Serovar Copenhageni (63,8 % bzw. 31,8 %) mit weitem Abstand vor Reaktionen gegen andere Serovare. Das Serovar Copenhageni und andere Vertreter der Serogruppe Icterohaemorrhagiae haben ein betont breites Wirtsspektrum, kommen bei Nutztieren aber eher selten, bei Mäusen und Ratten aus der Unterfamilie Echte Mäuse (*Murinae*) dagegen sehr häufig vor (Dedie *et al.*, 1993). Antikörper gegen Serovare mit besonderer Anpassung an Fleischfresser, Wiederkäuer oder Schweine wurden zwar ebenfalls gefunden, aber nur vereinzelt. Das mit Hundartigen assoziierte Serovar Canicola wurde zum Beispiel kein einziges Mal bei einem Fleischfresser gefunden. Reaktionen gegen das an Schweine adaptierte Serovar Tarassovi wurde insgesamt nur dreimal entdeckt, dabei nur einmal bei einem Schwein. Auch die an Wiederkäuer adaptierten Serovare Hardjo, Saxkoebing und Pomona traten bei den untersuchten Zoowiederkäuern sehr selten auf. Gegen sie gerichtete Antikörper wurden jeweils nur ein bzw. zwei Mal bei einem Wiederkäuer detektiert. Einzig Antikörper gegen das ebenfalls mit Wiederkäuern assoziierte Serovar Sejroe wurden etwas häufiger festgestellt. Immerhin sechs Wiederkäuer zeigten eine Reaktion gegen dieses Serovar. Damit traten serologische Reaktionen gegen Sejroe häufiger bei Wiederkäuern als bei anderen Tiergruppen auf. Die betroffenen Tierbestände wiesen zumindest im Untersuchungszeitraum jedoch keine klinischen Symptome wie etwa herabgesetzte Fruchtbarkeit auf, die auf eine akut bestehende Leptospireninfektion hindeuteten.

Sowohl Sebek *et al.* (1986) als auch Kadlec *et al.* (1983) und Geßler *et al.* (1987) stellten als dominierendes Serovar in Zoobeständen bzw. in Nutztierbeständen Baden-Württembergs das Serovar Grippotyphosa fest. Auch beim jagdbaren Wild waren Antikörper am häufigsten gegen dieses Serovar gerichtet (Horsch *et al.*, 1979; Hübner und Horsch, 1977; Hartman und Broekhuizen, 1980) oder es zählte zumindest zu den häufigsten Serovaren (Weber und Christoph, 1981). In der vorliegenden Untersuchung

spielte Grippotyphosa im Gegensatz dazu eine unbedeutende Rolle. Weder in der Wilhelma noch in den anderen untersuchten Tierhaltungen traten derartige Reaktionen besonders häufig in Erscheinung. Vielmehr machten sie in Stuttgart nur 5,1 % und in den anderen Tierhaltungen nur 6,8 % der serologischen Nachweise aus. Das Serovar Grippotyphosa ist typischerweise mit Wühlmäusen assoziiert, die ihm als Reservoir- und Erhaltungswirte dienen (Dedie *et al.*, 1993). Das serologische Reaktionsspektrum der untersuchten Zootiere deckt sich daher auffallend mit der bereits genannten Beobachtung, dass Wühlmäuse in der Wilhelma kaum vorkamen. Die beiden in dieser Studie untersuchten Wühlmäuse aus der Wilhelma stammten bezeichnenderweise aus Futtergras und –heu, das von außen in den Zoo importiert worden war. Immerhin kamen Feld- und Rötelmäuse auf dem Zoogelände vor und waren in unmittelbarer Nähe von Zootieren zumindest in einigen mit Grünflächen versehenen Außengehegen zu erwarten. Auch im angrenzenden Rosensteinpark, in dem das Futtergras im Sommerhalbjahr geschnitten wird, leben Wühlmäuse, die dieses Tierfutter kontaminieren können, wie die darin gefundenen Exemplare belegen. Drei von fünf serologischen Nachweisen für Grippotyphosa aus der Wilhelma stammen von Wasserschweinen aus der direkt an den Rosensteinpark angrenzenden Südamerika-Anlage mit ihren großen Grünflächen. Dies mag als Verdacht gewertet werden, dass die dort beheimatete Wühlmauspopulation tatsächlich das *Leptospira*-Serovar Grippotyphosa beherbergt. Aus organisatorischen und finanziellen Gründen konnte die Durchseuchung dieser Wühlmauspopulation leider nicht untersucht werden, um das von ihnen ausgehende Infektionsrisiko für die Zootiere der Wilhelma genauer zu bestimmen.

Vertreter der Serogruppe Icterohaemorrhagiae, von denen das Serovar Copenhageni das serologische Reaktionsmuster der hier untersuchten Zootiere dominierte, waren auch in den Arbeiten von Sebek *et al.* (1986) und Kadlec *et al.* (1983) diejenigen Leptospiren, gegen die Zootiere am häufigsten Antikörper gebildet hatten. Dagegen machte dieses Serovar bei der bundesweiten Untersuchung von 30.963 Haustieren durch Schönberg *et al.* (1987) nur 3 % der positiven Reaktionen aus. In Rinderbeständen im südlichen Baden-Württemberg konnte es überhaupt nicht festgestellt werden (Geßler *et al.*, 1987). Auch die Befunde, die Schönberg *et al.* (1987) an Wiederkäuern erhoben hatten unterschieden sich deutlich von den Daten dieser Arbeiten, denn die häufigsten Reaktionen richteten sich gegen das Serovar Hardjo (62,4 % der Seropositiven). Bei den anderen Tierarten kamen Reaktionen gegen Hardjo dagegen fast nie vor und es dominierten wiederum Reaktionen gegen Grippotyphosa. Das Serovar Hardjo ist besonders an den Organismus von Wiederkäuern angepasst und nutzt vor allem Rinder und Schafe als Erhaltungswirte (Ellis *et al.*, 1981; Gerritsen *et al.*, 1994; Bolin and Alt, 2001). Es tritt vor allem in Großbeständen auf (Geßler *et al.*, 1987; Schönberg *et al.*, 1987). In den hier untersuchten

zoologischen Gärten wurden Antikörper gegen dieses Serovar aber immer nur vereinzelt festgestellt. Reaktionen gegen die Serovare Sejroe und Saxkoebing, die derselben Serogruppe wie Hardjo angehören, traten dagegen etwas häufiger auf. Auch Lilenbaum *et al.* (2002) stellten fest, dass sich die Serovare bei Zootieren im Zoo von Rio de Janeiro von den bei Wildtieren in demselben Gebiet vorherrschenden Serovaren unterschieden. Trotz der zum Teil beträchtlichen Anzahl an seropositiven Zootieren, konnte bei keinem Zootier ein Zeichen einer bestehenden *Leptospira*-Infektion in Form von erregerspezifischer DNS oder *in vitro* anzüchtbaren Erregern gefunden werden. Auch die 14 serologisch positiven Zootiere, für die zusätzlich Daten aus der PCR vorlagen, wiesen keine Leptospiren-DNS in ihren Nierengewebsproben auf. Selbst bei Arten wie den Halsbandpekaris, bei denen 37,5 % der 32 untersuchten Tiere serologisch positiv waren, gelang kein direkter Leptospiren-Nachweis. Diese Befunde deuten darauf hin, dass es sich bei den serologischen Reaktionen überwiegend um Seronarben transienter und bereits überwundener Leptospireninfektionen handelte. Nur in Einzelfällen gab es serologische Anhaltspunkte dafür, dass Leptospirenservare wie Canicola und Hardjo vorhanden waren, für die Zootiere selbst als Reservoir- oder Erhaltungswirt dienen können. Offenbar sind die in den untersuchten Zoos gehaltenen Tiere meist nur Gelegenheitswirte und Endglieder von Infektketten, die ihren Anfang bei infizierten, wildlebenden Tieren auf dem Zoogelände nehmen. Die Bedeutung, die Zootieren als Leptospirenträger und vor allem Leptospirenausscheider und Ansteckungsquelle für den Menschen zukommt, ist daher eher gering einzuschätzen. Es muß jedoch darauf hingewiesen werden, dass eine abschließende Risikobewertung anhand der ermittelten Daten nicht vorgenommen werden kann. Hierzu war die mit direkten Nachweismethoden untersuchte Stichprobe zu klein und in der tierartlichen Zusammensetzung auch zu heterogen. Ursache war, dass sich die Beprobung der Zootiere aus Gründen des Tierschutzes auf Tiere beschränken mußte, die während der Laufzeit der Studie zufällig verstarben oder aus anderen Gründen euthanisiert werden mußten. Insgesamt wurden bei dieser Untersuchung 63 Zootiere aus 41 Arten getestet. Es starb allerdings auch keines dieser Zootiere unter Anzeichen einer Leptospirose. In einer solchen Situation wäre am ehesten mit einer Nierenbesiedlung durch den Erreger und einem entsprechend positiven PCR-Befund zu rechnen gewesen.

5.2 *Leptospira*-Infektionen bei Futtertieren und wildlebenden Tieren

Große Tierhaltungen und ihre Versorgungseinrichtungen sind vor allem aufgrund des ganzjährigen Nahrungsangebotes für wildlebende Kleinsäuger und Vögel besonders attraktiv. Um Anhaltspunkte für mögliche Eintragswege für Leptospiren in Zoos und

Ansteckungsquellen für Zootiere zu ermitteln, wurde in der vorliegenden Arbeit die Rolle dieser Tiere als Leptospiren-Reservoir untersucht. Da aus organisatorischen wie tierschützerischen Gründen solche Tiere nicht lebend zur Beprobung gelangten und damit meist keine Serumproben verwendet werden konnten, wurde versucht, *Leptospira*-Infektionen am Vorhandensein von *Leptospira*-DNS in postmortal entnommenen Nierengewebsproben dieser Tiere zu erkennen. Wie die Ergebnisse der Validierungsversuche belegten, konnte man die DNS der Bakterien mit der dazu benutzte PCR-Methode in den Nierengewebsproben detektieren. Hinsichtlich der Bewertung positiver Befunde wurde davon ausgegangen, dass beim Nachweis von *Leptospira*-DNS auch Leptospiren selbst vorhanden waren, und dass die Erreger bei derart besiedelten Organen zumindest zeitweise auch mit dem Urin ausgeschieden wurden. Um ein Infektionsrisiko für Zootiere zu sein, muss ein erregerausscheidendes Wildtier auch Zugang zu den Aufenthaltsorten der Zootiere oder zu deren Futter oder Wasserquellen haben. Von den wildlebenden Säugetieren erfüllten lediglich die Nagetiere und kleineren Insektenfresser beide Bedingungen. So waren in den untersuchten Zoos die am häufigsten vorgefundenen Arten Echter Mäuse (vor allem Gelbhalsmaus, Hausmaus, Wanderratte) auch die wahrscheinlichste Quelle für Leptospireninfektionen der Zootiere. Die Anzahl untersuchter Individuen ist bei den übrigen untersuchten Spezies zu gering, um statistisch gesicherte Aussagen über deren Rolle als Erregerreservoir machen zu können. So sollten die beiden Einzelfunde von Leptospiren-DNS bei einer Zwergfledermaus (*Pipistrellus pipistrellus*) und bei einem Igel (*Erinaceus europaeus*) nicht schon als Entdeckung eines neuen epidemiologisch bedeutsamen Ansteckungsrisikos bewertet werden. Immerhin wurden Fledertiere auch schon von anderen Untersuchern als Reservoirwirte für Leptospiren diskutiert (Smythe *et al.*, 2002). Und in anderen Untersuchungen (Babudieri und Farina, 1964; Dedie *et al.*, 1993; Fennestad und Borg-Petersen, 1972; Parnas, 1958) wurde bei Igeln sogar ein hoher Durchseuchungsgrad festgestellt, vor allem mit den Serovaren Australis und Autumnalis. Igel können in der Wilhelma häufig beobachtet werden, ihre Bedeutung für die Ansteckung von Zootieren ist aber eher gering einzuschätzen, da ihnen nur wenige Tiergehege zugänglich sind. Außerdem kamen Seroreaktionen gegen Australis in der Wilhelma überhaupt nur zweimal mit jeweils zweifelhaftem Titer vor. Das Serovar Autumnalis war mit einem Anteil von insgesamt 7,4 % der serologisch positiven Reaktionen immerhin dritthäufigstes Serovar in der Wilhelma, lag aber weit hinter Copenhageni.

Die ermittelte Durchseuchungsquote der Nager war im Vergleich zu einigen anderen Untersuchungen recht gering (Dedie *et al.*, 1993; Vinetz *et al.*, 1996; Sunbul *et al.*, 2001). Dies könnte damit zusammenhängen, dass durch die hohen Hygienestandards in zoologischen Gärten die Leptospirenverbreitung auch innerhalb der Reservoirwirtpopulation

erschwert wird. So mag der Infektionsdruck beispielsweise unter Ratten in der Kanalisation oder an anderen unhygienischen Orten weit höher sein als in Einrichtungen von zoologischen Gärten, in denen regelmäßig gereinigt und desinfiziert wird. Eine Rolle könnte auch der extrem warme und trockene Sommer 2003 gespielt haben. Zum einen könnte er über seine Auswirkung auf die Populationsdynamik die Durchseuchung der Nagerpopulation herabgesetzt haben. Zum anderen wäre denkbar, dass ausgeschiedene Leptospiren unter den besonderen Witterungsbedingungen rascher inaktiviert wurden.

