

Breitet sich die bovine kutane Leishmaniose in der Schweiz aus?

L. Lobsiger¹, C. F. Frey¹, N. Müller¹, G. Rosenberg¹, T. Schweizer², B. Gottstein¹

¹Institut für Parasitologie, Universität Bern, ²Tierarztpraxis Jürg Meier, Bärenswil

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, aufgrund einer im April 2009 erstmals diagnostizierten Leishmaniose bei einer Kuh in der Schweiz weiterführende, deskriptive Abklärungen zum potenziellen Vorkommen der Rinderleishmaniose vorzunehmen. Auf dem betroffenen Betrieb sowie auf dem nachbarlichen Milchviehbetrieb wurden weitere Tiere untersucht. Zusätzlich wurden praktizierende Tierärzte aufgefordert, Hautbiopsien von Verdachtsfällen zuzuschicken. Bei 12 eingesandten Proben ergaben die Untersuchungen für *Leishmania* negative Ergebnisse. Das Auftreten dieser Parasitose scheint somit in der Schweiz ein sehr seltenes Ereignis zu sein. Abschliessend werden einige Differenzialdiagnosen diskutiert.

Schlüsselwörter: Leishmaniose, Kuh, Histopathologie, IFAT (indirekter Immunfluoreszenz-Antikörper-Test), PCR, Differenzialdiagnosen

Is bovine leishmaniasis spreading in Switzerland?

The purpose of the present study was based upon the first diagnosed bovine cutaneous leishmaniasis in a cow in Switzerland in April 2009. We continued descriptively the search for other bovine cases in Switzerland. We carried out similar investigations in the original farm where the case had occurred, and in parallel also in the neighboring farm. Additionally, veterinary practitioners sent us an overall of 12 suspected cases of bovine leishmaniasis. Following diagnostic investigations, all cases were negative for *Leishmania*. The occurrence of this infection appears therefore to be a very rare event. Finally some differential diagnoses are discussed.

Keywords: Leishmaniasis, cow, histopathology, IFAT, PCR, differential diagnosis

Einleitung

Die Leishmaniose ist eine vorwiegend in den Tropen und Subtropen verbreitete chronische parasitäre Erkrankung bei Mensch und Tier, die Infektion wird durch Protozoen der Gattung *Leishmania* verursacht. Klinisch betroffen sind dabei Haut, Schleimhäute und/oder diverse Organsysteme. In Europa tritt die Leishmaniose vorwiegend beim Hund auf und ist im Mittelmeerraum weit verbreitet. Als Erreger der europäischen caninen Leishmaniose wird meistens die Spezies *Leishmania infantum* identifiziert, die von Schmetterlingsmücken (*Phlebotomus* spp.) (Rommel et al., 2000) übertragen wird. Vereinzelt wurden in Südeuropa an *L. infantum* erkrankte Katzen (Poli et al., 2002) und Pferde (Solano-Gallego et al., 2003; Rolão et al., 2005) beschrieben. Sogar bei einem Pferd aus dem süddeutschen Raum wurde eine Infektion mit *L. infantum* nachgewiesen (Köhler et al., 2002).

Im April 2009 wurde erstmals bei einer 7-jährigen Kuh, welche die Schweiz nie verlassen hatte, eine kutane Leishmaniose diagnostiziert und beschrieben (Lobsiger et al., 2009). Klinisch zeigte sich die Hauterkrankung in Form von disseminierten, ulzerierenden Hautläsionen an Kinn (Abb. 1.a), Ohrbasis (Abb. 1.b), den Carpi und am Unterbauch, sowie kleineren erhabenen Einzelknoten an der Thoraxwand und am Euter. Die Leishmaniose wurde histopathologisch, immunhistochemisch und mittels PCR diagnostiziert. Dabei wurde eine Spezies mit einer genetisch sehr engen Verwandtschaft mit der Art *L. siamensis* identifiziert (Übereinstimmung 98%, nachfolgend im Text als *L. siamensis*-ähnliche Spezies bezeichnet). *L. siamensis* wurde erstmals in einem thailändischen Patienten, der an viszeraler Leishmaniose litt, beschrieben (Sukmee et al., 2008). Dieselbe Leishmanien-Art, welche bei der Kuh gefunden wurde, konnte vorgängig bereits bei 9 Pferden aus der Schweiz und aus Deutsch-

