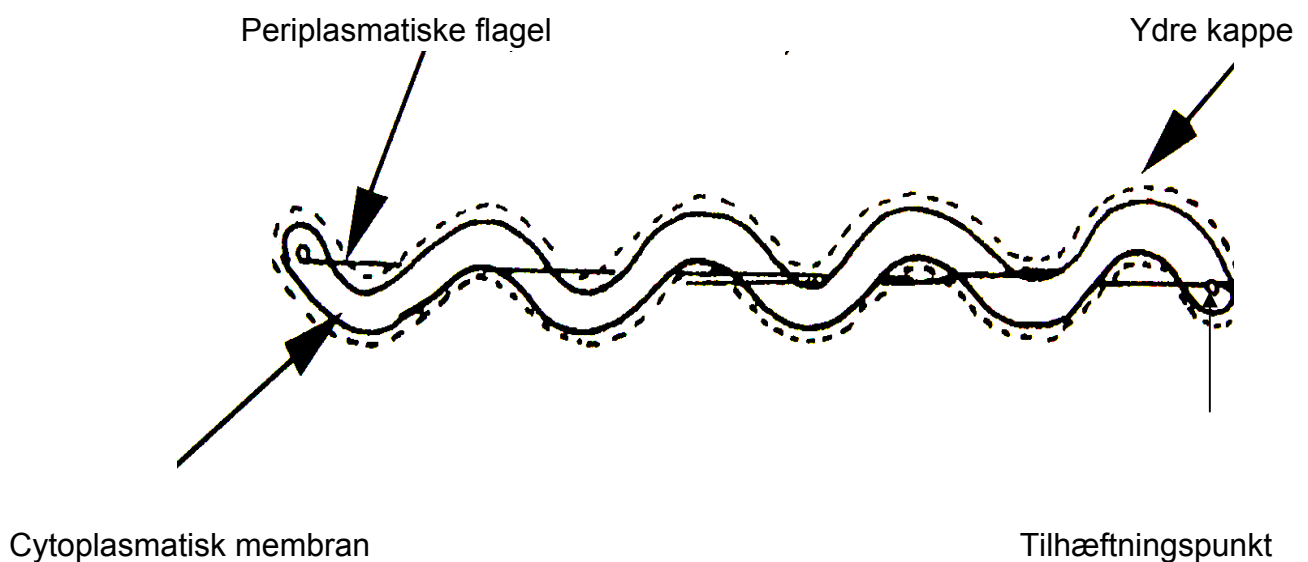


# Leptospirose hos hund; serologisk screening i Danmark 2005

## *Leptospira interrogans:*



Dyrlæge Michael Thorsen

Fagdyrlægekursus vedr. sygdomme hos hund og kat  
2003-2005  
Hovedopgave

## **Sammendrag:**

Der er stor usikkerhed om status af leptospirose hos hund i Danmark. Der er foretaget en screening af 128 hunde fordelt over landet. Ingen hunde er vaccineret i minimum 50 uger før blodprøveudtagningen, og alle har haft kontakt til overfladevand, som eks. mose, vandløb, enge med mere. Blandt de 128 hunde, har 9 hunde signifikant forhøjede titerværdier, svarende til 7,0 %. *L. icterohaemorrhagicae* og *L. sejroae* er hyppigst forekommende serovarer.

## **Indledning:**

Vaccinationsanbefalingerne er under en løbende revision i disse år. Leptospirose er blandt de sygdomme der vaccineres mod, men der er stor usikkerhed om forekomsten i Danmark, hvor sidste undersøgelse af leptospirose hos hund er fra 1960 (1). Ligeledes er der ikke aktuel viden, om hvilke serovarer som er aktuelle hos hund, og dermed om de tilgængelige vacciner er dækkende og om der på laboratorierne undersøges for relevante serovarer. I Danmark var leptospirose (serovar *L. icterohaemorrhagiae* og *L. canicola*) indeholdt i 88 % af de 291.000 solgte vacciner i år 2003 (2). I udlandet påvises andre serovarer i stigende grad (3,4), men der foreligger ingen undersøgelser om det er tilfældet i Danmark.

Denne undersøgelse har som formål:

- At undersøge forekomsten og bestemme prævalens af hunde med signifikant forhøjet titerværdi mod leptospirose i Danmark. Kravet til de undersøgte hunde er en særlig risiko gennem kontakt til overfladevand, herunder mose, vandløb, åer, enge og lignende (5).
- At undersøge hvilke serovarer som påvises.

## **Generelt:**

Leptospirose er en sygdom, fremkaldt af bakterier fra gruppen *Leptospira* som er udbredt over hele verden.

Leptospirose giver skade på nyrer og lever.

Kliniske symptomer på akut sygdom er uspecifikke, og omfatter oftest nedstemthed, anoreksi, opkast, polyuri/polydipsi, feber, diarre, (ofte blodig), ikterus og muskelsmerter (6,7,8). Leptospirose optræder oftest i sommer- og efterårsperioden (6, 9,10,11).

## **Zoonose:**

Det er en zoonose som, ud over smitterisiko i miljøet, giver risiko for smitte til ejere og personalet på klinikken. Ved mistanke bør der bruges handsker ved håndtering af både hunden og prøverne herfra (5,7).

## **Incidens i Danmark:**

Der findes ikke nutidige opgørelser for danske hunde. Historisk havde infektioner med påvisning af *L. canicola* (*L. can*) og *L. icterohaemorrhagiae* (*L. ict*) stor betydning i 1930'erne og 1940'erne (12). I 1940'erne blev fremstillet vaccine mod *L. can* som blev anvendt (12). Herefter faldt antallet af begge typer drastisk. Ved en undersøgelse blandt 897 hunde (1), var der følgende serologiske fund: *L. can*: 1,8 %, *L. ict*: 1,8 %, *L. sejroae* (*L. sej*): 11 %. Humant er der i perioden 1980-2002 blevet diagnosticeret 414 tilfælde i

Danmark, svarende til 18 pr år (10). Her udgør serotyperne *L. ict* og *L. sej* henholdsvis 26 % og 22 % af de humane tilfælde. Hos svin er diagnosticeret udbrud hos 10 besætninger i 2000 og 2001 med *L. pomona* (*L. pom*) (8 besætninger på Lolland), *L. tarassovi* og *L. bataviae* (13).

#### Incidens i udlandet:

Norge: Her har leptospirose historisk været en hyppigere diagnose end i dag: 6,5 % af undersøgte hunde ved Norges Veterinærhøjskole fik påvist leptospirose i perioden 1944-1946 (14). De sidste 20-30 år har der samlet været påvist 2 norske tilfælde, begge for nyligt (14).