Von den untersuchten Nagetieren waren Wanderratten mit 9,7 % der untersuchten Vertreter dieser Art am häufigsten Leptospiren-Wirte. Die Hausmaus mit 3 % und die Gelbhalsmaus mit 0,9 % der getesteten Individuen beherbergten Leptospiren zwar weitaus seltener, stellten demnach aber dennoch bedeutsame Infektionsquellen dar. Alle drei Arten halten sich oft im unmittelbaren Tierbereich auf und können dort sehr zahlreich werden. Die bereits oben erläuterte serologische Dominanz des Serovars Copenhageni bei den Zootieren würde gut mit einer dominierenden Rolle der Echten Mäuse als Quelle für Leptospireninfektionen in den untersuchten Zoos korrelieren. Außerdem paßt die im Vergleich mit den anderen untersuchten Tierhaltungen (25 %) hoch signifikant geringere Seroprävalenz in der Wilhelma (10,7 %) gut mit den PCR-Ergebnissen zum Vorkommen von Leptospiren-DNS bei den auf Zoogelände gefangenen Wildtieren zusammen. So waren Wanderratte mit 9,7 % fast dreimal so häufig Träger von Leptospiren wie die Hausmaus mit 3,0 % bzw. fast zehnmals so häufig wie die Gelbhalsmaus mit 0,9 %. Daraus ließe sich ableiten, dass das Risiko, mit Leptospiren konfrontiert zu werden, positiv mit der lokalen Populationsdichte der Ratten korreliert ist. Die niedrigere Seroprävalenz bei den Zootieren der Wilhelma kann somit eine Folge der dort verglichen mit den anderen untersuchten Zoos weit geringeren Anzahl an Wanderratten sein. Es ist aber auch gut möglich, dass in den anderen Tierhaltungen Leptospiren-Infektionen durch die dort vermehrt vorhandenen schlammigen Bereiche in den Tiergehegen und eventuelle Unterschiede im Hygienemanagement begünstigt wurden.

Die weit geringere Populationsdichte von Wanderratten in der Wilhelma im Vergleich mit deren Dichte in den anderen untersuchten Zoos steht vermutlich mit der unterschiedlichen Intensität in Zusammenhang, mit der die Schädlingsbekämpfung durchgeführt wird. Im Stuttgarter Zoo gab es ein offenbar effektives Bekämpfungsprogramm, das sowohl von Tierpflegern als auch durch eine eigens damit betraute Fremdfirma geleistet wurde und speziell gegen die Wanderratte gerichtet ist. Trotz der Bekämpfungsmaßnahmen gibt es aber dennoch starke Vorkommen von Haus- und Gelbhalsmäusen in der Wilhelma. Nach eigenen Beobachtungen scheint deren Dichte dort durch die geringe Konkurrenz und Verfolgung durch die größeren Wanderratten sogar höher als in den anderen Tierhaltungen zu sein. Anders als in der Wilhelma wurden die Bekämpfungsmaßnahmen

in den anderen untersuchten Zoos alleine von den Tierpflegern und nach eigener Einschätzung der Belegschaft bei weitem nicht konsequent durchgeführt. Komplizierend kann dort hinzukommen, dass besondere topografische Gegebenheiten die Einwanderung und das Vorkommen von Wanderratten in den anderen Tierhaltungen begünstigen. So werden fast alle anderen Zoogelände von einem Fließgewässer durchzogen, das Nagetieren als Leitlinie zur Besiedelung dienen kann (Becker, 1978). Außerdem befindet sich die Mistlagerstätte bei fast allen der untersuchten Tierhaltungen auf dem Betriebsgelände. In der Wilhelma gibt es eine Mauer als Barriere zum nächsten außerhalb gelegenen Fließgewässer, und der Mist wird abtransportiert und weit außerhalb des Zoos gelagert. Auch stehende Gewässer mit schlammigen Uferzonen sind in der Stuttgarter Wilhelma im Gegensatz zu den anderen untersuchten Zoos selten und im Tierbereich fast nicht zu finden. Die recht hohe Dichte an Feldhasen auf dem Zoogelände der Wilhelma und im angrenzenden Rosensteinpark von etwa einem Tier pro Hektar (Plasa, 2003), dürfte kein Risikofaktor für Leptospireninfektionen der Zootiere sein, da Feldhasen zu fast keinem der Gehege Zugang haben und auch mit den Futtermitteln kaum in Kontakt kommen. Eine Kontamination frisch geschnittenen Futtergrases und gelagerter Futterrüben durch Hasenurin ist jedoch nicht ausgeschlossen (Rietschel, 2003).

Hinweise, dass infizierte Futtertiere in den untersuchten Zoos als Ansteckungsquelle bedeutsam sind, fanden sich nicht. Immerhin wurden 123 Futtertiere aus 12 verschiedenen Arten mit stets negativem Ergebnis untersucht. Als Erregerquelle sollten derartige Futter- und Beutetiere dennoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Denn dass eine Ansteckung von Zootieren auf diese Weise prinzipiell möglich ist, zeigten bereits mehrere andere Autoren (Sassenburg, 1988; Schröder, 1975; Zwart und Treiber, 1998).

5.3 Qualität der verwendeten Testverfahren

Der Nachweis von Leptospiren-DNS in den Nierengewebsproben von Tieren wurde in Anlehnung an ein von Smythe *et al.*, 2002 entwickeltes und publiziertes PCR-Verfahren geführt. In der vorliegenden Arbeit war die Spezifität des verwendeten Primerpaares LeptoR / LeptoF unbefriedigend und wurde nur dadurch annehmbar, dass das PCR-Verfahren durch die Sequenzierung der mutmaßlich *Leptospira*-spezifischen PCR-Produkte ergänzt wurde. Immerhin konnten alle untersuchten Tierarten mit dem genannten Primerpaar untersucht werden, ohne dass es zur unerwünschten Amplifikation von DNS-Segmenten der Tiere kam. Die analytische Sensitivität des PCR-Verfahrens war, gemes-

sen an der Nachweisgrenze, zufriedenstellend niedrig und betrug bei der Untersuchung von wässrigen Erregersuspensionen je nach Serovar zwischen 3 und 300 *Leptospira*-Partikeln pro PCR-Ansatz. Die Nachweisgrenze für Leptospiren in Nierengewebe lag höher (ca. 2×10^6 Bakterien/g Gewebe), was in dieser Höhe doch überraschend war. Diese hohe Nachweisgrenze dürfte vor allem durch den Verlust an intakten, amplifizierbaren Zielmolekülen im Zuge der DNS-Extraktion bedingt gewesen sein. Auch ist nicht auszuschließen, dass trotz Extraktion und Aufreinigung der DNS doch noch Reste an Substanzen in den PCR-Ansätzen vorhanden waren, die die Polymerase-Reaktion inhibierten. Klinisches Probenmaterial enthält bekanntermaßen eine Vielzahl derart hemmender Stoffe (Wilson, 1997). Die ermittelte Nachweisgrenze ist gegenwärtig in ihrer diagnostischen Bedeutung schwierig einzuschätzen, da Daten über die Erregerlast in Nierengewebe bei *Leptospira*-infizierten Tieren bisher nicht vorliegen. Die positiven PCR-Ergebnisse, die in der vorliegenden Arbeit mit einer beträchtlichen Anzahl an getesteten Proben erzielt wurden, deuten jedoch daraufhin, dass die fragliche Nachweisgrenze unter natürlichen Bedingungen doch oft überschritten wird. Auch in der neueren Fachliteratur finden sich Anhaltspunkte dafür, dass bei infizierten Menschen und Tieren die Zahl der Erreger in Gewebe und Körperflüssigkeiten über der oben genannten Nachweisgrenze liegen kann. So wurden bei einem an akuter Leptospirose verstorbenen Patienten in der Lunge, einem Skelettmuskel, dem Pankreas und einer Niere mittels quantitativer PCR jeweils zwischen 1×10^5 und 5×10^6 Leptospiren/g Gewebe ermittelt (Segura *et al.*, 2005). Andere Untersucher fanden mittels quantitativer PCR im Blut von infizierten Menschen Leptospiren in einer Konzentrationen von 80 bis $1,5 \times 10^6$ Leptospiren/ml (Truccolo *et al.*, 2001). Urinproben von experimentell infizierten Kühen enthielten zwischen 1×10^4 und 4×10^4 Leptospiren/ml Urin (Gerritsen *et al.*, 1991). Man kann aus diesen Daten aber auch ableiten, dass die Zahl der Leptospiren im Nierengewebe von manchen infizierten Tieren unter der Nachweisgrenze des PCR-Verfahrens liegen kann. Daher wurden vermutlich einige infizierte Tiere im Rahmen der vorliegenden Studie nicht als solche erkannt, und die Durchseuchungsraten der wildlebenden Tiere wohl eher unterschätzt.

Mit der Sequenzierung wurden insgesamt 14 PCR-Resultate als falsch positiv entlarvt. Diese Aussage muss allerdings dahingehend relativiert werden, dass nur zwei dieser falsch positiven Proben bei der PCR-Auswertung als „positiv“ eingestuft worden waren, da sie ein deutliches und klar abgrenzbares PCR-Produkt mit der erwünschten Größe von 87 bp ergeben hatten. Die anderen Proben waren ohnehin aufgrund des unklaren Amplifikationsergebnisses allenfalls als „zweifelhaft“ bewertet. Der überwiegende Teil dieser Proben wäre in einer Routinediagnostik sogar „negativ“ deklariert worden. Dennoch wurde bei drei solchen zweifelhaften Proben Leptospiren-DNS bestätigt. Bezieht man nur die zwei genannten falsch positiven Proben auf die Gesamtzahl der richtig positiven Proben

und läßt die zweifelhaften Proben in der Zählung unberücksichtigt, so bleibt immer noch der recht hohe Anteil von 2 aus 26 (7,7 %).

Die große Zahl an Spezies, deren DNS durch die PCR angeblich amplifiziert und die nachfolgende Sequenzierung „identifiziert“ wurde, ist mit großer Wahrscheinlichkeit methodisch begründet und kann allein auf die Kürze des Amplikons zurückgeführt werden. Denn mit 87 Basenpaaren ist das Amplifikationsprodukt sehr kurz. Daher führen schon wenige Veränderungen in der Basenabfolge bei Sequenzvergleichen im BLAST-Programm zu dramatisch anderen Identifikationsergebnissen und Spezieszuordnungen. Punktuelle Sequenzierungs- oder Amplifikationsfehler oder auch natürlich vorkommende Sequenzvariationen im amplifizierten DNS-Abschnitt eines *Leptospira*-Stammes können bei einer derart kurzen Sequenz leicht dazu führen, dass DNS-Abschnitte vieler anderer Arten ähnlicher sind und der leptospirale Ursprung eines PCR-Produktes nicht mehr erkannt wird. Gestützt wird dieser Erklärungsansatz durch die Beobachtung, dass die BLAST-Analysen am häufigsten solche Lebewesen als Ursprung der sequenzierten DNS nannten, deren Genom bereits weitgehend oder vollständig entschlüsselt worden ist. Meist konnten sie bereits aufgrund der Umstände als unwahrscheinlich abgetan werden. Auch die mangelhafte Übereinstimmung zwischen den beiden Primern hinsichtlich der mit ihnen ermittelten Sequenzierergebnisse unterstützen diese Einschätzung. So ist es gut möglich, dass es sich bei einem Teil der aufgrund der Sequenzierung als negativ deklarierten Proben doch um amplifizierte Leptospiren-DNS gehandelt hatte. Aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erfahrungen kann das hier verwendete PCR-Protokoll für die Routinediagnostik nicht empfohlen werden. Für die durchgeführte Untersuchung erwies sich das Verfahren als ausreichend, da die Identität der PCR-Produkte durch die nachfolgende Sequenzierung mit hinreichender Sicherheit bestimmt werden konnte und außerdem die Unterschätzung der Durchseuchung mit Leptospiren eher hinzunehmen war als ihre Überschätzung.

Durch die Isolierung von Leptospiren aus dem Nierengewebe PCR-positiver Individuen und ihre anschließende exakte taxonomische Identifizierung sollte der Zusammenhang zwischen den auftretenden Serovaren und den als Reservoirwirt ermittelten Tieren belegt werden. Leider gelang die Anzucht von Leptospiren in keinem einzigen der 29 PCR-positiven Fälle, obwohl die Proben mit 75 Tagen sehr lange bebrütet wurden. Das muss aber nicht bedeuten, dass die kulturnegativen Nierengewebsproben gar nicht von vermehrungsfähigen Leptospiren besiedelt waren. Bei allen Proben war es aus technischen und organisatorischen Gründen unvermeidbar, sie mehrfach einzufrieren und wieder aufzutauen, bevor der Anzüchtungsversuch erfolgte. Einige mussten zum Teil mehrere Monate bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden. Hinzu kommt, dass bei fast allen Proben schon gleich zu Beginn der Bebrütung starkes Wachstum kontaminierender Keime

einsetzte, das sich auch durch den Einsatz anerkannter Hemmstoffe nicht beherrschen ließ. Es ist bekannt, dass eine Hemmstoff-resistente mikrobielle Überwucherung des Nährmediums die Vermehrung von Leptospiren erheblich hemmen oder sogar verhindern kann (Faine *et al.*, 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde mit der PCR bei mehreren potentiellen Reservoirtierarten das Vorhandensein von DNS nachgewiesen, die der Gattung *Leptospira* zuzuordnen war, ohne aber eine genauere spezies- oder sogar serovarspezifische Klassifikation vornehmen zu können. Welche Serovare die PCR-positiven Tiere beherbergten, mußte leider ungeklärt bleiben. Gerade die serovarspezifische Zuordnung wäre für die Erkennung epidemiologischer Zusammenhänge essentiell. Diese Zuordnung ist prinzipiell aber nicht einfach, da sich die klassische serologische Einteilung innerhalb des Genus *Leptospira* nicht mit der modernen genetischen Klassifikation deckt. Es sind in der Fachliteratur einige PCRs beschrieben, mit denen eine Differenzierung zumindest bis auf die Ebene der Serogruppen möglich sein soll. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mehrere solcher PCRs getestet (Barocchi *et al.*, 2001; Zuerner *et al.*, 1995). Aber auch mit verschiedenen Modifikationen des Ansatzes und des Amplifikationsprotokolls konnten bisher keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt werden (Daten nicht in der Arbeit gezeigt).