zoo Originalarbeiten

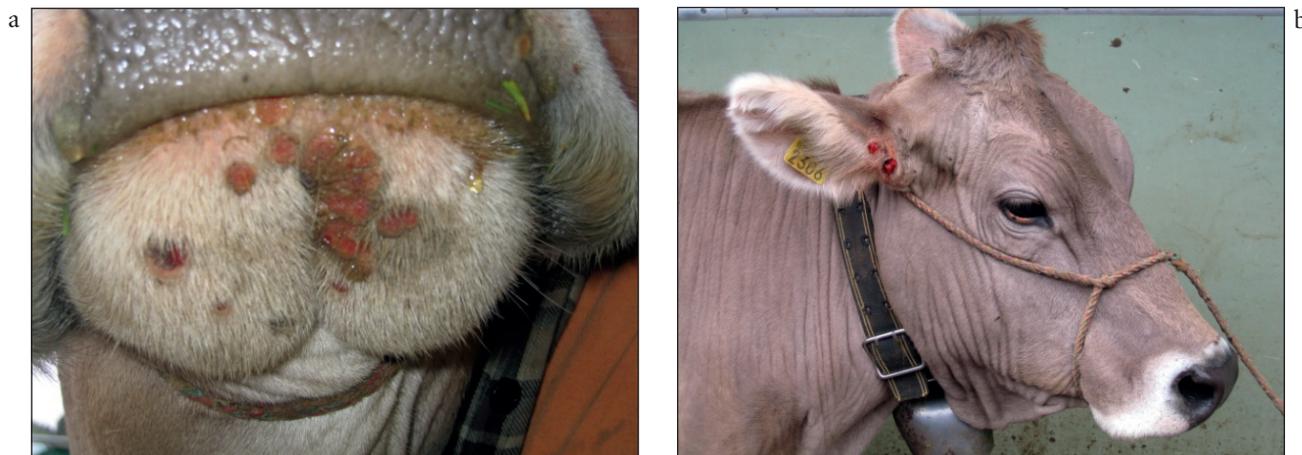


Abbildung 1: a) Kutane Leishmaniose beim Rind. Disseminierte flache Ulzera am Kinn. b) Tiefulzerierende Knoten an der Ohrbasis.

land nachgewiesen werden (Müller et al., 2009) (Abb. 2). Geographische Herkunft sowie Übertragungswege dieser ggf. neuen *Leishmania*-Spezies bei Pferd und Kuh sind bisher völlig unbekannt, und da es sich um eine potenzielle Zoonose handeln könnte, sind genauere Kenntnisse zur Ausbreitung und zur Pathogenese bei Tier und Mensch von Bedeutung. Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, weiterführende, deskriptive Abklärungen zum potenziellen Vorkommen der Rinderleishmaniose in der Schweiz vorzunehmen.

Tiere, Material und Methoden

Tiere

Es wurden 2 Betriebe in die vorliegende Studie einbezogen: Betrieb A (Mutterkuhhaltung), in dem die an Leishmaniose erkrankte Kuh lebte, und der rund 100 m entfernte nachbarliche Betrieb B (Milchviehbetrieb). Im Betrieb A wurde erstmals im Mai 2009 von allen Kühen, 4 Monate später ein zweites Mal nur von der ursprünglichen Leishmaniose-Kuh und ihrem unterdessen 2 Monate alten Kalb Blutproben entnommen. Im September 2010 wurden im Betrieb A nebst einer adspektorischen Nachkontrolle der Kühe nochmals Blut entnommen, sowie zusätzlich von 2 Pferden, 2 Hunden und 6 Ziegen, die alle in diesem Betrieb stehen. Im Betrieb B wurde von den 21 Milchkühen und vom Hofhund Blut entnommen. Die Tierärzte in der Schweiz wurden im Zeitraum April bis November 2010 aufgerufen, von verdächtigen, vor allem therapieresistenten Hautläsionen beim Rind Biopsien zu entnehmen und das Gewebematerial zur histopathologischen und molekularbiologischen Untersuchung einzuschicken. Wir erhielten in der Folge Hautbiopsien von 12 Kühen eingeschickt. Eine Kuh stammt aus dem obengenannten Betrieb A. Alle Biopsien waren von einem Fragebogen begleitet, aus dem folgende Angaben entnommen werden konnten: Identifikation des Tieres,

Aussehen und Dauer der Hautveränderungen, Lokalisation am Körper, mit/ohne Juckreiz, Einzeltier/mehrere Tiere betroffen, bereits durchgeführte Therapien und Ansprechen darauf. In 11 Einsendungen standen uns



Abbildung 2: Fundorte der durch *L. siamensis*-ähnlicher Spezies verursachten kutanen Leishmaniose 1998–2009; 9 Pferde (blau, 1 Standort unbekannt), 1 Rind (gelb). Alle sind sporadisch aufgetreten und liegen zum Teil weit voneinander entfernt. Die 3 Fälle in der Ostschweiz hatten keinen Kontakt zueinander.

Nativproben für molekularbiologische Untersuchungen (PCR) sowie in 8 Fällen Fotos der Hautveränderungen zur Verfügung.

Histologie

Die in Formalin fixierten Hautbiopsien für die histopathologische Untersuchung wurden in Paraffin eingebettet und anschliessend Dünnschnitte angefertigt und mit HE (Hämatoxylin-Eosin) und PAS (Periodic acid-Schiff reaction) gefärbt. Die Hautbiopsien wurden lichtmikroskopisch (400x) primär auf Leishmaniose abgesehen, anschliessend wurde eine histologische und wenn möglich aetiologische Diagnose gestellt und dem Einsender ein Rapport zugestellt.