Tyskland: En retrospektiv undersøgelse (11) fra 1999-2002 på 3671 hunde, viste at ca. 13 % havde høje titerværdier, og der var reaktioner for i alt 8 serovarer. En anden retrospektiv undersøgelse (15) fra to tyske områder i perioden 1985-1988 på 1401 hunde uden symptomer, viste titerværdi hos 49 %. Værdier for *L. ict* og *L. can* var generelt lave og blev tilskrevet vaccination. Prævalens-fordelingen viste at *L. grippotyphosa* (*L. grip*) og *L. bratislava* (*L. bra*) udgjorde 18 og 28 % samt *L. saxkoebing* (*L. sax*) 3 og 6 % i de to områder.

I Schweiz viste en undersøgelse fra 1999 på 50 hunde uden leptospirose-symptomer (16), at 34 % havde titer mod *L. grip*, *L. pom*, *L. bra*, *L. aust* og *L. ict*. 7 af 8 hunde med titerværdier på  $\geq 1:800$  havde aldrig været vaccineret.

I USA er vist en stigende incidens i perioden fra 1983 til 1998 og en øget risiko for hunde over 4 år i forhold til hunde under 1 år (9,17). I samme periode er set et skift, med øget påvisning af serovar *L. pom* og *L. grip* (18,19,20).

#### Om leptospira:

Leptospira er en langsomt voksende spirochæt der er vanskelig at dyrke (13,21,22).

Bakterien er spiralformet, bevægelig og med en ydre kappe af muco-peptider – se billede på forsiden (23). Denne kappe bærer de antigene egenskaber (24).

Optimale betingelser for vækst er fugtighed, 28-30° C og pH 7,2-7,6 (22). Leptospira tåler ikke indtørring, pH forskydninger fra neutralområdet, ultraviolet lys, frysning og sædvanlige desinfektionsmidler (22).

Vand, jord og slam, kontamineret med urin fra inficerede individer, kan indeholde infektiøse bakterier i måneder (7). Overlevelse i naturen kræver fugtige omgivelser i temperaturintervallet 10-45° C (13). Leptospira kan ikke overleve i havvand (10) og repliceres ikke i miljøet (7,24).

#### Inddeling af leptospira:

Gruppen af leptospira er opdelt i to arter. *L. biflexa* omfatter saprofytære non-patogene stammer. *L. interrogans* indeholder alle patogene stammer. Disse stammer inddeles serologisk i 30 serogrupper, som indeholder omkring 300 serovarer, baseret på antigen slægtskab (10,21,25).

Følgende serovarer/serogrupper er konstateret patogene for hund(hovedvært i parentes): *L. canicola* (hund), *L. icterohaemorrhagiae* (serovar *copenhageni*) (mus, rotte), *L. pomona* (kvæg, svin, brandmus), *L. grippotyphosa* (sydmarkmus, vaskebjørn), *L. hardjo* (kvæg), *L. autumnalis* (mus), og *L. bra* (serovar *australis*) (rotte, svin, hest, pindsvin), *L. ballum*, *L. bataviae*, *L. sejroe* (markmus) og *L. tarassovi* (7,13,14,26,27).

Infektion med leptospira: Hovedværten får oftest subklinisk infektion eller en let sygdom. Disse hovedværter udskiller en periode eller livslangt leptospirer til miljøet, hvorfra andre

dyr smittes (14,25). Disse hovedværter vedligeholder sygdommen. Bliver andre dyrearter end hovedværten smittet, bliver resultatet oftere en alvorlig sygdom.

Akut smittede dyr som ikke dør, kan blive kronisk inficerede. Leptospira har nyrernes tubuli som prædilektionssted, hvorfra de udskilles med urinen til miljøet. Denne renale carrier tilstand er nødvendig for at smitten kan spredes og vedligeholdes i miljøet. Det forklarer samtidig, at infektion med leptospira ofte resulterer i nyre-sygdom.

#### Smitteveje:

Der ses sjældent direkte smitte, som f.eks. transplacental og venerisk overførsel samt via fortæring af inficerede kadavere. Indirekte overførsel er reglen, og omfatter især kontakt til smittet overfladevand som brak- og kloakvand. Også jord, foder og liggemateriale er smitekilder. Særligt stillestående alkalisk vand favoriserer leptospira's overlevelse (5). I tempererede klimaer som Danmark tilhører, ses infektionerne oftest sommer og efterår, mens det i tropiske områder er over hele året (26).

Leptospira kan penetrere intakte mukøse membraner (5), men infektion sker oftest via defekter i huden (26).

#### Tilgængelige undersøgelsesmetoder for dyrlæger:

Leptospirose er en sjældent stillet diagnose. Den endegyldige diagnose sker ved isolering af bakterien. Dette er ikke praktisk muligt i den almindelige dyreklinik. Enkelte laboratorier tilbyder serologisk undersøgelse på serum ved en Mikroskopisk Agglutinations Test, MAT. Som noget nyt, er også undersøgelse ved PCR på blod og urin mulig. Begge tests har sine fordele og ulemper.

Denne undersøgelse anvender MAT. Den anses for at være reference-testen som andre tests vurderes op mod, og er den hyppigst anvendte test (25,28).

#### Beskrivelse af MAT:

Det er en serologisk test, som måler evnen hos IgG og IgM, til at binde levende leptospirer (29). MAT måler ikke kvantitativt IgG og IgM. Efter sammenblanding af serum med en defineret mængde levende leptospira af bestemt serovar-stamme, binder antistofferne de bevægelige leptospirer som herved bliver ubevægelige. Denne sammenklumpning kaldes en agglutination. I mikroskop bestemmes den højeste mulige fortynding hvor 50 % af den mulige agglutination finder sted. Fortyndingsgradens reciprokke værdi er titerværdien.

#### Om antistofferne og beskyttelse:

Efter 1. vaccination danner lymfocytterne IgM mod leptospirenes overfladeantigener (30).

Efter 2. vaccination, og senere ved infektion, dannes også IgG som kræver T-celle respons (30). IgM er store antistoffer med 10 bindingspunkter, hvor IgG har kun 1/5 størrelse af IgM og to bindingspunkter. IgM kobles derfor mere effektivt til leptospirerne, i forhold til IgG (29). Af denne grund ses ofte meget høje titerværdier kort efter infektion eller vaccination. IgM er mindre specialiseret end IgG og kan derfor lettere kobles til andre serovarer (29). Ved MAT ses derfor ofte reaktion for flere serovarer, kaldet krydsreaktion, kort tid efter smitte eller vaccination. IgG forbliver længere i dyret end IgM (30).

Der induceres ofte beskyttelse ved vaccination uden der kommer signifikante niveauer af de agglutinerende antistoffer (30). Den opnåede immunitet efter vaccination, er ikke relateret til titerværdien, så derfor er manglende titerværdi ikke et udtryk for manglende beskyttelse (31). Hunden vil stadig være beskyttet en periode efter titerværdien er faldet under påviselige niveauer (30).