Schlussfolgerungen

Zusammenfassend können aus den Untersuchungsergebnissen die folgenden Schlüsse gezogen werden:

1. Antikörper gegen Leptospiren kommen in deutschen Zoos bei vielen Zootierarten vor. Säugetiere, aber auch Vögel und Reptilien zeigen regelmäßig humorale Reaktionen gegen den Erreger.
2. Die Häufigkeit von Leptospireninfektionen ist je nach Tierart und Zoo verschieden und scheint mit dem Hygienestandard zu korrelieren
3. *Muridae* wie Haus- und Gelbhalsmäuse sowie Wanderratten stellen Leptospirenreservoirs in den untersuchten Zoos dar.
4. Nachweishäufigkeit, Artenspektrum wildlebender Tiere einerseits und die serovarspezifischen Reaktionsmuster serologisch positiver Zootiere andererseits legen den Schluß nahe, dass Infektionen bei Zootieren mit der Durchseuchung der wildlebenden Schadnagerpopulation korreliert sind, vor allem denen der Wanderratte.

Aus diesen Schlußfolgerungen und der Berücksichtigung praktischer Erfahrungen in der Zootierhaltung ergeben sich folgende Empfehlungen zur Verringerung des Infektionsrisikos:

1. Wildtiere, vor allem Nagetiere sollten keine Kontaktmöglichkeiten mit Zootieren und deren direkter Umgebung haben. Da diese Forderung jedoch gerade in den Stallungen von Großtieren und erst recht auf Außenanlagen nicht realisierbar ist, müssen die Populationsdichten der Nagetiere durch gezielte und intensive Bekämpfung möglichst gering gehalten werden.
2. Mist sowie Reste von Tierfutter und Einstreu sollten nicht im eigentlichen Zoogelände gelagert, sondern so schnell wie möglich von dort entfernt werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Informationen über das Vorkommen von *Leptospira*-Infektionen in Tierbeständen zoologischer Gärten in Deutschland zu gewinnen. Hierzu wurden Serum- und Nierengewebsproben von Zootieren (n = 927), Futtertieren (n = 123) und wildlebenden Tieren (n = 745) auf *Leptospira*-spezifische Antikörper bzw. Leptospiren und *Leptospira*-spezifische DNS untersucht. Die Proben stammten von Tieren in den folgenden zoologischen Gärten und Tierparks: Tierpark im Leintal, Tierpark Göppingen, Tierpark Pforzheim, Tierpark Ulm, Schwabenpark Welzheim, Nyphaea Esslingen und Zoologisch-Botanischer Garten Wilhelma, Stuttgart, in Baden-Württemberg sowie Zoo Landau/Pfalz in Rheinland Pfalz und Naturzoo Rheine in Nordrhein-Westfalen. Die Serumproben waren in den Jahren von 1996 bis 2003 von Zootieren im Zuge routinetierärztlichen Untersuchungen entnommen worden. Nierengewebsproben wurden in den Jahren 2002 und 2003 gewonnen. Sie stammten zum einen von Zootieren (n = 75), die in diesem Zeitraum zu Tode gekommen waren. Außerdem wurden Nierengewebsproben von wildlebenden Tieren (n = 745) entnommen, die auf dem Zoogelände bei der Schädlingsbekämpfung mit Fallen gefangen oder vergiftet, oder bei der Bejagung erlegt oder zufällig tot aufgefunden worden waren. In gleicher Weise wurden kleine Säugetiere und Vögel (n = 123) beprobt, die als Futtertiere für beutegreifende Zootiere verwendet wurden. Die Untersuchung der Serumproben auf *Leptospira*-spezifische Antikörper erfolgte im Mikroagglutinationstest (MAT). Nierengewebsproben wurden einem DNS-Extraktionsverfahren unterzogen und mit der LeptoF/LeptoR-PCR nach Smythe et al., 2002 untersucht. Parallel wurde versucht, Leptospiren durch Anzucht in EMJH-Medium im Nierengewebe nachzuweisen.

Bei der Untersuchung der Zootiere konnten gegen alle 10 untersuchten *Leptospira*-Serovare gerichtete Antikörper gefunden werden (Australis, Autumnalis, Canicola, Grippotyphosa, Copenhageni, Pomona, Hardjo, Saxkoebing, Sejroe, Tarassovi). Gegen mindestens ein Serovar gerichtete Antikörper-Titer ab einer Höhe von 1:100 kamen bei 12,6 % der Zootiere vor. In der Wilhelma waren bei 10,7 % der Zootiere gegen *Leptospira* gerichtete Antikörper nachweisbar, in den anderen Zoos bei 25,0 %. Dieser Unterschied war signifikant. Gegen das Serovar Copenhageni gerichtete Antikörper kamen am häufigsten vor (63,8 % der positiven Reaktionen in der Wilhelma und 31,8 % in den anderen Zoos). Am häufigsten waren gegen *Leptospira* gerichtete Antikörper bei den Gattungen der Raubtiere mit 30 % (n = 15) und der Unpaarhufer mit 24,0 % (n = 19) festzustellen. Jedoch wurden bei keinem einzigen Zootier Leptospiren oder *Leptospira*-spezifische DNS mittels Anzuchtung bzw. PCR nachgewiesen. Dagegen reagierten Proben von 3,4 % der untersuchten wildlebenden Tiere in der PCR positiv. Am häufigsten

wurde *Leptospira*-DNS bei Wanderratten (*Rattus norvegicus*) nachgewiesen (9,7 % der untersuchten Tiere). Auch die Hausmaus (*Mus musculus*) mit 3,0 % und die Gelbhalsmaus (*Apodemus flavicollis*) mit 0,9 % wurden als Leptospiren-Wirte belegt. Außerdem reagierten ein Igel (*Erinaceus europaeus*) und eine Zwergfledermaus (*Pipistrellus pipistrellus*) PCR-positiv. Bei keinem von 86 getesteten wildlebenden Tieren aus der Wilhelma verlief der MAT positiv. Als mögliche Ausscheider dominierten in der Wilhelma Haus- und Gelbhalsmaus. Wanderratten kamen dort aufgrund eines intensiven und effektiven Bekämpfungsprogramms nur selten vor. Diese Art war im Unterschied dazu in den anderen Tierhaltungen das häufigste Nagetier. Bei keinem Futtertier wurden Leptospiren-DNS oder gegen *Leptospira* gerichtete Antikörper festgestellt.

Die Häufigkeit von *Leptospira*-Infektionen bei Zootieren scheint mit der Höhe der Rattenpopulation zuzunehmen, weshalb die Bekämpfung gerade dieser Tierart zur Vermeidung von Leptospirosen in Zoos bedeutsam ist. Für das Zoopersonal scheint vom Tierbestand der untersuchten Tierhaltungen kein besonderes Infektionsrisiko auszugehen. Selbst bei serologisch positiven Zootieren wurde in keinem Fall in den Nieren Leptospiren-DNS gefunden. Personen mit Kontakt zu Tieren oder tierischen Ausscheidungen sollten auf das Leptospirosenrisiko hingewiesen werden. Maßnahmen des Infektionsschutzes (Schutzkleidung, Desinfektionsvorrichtungen, Abfallentsorgung u.ä.) sollten in die betrieblichen Abläufe integriert sein und auch gegen Leptospiren gerichtet sein.

SUMMARY

The aim of this study was to present data about the prevalence of leptospiral infections in animal collections of German zoologic gardens. The risk of exposure and subsequent infection for zoo animals and zoo staff was assessed by serological, molecular biological, and epidemiological studies on zoo animal species as well as free roaming and feeding animals.

Blood serum samples and kidney samples from zoo animals (n = 927), feeding animals (n = 123) and free roaming animals (n = 745) were tested for antibodies against leptospires or leptospires and leptospiral DNA, respectively. Samples originated in the Zoological Botanical Garden Wilhelma, Stuttgart, and six other zoos located in Germany. Serum samples had been collected from 1996 through 2003 during routine veterinary examinations. Kidney samples were collected during 2002 and 2003. They originated from zoo animals (n = 75) that died in that period for various reasons, and from free roaming animals (n = 745) trapped or poisoned during normal pest control. Similarly, samples were taken from small birds and mammals (n = 123) used as prey for predator species. Serum samples were tested for antibodies against leptospires by the microagglutination assay (MAT). Kidney samples were submitted to a DNA extraction procedure followed by PCR analysis for leptospiral DNA with primers LeptoF and LeptoR (Smythe et al., 2002). Additionally, kidney samples were tested for leptospires by culture methods using EMJH medium.

In zoo animals, antibodies were detected against all serovars that were used as test antigen in the MAT (Australis, Autumnalis, Canicola, Grippotyphosa, Copenhageni, Pomona, Hardjo, Saxkoebing, Sejroe, Tarassovi). In summary, 12.6 % of the tested zoo animals showed antibodies (titres of $\geq 1:100$) against at least one serovar. Significantly less animals proved positive in the Wilhelma (10.7 %) than in the other zoos (25 %). Most of the positive serum samples contained antibodies against serovar Copenhageni (63.8 %, Wilhelma; 31.8 %, other zoos). Antibodies against leptospires were most prevalent in tested predators (30 %) and odd-toed ungulates (24 %). However, leptospires were not detected in any zoo animal by the culture or PCR method. In contrast, leptospiral DNA was detected in 3.4 % of the free roaming animals. The rate of positive individuals (9.7 %) was highest in the brown rat (*Rattus norvegicus*). Leptospiral DNA was also detected in house mice (*Mus musculus*; 3.0 %) and yellow necked field mice (*Apodemus flavicollis*; 0,9 %). Interestingly, one hedgehog (*Erinaceus europaeus*) and one pipistrelle bat (*Pipistrellus pipistrellus*) tested positive as well. Antibodies against leptospires were not detected in any of the 86 samples from free roaming animals tested by the MAT. Additionally, none of the tested prey animals tested positive for leptospires or leptospiral DNA or leptospiral antibodies. In the Wilhelma Zoo, the house mice and the yellow necked

field mice were observed to be the dominating potential shedders of leptospire while the brown rat was rare in this zoo due to an intensive and effective pest control program. In contrast, the brown rat was the most common rodent in the other zoos.

These results suggest that zoo animals in Germany are exposed to leptospire frequently and that this frequency positively correlates with the local population density of the brown rat. However, the risk of infection appears to be low for the staffs and visitors from the animal collections in the zoos examined. Even in kidney samples from seropositive zoo animals leptospiral DNA was never detectable. Nevertheless, people having contact to animals or their excretions should be educated about risks of infection and protective measures. It is crucial to implement and maintain strict rules of hygiene including those specifically directed against leptospire.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Abdussalam, M., Alexander, A. D., Babudieri, B., Borg-Petersen, C., Eichhorn, E., Galton, M. M., Kaplan, M. M., Stableforth, A. W., Turner, L. H., Van der Hoeven, J., Wolff, J. W., Yager, R. H. (1965). Classification of leptospire and recent advances in leptospirosis. Bull. Wrlld. Hlth. Org. 32: 881-891

Acevedo-Whitehouse, K., De La, C. H., Gulland, F. M., Auriolos-Gamboa, D., Arellano-Carbajal, F., Suarez-Guemes, F. (2003). Evidence of *Leptospira interrogans* infection in Californian sea lion pups in the gulf of California. J. Wildl. Dis. 39: 145-151

Adler, B., Cousins, D. V., Faine, S., Robertson, G. M. (1982). Bovine IgM and IgG response to *Leptospira interrogans* serovar Hardjo as measured by enzyme immunoassay. Vet. Microbio. 27: 577-585

Adler, H., Vonstein, S., Deplazes P., Stieger, C., Frei, R.: (2002). Prevalence of *Leptospira* spp. in various species of small mammals caught in an inner-city area in Switzerland. Epidemiol Infect. 128 (1): 107-109

Alexander, A. D., Lennette, E. H., Balows, A., Hausler, W. J., Shadomy, H. J. (1985). *Leptospira*. Manual of clinical microbiology 473-478

Alston, J. M., Broom, J. C. (1958). Leptospirosis in man and animals. E. & S. Livingstone, Edinburgh and London

Anderson, D. C., Geistfeld, J. G., Maetz, H. M., Patton, C. M., Kaufmann, A. F. (1978). Leptospirosis in zoo workers associated with bears. Am. J. Trop. Med. Hyg. 27 (1): 210-211

Anonym. (2006a). Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2004. www.rki.de; letzter Zugriff 28.03.2006

Anonym. (2006b). Aktuelle Statistik meldepflichtiger Infektionskrankheiten. Epidemiologisches Bulletin, 3: 26-28

Arambulo, P. V. 3rd, Topacio, T. M. Jr., Famatiga, E. G., Sarmiento, R. V., Lopez, S. (1972). Leptospirosis among abattoir employees, dog pound workers, and fish inspectors in the city of Manila. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 3 (2): 212-220

Arzouni, J. P., Parola, P., La Scola, B., Postic, D., Brouqui, P., Raoult, D. (2002). Human infection caused by *Leptospira fainei*. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 865-868

Babudieri, B. (1958). Animal reservoirs of Leptospire. *Ann. New York Acad. Sci.* 70: 427-444