PCR

Für die PCR wurden je 25 mg Gewebe aus dem dermalen Bereich, wo Leishmanien zu erwarten sind, entnommen. Die DNA wurde mit einem Kit (DNeasy™ tissue Kit, Qiagen, Basel, Schweiz) nach Protokoll des Herstellers aufbereitet. Anschliessend wurde mittels zweier PCRs nach DNA von Altwelt-Leishmanien (Piarroux et al., 1995), beziehungsweise von *L. siamensis* (Müller et al., 2009) gesucht.

Serologische Untersuchungen

Indirekter Immunfluoreszenztest (IFAT)

Alle Rinderseren wurden mittels IFAT ausgewertet. Als Antigen wurden promastigote *L. infantum*-Organismen aus institutseigener Kultur verwendet. Als positive Kontrolle wurde das Serum der *Leishmania*-positiven Kuh vom Mai 2009 verwendet (Tier Nr. 1.1, Tab. 1). Als negative Kontrollprobe diente das Serum einer arbiträr selektionierten gesunden Kuh vom Betrieb B. Die Kontrollseren (Verdünnung 1:40) und die mit einer phosphatgepufferten physiologischen Kochsalzlösung (PBS, pH 7.4) verdünnten Testseren (Verdünnungsreihe 1:40, 1:80, 1:160, 1:320) wurden auf die gefensterten Objektträger aufgetragen und anschliessend 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Objektträger mit einem Fluoreszein-markierten sekundären Antikörper in der Verdünnung 1:200 (rabbit-anti-bovine IgG-FITC, Sigma F7887) beschichtet und für weitere 30 min inkubiert und anschliessend erneut dreimal mit PBS gewaschen. Die getrockneten Objektträger wurden mit Fluoprep (BioMerieux 75521) eingedeckt. Die Beurteilung der Reaktion erfolgte unter einem Fluoreszenzmikroskop (Leitz Laborlux S) bei 400-facher Vergrösserung. Als positive Reaktion wurde eine deutliche, apfelgrüne Fluoreszenz der Leishmanien bei einer Serumverdünnung von $\geq 1:80$ definiert. Als negativ wurde gewertet, wenn keine erkennbare Fluoreszenz auftrat, beziehungsweise die Leishmanien nur als braunrötliche

Umrisse erkennbar waren. Als «out-group» Negativkontrollen wurden aus der institutseigenen Serumbank blind 35 Rinderblutproben aus 19 verschiedenen Betrieben ausgewählt und mitanalysiert.

ELISA-Test

Die Blutproben der 3 Hunde, der 2 Pferde und der 6 Ziegen (alle Betrieb A) wurden mit dem institutseigenen, (primär für Hunde) validierten ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) auf anti-*Leishmania*-Antikörper geprüft (Mettler et al., 2005). Als Antigen diente Rohproteinextrakt aus kultivierten *L. infantum*-Promastigoten (Gottstein et al., 1988). Positive und negative Kontrollseren, sowie die Tierart-spezifischen Konjugate wurden aus der Routineserologie übernommen. Da bei der Ziege kein positives Kontrollserum zur Verfügung stand, musste der Test arbiträr abgelesen werden. Als «seropositiv» wären Reaktionen mit einem Absorptionswert grösser als der Mittelwert plus 3 Standardabweichungen der «negativen» Seren taxiert worden.

Autopsie

Im Dezember 2010 musste die im Frühjahr 2009 an Leishmaniose erkrankte Kuh wegen eines Geburtstraumas euthanasiert werden, und anschliessend wurde das Tier am Institut sezirt. Es wurden dabei Gewebeproben (Leber, Milz, Knochenmark, Lymphknoten) für die histologische Untersuchung, die *in vitro*-Kultivierung sowie für die PCR entnommen.

Ergebnisse

Untersuchungen der Hautbiopsien

Die histopathologischen Diagnosen sowie die klinischen Angaben der von den Tierärzten erhaltenen 12 Hautbiopsien sind in der Tabelle 2 festgehalten. In keinem einzigen Fall konnten histopathologisch direkt Leishmanien nachgewiesen werden. Im Biopat der verdächtigen Kuh aus dem Betrieb A (Tier Nr. 2.10, Tab. 2) war das Entzündungsbild vergleichbar mit dem der Kuh mit kutaner Leishmaniose von 2009. Klinisch wurden multiple Ulzera von 1–2 cm Durchmesser am kaudalen Euteransatz beobachtet. Unter der ulzerierten Epidermis war das dermale Gewebe nodulär bis diffus von massenhaft Eosinophilen und Makrophagen infiltriert; zusätzlich war eine Fibroblastenproliferation und Neovaskularisation erkennbar. Am häufigsten (in 8 der 12 Fälle) lag eine bakterielle Follikulitis, Furunkulose und eine Pyodermie vor, oft chronisch aktiv mit Vernarbungen. Meist traten diese Hautveränderungen am Hals, im Schulterbereich (Abb. 3) und am Nacken auf. In zwei Fällen war das proximale Euter und der Innenschenkel mitbetroffen (Abb. 4). Klinisch äusserten sich die Hautveränderungen

202 Originalarbeiten

Tabelle 1: Gemessene Antikörper-Titer der Kühe aus dem Bestand A im Verlauf von 16 Monaten und die PCR Ergebnisse aus den Hautläsionen. Tier Nr. 1.1. ist das im Frühjahr 2009 an Leishmaniose erkrankte Tier.