### Fordelen ved MAT:

Testen kan påvise serotype og dermed kan den inducerende serovar identificeres. Titerværdi kan måles i en periode efter den akutte infektion. Der er generelt en god specificitet, som gør den velegnet til screening af en bestand som skal erklæres fri. Den foretages over hele verden og er den mest anvendte (25).

### Ulemper:

Testen er ikke i stand til at afgøre om titerværdien er en følge af vaccination eller infektion (25). Kronisk inficerede dyr kan have lave eller ingen titerværdi (32,33). Der ses krydsreaktion mellem serovarer, hvorved kan det være uklart, hvilken serovar som er årsag til infektionen.

Testen kan være negativ i op til 13 dage efter smitte (19). Der kan være smitte med anden serovar end de som der testes for (14). Tidlig behandling af sygdom med korrekt antibiotikabehandling nedsætter titerstigningen (3). Titerværdi kan blive lavere hvis den anvendte laboratoriestamme varierer fra den lokale serovar (21,35). Specificiteten angives at være høj da der ikke sker krydsreaktion med antigener mod andre bakterier men kun indenfor serogruppen (25). Der er ingen tilgængelig oplysning om værdien for sensitivitet og specificitet (35). Aflæsningen foretages af uddannet personale og beror på et personligt skøn. Af denne grund kan titerværdien variere med 1 titreringsgrad (27).

### Udvikling i titerværdi:

I en undersøgelse (19) kunne der måles titerværdi fra dag 5-13 efter naturlig infektion. Ved eksperimentel infektion (36) af 24 beagler med *L. bataviae*, blev målt højeste titerværdier 1:400 og 1:3200 ved MAT på dag 21-30. Efter 5 måneder var højest målte værdi på 1:200.

Titerværdier efter vaccination er blevet undersøgt (30,31). I det ene studie (30) blev der målt både MAT titerværdi, IgG og IgM på 8 uvaccinerede beagler som blev basisvaccineret to gange med 3 ugers mellemrum, og på 7 beagler som blev årligt revaccineret efter vaccination 1 og 2 år tidligere. Undersøgelsen viste at MAT-titerværdi for *L. can* efter basisvaccination forblev negativ, og titerværdi for *L. ict* blev negativ efter 13 uger. Ved årlig revaccination kunne der påvises titerværdi på *L. can* indtil 7 uger efter vaccination. Der var en langsomt faldende titerværdi mod *L. ict*, som nåede laveste titerværdi efter 52 uger. Det andet studie (31) viste at titerværdierne for *L. can* faldt til laveste niveau 1 år efter basisvaccination. For *L. ict* kunne der ikke påvises titerværdi 14 uger efter basisvaccination.

### Diagnose ud fra MAT:

I litteraturen angives forskellige måder diagnosen leptospirose kan stilles på: Ved en firefold stigning i titerværdi mellem måling i akutte stadie og igen 1-4 uger senere, kaldet serokonvertering (21,32). Ved titerværdi større end 1:800 på en ikke-vaccine serovar (26). Ved titerværdi over 1:800 på dyr med typiske laboratoriefund og kliniske symptomer, og som er blevet vaccineret mod denne serovar minimum 3 måneder forinden (11,34). Generelt angives at diagnosen leptospirose ikke kan stilles ud fra en høj titerværdi alene, men er betinget af relevante kliniske symptomer. Ved krydsreaktion antages den inficerende serovar generelt at være den serovar med højeste titerværdi, men det behøver ikke at være tilfældet (21,37). Er to titerværdier lige høje, nævnes de begge. Ved kronisk infektion, eller efter dyret er blevet rask, vil titerværdien gradvis falde og med tiden ses

ingen eller lav titerværdi (38). En undersøgelse (33) har påvist leptospirer i urinen hos 3 hunde som havde negativ titerværdi.

En human kilde (21) angiver at titer på  $\geq 1:100$  er tegn på tidligere eksponering. Når en serologisk diagnose for akut leptospirose skal stilles, kan man lade sin cut-off værdi afhænge af det titer-niveau som baggrunds-eksponeringen udgør i populationen (21). I endemisk smittede områder, vælges høj cut-off værdi ofte, f.eks. 1:800 (eksempelvis i mange tropiske områder) modsat områder hvor infektion er mindre almindelig, hvor den sættes lavere, eks. 1:200 (21). VML angiver at værdier på 1:100 og 1:200 ikke er diagnostisk, 1:400 og 1:800 er under mistanke og  $\geq 1:1600$  er signifikant forhøjet titer. Dog kan det teoretisk være muligt at måle titerværdier efter vaccination på op til 1:1 600 (35).

#### Signifikant forhøjet titerværdi:

De signifikante titerværdier er måleresultater som ligger over, hvad der kan forklares som følge af almindelig måleusikkerhed og indflydelsen fra vaccination. Denne undersøgelse skal ikke diagnosticere klinisk leptospirose, hvorfor titerværdierne skal tolkes anderledes. De undersøgte hunde som kan have været i kontakt med leptospirer, må antages ikke at være akut inficeret men i stedet være kronisk inficeret eller have en titerværdi som gradvis falder. Da der kan være stor tidsmæssig forskel i periode fra kontakt til leptospirer og indtil prøven udtages, vil der kunne forudses en spredning i målte titerværdier i denne gruppe. Valg af cut-off værdi i denne undersøgelse sættes til 1:400 for ikke-vaccinations serovarer og 1:800 for vaccinations serovarer.

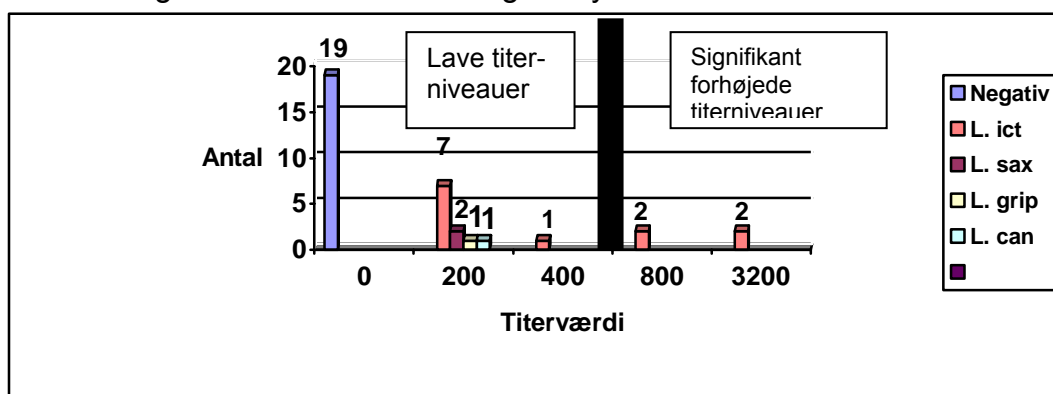
#### Præliminær undersøgelse:

Der er indhentet data fra VML og Danmarks Fødevarerforskning (DFVF) på indsendte prøver til undersøgelse for leptospirose ved MAT.