Babudieri, B. and Farina, A. (1964). The *Leptospirae* of the Italian Hedge-Hog. *Path. Microbiol.* 27: 103-116

Baldwin, C. J. and Atkinson, C. E. (1987). Leptospirosis in dogs. *Comp. Cont. Ed. Pract. Vet.* 9, 499-508

Ball, M.G. (1966). Animal hosts of Leptospire in Kenya and Uganda. *Am. J. Trop. Med. & Hyg.* 15: 523-530

Barcellos, C., Sabroza, P. C. (2001). The place behind the case: leptospirosis risks and associated environmental conditions in a flood-related outbreak in Rio de Janeiro. *Cad. Saude. Publica.* 17: Suppl. 59-67

Barocchi, M. A., Ko, A.I., Ferrer, S.R., Faria, M.T., Reis, M.G. and Piple, L.W. (2001). Identification of new repetitive element in *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni and its application to PCR-based differentiation of *Leptospira* Serogroups; *J. Clin. Microbiol.* 39: 191-195

Bauerfeind, R. (2006). Persönliche Mitteilungen

Becker, K. (1978). *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) – Wanderratte. In: **Niethammer, Krapp (Hrsg.)** (1978). *Handbuch der Säugetiere Europas, Band 1, Nagetiere I*, Akademischer Verlag, Wiesbaden

Birnbaum, S., Shenberg, E., Torten, M. (1972). The influence of maternal antibodies on the epidemiology of leptospiral carrier state in mice. *Am. J. Epidemiol.* 96: 313-317

Black, P. F., Conrey, B.G., Smythe, L. D., Dohnt, M. F., Norris, M. A. and Symonds, M. L. (2001). Prevalence of antibodies to *Leptospira* serovars in beef cattle in central Queensland. Aust. Vet. J. 79: 344-348

Blackmore, D. K., Schollum, L. M., Moriarty, K. M. (1984). The magnitude and duration of titres of leptospiral agglutinins in human sera. New Zealand Med. J. 97: 83-86

BMELV (2006). Statistik über meldepflichtige Tierkrankheiten 1985 – 2004. Persönliche Mitteilung Frau Meller, Bundesministerium für Verbraucherschutz Ernährung und Landwirtschaft am 12.12.2005.

Böhme, W. (1978). *Apodemus agrarius* (Pallas 1771) – Brandmaus. In: **Niethammer, Krapp (Hrsg.)** (1978). Handbuch der Säugetiere Europas, Band 1, Nagetiere I, Akademischer Verlag, Wiesbaden

Bolin, C. A. (2003). Leptospirosis. In: **Fowler (Hrsg.)** (2003). Zoo and wild animal medicine. Elsevier Science, USA

Bolin, C. A., Zuerner, R. L., Trueba, G. (1989). Comparison of three techniques to detect *Leptospira interrogans* serovar Hardjo type Hardjo-bovis in bovine urine. Am. J. Vet. Res. 50: 1001-1003

Bolin, C. A. and Alt, D. P. (2001). Use of a monovalent leptospiral vaccine to prevent renal colonisation and urinary shedding in cattle exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. Am. J. Vet. Res. 62 (7): 995-1000

Brack, M. (1998). Zoonoses of nonhuman primates – A review. Verh. Ber. Erkr. Zootiere 40: 25-41

Braun, J. L., McCulloch, W. F., Top, F. H. (1964). Further observations on the epidemiology of Leptospirosis in Iowa. 1. Case occurring among abattoir employees. Zoonoses Res. 65:39-46

Brem, S., Grabner, A., Hänichen, T., Kopp, H., Meyer, P. (1992). Leptospireninfektion (*Leptospira grippotyphosa*) als Ursache einer hämolytischen Anämie bei einem Pferd. Pferdeheilkunde 8 (5): 297-301

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

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

Brunnell, J. E. , Hice, C.L., Watts, D.M., Montrueil, V., Tesh, R.B., Vinetz, J.M. (2000). Detection of pathogenic *Leptospira* spp. infections among mammals captured in the Peruvian Amazon basin region. Am. J. Trop Med Hyg. 63 (5-6): 255-258

Calle, P.P., Rivas, J. Munoz, M., Thorbjarnarson, J., Holmstrom, W., Karesh, W. (2001). Infectious diseases serologic survey in free-ranging Venezuelan anacondas (*Eunectes murinus*). J. Zoo. Wildl. Med. 32 (3): 320-323

Chernukcha, Y. G., Ananyina, Y. G., Zenkovitch, N. S. (1974). Pathogenicity of Leptospirens of various serological types for some species of wild rodents. Zentralbl. Bacteriol. 228: 388-359

Cho, M K., Kee, S. H., Song, H. J., Kim, K. H., Song, K. H., Beak, L. J., Kim, H. H., Oh, H. B., Kim, Y. W., Chang, W. H. (1998). Infection rate of *Leptospira interrogans* in the field rodent, *Apodemus agrarius*, in Korea. Epidemiol. Infect 1212 (3): 685-690

Christensen, N. O. (1963). Some observations on diseases in Carnivores in the Copenhagen Zoo. Verh. Ber. Erkg. Zootiere 89: 46-55

Clark, L. G., Kresse, J. I., Carbrey, E. A., Marshak, R. R., Hollister, C. J. (1961). Leptospirosis in cattle and wildlife on a Pennsylvania farm. J. Am. Vet. Med. Assoc. 139 (8): 889-891

Clark, L. G. Kresse, J. I., Marshak, R. R., Hollister, C. J. (1962). *Leptospira grippothyosa* infections in cattle and wildlife in Pennsylvania. J. Am. Vet. Med. Assoc. 141: 710-712

Colagross-Schouten, A. M., Mazet, J. A., Gulland, F. M., Miller, M. A., Hietals, S. (2002). Diagnosis and seroprevalence of leptospirosis in Californian sea lions from the coastal California. *J. Wildl. Dis.* 38: 7-17

Costa, E., Lopes, A. A., Sacramento, E., Santos, P. A (2000). Massive ocular haemorrhage resulting in blindness in a patient with the sickle cell trait who developed leptospirosis. Case report. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 42 (5): 287-289

Costa, E., Sacramento, E., Lopes, A. A., Bina, J. C. (2001). Facial nerve palsy associated with leptospirosis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 34 (2): 219-220

Cumberland, P., Everard, C. O., Levett, P. N. (1999). Assessment of the efficacy of an IgM-elisa and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61: 731-734

Daher, E. F. and Nogueira, C. B. (2000). Evaluation of penicillin therapy in patients with leptospirosis and acute renal failure. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 42 (6): 327-332

Dahme, E. and Weiss, E. (Hrsg.) (1999). Grundriß der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere, Enke, Stuttgart

Dedek, J. Leptospirosen. In: **Dedek, J. und Steineck, T. (Hrsg.)** (1994). Wildhygiene. Gustav Fischer, Stuttgart

Dedie, K., Bockemühl, J., Kühn, H., Volkmer, K. J., Weinke, T. (1993). Leptospirosen. In: Bakterielle Zoonosen bei Tier und Mensch. Enke, Stuttgart

Deutz, A., Fuchs, K., Hinterdorfer, F. und Schuller, W. (1996). Serologische Untersuchung von Tierärzten auf Zoonosen. 1. Mitteilung: Grunddaten und Seroprävalenzen gegenüber bakteriellen Zoonosen. *Wien. Tierärztl. Mschr.* 83: 283-288

Deutz, A. und Köfer, J. (1999). Schwein und Wildschwein als Träger von Zoonosen. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 112: 305-310

Diesch, S. L., McCulloch, W. F., Braun, J. L., Ellinghausen, H. C. Jr. (1966). Leptospire isolated from frog kidneys. *Nature* 209: 939-940

Dikken, H. and Kmety, K. Serological typing methods of leptospire, p 259-307. In **Bergan, T. and Norris, J.R. (ed.)** (1978). *Methods in Microbiology*, Vol. 11. Academic Press, London, U.K.

Dura, E. U. (1994). Vergleichende Untersuchung von ELISA, Mikroagglutination und Immunfluoreszenztest zum Nachweis von Antikörpern gegen Leptospiren. Dissertation an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Ebani, V. V., Cerri, D., Fratini, F., Rizzo, E., Poli, A., Andreani, E. (2003). *Leptospira* and *brucella* seroprevalence in hares (*Lepus europaeus*, Pallas) in district of Pisa (Italy). *Verh. Ber. Erkr. Zootiere* 41: 221-223

Elbers, A. R., Vecht, U., Osterhaus, A. D., Groen, J., Wisselink, H. J., Diepersloot, R. J., Tielen, M. J. (1999). Low prevalence of antibodies against the zoonotic agents *Brucella abortus*, *Leptospira* spp., *Streptococcus suis* serotype II, hantavirus, and lymphocytic choriomeningitis virus among veterinarians and pig farmers in the southern part of The Netherlands. *Vet Q.* 21 (2):50-54

Ellis, A. W., O'Brien, J. J., Cassels, J. (1981). Role of cattle in the maintenance of *leptospira interrogans* Hardjo infection in Northern Ireland. *Vet. Rec.* 108: 555-557

Ellis, W. A., O'Brien, J. J., Neill, S. D., Hamma, J. (1982). Bovine leptospirosis: serological findings in aborting cows. *Vet. Rec.* 110: 178-180

Ellis, W. A. (1984). The diagnosis of leptospirosis in farm animals. pp. 13-24 In: **Ellis, W. A., Little, T. W. A., eds.** (1986). *The present state of leptospirosis diagnosis and control.*, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster

Ellis, W., Thiermann, A., Marschall, R. (1986). Genotypes of *Leptospira hardjo* and their role in clinical disease. *Proc. 14 Wld. Congr. Dis. Cattle*, Vol. II. Dublin: 966-970

Emanuel, M. L., MacKerras, I. M., Smith, D. J. (1964). The epidemiology of leptospirosis in North Queensland. I. General surgery of animal hosts. *J. Hyg. (Lond)* 62: 451-484

Eskens, U., Kugel, B., Hamann, H.P. und Zschöck, M. (1999). Infektiöse Erkrankungen von Hasenartigen und Nagern. *Verh. Ber. Erkr. Zootiere* 39: 221-239

Espi, A., Prieto, J. M., Fernandez, M., Alvarez, M. (2000). Serological prevalence to six leptospiral serovars in cattle in Asturias (Northern Spain). *Epidemiol. Infect.* 124 (3): 599-602

Evans, L.B. (1962). Natural occurrence of *Leptospira icterohaemorrhagiae* in an Opossum. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 110: 113-115

Evarard, J. D. and Evarard, C. O. R. (1993). Leptospirosis in the Caribbean. *Rev. Med. Microbiol.* 4: 114-122

Everard, C. O. R. and Bennett, S. (1990). Persistence of leptospiral agglutinins in Trinidadian survey subjects. *Eur. J. Epidemiol.* 6: 40-44

Faber, N. A., Crawford, M., LeFebvre, R.B., Buyukmihci, N. C., Madigan, J. E., Willits, N. H. (2000). Detection of *Leptospira* spp. in the Aqueous Humor of Horses with Naturally Acquired Recurrent Uveitis. *J. Clin. Microbiol.* 38 (7): 2731-2733

Faine, S. (1982). Guidelines for the control of Leptospirosis. World Health Organization, Geneva

Faine, S. (1994). *Leptospira* and Leptospirosis. CRC Press, Boca Raton Ann Arbor, London, Tokyo

Faine, S., Adler, B., Bolin, C., Perolat, P. (2000). *Leptospira* and Leptospirosis. Medical Science, Melbourne, Australia

Fear, F. A., Pinkerton, M. E., Cline, J. A., Krienwaldt, F., Kalter, S. S. (1968). A Leptospirosis outbreak in a baboon (*Papio spec.*) colony. *Lab. Anim. Care* 18: 22-28

Fennestad, K.L. and Borg-Petersen, C. (1972). Leptospirosis in Danish wild mammals. *J. Wildl. Dis.* 8: 343-351

Fischer, J., Markus, R., Baumgarten, R., Fengler, J. D., Bartke, D. (1982). Die Leptospirose – ein Fallbericht. *Z. Aeztl. Fortbildung* 76: 641-644

Freudiger, U., Grünbaum, E.-G., Schimke, E. (Hrsg.) (1997). Klinik der Hundekrankheiten. Enke, Stuttgart

Friedrich, K. (2004). Persönliche Mitteilungen

Frolka, J. (1986). Erfahrungen beim im Zoo gehaltenen Schabrackentapir (*Tapirus indicus*) und Flachlandtapir (*Tapirus terrestris*). Verh. ber. Erkg. Zootiere 28: 189-193

Füzi, M. und Csoka, R. (1963). Serologische Untersuchungen auf Leptospirose unter Affen. Zschr. Immun. Allerg. forsch. 125: 246-252

Gabrisch, K. Frettchen und Marder. In: **Gabrisch, K. und Zwart, P. (Hrsg.)** (1998). Krankheiten der Heimtiere. Schlütersche Verlagsbuchhandlung, Hannover

Gabrisch, K. und Gass, H. Skunk. In: **Gabrisch, K. und Zwart, P. (Hrsg.)**. (1998). Krankheiten der Heimtiere. Schlütersche Verlagsbuchhandlung, Hannover

Gerritsen, M. J., Koopmans, M. J., Petersen, D., Olyhoek, T. (1994). Sheep as maintenance host for *Leptospira interrogans* serovar Hardjo subtype hardjobovis. Am. J. Vet. Res. 55 (9): 1232-1237

Gerritsen, M. J., Olyhoek, T., Smith, M. A., Bokhout, B. A. (1991). Sample preparation method for polymerase chain reaction-based semiquantitative detection of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo subtype Hardjobovis in bovine urine. J. Clin. Microbiol. 29: 2805-2808