Tier Nr.	IFAT Titer Mai 2009	IFAT Titer Sept. 2009	IFAT Titer Sept. 2010	Bemerkung	PCR <i>L. siamensis</i>
1.1	1:320/1:640 positiv	1:80 schwach pos.	1:80 schwach positiv	Mai 2009 disseminierte Ulzera und Knoten	Positiv (98% Übereinstimmung)
1.2	1:80 schwach positiv		1:80 schwach positiv	September 2010 Ulzera am Euter	negativ
1.3	< 1:40 negativ		< 1:40 negativ		
1.4	< 1:40 negativ		< 1:40 negativ		
1.5	< 1:40 negativ		< 1:40 negativ		
1.6	< 1:40 negativ		< 1:40 negativ		
1.7		negativ		Kalb von Kuh Nr. 1	
1.8	< 1:40 negativ		*		
1.9	1:40 negativ		*		
1.10	1:40 negativ		*		
1.11	1:40 negativ		*		

* Tiere zwischenzeitlich geschlachtet, nicht geprüft

durch disseminierte, 1–2 cm grosse Knoten, die oft ulzeriert und mit blutigen oder serozellulären Krusten bedeckt oder mit Eiter gefüllt waren. Da primär nach Leishmanien gesucht wurde, wird auf eine nähere Beschreibung der übrigen Fälle verzichtet (Tab. 2). Auch die PCR-Untersuchungen sowohl auf Altwelt-Leishmanien wie auch auf *L. siamensis* ergaben in sämtlichen Biopsieproben inklusive dem verdächtigen Tier aus dem Betrieb A ein negatives Resultat.

Serologische Untersuchungen

Indirekter Immunfluoreszenztest (IFAT)

Betrieb A: Die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen mittels IFAT sind in Tabelle 1 ersichtlich. Die eingangs der Publikation beschriebene Kuh mit kutaner Leishmaniose (Nr. 1.1) zeigte während der Phase klinischer Symptome im Frühjahr 2009 einen sehr hohen Antikörper-Titer von 1:400 (Lobsiger et al., 2009). Die Werte einer parallelen Untersuchung am Institut für Parasitologie der Universität Bern betragen 1:320 beziehungsweise 1:640. Im Frühjahr 2009 wurde der ganze Bestand serologisch untersucht, wobei bei einer weiteren Kuh (Tier Nr. 1.2) ein Titer von 1:80 gemessen wurde (erster positiver Titerwert; der Grenzwert wurde von uns arbiträr auf 1:80 gesetzt), ohne dass klinische Erscheinungen festgestellt wurden. Die übrigen Tiere zeigten mit einem Titer \leq 1:40 negative Befunde. Vier Monate später wurden nur Tier Nr. 1.1 und ihr zweimonatiges Kalb untersucht. Hierbei wies das Tier Nr. 1.1 einen deutlichen Titerabfall auf 1:80 auf. Dieses Niveau hielt sich anschliessend konstant über ein Jahr lang (letzte Messung



Abbildung 3: Disseminierte Follikulitis an Hals und Schulter.



Abbildung 4: Innenschenkel-Euterdermatitis.

Tabelle 2: Histopathologische Diagnosen der eingesandten Proben sowie anamnestische Angaben und Klinik. Tier 2.10 ist mit dem Tier 1.2 in Tabelle 1 identisch und stammt aus dem Betrieb A.