#### VML:

Titerværdier på  $\geq 1:800$  for vaccinationsserovarer vurderes som signifikant forhøjet, og  $\geq 1:400$  for andre serovarer. 35 prøver fra Danmark er undersøgt i 2004-2005.

Vaccinationsstatus og øvrige baggrundsoplysninger er ukendt. Der er undersøgt for mellem 9 og 11 serovarer. Der er ingen krydsreaktioner.



Figur 1: Påviste serovarer, titerværdier og antal for 35 indsendte prøver til VML i perioden 2004-2005 (39).

Der er i alt titer-reaktion på 16 prøver, svarende til 46 % (se figur 1). Der er 4 prøver på 1:800 og derover, svarende til at 11,4 % har signifikant forhøjede titerværdi. Der er i alt 2

prøver med titerværdi 1:3 200, svarende til 5,7 %. Alle titerværdier over 1:200 er reaktioner på *L. ict.*

Der er indhentet journaloplysninger på de to hunde med titerværdi på 3200, så deres kasuistikker kan fremlægges:

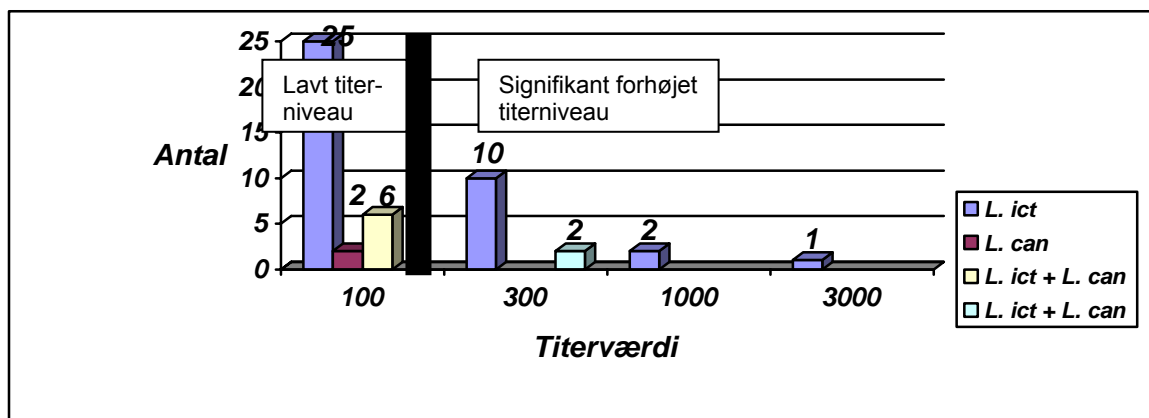
( se figur 1):

1. Juli 2004. Ruhåret hønsehund, han, alder 11 uger, aldrig vaccineret. Solgt fra Aarup til København. Er meget sløv og vil ikke spise. Ikterus, dehydreret, nedstemt, Temperatur 38,6. Blod: WBC 14,6, Hct: 36,5, Tbil: 166, BUN: 20, mistanke om leptospirose, serum undersøgt ved MAT på VML: titerværdi 1:3200 for *L. ict.* Terapi: betamox injektion, ændret til Ronaxan efter svar, bedring og udskrevet to dage efter. PCR på urin var negativ. Diagnose: leptospirose.
2. Oktober 2005. Blanding (bordercollieXgravhund), han, 9 år, ikke vaccineret i "mands minde" ifølge undersøgende. Har badet i Gudenå.  
30/9 2005: Symptomer: smerter, polydipsi, Temperatur: 38,8, røntgen iab., explorativ laparotomi påviste svulne lyse nyrer. Blod: BUN >50, crea: 554, serum til MAT undersøgelse for leptospirose ved VML. Væske- og antibiotikaterapi.  
4/10 2005: spiser pænt, BUN>50, crea: 577.  
6/10 2005: aflivning.  
10/10 2005: titerværdi 1:3 200 for *L. ict.* Diagnose akut leptospirose. Ingen yderligere undersøgelser mulig da hund er bortskaffet ved prøvesvar.

Blandt udleveret data fra VML, er MAT resultater på 344 tyske hunde som er undersøgt i 2004-2005. Der er i alt 28 prøvesvar med en titerværdi  $\geq 1:800$ , svarende til 8,1 %. 25 af de 28 hunde har reaktion for *L. ict.*

#### DFVF:

Der er undersøgt 698 prøver fra 1999-2005. Der er undersøgt for *L. can* og *L. ict.* Laboratoriet angiver at titerværdi 1:100 kan skyldes vaccinationsantistoffer. Titerværdi på  $\geq 1:300$  angives af DFVF som positiv resultat, hvorfor hunde med disse værdier antages at have signifikant forhøjede titerværdier. Det skal bemærkes at de fleste hunde det seneste år kun er undersøgt for *L. ict.*



Figur 2: Påviste serovarier, titerværdier og antal for 698 prøver indsendt til DFVF i perioden 1999-2005 (40).

Der er titer-værdi på 1:100 og mere hos 48 af 698 dyr, svarende til 6,9 %. Der er signifikant forhøjede titer på  $\geq 1:300$  hos 15, svarende til 2,1 %. Alle signifikante titerværdier bortset fra to, var for *L. ict.*

#### Estimering af prævalensen af hunde med signifikant forhøjede titerværdi i Danmark:

Denne præliminære undersøgelses resultater anvendes som basis, for at komme med det mest kvalificerede bud på en prævalens af hunde med signifikant forhøjede titerværdi. Dette estimat anvendes i afsnittet "metode", se senere, til beregning af den nødvendige stikprøvestørrelse i undersøgelsens hoveddel, den serologiske screening.

Der er en prævalens af signifikant forhøjede titerværdier på henholdsvis 2,1 % blandt de 734 hunde undersøgt på DFVF og 11,4 % blandt de 36 hunde undersøgt ved VML.

Gennemsnittet af de to tal er 6,75 %. Prævalensen for DFVF-data hviler på en større talmængde og en længere periode, og vægtes derfor tungere. Prævalensen på 8,1 % blandt tyske hunde tages med i vurderingen da Tyskland grænser op til Danmark, og dermed har et klima og en vildfauna som ligner Danmarks.

Prævalensen estimeres på denne baggrund til 5 %.

#### Materialer:

Den population som undersøges, kan defineres som primært jagthunde og andre hunde med kontakt til overfladevand, herunder mose, vandløb, åer, enge og lignende.

Eksklusionskriterium er alle hunde hvor der er mindre end 50 ugers afstand til sidste vaccination mod leptospirose.