Geßler, H., Reißhauer, K., Thurn, M. (1987). Vorkommen und Bedeutung von Leptospirenantikörpern bei Rindern in Südwürttemberg. Tierärztl. Umsch. 42: 405-408

Gessmann, P. (2002). persönliche Mitteilung

Göltenboth, R. und Klös, H. G. (Hrsg.) (1995). Krankheiten der Zoo- und Wildtiere. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin

Guitian, F. J., Garcia-Pena, F. J., Oliveira J., Sanjuan M. L., Yus E. (2001). Serological study of the frequency of leptospiral infections among dairy cows in farms with suboptimal reproductive efficiency in Galicia, Spain. Vet. Microbiol. 80: 275-284

Guitian, J., Thurmond, M. C., Hietala, S. K. (1999). Infertility and abortion among first-lactation dairy cows seropositive or seronegative for *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. J. Am. Vet. Med. Assoc. 215 (4): 515-518

Gravenkamp, C., Van de Kemp, H., Franzen, M., Carrington, D., Schoone, G. J., Van Eys, G. J., Everard, C. O., Hartskeerl, R. A., Trepstra, W. J. (1993). Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. J. Gen. Microbiol. 139 (Pt 8): 1691-1700

Grzimek, B. (Hrsg.). (1989). Grzimeks Enzyklopädie der Säugetiere. Registerband. Kindler Verlag, München

Haditsch, M. (2002) Leptospirosis, flood-related – Austria (<http://www.promedmain.org>, letzter Zugriff am 17.09.2002)

Hahn, H., Falke, D., Kaufmann, S. H. E., Ullmann, U. (1999). Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

Häfeli, W. (2002). Persönliche Mitteilung

Hänichen, T., Hegel, G. v., Breuer, W., Brem, S. (1992). Beobachtungen anlässlich einer Leptospirose-Epizootie bei Maras (*Dolichotis patagonium*) und Europäischen Wölfen (*Canis lupus*). Verh. Ber. Erkr. Zootiere 34: 143-150

Hänichen, T., Wisser, J., Wanke, R. (2001). Chronic tubulointerstitial nephropathy in six okapis (*Okapia johnstoni*) J. Zoo Wildl. Med. 32 (4): 459-464

Hartman, E.G. and Broekhuizen, U. (1980). Antibodies to *Leptospira* in European Hares (*Lepus europaeus* Pallas) in the Netherlands. Zbl. Vet. Med. B. 27: 640-649

Hatheway, S. and Little, T. (1983). Epidemiological study of *Leptospira* Hardjo infection in second calf dairy cows. Vet. Rec. 109: 215-218

Hayden, J. (2000). Leptospirosis control in UK pigs. Vet. Rec. 147 (20): 584

Heinemann, M. B., Garcia, J. F., Nunes, C. M., Gregori, F., Moraes Higa, Z. M., Arruda Vasconcellos, S., Richtzenhain, L. J. (2000). Detection and differentiation of *Leptospira* spp. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Vet. Microbiol.* 73: 261-267

Herweg, C. und Küpper, W. Die Gefährdung des Tierhalters durch Heimtiere (Zoonosen) in **Gabrisch, K. und Zwart, P. (Hrsg.)** (1998). *Krankheiten der Heimtiere*. Schlütersche Verlagsbuchhandlung, Hannover

Hoag, W. G., Gochenour, W. S. J., Yager, R. H. (1953). Use of baby chicks for isolation of leptospire. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 83 : 712-713

Hodges, R. T. and Ris, D. R. (1974). Complement fixing and agglutinating antibody response and Leptospirosis in calves inoculated with *leptospira* serotypes Pomona, Hardjo, Copenhageni or Ballum. *N. Z. Vet. J.* 22: 25-30

Hookey, J, V, (1992). Detection of *Leptospiraceae* by amplication of 16S ribosomal DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 69: 267-274

Horsch, F. (1980). Leptospirosen. In: *Infektionskrankheiten der Haustiere*, 2. Auflage. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena: 665-684

Horsch, F., Klockermann, J., Janetzky, B., Drechser, H., Löbnitz, P. (1970). Untersuchung von Wildtieren auf Leptospirose. *Mh. Vet.-Med.* 25: 634-639

Hübner, A. und Horsch, F. (1977). Untersuchung zum Leptospirosegeschehen unter den heimischen Wildtieren. *Mh. Vet.-Med.* 32 175-177

Jentsch, K. D., Schröder, H. D., Karasek, E. (1969). Beitrag zum Vorkommen von Zooanthroponosen bei Zootieren. *Verh. Ber. Erkg. Zootiere* 11: 7-17

Johnson, P. Jr. and Morter, R. (1969). A natural outbreak of Leptospirosis in a Monkey colony. *Verh. Ber. Erkg. Zootiere* 11: 69-72

Johnson, R. C. and Faine, S. *Leptospira*, p. 62-67. In **Krieg, N. R. and Holt, J.G. (ed.)**. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol.1. Williams & Wilkins, Baltimore

Jucker-Voss, M., Prosl, H., Lussy, H., Enzenberg, U., Auer, H., Lassnig, H., Müller, M., Nowotny, N. (2004). Screening for antibodies against zoonotic agents among employees of the Zoological Garden of Vienna, Schonbrunn, Austria. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 117 (9-10):404-9

Kadlec, V. (1983). Antibodies to *leptospirae* in zoo animals in German Democratic Republic. Fol. Parasit. (Praha) 30: 9-13

Kathe, J., Mochmann, H. Leptospiren und Leptospirosen, Teil I und II. In **Bieling et al. (Hrsg.)** (1967). Infektionskrankheiten und ihre Erreger. Fischer, Jena

Kee, S. H., Kim, I-S., Choi, M-S. and Chang, W-H. (1994). Detection of leptospiral DNA by PCR. J. Clin. Microbiol. 32 (4): 1035-1039

Kemenes, F. und Fabian, L. (1986). Untersuchung zur Empfänglichkeit der Feldmaus (*Microtus arvalis*) für *Leptospira interrogans* Serovar Pomona. Verh.ber. Erkr. Zootiere 28: 333-339

Kimmig, P. und Oehme, R. (2002): unveröffentlichte Daten; persönliche Mitteilung

Kingscote, B. F. (1985). Leptospirosis in two veterinarians. C. M. A. J. 1; 133 (9): 879-880

Klaasen, H., Molkenboer, M., Vrijenhoek, M., Kaashoek, M. (2003). Duration of immunity in dogs vaccinated against leptospirosis with a bivalent vaccine. Vet. Microbiol. 95: 121-132

Kmety, E. (1955). Leptospiroseherde in der Slowakei. Zbl. Bakt. I. Orig. 163: 464-476

Kmety, E. and Dikken, H. (1960). Classification of the species *Leptospira interrogans* and history of its serovars. University Press Groningen, Groningen, The Netherlands

Knorr, H. L. J. und Weber, A. (1992). Über okuläre Manifestationen ausgewählter Zoonosen beim Menschen. Tierärztl. Praxis 20: 347-354

Ko, A. I., Galvao Reis, M., Ribeiro-dourado, C.M., Johnson, W.D., Riley, L.W. (1999). Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group, Lancet 354: 820-825

Kohm, A. (1988). Tod eines Eisbärenbabys infolge einer Leptospiren-Infektion. Verh. Ber. Erkr. Zootiere 30: 297-300

Kositantont, U., Naigowit, P., Imvithaya, A., Sigchai, C., Puthanavathana, P. (2003). Prevalence of antibodies to *Leptospira* serovars in rodents and shrews trapped in low and high endemic areas in Thailand. J. Med. Assoc. Thai. 86 (2): 136-142

Krauss, H., Weber, B., Enders, B., Schiefer, H. G., Slenczka, W., Zander, H. (1997). Zoonose. Von Tier zu Mensch übertragbare Infektionskrankheiten. 2. überarbeitete und erweiterte Auflage. Dt. Ärzte-Verlag, Köln

Kraus, R. (2004). Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2003. Robert-Koch-Institut, Berlin

Krieg, N. R. and Holt, J.G. (ed.) (1984). Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol.1. Williams & Wilkins, Baltimore

Kuriakose, M., Eapen, C.K., Paul, R. (1997). Leptospirosis in Kolenchery, Kerala, India: epidemiology, prevalent local serogroups and serovars and a new serovar, Eur. J. Epidemiol 13: 691-697

Labelle, P., Mikaelian, I., Martineau, D., Beaudin, S., Blanchette, N., Lafond, R., St-Onge, S. (2000). Seroprevalence of leptospirosis in lynx and bobcats from Quebec. Can. Vet. J. 41 (4): 319-320

Legel, S. (Hrsg.) (1990). Nutztiere der Tropen und Subtropen, Band 2, Hirzel Verlag, Leipzig

Leonard, F. C., Quinn, P. J., Ellis, W. A., O'Farrell, K. (1992). Duration of urinary excretion of leptospire by cattle naturally or experimentally infected with *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. Vet. Rec. 131: 435-439

Levett, P. (2001). Leptospirosis. Clin. Microbiol. Rev. 14: 296-326

Lilenbaum, W., Monteiro, R.V., Ristow, P., Fraguas, S., Cardos, V. S., Fedullo, L. P. L. (2002). Leptospirosis antibodies in mammals from Rio de Janeiro Zoo, Brasil. Res. Vet. Sci. 73 :319-321

Lucchesi, P. M. A., Parma, A. E., Arroyo, G. H. (2002). Serovar distribution of a DNA sequence involved in the antigenic relationship between *Leptospira* and equine cornea. BMC. Microbiol. 2: 3

Luyven, G. und Parvanta M. F. (1988). Beitrag zur Bedeutung des kulturellen Nachweises von Leptospiren bei verschiedenen Säugetierarten. Tierärztl. Umsch. 43: 384-391

Maltzan, J. G. (2002). Persönliche Mitteilung

Marcus, L. L. (1983). Amphibien und Reptilien in Heim, Labor und Zoo. Enke Verlag, Stuttgart

Margulis, L., Sagan, D. (1999). Leben : Vom Ursprung zur Vielfalt. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

Marschall, R. B. (1992). Subcommittee on the Taxonomy of *leptospira*. Minutes of the meeting, 13 and 15 September 1990. Int. J. Syst. Bacteriol. 42 : 330-334

McNamara, T., Linn, M., Calle, P., Cook, R., Karesh, W., Raphael, B. (1999). Leptospirosis : an under-reported disease in zoo animals ? Verh. Ber. Erkr. Zootiere 39: 185-188

Merien, F., Amouriaux, P., Baranto, G., Saint Girons, I. (1992). Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. J. Clin. Microbiol. 30: 2219-2224

Mettler, F. und Weilenmann, H. (1974). *Leptospira icterohaemorrhagiae*-Enzootie bei Kanadischen Bibern (*Castor canadensis*). Verh.ber. Erkr. Zootier 16: 201-205

Mikaelian, I., Higgins, R., Lequent, M., Major, M., Lefebure, F., Martineau, D. (1997). Leptospirosis in racoons in Quebec: 2 case reports and seroprevalence in a recreational area. Can. Vet. J. 38: 440-442

Miller, R. E., Boever, W. J. (1982). Fatal hemolytic anemia in the black rhinoceros: case report and a survey. J. Am. Vet. Med. Assoc. 181: 1228-1231

Miller, R. E. (2003). Chapter 55, Rhinocerotidae. In : **Fowler, M.** Zoo and wildlife medicine. Elsevier Science, St. Louis

Minette, H. P. (1964). Leptospirosis in rodents and mongooses on the island of Hawaii. Am. J. Trop. Med. Hyg. 13: 826-832

Minette, H. P. (1966). Leptospirosis in primates other than man. Am. J. Trop. Med. Hyg. 15: 190-198

Minette, H. P. (1983). Leptospirosis in poikilothermic vertebrates. A review. Int. J. Zoonoses 10: 111-121

Mochmann, H. Leptospiren. In: **Brüschke (Hrsg.)** (1983). Handbuch der Inneren Erkrankungen. Bd. V, Fischer, Jena

Montali, R. J. (1999). Important aspects of zoonotic diseases in zoo and wildlife species. Verh. Ber. Erkr. Zootiere 39: 149-155

Montali, R. J. and Kelly, K. (1989). Pathologic survey and review of diseases of captive maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) and bush dogs (*Speothos venaticus*). Verh. Ber. Erkr. Zootiere 31: 35-43

Morse, E. V., Allen, V., Worley, G. Jr. (1955). Brucellosis and leptospirosis serological test results on serums of Wisconsin veterinarians. J. Am. Vet. Med. Assoc. 126(934): 59

Neiffer, D.L., Klein, E.C., Wallace-Switalski, C. (2001). *Leptospira* infection in two black rhinoceroses (*Diceros bicornis*, Michaeli) J. Zoo. Wildl. Med. 32 (4): 476-486

Niethammer, J. und Krapp, F. (Hrsg) (1982). Handbuch der Säugetiere Europas, Band 2/1 Nagetiere II, Akademische Verlagsgesellschaft, Wiesbaden

OIE-Manual 2000 (01.02.06). Chapter 2.2.4. Leptospirosis. (Internet)

http://www.oie.int/hs2/sit_mald_freq_pl.asp?cont=6&c_mald=24, Letzter Zugriff am 29.03.2006

Okazaki, W. and Ringen, L. M. (1957). Some Effects of various environment conditions on the survival of *Leptospira Pomona*. Am. J. vet. Res. 18: 219-223

Ottolenghi, A. (12 Feb 2003). Leptospirosis – Ecuador (Manabi). El Comercio (quito) (<http://www.promedmail.org>, letzter Zugriff am 17.09.2002)