Rind-Nr. Datum	Läsionen makroskopisch	Lokalisation und Klinik	Histopathologische Diagnose	Bemerkungen
2.1 05. 2010	Grossflächige, z. T. blutende, z. T. nässende Hautläsionen mit Krusten	Schulter, Schwanzansatz, Oberschenkel	Ausgedehnte und tiefe Pyodermie, eitrig Follikulitis und Furunkulose. Bakterielle Infektion (Staphylokokken?).	Komplette Abheilung nach Waschungen mit Betadine und 4 Tagen Penicillin/Streptomycin i. m.
2.2 05.2010	Disseminierte Ulzera und Knoten	Vorderbrust, Thorax bilateral, Lendengegend, mit Juckreiz	subakute bis chronische, perivaskuläre Dermatitis; eine ektoparasitäre und/oder allergische Ursache (Insektenstiche) wird vermutet.	Mit Penicillin/Streptomycin und Jodsalbe ohne Erfolg behandelt
2.3 05. 2010	Vereinzelte Ulzera und Knoten	Unterschenkel, Unterbauch, Vorderbrust; abends ausgeprägter	Noduläre Nekrobiose mit Epidermisnekrose; Ursache unklar, Verdacht auf Insektenbissallergie.	Gelegentlich beim Pferd: Ursache oft unbekannt, eine allerg. Reaktion auf Culicoides wird beschrieben.
2.4 05.2010	Auf 10x15cm blutige Krusten, z. T. nässend und eitrig, Haut verdickt,	Nacken, Ohransatz, periorbital, Bug-lymphknoten vergr.; Hochgr. Juckreiz	Tiefe chron.-aktive, fokal eitrig Dermatitis und eitrig Follikulitis. Wahrsch. primär allergisches oder ektoparasitäres Problem mit sekundär bakterieller Infektion (infolge des Kratzen und Scheuerns).	Penicillin/Streptomycin & Dexamethason; 1 Tag später plus Doramectin. Abheilung innert einem Monat.
2.5 06.2010	Fokal-disseminierte ulzerative Hautläsionen	Gliedmassen, Thorax seitlich und Lendengegend; kein Juckreiz	Chron.-aktive, fokal pustulöse Dermatitis, herdförmig fibrosierend (Vernarbungen). Trauma, z.T. im Abheilstadium.	Hornstösse und Stürze mit Hautabschürfungen vermutet.
2.6 06. 2010	Flächenhafte massive Hyperkeratose und Hautverdickungen, reptilienartig aussehende Haut	Hals, Unterlippe, Euter, Zitzenbasis, Schwanzansatz und Vordergliedmassen	Pustulöse Dermatitis, chronisch aktive und z. T. fibrosierende Pyodermie, eitrig Follikulitis und Furunkulose. Granulomatöse Vaskulitis?	Seltene Hautform von BKF, mit sekundär ausgedehnter bakterieller Infektion. PCR BKF: positiv à Euthanasie
2.7 07.2010 (Abb. 3)	Multiple Knoten 0.5 – 1cm gross, Hyperkeratose, kein Juckreiz.	Hals, Schulter	Chronische fibrosierende Pyodermie, eitrig Follikulitis.	Mit Eprinomectin Pour-on ohne Erfolg therapiert; später Spontanheilung
2.8 07. 2010	Hautverdickungen und Oedeme	?	Eitrig Follikulitis, Pyodermie	
2.9 08. 2010	Flächenhafte nässende und ulzerierende Hautveränderungen, Eiteraustritt aus Knoten.	Hals und Schulter dorsal	Pustulöse Dermatitis, tiefe Furunkulose, eitrig Follikulitis, ausgedehnte chronisch aktive Pyodermie; bakterielle Infektion	Tetrazyklin-Spray, allmähliche Abheilung
2.10 09.2010	3 rundliche ulzerierende und exsudative Knoten 1 – 2 cm gross	Euteransatz kaudal	Herdförmig ulzerierende und tiefreichende granulomatöse und eosinophile Dermatitis, histopathologisch keine Leishmanien erkennbar; Euter- Innenschenkeldermatitis	Im selben Bestand vor einem Jahr wurde bei einer Kuh Hautleishmaniose diagnostiziert
2.11 11.2010 (Abb. 4),	Multiple ulzerierende Knoten und Pusteln, offene Wunde am Euteransatz kaudal	Kopf, ums Flotzmaul, Hals, Vgl proximal, Euter	Perivaskuläre Dermatitis, gemischtzellig mit vielen Eosinophilen, Euter-Innenschenkeldermatitis Furunkeln (Hals)	Verdacht Insektenbisse mit sek. bakterieller Infektion.
2.12 11.2010	Ulzera und eitrig Knoten	Oberschenkel innenseitig und Euter proximal	Abszedierende Dermatitis/Furunkulose, bakterielle Infektion, Euter-Innenschenkel-dermatitis (Staphylokokken?)	Penicillin/Streptomycin und Dimethylsulfoxid Salbe, langsame Abheilung und Entleerung von Eiter

September 2010). Die Hautläsionen verschwanden nach dem Abkalben im Juli 2009 nach und nach, bei einem Betriebsbesuch im September 2010 erschien das Tier bis

auf einzelne Leckspuren an den Carpi vollständig abgeheilt und das Haar war nachgewachsen (Abb. 5a und 5b). Am Flotzmaulrand blieben einzelne umschriebene un-

204 Originalarbeiten

pigmentierte rosa Hautstellen mit Alopezie zurück. Ihr Kalb blieb gesund und die Serologie (IFAT) des Kalbes blieb negativ. Im September 2010 wurde der gesamte Betrieb erneut serologisch geprüft. Die Kuh Nr. 1.2 zeigte weiterhin einen niedrigen Titer von 1:80, jedoch wurden zugleich ulzerative Läsionen am proximalen Euter festgestellt. Wie oben beschrieben, ergab die PCR-Untersuchung ein negatives Resultat auf *Leishmania*.