I efteråret 2005, uge 39-43, udtog 21 klinikker i alt 128 blodprøver. Klinikkerne var fordelt med 36 prøver på Fyn, 33 prøver på Sjælland, 51 prøver i Jylland og 8 prøver på Lolland. Hver klinik udtog mellem 1 og 23 blodprøver. Dyr lægerne tog prøver af tilgængelige hunde som opfyldte kriterierne

Hver deltagende hunde blev på skema registreret med følgende:

Laboratorie-label med nummer, alder (opdelt i <2 år, 2-5, 5-12), køn, antal vaccinationer, periode siden sidste vaccination mod leptospirose, udtagelsesdato, landsdel, sygdom det seneste år (feber, opkast, diagnosticeret nyre/lever afvigelse).

Blodprøven bestod af 1 ml. serum som blev mærket med laboratorie-label fra VML og opbevaret ved  $-18^{\circ}$  C indtil afsendelsen. Label blev sat på ovennævnte skema og på rekvisitionsskema til VML. Alle prøver blev indsendt fra onsdag d. 26. oktober 2005.

#### Metode:

Undersøgelsen er en screening over de første tilgængelige hunde som opfylder kriterierne, ud fra anamnesticke oplysninger, Ingen hunde som opfylder betingelsen bliver udelukket hvis ejeren indvilliger i udtagningen af prøver.

Til beregning af stikprøvestørrelsen til prævalensberegning anvendes denne formel:

$$n = \frac{Z^2 P(1-P)}{L^2}$$

hvor

n= beregnet stikprøve størrelse

Z= bredden på konfidensintervallet ved 95 % = 1,96

P= estimeret prævalens= 5 % (se side 8)

L= acceptabel usikkerhed for estimat for prævalens=4 %



Den accepterede usikkerhed sættes til 4 %. Herved dækkes intervallet mellem 1 % og 9 %, med en sikkerhed på 95 % konfidensniveau.

Indsættes værdierne fås følgende stikprøvestørrelse:  $n = \frac{1,96^2 \times 0,05 \times (1 - 0,05)}{0,04 \times 0,04} = 114$  hunde

VML analyserede alle blodprøverne ved en mikro-agglutinationstest, MAT. Alle prøver (undtagen 3 som blev indsendt 1 uge før ved et tilfælde) blev undersøgt lige efter hinanden, for at nedsætte risiko for variation forårsaget af forskellig aflæsning af forskelligt personale. Hver serumprøve blev screenet initialt ved en fortynding på 200 mod levende leptospira-kulturer. Prøver med agglutination blev titreret videre ved fordobling indtil højeste titrering blev nået med 50 % agglutination.

Der er undersøgt for følgende 9 sero-varianter : *L. canicola*, *L. icterohaemorrhagicae* (*copenhageni*), *L. pomona*, *L. bratislava* (*australis*), *L. autumnalis*, *L. grippotyphosa*, *L. saxkoebing*, *L. sejerøe*, og *L. tarassovi*.

Værdierne fordobles ved hver fortynding og har derfor følgende mulige tal: 0 (negativ), 200, 400, 800, 1600, 3200, 6400 og så videre.

## **Resultater:**

Der er undersøgt 128 danske hunde i efteråret 2005 som alle indgik i risikogruppen. Racefordelingen er følgende: 57 retrievere, 28 hønsehunde og 18 spaniels. De øvrige 25 bestod af terrier, schæfere, collie, gravhunde, blandingsracer samt 5 ikke-raceangivende hunde. Der er undersøgt 72 hanhunde, 54 tævehunde og 2 havde ikke oplyst køn. Gennemsnitsalderen er 5,2 år.

Resultaterne ses i tabel 1 og i figur 3.

Der er i alt 57 hunde med titerværdi, svarende til 44,5 %.

Tabel 1: Titerværdier i forhold til serovarer (værdier med fed skrift er signifikant forhøjet)

Titer	Negativ	<i>L. ict</i>	<i>L. sej</i>	<i>L. grip</i>	<i>L. aut</i>	<i>L. sax</i>	Total
0	71						71
1:100		13	7	1		1	22
1:200		11	7				18
1:400		8	<b>4</b>	<b>1</b>			13
1:800		<b>2</b>					2
1:1 600		<b>1</b>			<b>1</b>		2
Total	71	35	18	2	1	1	128
Procent af positive		61,4	31,6	3,5	1,8	1,8	
Procent af alle prøver	55,5	27,3	14,1	1,6	0,8	0,8	

9 hunde har signifikant forhøjede titerværdier (sum af værdier med fed skrift i tabel 1). Prævalensen af hunde med signifikant forhøjede titerværdier er  $9/128 \times 100 \% = 7,0 \%$ . I alt har 55,5 % af hundene ingen titerværdi og dermed har 44,5 % af hundene titerværdi mod 1 eller flere serovarer.

Krydsreaktioner: Der er i alt 13 prøver med krydsreaktion: 11 prøver har titer 1:100. 9 af krydsreaktionerne er mellem *L. ict* og *L. sej*. Prøven med titerværdi 1:1 600 mod *L. aut* havde også krydsreaktion mod *L. can* (1:400) og *L. aust* (1:100). Prøven med titer mod *L. grip* (1:400) havde også krydsreaktion mod *L. pom* (1:200), *L. ict* (1:200) og *L. aut* (1:100).

Der er 9 hunde med angivet sygdom det seneste år, hvor ingen symptomer kan relateres til leptospirose. 3 af de 9 hunde havde titerværdi 1:100 eller 1:200, mens de øvrige 6 hunde havde negativ reaktion.

Tabel 2 viser fordelingen af titerværdier i forhold til antallet af vaccinationer. Hundene opdeles i 2 grupper: vaccination op til to gange og vaccination tre eller flere gange. Der er 12 hunde hvor vaccination ikke er foretaget, svarende til 9,4 %. 3 af hundene har en ikke-signifikant titerværdi og 9 hunde har negativt resultat. For 17 hunde var antal vaccinationer ikke oplyst, og ingen havde signifikant forhøjet titerværdi. De indgår derfor ikke i tabel 2. Der er 58 hunde som er vaccineret 3 eller flere gange. Af disse har 22 hunde ingen titerværdi. De fire hunde med titer 1:800 og 1:1 600 tilhører denne gruppe.

Tabel 2: Signifikant forhøjede titerværdier i forhold til antal af vaccinationer.

	Sign forhøjet titer	Øvrige, lave og nul værdier
Vaccineret $\geq 3$ gange	8	50
Vaccineret max.2 gange	1	52

Fichers exact test:  $P = 0,03$  og dermed signifikant på 95 % niveau. OR er 8,32 og intervallet for OR er mellem  $0,99 < OR < 183$ .

Fordelingen af titerværdier i forhold til afstanden til sidste vaccination er angivet for tre grupper: 72 hunde er i gruppen hvor vaccination er foretaget mellem 50 uger og  $1\frac{1}{2}$  år inden prøveudtagningen. 44 hunde er vaccineret mere end  $1\frac{1}{2}$  år forinden. 12 hunde er aldrig vaccineret.