Pappas, M. G., Ballou, W. R., Gray, M. R., Takafuji, E. T., Miller, R. N., Hockmeyer, W. T. (1985). Rapid serodiagnosis of Leptospirosis using the IgM-specific Dot-ELISA: Comparison with the Microscopic Agglutination Test. Am. J. Trop. Med. Hyg. 34 (2): 346-354

Parnas, J. (1959). Zur Leptospirose auf dem Lande in der Lubliner Gegend. Arch. Exp. Vet. Med. 13: 171-284

Parnas, J. und Weber A. (1989). Zoonosen durch jagdbares Wild. VET 2: 16-21

Perolat, P., Chappel, R. J., Adler, B., Baranton, G., Bulach, D. M., Billinghurst, M. L., Letocart, M., Merien, F., Serrano, M. S. (1998). *Leptospira fainei* sp. Nov., isplated from pigs in Australia. Int. J. Bacteriol. 48 (3): 851-658

Pete, G. E., Horgan M. C., FitzSimon N., Mellotte G. J. (1989). A review of the epidemiology of leptospirosis in the Republic of Ireland. Ir. Med. J. 93: (4) 114-117

Planc, R., Dean, D. (2000). Overview of the epidemiology, microbiology and pathogenesis of *Leptospira* in humans. Microbes and Infection 2: 1265-1276

Plasa, L. (2003). Persönliche Mitteilung

Plesko, I., Hruzik, J., Janovicova, E., Savari, K. (1966). On the problem of occupational leptospiroses in employees of the Slovak meat industry. Prac. Lek. 18 (5): 201-206

Plesko, I., Janovicova, E., Lac, J. (1964). Beitrag zur Bedeutung von Kaltblütern für die Zirkulation der Leptospiren in der Natur. Zbl. Bakt. I. Orig. 192: 482-484

Poley, D. (1993). Berichte aus der Arche. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Quinn, P. J., Markey, B. K., Carter, M. E., Donnelly, W. J., Leonard, F. C. (2002). *Veterinary Microbiology and Microbial Diseases*. Blackwell Science, London.

Rama, P., Jarvis, B. D., Corner, R. J., Penny, D., Marschall, R. B. (1992). Genetic characterization of pathogenic *Leptospira* species by DNA hybridization. *Int. J. Bacteriol.* 42: 215-219

Rathinam, S. R., Namperumalsamy, P., Emmett, T., Cunningham, Jr. (2000). Spontaneous cataract absorption in patients with leptospiral uveitis. *Br. J. Ophthalmol.* 84: 1135-1141

Ratnam, S. (1994). Leptospirosis: an Indian perspective. *Indian J. Med. Microbiol.* 12: 228-239

Reinhard, K. R. (1953). *Parasitological Reviews: Newer knowledge of leptospirosis in the United States.* *Exp. Parasitol.* 2: 87-115

Rietschel, W. (1991). Erfahrungen bei der Immobilisation von Primaten. Verhandlungsbericht 11. Arbeitstagung der Zootierärzte im deutschsprachigen Raum, Stuttgart: 142-143

Rietschel, W. (1998). Zoonoses in primates in zoological gardens (including zoo-staff). *Verh. Ber. Erkr. Zootiere* 40: 71-84

Rietschel, W. (2002). persönliche Mitteilungen

Robertson, M. H., Clarke, I. R., Coghan, J. D., Gill, O. N. (1981). Leptospirosis in trout farmers. *Lancet.* 19: 626-627

Rolle, M. und Mayer, T. (2002). *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. Enke Verlag, Stuttgart

Romero, E. C., Billerbeck A. E., Lando V. S., Camargo E. D., Souza C. C., Yasuda P. H. (1998). Detection of *Leptospira* DNA in patients with aseptic meningitis by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 36 (5): 1453-1455

Roth, E. E. (1964). Leptospirosis in wildlife in the United States. Proc.101st Ann. Meeting Am. Med. Assoc.: 211-218

Roth, E. E., Adams, W. V., Sanford, G. E., Greer, B., Newman, K., Moore, M. Mayeux, P. and D. Linder (1963). The bacteriologic and serologic incidence of leptospirosis among striped skunks in Louisiana. Zoonoses Res. 2: 13-19

Rudland, S. V. (1989). Leptospirosis. Do you consider the diagnosis? J. R. Nav. Med. Serv. 75, 143-146

Sassenburg, L. Degu. In: **Gabrisch, K. und Zwart, P.** (1998). Krankheiten der Heimtiere, Schlütersche Verlagsanstalt, Hannover

Savio, M. L., Rossi, C., Fusi, P., Tagliabue, S., Pacciarini, M. L. (1994). Detection and identification of *Leptospira interrogans* serovars by PCR coupled with restriction endonuclease analysis of amplified DNA. J. Clin. Microbiol. 32: 935-941

Schallibaum, R. (1967). Examination of employees of the abbatoir. (A study from the abattoir in St. Gallen). Schweiz. Arch. Tierheilkd. 106(5): 269-272

Schnurrenberger, P. R., Hanson, L. E., Martin, R. J. (1978). Infections with *Erysipelothrix*, *Leptospira*, and *Chlamydia* in Illinois veterinarians. Int. J. Zoonoses 5(1): 55-61

Schönberg, A. (1984). Diagnostik bei Leptospiren. Zbl. Bakt. Hyg. A 258: 480-491

Schönberg, A., Staak C., Kämpfe U. (1987). Leptospirose in der Bundesrepublik Deutschland. J. Vet. Med. 34: 96-108

Schröder, H. D. (1975). Zur Leptospirose bei Zoo- und Wildtieren. Verh. Ber. Erkg. Zootiere 17: 95-103

Schröder, H. D. (1990). Zur Bedeutung bakterieller Zoonosen bei Wildtieren in Menschenhand. Verh. Ber. Erkg. Zootiere 32: 165-179

Schröder, H. D. (1999). Zum gegenwärtigen Stand der bakteriellen Zoonosen bei Zootieren. Verh. Ber. Erkg. Zootiere 39: 177-180

Schwarz, E. (1960). Classification, origin and distribution of commensal rats. Bull. World Health Organ 23: 411-416

Sebek, Z. and Rosicky, B. (1975). Distribution and biotic structure of leptospirosis foci in some European countries. Zbl. Bakt. Orig. A 233: 380-399

Sebek, Z., Mikulica, V., Valova, M. (1986). Zur Leptospirose der exotischen Tiere in zoologischen Gärten. Mh. Vet. Med. 41: 571-576

Segura, E. R., Ganoza, C. A., Campos, K., Ricaldi, J. N., Torres, S., Silva, H., Cespedes, M. J., Mathias, M. A., Swancutt, M. A., Lopez Linan, R., Gotuzzo, E., Guerra, H., Gilman, R. H., Vinetz, J. M.; Peru-United States Leptospirosis Consortium. (2005). Clinical spectrum of pulmonary involvement in leptospirosis in a region of endemity. With quantification of leptospiral burden. Clin. Infect. Dis. 40: 343-351

Selbitz, H. J. und Bisping, W. (1995). Tierseuchen und Zoonosen: alte und neue Herausforderungen. Gustav Fischer Verlag, Jena

Shive, R. J., Green, S. S., Evans, L. B., Garner, F. M. (1969). Leptospirosis in Barbary apes (*Macaca sylvana*). J. Am. Med. Vet. Assoc. 155: 1176-1178

Shotts, E., Andrews, C.L., Harvey, T.W. (1975). Leptospirosis in selected wild mammals of the Florida Panhandle and Southwestern Georgia. J. Am. Med. Assoc. 167: 587-589

Simon, M. C., Ortega, C., Alonso, J. L., Girones, O., Muzquiz, J., Garcia, J. (1999). Risk factors associated with the seroprevalence of leptospirosis among students at the veterinary school of Zaragoza University. Vet. Rec. 144 (11): 287-291

Simpson, F. G., Green, K. A., Haug, G. J., Brooks, D. L. (1998). Leptospirosis associated with severe pulmonary haemorrhage in Far North Queensland, Med. J. Aust. 169: 151-153

Smith, D. C. (1979). From extracellular to intracellular: The establishment of a symbiosis. Proc. Royal Soc. 204: 115-130

Smyth, J. A., Fitzpatrick, D. A., Ellisd, W. A. (1999). Stillbirth/perinatal weak calf syndrome: a study of calves infected with *Leptospira*. Vet. Rec. 145 (19): 539-542

Smythe, L. D., Field, H. E., Barnett, L. J., Smith, C. S., Dohnt, M. F., Symonds, M. L., Moore, M. R., Rolfe, P. F. (2002). Leptospiral antibodies in flying foxes in Australia. *J. Wildl. Dis.* 38 (1): 182-186

Smythe, L. D., Smith, I. L., Smith, G. A., Dohnt, M. F., Symonds, M. L., Barnett, L. J., McKay, D. B. (2002). A quantitative PCR (*TaqMan*) assay for pathogenic *Leptospira* spp. *BMC Inf. Diseases*, 2: 13-19

Sperber, S. J. und Schleupner, C. J. (1989). Leptospirosis: a forgotten cause of aseptic meningitis and multisystem febrile illness. *South. Med. J.* 82: 1285-1288

Stahlheim, O. *Leptospira*. in: **H. Bobel, Schliesser, T. (Hrsg.)** (1985). *Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren*. Bd. V, Fischer, Jena

Stallmann, N. I. C. o. S. B. (1984). Subcommittee on the taxonomy of *Leptospira*. Minutes of the meeting, 6 to 10 August 1982, Boston, Massachusetts. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34 : 258-259

Steffen, I., Frei, R., Widmer, A. F. (2000). Leptospirose: eine oft verpasste Diagnose? Epidemiologie und Diagnostik in der Schweiz. *Schweiz. Rundsch. Med. Prax.* 89 (31-32): 1257-1262

Steger-Lieb, A., Gerber, B., Nicolet, J., Gaschen, F. (1999). Eine alte Krankheit mit neuem Gesicht: Die Hundeleptospirose verliert nicht an Aktualität. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 141 (11): 499-507

Stephan, C., Hunfeld, K.P., Schönberg, A., Ott, M.G., Hatzenecker, M., Bitzer, R., Just-Nübling, G. (2000). Leptospirose-Erkrankungen nach einem Betriebsausflug. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 125 (20): 623-627

Sting, R. (2004). Persönliche Mitteilung.

Straube, M. (2002). Erste Ergebnisse der Untersuchung zum Vorkommen von Leptospiren in Tierbeständen zoologischer Gärten. 22. Arbeitstagung der Zootierärzte im Deutschsprachigen Raum München

Straube, M. (2004). Unveröffentlichte Daten.

Straube, M. (2006). Unveröffentlichte Daten.

Straube, M., Rietschel, W., Bauerfeind, R. (2003). Epidemiology of leptospirosis in zoo-animals. Examinations in Central European zoological gardens. Verh. Ber. Erkr. Zootiere 41: 419

Straube, M., Bauerfeind, R., Friedrich, K., Rietschel, W. (2004). Epidemiologie und Diagnostik der Leptospirose in Tierparks und Zoos. Dt. Vet. Med. Gesellschaft: ZWE-Tagung 2004: 95-99

Sunbul, M., Esen, S., Leblebicioglu, H., Hokelek, M., Pekbay, A., Eroglu, C. (2001). *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. 33 (12): 896-898

Surujballi, O. and Mallory, M. (2001). Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for detection of *Leptospira interrogans* serovar Pomona antibodies in bovine sera. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 8 (1): 40-43

Terpstra, W. J., Ligthart, G. S., Schoone, G. J. (1980). Serodiagnosis of human leptospirosis by enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA). Zentralbl. Bakteriologie A 247: 400-405

Terpstra, W. (2003). Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. World Health Organisation, Geneva

Terry, J., Trent, M., Bartlett, M. (2000). A cluster of leptospirosis among abattoir workers. Commun. Dis. Intell. 24 (6): 158-160

Thiermann, A. B. (1984). Isolation of Leptospire in diagnosis of leptospirosis. Mod. Vet. Pract. 65 (10): 758-759

Torten, M.: Leptospirosis. In: (1979). CRC Handbook Series in Zoonoses. Vol. I. CRC Press, Boca Raton

Truccolo, J., Serais, O., Merien, F., Perolat, P. (2001). Following the course of leptospirosis: evidence of a critical threshold for the vital prognosis using a quantitative PCR assay. FEMS Microbiology Letters 204: 317-321

Tschirch, W., und Jorga, W. (1986). Leptospirose bei Bärenmakaken (*Macaca arctoides*). Verh. Ber. Erkr. Zootiere 29: 261-262

Twigg, G. I., Cuerden, C. M., Hughes, D. M., Medhurst, P. (1969). The Leptospirosis reservoir in British wild mammals. Vet. Rec.27: 424-426

Van der Hoeden, J. (1966). Leptospiral antibodies in cold blooded animals. Ann. Soc. Belge. Med. trop. 46: 171-172

Vinetz, J. M., Glass G. E., Flexner C. E., Mueller P., Kaslow C. D. (1996). Sporadic urban leptospirosis. Ann. Intern. Med. 1255: 794-798

Wagenaar, J. A., Segers, R. P., Van der Zeijst, B. A. (1994). Rapid and specific detection of pathogenic *Leptospira* species by amplication of ribosomal sequences. Mol. Biotechnol. 2: 1-14

Wagenaar, J., Zuerner R. L., Alt D., Bolin C. A. (2000). 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. 63 (3): 316-320

Waldmann, K. H., Wendt, M. (2001). Lehrbuch der Schweinekrankheiten. Parey Buchverlag, Berlin