Betrieb B: Von den 21 untersuchten Milchkühen wurden 19 Tiere mit einem Antikörper-Titer $\leq 1:40$ negativ gewertet, ein einzelnes Tier zeigte einen schwachen Titer von 1:80 und ein weiteres Tier wies einen Titer von 1:160

auf, welchen wir ebenfalls als schwach positiv werteten. Beide Kühe waren ohne klinische Auffälligkeiten.

Kontrollproben: Sämtliche 35 Blutproben aus der instituts-eigenen Serumbank wurden entweder negativ oder mit einem Antikörpertiter von höchstens 1:40 getestet und somit als negativ befunden.

ELISA-Test

Die beiden Pferde, die Hunde sowie die 6 Ziegen aus dem Betrieb A sowie der Hofhund aus dem Betrieb B lieferten alle negative Ergebnisse.



Abbildung 5: a) Rind mit kutaner Leishmaniose (Mai 2009). b) Gleiches Tier im September 2010: Die Hautläsionen sind abgeheilt und die Haare nachgewachsen.

Autopsie und Untersuchung der Gewebeproben

Die euthanasierte *Leishmania*-positive Kuh (Tier Nr. 1.1) war sehr gut genährt, Lymphknoten und Milz waren von normaler Grösse und ohne makroskopische Veränderungen. Infolge postmortalen Autolyse war eine genaue histologische Untersuchung der Gewebeproben leider nicht mehr möglich. In einem einzelnen subkutanen Lymphknoten konnte mittels PCR *L. siamensis*-DNA nachgewiesen werden. Auf eine Sequenzierung wurde aufgrund der geringen amplifizierten DNA-Menge verzichtet. Versuche, den Erreger mittels *in vitro*-Kultivierung zu züchten (NNN-Medium mit oder ohne Urinzugabe; Iqbal et al., 2006), scheiterten bei allen untersuchten Gewebeproben, einschliesslich des PCR-positiven Lymphknotens.

Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte in der Schweiz kein weiterer Fall der durch die *L. siamensis*-ähnliche Art verursachten Hauterkrankung beim Pferd und Rind dokumentiert werden. Das Phänomen scheint daher sporadischer Natur zu sein, und die Epidemiologie sowie die Pathogenese bleiben in vielen Bereichen unklar. Soweit rückverfolgbar, sind sowohl bei der erkrankten Kuh (Lobsiger et al., 2010) als auch bei den Pferden (Müller et al., 2009) die klinischen Zeichen spontan verschwunden. Die Kuh und eines der befallenen Pferde in der Schweiz waren zum Zeitpunkt der Erkrankung trächtig. Bei beiden Tieren verschwanden die Hautläsionen nach der Geburt graduell, was auf einen starken Einfluss der allgemeinen Immunlage auf den Krankheitsverlauf hinweisen könnte. Da die *Leishmania*-positive Kuh in der Schweiz geboren wurde und zeitlebens in ihrer angestammten Region verblieb, muss der Parasit entweder punktuell eingeschleppt worden sein, oder er existierte schon länger als nicht- oder schwach pathogener Organismus in Mitteleuropa. Anders als bei der konventionellen *L. infantum*-Leishmaniose des Hundes zeigte keines der Tiere (Pferde und Kuh) Allgemeinstörungen. Die Leishmaniose schien sich somit ausschliesslich auf die Haut zu beschränken. Bei der *Leishmania*-positiven Kuh haben wir nach Erkrankung einen Antikörperabfall von 1:400 auf 1:80 innerhalb von 4 Monaten festgestellt, und der Titer blieb auch ein Jahr später auf diesem niedrigen Niveau. Im selben Betrieb wurde bei einer weiteren Kuh ein Titer von 1:80 und im benachbarten Stall bei 2 Kühen Titer von 1:80 bzw. 1:160 gemessen. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Tiere Kontakt mit Leishmanien hatten, jedoch klinisch unauffällig blieben. Es ist jedoch anzumerken, dass der von uns festgesetzte Grenztiter relativ arbiträr auf der Erfahrung mit wenigen negativen Tieren sowie nur einem ätiologisch abgesicherten positiven Tier beruhte. Demzufolge sind unsere serologischen Ergebnisse mit Vorsicht zu interpretieren.

Wie diese Leishmanien bei Pferd und Kuh übertragen werden, bleibt nach wie vor ungeklärt. Für *L. infantum* sind im Mittelmeerraum Phlebotomen die wichtigsten Vektoren. Dass das Verbreitungsgebiet dieser Insekten nicht auf mediterrane Regionen beschränkt ist, konnte in grossangelegten Studien gezeigt werden: Weit nördlich der Alpen in Deutschland wurden Phlebotomen nachgewiesen, darunter *Ph. perniciosus*, welcher als gesicherter Überträger von *L. infantum* gilt (Naucke, 2007). Auf Grund der möglicherweise langen Inkubationszeit, beim Hund beträgt diese mehrere Monate bis Jahre (Eckert et al., 2008), müssen die Überträgerinsekten aber nicht zwingend gleichzeitig mit den klinischen Symptomen der Tiere auffindbar sein. Auch sind wir nicht sicher, dass Phlebotomen die Überträger sind, zumal es sich um eine bisher nicht beschriebene Leishmanienart handelt.