Tabel 3: Signifikant forhøjede titerværdier i forhold til afstanden til sidste vaccination

	Sign. forhøjet titerværdi	Øvrige, lave og nul værdier
Vaccineret $< 1\frac{1}{2}$ år siden	6	66
Vaccineret $\geq 1\frac{1}{2}$ år siden	2	41
Aldrig vaccineret	1	12

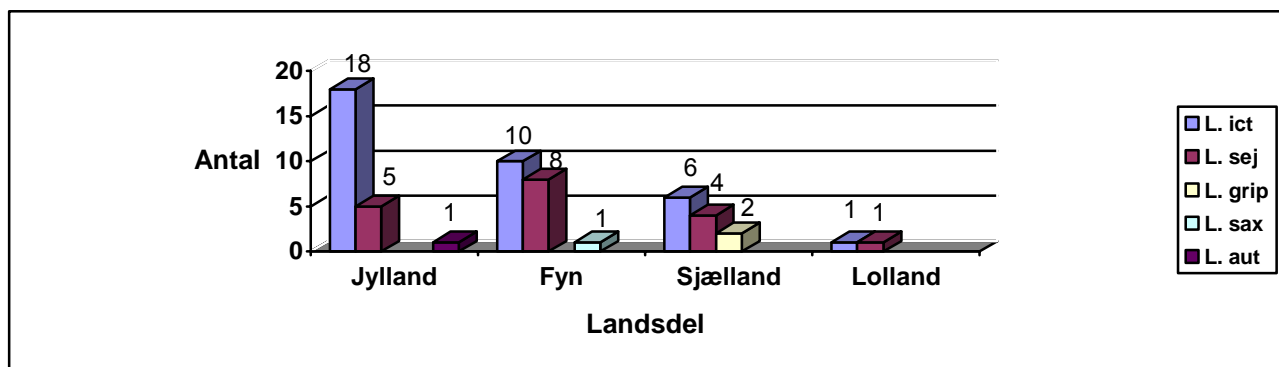
Der er ingen statistisk forskel mellem grupperne med hensyn til afstand til sidste vaccination.

Tabel 4: Fordelingen af titerværdier i forhold til hundenes alder.

	Sign. forhøjet titerværdi	Øvrige, lave og nul værdier
Alder $\leq 5$ år	4	72
Alder $> 5$ år	5	47

OR er 1,91, og Fischers exact test beregnes til:  $P = 0,48$ . Der er ingen signifikant forskel mellem gruppen af hunde over og under 5 år.

Figur 3 viser antal målte serovarer i de undersøgte landsdele. Der er i alt undersøgt 8 prøver fra Lolland, 33 fra Sjælland, 36 fra Fyn og 51 fra Jylland.



Figur 3. Antal fundne serovarer fordelt efter landsdel.

Tabel 5: Fordeling af signifikant forhøjede titerværdier i forhold til landsdel.

	Signifikant forhøjet titerværdi	Negativ titerværdi
Jylland	3	48
Fyn	4	32
Sjælland	2	31
Lolland	0	8

## Diskussion

Denne undersøgelses udgangspunkt har været at undersøge hunde hvis levevis antageligt giver en forøget risiko for at komme i kontakt med leptospirer. Flere undersøgelser har vist at prævalensen er størst i sommer- og efterårsmånederne (6,9,10,11). Valget af oktober som periode for prøveudtagelsen kan derfor indikere at den målte prævalens af hunde med titerværdi kunne have været lavere hvis undersøgelsen f.eks. var foretaget i en forårsmåned.

I beregningen af den nødvendige stikprøvestørrelse, indgår prævalensen i populationen. Da der ikke eksisterer opgørelser over leptospirose-tilfælde eller titerværdier, har denne undersøgelse benyttet tilgængeligt laboratoriemateriale for at have den bedst mulige indikation af prævalensen. Den estimerede prævalens på 5 % er dog en værdi med stor usikkerhed, da oplysninger savnes om kliniske symptomer, undersøgelsesanledning, afstand til sidste vaccination samt hvilken del af hundepopulationen som er undersøgt.

Den undersøgte population er racemæssigt meget forskellig fra den danske racefordeling, da 80 % af deltagende hunde er retriever, hønsehund og spaniel. De fremkomne data og fortolkningen heraf gælder derfor ikke nødvendigvis for andre typer hunde med anden livsstil. Alderen er jævnt fordelt med en gennemsnitsalder på 5,2 år.

MAT er en undersøgelsesmetode som ikke kan skelne mellem infektions- og vaccinations-titerværdier (25). I en ideel undersøgelse er hundene aldrig vaccineret. Med de tilstedeværende betingelser for denne undersøgelse, er det ikke vurderet muligt at

indsamle det nødvendige antal prøver på aldrig-vaccinerede hunde i perioden. 12 hunde i undersøgelsen har aldrig modtaget vaccination. Gruppen af aldrig-vaccinerede er så lille at der ikke kan foretages statistisk sammenligning med gruppen af tidligere vaccinerede hunde.

Titerværdien efter kontakt til leptospirose i form af vaccination eller naturlig infektion, falder over tid, så titerværdierne er vist faldet til laveste værdi eller de er negative 1 år efter sidste vaccination (30,31). For at sikre lavest mulige vaccinations-titerværdier, har kravet for samtlige hunde været, at de ikke har modtaget vaccination minimum 50 uger forinden. De laveste titerværdier sorteres fra ved at vælge en cut-off værdi, som sættes højt for have større sikkerhed for at de medtagne titerværdier skyldes naturlig smitte. For *L. ict* kan der måles en lav værdi efter tidligere vaccination, hvorfor der anlægges en højere cut-off værdi for denne serotype. Værdier over 1:200 antages at være signifikant forhøjede titerværdier for alle titerværdier bortset fra *L. ict* og *L. can*, hvor værdier over 1:400 antages at være signifikant forhøjede.

Denne undersøgelse har vist titerværdi hos 57 hunde, svarende til 44,5 %. Det betyder at omkring halvdelen af de vaccinerede hunde ikke har titerværdi.

Ved at bruge cut-off grænsen, viser denne undersøgelse at 9 hunde har signifikant forhøjede titerværdier af de 128 undersøgte, svarende til en prævalens på 7 %. Resultatet er indenfor det forventede prævalensinterval på 1 – 9 %. 6 hunde har signifikant forhøjede titerværdi mod ikke-vaccinations serovarerne *L. sej*, *L. grip* og *L. aut*. Det er interessant, da disse tilfælde peger på en naturlig infektion, som støttes af at den ene hund aldrig er vaccineret. Hvis titerreaktionerne hos de øvrige 5 hunde er opstået som følge af vaccination, kræver det en krydsreaktion med *L. ict* til disse serovarer og bortfald af reaktion for *L. ict*. Følgende taler mod dette: Det antages normalt, at den serovar med højeste titerværdi er den primære (24,25). Graden af krydsreaktioner aftager med tiden efter infektion (21) og i denne undersøgelse er gået minimum 50 uger.