Ward, T. G. and Turner, T. B. (1942). Study of certain epidemiological features of leptospiral jaundice in Baltimore. Am. J. Hyg. 35: 122-133

Weber, A., Weber, G., Krauss, H. (1994). Evaluation of the slide agglutination test for detection of leptospiral antibodies in serum samples of slaughter pigs. Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. (A) 257: 498-500

Weber, A. (1987). Leptospirose – Eine häufig unerkannte Infektionskrankheit bei Mensch und Tier. VET 2 (7/8): 20-25

Weber, A. und Christoph, H. (1981). Serologische Untersuchung zum Vorkommen von Leptospirosen bei Schalenwild in der Bundesrepublik Deutschland. Zeitschrift für Jagdwissenschaft 27: 283-287

Weber, A., Paulsen, J. und Krauss, H. (1978). Seroepidemiologische Untersuchungen zum Vorkommen von Infektionskrankheiten bei einheimischen Schalenwild. *Prakt. Tierarzt* 59: 353-357

Wenz, M., Gorissen, B., Wieshammer, S. (2001). Weil's syndrome with bone marrow involvement after collecting walnuts. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 126 (41): 1132-1135

Wesche, P., Wallis, T. und Steward, P. (2002). Outbreak of *Yersinia pseudotuberculosis* infection in callitrichid monkeys causing fatalities and subsequent interventions with an emergency vaccine. *Verh. Ber. Erkr. Zootiere* 42: 253-255

White, F. H. (1963). Leptospiral agglutinins in snake serums. *Am. J. Vet. Res.* 24: 179-182

Wilson, I. G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environm. Microbiol.* 63 : 3741-3751

Wilbert, R., Delorme, M. (1927). Sur une spirochetose ictero-hémorragique du chimpanzé transmissible à l'homme. *Ann. Inst. Pasteur.* 41 : 1139-1155

Woo, T.H., Smyth, L. D., Symonds, M. L., Norris, M. A., Dohnt, M. F., Patel, B. K. (1997). Rapid distinction between *Leptospira interrogans* and *Leptospira biflexa* by PCR amplification of 23S ribosomal DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 150: 9-18

Woodward, M. J., Sullivan, G. J., Palmer, N. N., Woolley, J. C., Redstone, J. S. (1991). Development of a PCR test specific for *Leptospira Hardjo* genotype bovis. *Vet. Rec.* 128: 282-283

Yasuda, P. H., Steigerwalt, A. G., Sulzer, K. R., Kaufmann, A. F., Rogers, F., Brenner, D. J. (1987). Desoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with proposals for seven new *Leptospira* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37 : 407-415

Zwart, P. und Treiber, A.: Gerbil. In: **Gabrisch, K. und Zwart, P. (Hrsg.)** (1998). *Krankheiten der Heimtiere.* Schlütersche Verlagsgesellschaft, Hannover

Zuelzer, M. (1918). Beiträge zur Morphologie und Entwicklung der Weilschen Spirochaete. Arbeiten der Kaiserlichen Gesellschaft A 51: 159-179

Zuerner, R., Alt, D. and Bolin, C. (1995). IS1533-based PCR assay for identification of *Leptospira interrogans* sensu lato serovars. J. Clin. Microbiol. 33 (1): 3284-3289

Anhang

Nährmedien zur Anzucht von Leptospiren

Medium	Substanz	Menge	Bezugsquelle
EMJH-Grundmedium	Na ₂ HPO ₄	1 g	Difco Laboratories
	KH ₂ PO ₄	0,3 g	
	NaCl	1 g	
	NH ₄ Cl	0,25 g	
	Thiamin	0,005 g	
EMJH-Enrichment	Rinderserumalbumin	10,0 g	Difco Laboratories
	CaCl ₂ +H ₂ O	0,01 g	
	MgCl ₂ *6H ₂ O	0,01 g	
	ZnSO ₄ *7 H ₂ O	0,004 g	
	CuSO ₄ *5 H ₂ O	0,0003 g	
	FeSO ₄ *6 H ₂ O	0,05 g	
	Vitamin B12	0,0002 g	
	Tween 80	1,25 g	
Glycerol	0,1 g		
In 80 ml Aqua bidest. auflösen			

Reagenzien

Reagenz	Bezugsquelle
5-Fluorouracil	Sigma
10x Puffer mit EDTA	Applied Biosystems
100 Base-Pair Ladder	Amersham Biosciences
Ampli Taq® DNA Polymerase	Applied Biosystems
Big Dye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing RP-100	Applied Biosystems
Big Dye® Sequencing Buffer	Applied Biosystems
Borsäure	Merck
Diethylpyrocarbonat (DEP)	Fluka
EDTA	Merck
Ethanol absolut	Merck
Ethidiumbromidlösung	Merck
Ficoll	Biochrom KG Seromed®
Guanidinthiocyanat	Fluka
HCl (25 %ig)	Merck

Reagenz	Bezugsquelle
MgCl ₂	Merck
NaCl	Merck
Nukleasefreies Wasser	Promega
PeqGOLD Universal Agarose	Peqlab
Performance Optimized Polymer 6 (POP-6)	Applied Biosystems
Proteinase-K-Lösung	Roche Diagnostics GmbH
SDS	Merck
SiO ₂ -Partikel (0,5-10 µm Durchmesser)	Sigma
Template Suppression Reagent	Applied Biosystems
Taq-DNA-Polymerase	Promega
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Merck
Triton X-100	Sigma

Kits

Kit	Bezugsquelle
Qiaquick [®] PCR Purification Kit	Qiagen
DyeEx [™] 2.0 Spin Kit	Qiagen

Lösungen

Lösung	Substanz	Menge
Lysispuffer (LP)	Guanidiniumisothiocyanat	120 g
	0,1 M Tris Cl, pH 6,4	100 ml
	EDTA, pH 8,0	22 ml
	Triton X-100	2,6 g
Waschpuffer (WP)	Guanidiniumisothiocyanat	120 g
	0,1 M Tris, pH 6,4	100 ml
Digestionspuffer	Tris-HCl (pH 7,5)	10 mM
	EDTA (pH 8,0)	10 mM
	NaCl	50 mM
	SDS (pH 7,5)	2 %
	Mit H ₂ O auf das gewünschte Endvolumen auffüllen	

Lösung	Substanz	Menge
TBE-Puffer (5x)	Tris	161,7 g
	Borsäure	85,5 g
	0,5 M EDTA	60 ml
		ad 3 l H ₂ O
DEP-Wasser (Gebrauchslösung)	10 %ige Stammlösung in Ethanol 1:100 mit H ₂ O _{bidest} (steril) verdünnen	
0,1M Tris-HCl-Lösung (pH 6,49)	Tris	12,11 g
	DEP-Gebrauchslösung	800 ml
	HCl (25 %ig)	auf pH 6,4 ± 0,1 einstellen
	DEP-Gebrauchslösung	auf 1 l auffüllen

Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
Duran Glasflaschen mit Deckel	Schott
Einmalpipettenspitzen gestopft	Biozym
Einmalpipettenspitzen ungestopft	Eppendorf
Einwegpipetten (1 ml)	Greiner
Einmalhandschuhe	Asid BONZ
Impfösen	Nunc
Mikroplatten (96-er well)	Greiner
Objektträger	Langenbruch Emmendingen
PCR-Gefäße (0,2 ml)	Biozym
Einmalreagenzgläser (Glas)	Assistent
Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml)	Eppendorf
Sequenziergefäße	Applied Biosystems
Spritzen (2 ml; 5 ml)	Neojekt
Sterilfilter für Spritzen (FP 30/0,45 CA-S)	Schleicher & Schuell
Testplatten	Schütt Labortechnik

Geräte

Gerät	Bezugsquelle
ABI Prism® 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Brutschrank B5042	Heraeus
Bunsenbrenner	Wartwig Labor- und Dentaltechnik, Göttingen
Eismaschine AF 80 ASE 230/50/1	Scotsman AF-80
Elektrophoresekammer Gene Power Supply GPS 200 / 400	Amersham Bioscience
Geldokumentationssystem GNA 100	LTF
GeneQuant RNA/DNA Calculator	Amersham Bioscience
Hybridisierungssofen 400HY-E	Bachofer
Kühlschränke	Liebherr
Kühlzentrifugen 5402	Eppendorf
Rotorformat F-45-18-11 für 18 Reaktionsgefäße	Eppendorf
Kühlzentrifuge 5804R	Eppendorf
Rotorformat FA-45-30-11 für 30 Reaktionsgefäße	Eppendorf
Magnetrührer	IKH-Werke
Netzteil für Elektrophorese	Amersham Bioscience
Pipetten	Eppendorf
Reinraumwerkbank 1732	Heraeus
Reinstwasseranlage (MILLY-Q water purifications System)	Millipore Corporation
Sterilbank Klasse 2	BDK
Thermocycler: GeneAmp® PCR System 2400 GeneAmp® PCR System 9700	Applied Biosystems
Tiefkühler (-20 °C; -70 °C) HERAFreeze	Heraeus
Tischzentrifuge 5402	Eppendorf
Vortex MS1 Minishaker	Heidolph, IKA-Werke
Waage, Typ W-PM 2000	Mettler
Wasserbäder	GFL
Zentrifuge (COMBIFUGE®) Typ 1613+1800	Heraeus
Winkelrotor Nr. 715	Heraeus

Tabelle 25:

Systematik der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Tierarten (nach Grzimek, 1989)

Klasse Amphibien (*Amphibia*)**Ordnung Froschlurche (*Anura*)**Familie Laubfrösche (*Hylidae*)Spezies: Krötenlaubfrosch (*Phrynohyas venulosa*)**Klasse Reptilien (*Reptilia*)****Ordnung Schildkröten (*Testudines*)**Familie Landschildkröten (*Testudinidae*)Spezies: Riesenschildkröte (*Testudo elephantopus*)Griechische Landschildkröte (*Testudo hermanni*)**Ordnung Krokodile (*Crocodylia*)**Familie Krokodile (*Crocodylidae*)Spezies: Australienkrokodil (*Crocodylus johnsoni*)**Ordnung Echsen (*Sauria*)**Familie Leguane (*Iguanidae*)Spezies: Nashornleguan (*Cyclura cornuta*)**Ordnung Schlangen (*Serpentes*)**Familie Riesenschlangen (*Boidae*)Spezies: Abgottschlange (*Boa constrictor*)Tigerpython (*Python molurus bivittatus*)**Klasse Vögel (*Aves*)****Ordnung Straußenvögel (*Rheiformes*)**Familie Nandus (*Rheidae*)Spezies: Nandu (*Rhea americana*)**Ordnung Pinguine (*Sphenisciformes*)**Familie Pinguine (*Spheniscidae*)Spezies: Brillenpinguin (*Spheniscus demersus*)**Ordnung Schreitvögel (*Ciconiiformes*)**Familie Reiher (*Ardeidae*)Spezies: Graureiher (*Ardea cinerea*)Seidenreiher (*Egretta garzetta*)Kuhreiher (*Bubulcus ibis*)Familie Störche (*Ciconiidae*)Spezies: Weißstorch (*Ciconia ciconia*)Familie Ibisvögel (*Threskiornithidae*)Spezies: Löffler (*Platalea leucorodia*)**Ordnung Flamingos (*Phoenicopteriformes*)**Familie Flamingos (*Phoenicopteridae*)Spezies: Flamingo (*Phoenicopterus spec.*)**Ordnung Entenvögel (*Anseriformes*)**Familie Enten (*Anatidae*)Spezies: Höckerschwan (*Cygnus olor*)Witwenpfeifgans (*Dendrocygna viduata*)Eiderente (*Somateria mollissima*)Brandgans (*Tadorna tadorna*)Fortsetzung **Tabelle 23** auf der nächsten Seite

Fortsetzung **Tabelle 23**

Ordnung Hühnervögel (*Galliformes*)Familie Hühner (*Phasianidae*)Spezies: Bankiva-Huhn (*Gallus gallus*)Leghorn Huhn (*Gallus gallus* f. *domestica*)Sebright-Huhn (*Gallus gallus* f. *domestica*)Pute (*Meleagris gallopavo* f. *domestica*)Pfau (*Parvo cristatus*)**Ordnung Kranichvögel (*Gruiformes*)**Familie Rallenvögel (*Rallidae*)Spezies: Bläßhuhn (*Fulica atra*)Teichhuhn (*Gallinula chloropus*)Familie Kraniche (*Gruidae*)Spezies: Kronenkranich (*Balearica pavonima*)Klunkerkranich (*Bugeranus carunculatus*)**Ordnung Taubenvögel (*Columbiformes*)**Familie Tauben (*Columbidae*)Spezies: Taube (*Columba livia* f. *domestica*)Schildtaube (*Columba livia* f. *domestica*)**Ordnung Sperlingsvögel (*Passeriformes*)**Familie Drosseln (*Turdidae*)Spezies: Amsel (*Turdus merula*)Familie Rabenvögel (*Corvidae*)Spezies: Rabenkrähe (*Corvus corone*)**Klasse Säugetiere (*Mammalia*)****Unterklasse Beutelsäuger (*Metatheria*)****Ordnung Beuteltiere (*Masupialia*)**Familie Känguruhs (*Macropodidae*)Spezies: Rotes Riesenkänguruh (*Macropus briviceps*)Bennettkänguruh (*Macropus rufigriseus*)**Unterklasse Plazentatiere (*Placentalia*)****Ordnung Insektenfresser (*Insektivora*)**Familie Igel (*Erinaceidae*)Spezies: Igel (*Erinaceus europaeus*)Familie Tanreks (*Tenrecidae*)Spezies: Großer Tanrek (*Tenrec ecaudatus*)Familie Spitzmäuse (*Soricidae*)Spezies: Waldspitzmaus (*Sorex araneus*)Hausspitzmaus (*Crocidura russula*)**Ordnung Rüsselspringer (*Macroscelidea*)**Familie Rüsselspringer (*Macrocelidae*)Spezies: Kurzohrrüsselspringer (*Macroscelides proboscideus*)**Ordnung Fledertiere (*Chiroptera*)**Familie Flughunde (*Pteropidae*)Spezies: Nilflughund (*Rousettus aegyptiacus*)Riesenflughund (*Pteropus giganteus*)Familie Neuwelt-Blattnasen (*Phyllostomidae*)Spezies: Brillen-Blattnase (*Carollia perspiculata*)