Die Schwierigkeiten, den Erreger mittels klassischer *in vitro*-Kultivierung zu züchten, haben sich bei der weiteren Untersuchung der seziierten Kuh gezeigt. In der früheren Untersuchung (Lobsiger et al., 2009) wurde dieses Scheitern womöglich auf eine massive Kontamination der Kulturen mittels Bakterien und Pilze zurückgeführt, die ex vivo Probenentnahme konnte damals nicht unter optimalen aseptischen Bedingungen durchgeführt werden. Bei den vorliegenden Untersuchungen waren die Bedingungen nach Nekropsie besser und die Kontamination dementsprechend auch viel geringer. Es stellt sich nun die Frage, ob das für klassische Alt- und Neuwelt-*Leishmania*-Arten (welche durch Phlebotomen übertragen werden) geeignete Medium auch für die vorliegende *Leishmania*-Art grundsätzlich funktionieren würde. Diese Frage stellt sich auch im Zusammenhang mit dem/den bisher völlig unbekanntem Vektoren. In einer kürzlich erschienenen Übersichtsarbeit von Dantas-Torres (2011) wurde diskutiert, ob ausser Phlebotomen nicht auch Zecken als Vektoren für *Leishmania*-Parasiten in Frage kommen. Auch wenn dies für klassische *Leishmania*-Arten eher unwahrscheinlich ist, könnten doch neue beziehungsweise unbekannte Leishmanien alternative Vektoren verwenden. In einem solchen Fall müsste aber das zur Kultivierung von promastigoten Stadien eingesetzte Medium der Physiologie dieser Vektoren angepasst werden.

Eine Leishmaniose kann bei einer Kuh oder beim Pferd nicht bloss aufgrund des klinischen Bildes diagnostiziert werden. Wichtig zur Abklärung sind neben einer umfassenden Anamnese histopathologische und molekularbiologische Untersuchungen. In der vorliegenden Arbeit sind einige mögliche, nicht abschliessende Differenzialdiagnosen aus dem eingesandten Material aufgezeigt worden. Follikulitis und Furunkulose waren in unserem Untersuchungsmaterial am häufigsten vertreten. Generell sind es jedoch seltene Hautläsionen, die durch *Staphylococcus aureus* oder, weniger häufig, *S. hyicus* verursacht werden. Prädisponierende Faktoren für diese Infektionen sind Feuchtigkeit, warme Umgebungstemperatur oder Traumata. Die Hauteffloreszenzen werden am häufigsten am Rumpf, Perineum, Schwanz,

206 Originalarbeiten

distale Gliedmassen, Nacken und Gesicht vorgefunden (Scott, 2007). Zitzen- und Euterverletzungen sind häufig auf mangelnde Klauenpflege oder Aufstallungsfehler zurückzuführen. Traumata an den Gliedmassen sind oft durch Stacheldraht oder schadhafte Stalleinrichtungen verursacht (Methling et al, 2004). Euter-Schenkelläsionen können durch Reibung an der Schenkellinnenseite vor allem bei Kühen mit prall gefülltem, grossem Euter beobachtet werden. Zusätzliche Faktoren wie Feuchtigkeit, mangelnde Stallhygiene und Wärme können die Symptome verschlimmern (Methling et al., 2004; Avenarius et al., 2009). Die Leishmaniose bei Kuh und Pferd tritt bei uns nur sporadisch mit sehr geringer Ausbreitungstendenz in Erscheinung. Da es sich um eine

Zoonose handeln könnte, sind jedoch weitere Untersuchungen angezeigt.

Dank

Wir bedanken uns herzlich bei Didier Hirt, Caroline Müller und Verena Eidam für ihre technische Unterstützung im Labor und bei allen beteiligten Tierärzten für das Einsenden von Biopsiematerial, Fotos und Blutproben. Wolf von Bomhard (Fachpraxis für Tierpathologie, D-München) danken wir für die Überlassung von Informationen zu den Leishmaniose-Fällen bei Pferden in Deutschland.

La leishmaniose cutanée bovine se répand-elle en Suisse?

Suite au premier diagnostique de leishmaniose chez une vache posé en Suisse en avril 2009, le présent travail avait pour but d'éclaircir la présence potentielle de leishmaniose bovine. D'autres animaux provenant de l'exploitation touchée ainsi que des exploitations laitières voisines ont été examinées. En outre, les vétérinaires praticiens ont été priés de faire parvenir des biopsies de peau des cas suspects. Sur 12 échantillons les examens quant à *Leishmania* ont donnés des résultats négatifs. L'apparition de cette parasitose semble donc extrêmement rare en Suisse. En conclusion, on discute quelques diagnostique différentiels.

Vi è propagazione di leishmaniosi cutanea bovina in Svizzera?