Af de 35 seropositive hunde har 3 hunde signifikante forhøjede titerværdier for *L. ict*. Der er således en mulighed for at hunde bliver naturligt inficeret, med mindre at vaccinationstiter kan påvises i niveauet 1:800 og 1:1 600 efter 1½ år. Muligheden for naturlig infektion støttes også af at 3 af 12 aldrig-vaccinerede hunde fik målt en titerværdi.

Denne undersøgelse viste den sammenhæng, at hunde vaccineret mere end to gange hyppigere har signifikant forhøjede titerværdi. Årsagen kendes ikke, og der er ikke undersøgelser over udvikling i titerværdi sammenholdt med stigende antal vaccinationer. En forklaring kan være at immunapparatet ved stigende antal vaccinationer mere effektivt danner antistoffer, hvorved titerværdien stiger til et højere niveau. Undersøgelsen viste derimod ingen sikker forskel mellem hverken afstand til sidste vaccination og titerværdi, eller alder og titerværdi.

Den anvendte test, MAT, har den store fordel, at kunne bestemme hvilken serovar hunden har haft kontakt til, og påvise det en længere periode efter infektionen er ophørt. MAT muliggør derfor at se om der er overensstemmelse mellem de fundne serovarer og de benyttede vaccinations-serovarer. Der er påvist 5 serovarer i undersøgelsen, hvoraf *L. ict* og *L. sej* udgjorde henholdsvis 61,4 % og 31,6 % af hundene med titerværdi. I den sidste danske undersøgelse som er fra 1960 (1), blev der påvist titerreaktion mod *L. sej* hos 11 %, samt *L. ict* og *L. can* hos hver 1,8 % af de undersøgte hunde. Sammenholdes dette med danske humane opgørelser over de sidste 20 år (28) som viser at de hunde-patogene

serovarer udgjorde 48 % af alle tilfælde, fordelt med 26 % mod *L. ict* og 22 % mod *L. sej*, støtter denne undersøgelse at de hyppigst hunde-patogene serovarer i Danmark er *L. ict* og *L. sej*. Ydermere harmonerer reservoiret som er hhv. rotten og markmusen (41) for disse to serovarer, med at begge er almindelig forekommende over hele landet.

Denne undersøgelse viser ingen tendens til, som i andre lande (18,19,20), at der er sket et skift i aktuelle serovarer i retning mod *L. pom* og *L. grip*, da kun 2 af 128 hunde havde *L. grip* som højeste titer-serovar. Trods fund af *L. pom* hos danske svinebesætninger (13), har denne undersøgelse ikke vist at denne serovar er aktuell hos hunde i denne undersøgelse. Fundet af én hund med signifikant forhøjede titerværdi 1:1 600 mod *L. aut* er overraskende. Denne hund havde lavere titerværdier for *L. can* og *L. aust*. En undersøgelse (37) viste at hvalpe vaccineret mod *L. pom* og *L. grip* havde højere titerværdi for *L. aut*, end for vaccinations-serovarerne. Der er således den mulighed at en af de to øvrige påviste serovarer er den inficerende.

*L. can* som indgår i de danske leptospirose vacciner, blev kun påvist i en prøve som krydsreaktion. Dette fund af manglende titerværdier for *L. can* svarer til studiet af Hartman (30) som ikke fandt titerværdier 7 uger efter årlig revaccination. Denne undersøgelse viser at titerværdi mod *L. can* mere end 50 uger efter vaccination må forventes at være negativ. I den retrospektive undersøgelse (se side 7) var i alt 10 prøver positive af 698 for *L. can*. Da der ikke er angivet sidste vaccinationsdato for hundene, er det en mulighed at de positive prøver er vaccinationstiter påvist kort tid efter vaccination for hunde.

Der er fundet titerreaktioner i alle undersøgte landsdele. Der er undersøgt 8 hunde fra Lolland, som er for spinkelt materiale at behandle. Der er fundet signifikant forhøjede titerværdier hos hunde fra både Sjælland, Jylland og Fyn. Fælles for de 3 landsdele, er flest reaktioner for *L. ict* fulgt af *L. sej*. Når de 9 serovarer fordeles på landsdel, bliver antallet for lille til statistisk bearbejdning.

Det er interessant at der kan findes så relativt høje titerværdier hos hunde som ifølge ejer ikke har haft symptomer på sygdom det seneste år. Denne test skal fortolkes forsigtigt ved titerværdier på 1:1 600 og derunder hos en hund mistænkt for leptospirose.

Hvis det antages at nogle af de undersøgte hunde er naturligt inficeret, og ingen har angivet kliniske symptomer på leptospirose det seneste år, kan det tænkes at hundene har haft en subklinisk leptospirose, en hypotese som er fremført tidligere (24). Bliver hundene inficeret med jævne mellemrum, kan det ikke udelukkes at denne kontakt kan virke som en slags vaccination som hindrer klinisk sygdom.

## **Konklusion**

Der er blandt 128 undersøgte hunde med kontakt til overfladevand, som eksempel mose og vandløb, gennem færden på jagt og i vådområder, fundet titerværdi mod leptospirose hos 44,5 %, herunder signifikant forhøjede titerværdier hos 9 hunde, svarende til 7 %.

De hyppigst forekommende serovarer, er *L. icterohaemorrhagiae*, som udgjorde 61 % af titerværdierne samt *L. seji* med 32 %. Der er fundet signifikant forhøjede titerværdier for serovarerne *L. ict*, *L. sej*, *L. grip* og *L. aut*

Denne undersøgelse har ikke vist at *L. canicola* er af betydning i Danmark på baggrund af den foretagne serologiske screening.

En stor tak til de øvrige deltagere på fagdyrlægekurset som har hjulpet med at udtage prøverne, til Mariann Criel og Claes Enøe for epidemiologisk vejledning, til firmaerne Merial og Intervet for økonomisk støtte til laboratorie-udgifter, til Vibeke Sørensen (DFVF) og VetMedLabor for udlevering af data på udførte undersøgelser for leptospirose og til dyrlæge Johanne Østerbye for inspiration til at lave denne undersøgelse.