Fortsetzung **Tabelle 23**

-
- Familie Glattnasen (*Vespertilionidae*)
 - Spezies: Abendsegler (*Nyctalus noctula*)
 - Zweifarbflieger (*Vespertilio murinus*)
 - Zwergfledermaus (*Pipistrellus pipistrellus*)
 - Rauhhaufledermaus (*Pipistrellus nathusii*)
 - Braunes Langohr (*Plecotus auritus*)
 - Ordnung Spitzhörnchen (*Scandentia*)**
 - Familie Spitzhörnchen (*Tupaiaidae*)
 - Spezies: Tupaia (*Tupaia glis*)
 - Ordnung Herrentiere (*Primates*)**
 - Familie Lemuren (*Lemuridae*)
 - Spezies: Roter Vari (*Varecia variegata rubra*)
 - Familie Loriartige (*Lorisidae*)
 - Spezies : Plumplori (*Nycticebus coucang*)
 - Familie Kapuzinerartige (*Cebidae*)
 - Spezies: Schwarzer Brüllaffe (*Alouatta caraya*)
 - Goldstirn Klammeraffe (*Ateles belzebuth hybridus*)
 - Totenkopffäffchen (*Saimiri boliviensis*)
 - Familie Meerkatzenartige (*Cercopithecidae*)
 - Spezies: Grüne Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*)
 - Javaneraffe (*Macaca fascicularis*)
 - Japanmakak (*Macaca fuscata*)
 - Bartaffe (*Macaca silena*)
 - Drill (*Mandrillus leucocephalus*)
 - Mandrill (*Mandrillus spinx*)
 - Dschelada (*Theropithecus gelada*)
 - Familie Schlankaffen (*Colobidae*)
 - Spezies: Haubenlangur (*Trachypithecus a. auratus*)
 - Familie Kleine Menschenaffen (*Hylobatidae*)
 - Spezies: Weißhandgibbon (*Hylobates lar*)
 - Familie Große Menschenaffen (*Pongidae*)
 - Spezies: Orang Utan (*Pongo pygmaeus*)
 - Gorilla (*Gorilla gorilla*)
 - Bonobo (*Pan panisculus*)
 - Schimpanse (*Pan troglodytes*)
 - Ordnung Nagetiere (*Rodentia*)**
 - Familie Hörnchen (*Sciurinae*)
 - Spezies: Eichhörnchen (*Sciurus vulgaris*)
 - Familie Wühler (*Cricetidae*)
 - Spezies: Mongolische Rennmaus (*Meriones unguiculatus*)
 - Rennmaus (*Meriones unguiculatus*)
 - Rötelmaus (*Clethrionomys glareolus*)
 - Feldmaus (*Microtus arvalis*)
 - Wühlmaus (*Microtus spec.*)
 - Familie Echte Mäuse (*Muridae*)
 - Spezies: Gelbhalsmaus (*Apodemus flavicollis*)
 - Waldmaus (*Apodemus sylvaticus*)
 - Wanderratte (*Rattus norvegicus*)
-

Fortsetzung **Tabelle 23**

-
- Hausmaus (*Mus musculus*)
 - Futtermaus (*Mus musculus*)
 - Familie Bilche (*Gliridae*)
 - Spezies: Siebenschläfer (*Glis glis*)
 - Familie Stachelschweine (*Hystricidae*)
 - Spezies: Stachelschwein (*Hystrix indica*)
 - Familie (*Erithizontidae*)
 - Spezies: Greifstachler (*Coendu prehensilis*)
 - Familie Meerschweinchenartige (*Caviidae*)
 - Spezies: Mara (*Dolichotis patagonum*)
 - Meerschweinchen (*Cavia aperea* f. *porcellus*)
 - Familie Trugratten (*Octodontidae*)
 - Spezies: Degu (*Octodon degu*)
 - Familie Wasserschweinartige (*Hydrochoeridae*)
 - Spezies: Wasserschwein (*Hydrochoerus hydrochaeris*)
 - Familie Agutis (*Dasyproctidae*)
 - Spezies: Bergpaka (*Stictomys taczanowskii*)
 - Familie Chinchillas (*Chinchillidae*)
 - Spezies: Viscacha (*Lagostomus maximus*)
 - Familie Ferkelratten (*Capromyidae*)
 - Spezies: Kuba-Baumratte (*Capromys pilorides*)
 - Familie Biberratten (*Myocastoridae*)
 - Spezies: Nutria (*Myocastor coypus*)
 - Ordnung Fleischfresser (*Carnivora*)**
 - Familie Hundartige (*Canidae*)
 - Spezies: Mähnenwolf (*Chrysocyon brachyurus*)
 - Waldhund (*Speothos venaticus*)
 - Jack Russel Terrier (*Canis lupus* f. *familiaris*)
 - Rotfuchs (*Vulpes vulpes*)
 - Familie Marderartige (*Mustelidae*)
 - Spezies: Steinmarder (*Martes foina*)
 - Frettchen (*Mustela putorius*)
 - Familie Großbären (*Ursidae*)
 - Spezies: Brillenbär (*Tremarctos ornatus*)
 - Schwarzbär (*Ursus americanus*)
 - Braunbär (*Ursus arctos*)
 - Eisbär (*Ursus maritimus*)
 - Familie Schleichkatzen (*Viverridae*)
 - Spezies: Zeboramanguste (*Mungo mungo*)
 - Erdmännchen (*Suricata suricata*)
 - Familie Katzenartige (*Felidae*)
 - Spezies: Gepard (*Acinonyx jubatus*)
 - Serval (*Laptailurus serval*)
 - Tiger (*Panthera tigris*)
 - Sumatra-Tiger (*Panthera tigris sumatrae*)
 - Löwe (*Panthera leo*)
 - Jaguar (*Panthera onca*)
 - Persischer Leopard (*Panthera pardus saxicolor*)
 - Schneeleopard (*Uncia uncia*)
 - Puma (*Profelis concolor*)
 - Spezies: See-Elefant (*Mirounga leonina*)
-

Fortsetzung **Tabelle 23**

- Familie Ohrenrobben (*Otariidae*)
 Spezies: Kalifornischer Seelöwe (*Zalophus californicus*)
 Familie Hundсроbben (*Phocidae*)
- Ordnung Rüsseltiere (*Proboscidea*)**
 Familie Elefanten (*Elephantidae*)
 Spezies: Asiatischer Elefant (*Elephas maximus*)
- Ordnung Schliefer (*Hyracoidea*)**
 Familie Klippschliefer (*Procaviidae*)
 Spezies: Klippschliefer (*Procavia capensis*)
- Ordnung Unpaarhufer (*Perissodactyla*)**
 Familie Pferdeartige (*Equidae*)
 Spezies: Poitou-Esel (*Equus africanus* f. *asinus*)
 Zwergesel (*Equus africanus* f. *asinus*)
 Somali-Wildesel (*Equus africanus somalicus*)
 Grevyzebra (*Equus grevy*)
 Grantzebra (*Equus quagga boehmi*)
 Przewalskipferd (*Equus przewalskii*)
 Shetlandpony (*Equus przewalskii* f. *caballus*)
 Pony (*Equus przewalskii* f. *caballus*)
 Pferd (*Equus przewalskii* f. *caballus*)
 Kulan (*Equus hemionus kulan*)
 Onager (*Equus hemionus onager*)
- Familie Tapire (*Tapiridae*)
 Spezies: Schabrackentapir (*Tapirus indicus*)
 Bergtapir (*Tapirus pinchaque*)
- Familie Nashörner (*Rhinocerotidae*)
 Spezies: Indisches Panzernashorn (*Rhinoceros unicornis*)
- Ordnung Paarhufer (*Artiodactyla*)**
 Familie Schweine (*Suidae*)
 Spezies: Hirscheber (*Babyroussa babyroussa*)
 Warzenschwein (*Phacochoerus aethiopicus*)
 Wildschwein (*Sus scrofa*)
 Schwäbisch-Hällisches Schwein (*Sus scrofa* f. *domestica*)
- Familie Nabelschweine (*Tayassuidae*)
 Spezies: Halsbandpekari (*Tayassu tajacu*)
- Familie Kamele (*Camelidae*)
 Spezies: Alpaka / Lama (*Lama guanicoe* f. *glama*)
 Guanaco (*Lama guanicoe*)
 Vicugna (*Lama vicugna*)
- Familie Hirsche (*Cervidae*)
 Spezies: Mesopotamischer Damhirsch (*Dama dama mesopotamica*)
 Damhirsch (*Dama dama*)
 Milu (*Elaphus davidianus*)
 Elch (*Alces alces*)
- Familie Giraffen (*Giraffidae*)
 Spezies: Netzgiraffe (*Giraffa camelopardalis reticulatus*)
 Okapi (*Okapia johnstoni*)

Fortsetzung **Tabelle 23**

Familie Hornträger (*Bovidae*)Spezies: Blauducker (*Cephalophus monticola*)Mendesantilope (*Addax nasomaculatus*)Mähnspringer (*Ammotragus lervia*)Wisent (*Bison bison bonatus*)Limpurger Rind (*Bos primigenius* f. *taurus*)Hinterwälder Rind (*Bos primigenius* f. *taurus*)Anoa (*Bubalus depressicornis*)Takin (*Budorcas t. taxicolor*)Bezoarziege (*Capra aegagrus cretica*)Zwergziege (*Capra aegagrus* f. *hircus*)Ziege (*Capra aegagrus* f. *hircus*)Markhor (*Capra falconeri*)Steinbock (*Capra ibex ibex*)Bleißbock (*Damaliscus d. phillipsi*)Schneeziege (*Oreamnos americanus*)Oryxantilope (*Oryx gazella gazella*)Fettsteißschaf (*Ovis ammon* f. *aries*)Kamerunschaf (*Ovis ammon* f. *aries*)Skudde (*Ovis ammon* f. *aries*)Schaf (*Ovis ammon* f. *aries*)Mufflon (*Ovis ammon musimon*)Dallschaf (*Ovis dalli*)Nyala (*Tragelaphus angasi*)Bongo (*Tragelaphus euryceros*)Kleiner Kudu (*Tragelaphus imberbis*)Elenantilope (*Tragelaphus oryx*)**Ordnung Hasentiere (*Lagomorpha*)**Familie Hasenartige (*Leporidae*)Spezies: Feldhase (*Lepus europaeus*)Futterkaninchen (*Oryctolagus cuniculus* f.
domestica)

DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Dr. W. Rietschel für die Vergabe des Themas sowie für seine stets hervorragende fachliche und praktische Unterstützung, ohne die diese Arbeit kaum zustande gekommen wäre.

Herrn Prof. Dr. R. Bauerfeind danke ich besonders für die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit. Seine Anregungen, die stets konstruktive Kritik und Diskussionen mit ihm haben wesentlich zu dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. D. Jauch danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in der Wilhelma.

Der Grimminger-Stiftung für Zoonosenforschung gilt mein besonderer Dank für die finanzielle Förderung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. P. Kimmig danke ich für die großzügige Bereitstellung eines Laborplatzes in der Abteilung Mikrobiologie am Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg. Allen Mitarbeitern dieser Abteilung, besonders Herrn Dr. Rainer Oehme und Frau Dr. Kathrin Hartel, danke ich für das gute Arbeitsklima und die freundlich gewährten Hilfen.

Bei Herrn Dr. R. Sting möchte ich mich für seine Unterstützung und die Bereitstellung eines Laborplatzes in der Abteilung Serologie des Chemischen-und-Veterinär-Untersuchungsamts Stuttgart bedanken. Ein Dank für die gute Zusammenarbeit und die Hilfen sei auch an Herrn Tierarzt F. Wortberg und Frau R. Wolf sowie den anderen Mitarbeitern dieser Abteilung ausgesprochen.

Besonderen Dank schulde ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Wilhelma, die durch ihre tatkräftige Zusammenarbeit bei der Probennahme diese Arbeit wesentlich gefördert haben. Vor allem danke ich Frau E. Stark und den Mitarbeitern der Krankenstation für ihre Hilfsbereitschaft und das harmonische Arbeitsklima, sowie Herrn M. Rehmann, der darüber hinaus auch wertvolle „Fahrdienste“ leistete.

Den Tierparks im Leintal, Ulm, Pforzheim und Göppingen, dem Schwabenpark Welzheim, der Nymphaea Esslingen, dem Zoo Landau sowie dem Naturzoo Rheine, die Serumproben oder Nagetiere zur Verfügung gestellt haben, danke ich herzlich für ihre Hilfe.

Herr Dr. W. Rietschel und Frau Eva Stark haben sich die Mühe gemacht, diese Arbeit Korrektur zulesen. Dr. P. Rietschel hat die englische Zusammenfassung überprüft. Dafür herzlichen Dank!

Und schließlich danke ich meinen Eltern und Freunden dafür, dass sie Zuversicht vermittelt haben. Ohne ihre moralische Rückendeckung wäre mir diese Arbeit weitaus schwerer geworden.

Ich erkläre: Ich habe die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