Sulla base di un caso diagnosticato di leishmaniosi nell'aprile 2009 in un bovino in Svizzera, si è deciso di fare questo studio, con lo scopo di condurre dei chiarimenti descrittivi sull'esistenza potenziale della leishmaniosi nei bovini. Nell'azienda in questione così come nelle aziende lattiere vicine sono stati esaminati altri bovini. È stato inoltre richiesto ai veterinari di inviare biopsie cutanee nei casi sospetti. Dalle analisi, i 12 campioni inviati sono risultati tutti negativi alla *Leishmania*. La comparsa di questa parassitosi risulta quindi essere molto rara in Svizzera. Alla fine sono state discusse alcune diagnosi differenziate.

Literatur

Avenarius A., Groeger S., Wehrend A.: Das Zwischenschenkel-ekzem bei der Milchkuh – eine Übersicht der Literatur. Tierärztl. Praxis 2009, 37: 67–71.

Dantas-Torres: Ticks as vectors of *Leishmania* parasites. Trends Parasitol. 2011, 27: 155–159.

Eckert J., Friedhoff K. T., Zahner H., Deplazes P.: Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin, Enke Verlag 2.Auflage, 2008.

Gottstein B., Deplazes P., Arnold P., Mehlitz D., Reiter I., Eckert J.: Immundiagnose der Leishmaniose des Hundes mit ELISA und Mini-Western-Blot. Schweiz. Arch. Tierheilk. 1988, 130: 249–262.

Iqbal J., Jamshid M., Ahmed B., Bukhari I., Bashir S., Yasinzaï MM.: Some studies on human urine as promoter for the growth of *leishmania* in vitro. Pak J Pharm Sci. 2006, 19(2): 152–5.

Köhler K., Hetzel U., Domingo M., Schönian G., Zahner H., Burkhardt E.: Cutaneous leishmaniose in a horse in southern Germany caused by *Leishmania infantum*. 2002, 109: 9–17.

Lobsiger L., Müller N., Schweizer T., Frey C. F., Wiederkehr B., Zumkehr B., Gottstein B.: An autochthonous case of cutaneous bovine leishmaniasis in Switzerland. Vet. Parasitol. 2010, 169: 408–414.

Methling W., Busch W., Amselgruber W. M.: Tiergesundheits- und Tierkrankheitslehre. Parey Verlag Stuttgart, 2004.

Mettler M., Grimm F., Capelli G., Camp H., Deplazes P.: Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, an Immunofluorescent-Antibody Test, and Two Rapid Tests (Immunochromatographic-Dipstick and Gel Tests) for Serological Diagnosis of Symptomatic and Asymptomatic *Leishmania* Infections in Dogs. J.Clin.Microbiol. 2005, 43: 5515–5519.

Müller N., Welle M., Lobsiger L., Stoffel M. H., Kühni Boghenbor K., Hilbe M., Gottstein B., Frey C. F., Geyer G., von Bomhard W.: Occurrence of *Leishmania* sp. in cutaneous lesions of horses in Central Europe. Vet. Parasitol. 2009, 166: 346–351.

Naucke T. J.: Leishmaniose-Einzug in Deutschland. Tierärztl. Umschau 2007, 62: 495–500.

Piarroux R., Fontes M., Perasso R., Gambarelli F., Joblet C., Dumon H., Quilici M.: Phylogenetic relationships between Old

World *Leishmania* strains revealed by analysis of a repetitive DNA sequence. *Mol. Biol. Parasitol.* 1995, 73: 249–252.

Poli F, Abramo P, Barsotti S, Leva M, Gramiccia A, Ludovisi A, Mancianti F: Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. *Vet. Parasitol.* 2002, 106: 181–191.

Rolão N, Martins M. J., João A., Campino L.: Equine infection with *Leishmania* in Portugal. *Parasite* 2005, 12: 183–186.

Rommel R., Eckert J., Kutzer E., Körting W., Schneider T.: *Veterinärmedizinische Parasitologie*, Parey Buchverlag Berlin 2000.

Solano-Gallego L., Fernández-Bellón H., Serra R., Gállego M., Ramis A., Fondevilla D., Ferrer L.: Cutaneous leishmaniasis in three horses in Spain. *Equine Vet. J.* 2003, 35: 320–323.

Scott D. W.: *Color Atlas of Farm Animal Dermatology*, Blackwell Publishing, 2007.

Sukmee T., Siripattanapipong S., Mungthin M., Worapong J., Rangsin R., Samung Y., Kongkaew W., Bumrungsana K., Cha-

nachai K., Apiwathanasorn C., Rujijindakul P., Wattanasri S., Ungchusak K., Leelayoova S.: A suspected new species of *Leishmania*, the causative agent of visceral leishmaniasis in a Thai patient. *Int. J. Parasitol.* 2008, 38: 617–622.

Korrespondenz

Dr. med. vet. FVH Lisbeth Lobsiger
Kirchgasse 10
CH-3053 Münchenbuchsee
lisbeth.lobsiger@quick-line.ch

Received: 5 May 2011

Accepted: 18 December 2011