## **Litteratur:**

1. Borg-Petersen C, Fennestad KL: Incidence of canine leptospirosis in Denmark. Nord VetMed 1962, 14, 609-619.
2. DFVF: Vaccineforbrug hos hunde. [www.dfvf.dk](http://www.dfvf.dk), 2005.
3. Ward MP, Guptill LF, Wu CC: Evaluation of environmental risk factors for leptospirosis in dogs: 36 cases (1997-2002). J Amer Vet Med Ass 2004, 225, 72-76.
4. Birnbaum N, Barr SC, Center SA: Naturally acquired leptospirosis in 36 dogs: serological and clinicopathological features. J Small Anim Pract 1998, 39, 231-236.
5. Hansson LE: Leptospirosis in domestic animals: The public health perspective. J Amer Vet Med Ass 1982, 181, 1505-1509.
6. Boutillier P, Carr A, Schulman RL: Leptospirosis in Dogs: A Serologic Survey and Case Series 1996 to 2001. Vet Therapeutics 2003, 4, 387-396.
7. Wohl JS: Canine Leptospirosis. Comp on Cont Edu Pract Vet 1996, 18, 1215-1241.
8. Hartman EG, van Den Ingh TSGAM, Rothuizen J: Clinical, pathological and serological features of spontaneous canine leptospirosis. An evaluation of the IgM- and IgG-specific ELISA. Vet Immunol Immunopathol 1986, 13, 261-271.
9. Ward MP, Guptill LF, Prah A, Wu CC: Serovar-specific prevalence and risk factors for leptospirosis among dogs: 90 cases (1997-2002). J Amer Vet Med Ass 2004, 224, 1958-1963.
10. Lemcke A, Rasmussen E, Gliemann SO, Krogfelt KA: Leptospirose i Danmark 1980-2002, Ugeskr Læger 2004, 166, 2659-2663.
11. Gerier-Dömling D, Heil-Franke G, Müller E: Nachweis von Leptospirenantikörpern bei Hunden. Kleintier-prax 2003, 48, 755-758.
12. Ottosen HE: Leptospirosis canis i Danmark. Medlemsbl Danske Dyrlægeforen 1962, 45, 455-58.
13. Friis NF, Jorsal SE, Kokotovic B, Lodal J, Nielsen LM, Schirmer AL, Sørensen V, Thorup F: Leptospirose hos svin. DVT 2002, 5, .
14. Sunde M, Heiene R, Fonnum KJ, Wold A: Leptospirose – en infeksjon med ny aktualitet?. Norsk VetTidsskr 2002, 563-570.
15. Brem S, Kopp H, Meyer P: Leptospira antibody detection in dog serum in the years 1985 to 1988. Berl Münch tierärztl Wschr 1990, 103, 6-8.
16. Steger-Lieb A, Gerber B, Nicolet J, Gaschen F: Eine alte Krankheit mit neuem Gesicht: Die Hundeleptospirose verliert nicht an Aktualität. Schweiz Arch Tierheilk 1999, 141, 499-507.
17. Ward MP, Glickman LT, Guptill LF: Prevalence of and risk factors for leptospirosis among dogs in the United States and Canada: 677 cases (1970-1998). J Amer Vet Med Ass 2002, 220, 53-58.
18. Rentko VT, Clark N, Ross LA, Schelling SH: Canine Leptospirosis – A Retrospective Study of 17 cases. J Vet Intern Med 1992, 6, 235-244.

19. Brown CA, Roberts AW, Miller MA, Davis DA, Brown SA, Bolin CA, Jarecki-Black J, Greene CE, Miller-Liebl D: *Leptospira interrogans* serovar *grippotyphosa* infection in dogs. J Amer Vet Med Ass 1996, 209, 1265-1267.
20. Harkin KR, Gartrell CL: Canine Leptospirosis in New Jersey and Michigan: 17 cases (1990-1995). J Amer Anim Hosp Ass 1996, 32, 495-501.
21. Levett PN: Leptospirosis. Clin Microb Rev 2001, april, 296-326.
22. Faine S: Leptospira. I: Balows A, Duerden BI (ed). Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Ninth Edition, Arnold, Vol 2, 1287-1303.
23. Greene CE: Canine Leptospirosis; A re-emerging Disease. Proc WSAVA 2003, pp 414-416.
24. Greene CE, Miller MA, Brown CA: Leptospirosis. I: Greene C (ed). Infectious Diseases of the Dog and Cat, 2<sup>nd</sup> Ed., WB Saunders, Philadelphia 1998, pp 273-281.
25. World Organisation for Animal Health –OIE: Leptospirosis: Manual of diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals chapter.2.2.4.. [http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A\\_00043.htm](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00043.htm) , 5<sup>th</sup> edition, 2004.
26. Dziezyc J: Canine systemic bacterial infections. Vet Clin North America, Small Anim Pract 2000, 30, 1103-1117.
27. Krogfeldt K: Personlig meddelelse 2005. Statens Seruminstitut.
28. O'Keefe JS: A serosurvey for antibodies to *Leptospira* in dogs in the lower North Island of New Zealand. NZ Vet J 2002, 50, 23-25.
29. Åsted B: Personlig meddelelse 2005. Professor i Immunologi ved KVL.
30. Hartman EG, van Houten M, Frik JF, van der Donk: Humoral immune response of dogs after vaccination against leptospirosis measured by an IgM- and IgG- specific ELISA. Vet Immunol Immunopathol 1984, 7, 245-254.
31. Klaasen HLBM, Molkenboer MJCH, Vrijenhoek MP, Kaashoek MJ: Duration of immunity in dogs vaccinated against leptospirosis with a bivalent inactivated vaccine. Vet microbial 2003, 95, 121-132.
32. Baldwin CJ, Atkins CE: Leptospirosis in Dogs. Comp cont edu small anim 1987, 9, 499-507.
33. van den Broek AHM, Thrusfield MV, Dobbie GR, Ellis WA: A serological and bacteriological survey of leptospiral infection in dogs in Edinburgh and Glasgow. J Small Anim Pract 1991, 32, 118-124.
34. Sessions JK, Greene CE: Canine Leptospirosis. Comp Cont Edu Small Anim 2004, 606-622.
35. Ruckaberle E: Personlig meddelelse 2005, Dyrlæge ved VetMedLabor, Tyskland.
36. Keenan KP, Alexander AD, Montgomery CA: Pathogenesis of Experimental *Leptospira interrogans*, serovar *bataviae*, infection in the Dog: Microbiological, Clinical, Hematologic, and Biochemical Studies. Amer J Vet Res 1978, 39, 449-454.
37. Barr SC, McDonough PL, Scipioni\_Ball RL, Starr JK: Serologic responses of dogs given a commercial vaccine against *Leptospira interrogans* serovar *Pomona* and *Leptospira kirschneri* serovar *grippotyphosa*. Amer J Vet Res 2005, 66, 1780-84.
38. Ford RB: Leptospirosis. Kursusmateriale udleveret ved Merial symposium 2004.
39. VetMedLabor, Tyskland: Resultater af udførte MAT undersøgelse for leptospirose hos danske og tyske hunde i perioden 2004-2005.
40. DFVF: Resultater af udførte MAT undersøgelser for leptospirose i perioden 1999-2005, udleveret af Vibeke Sørensen.
41. Fennestad KL, Borg-Petersen C: Leptospirosis in Danish wild mammals. J. Wildlife Dis 1972, 8, 343-51.