

Aus dem
Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Umweltstabilität von Leptospiren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Lisa Hanne Nau
aus München

Leipzig, 2021

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Dr. Thomas Vahlenkamp

Betreuer: Prof. Dr. Martin Pfeffer

Gutachter: Prof. Dr. Martin Pfeffer, Institut für Tierhygiene und Öffentliches
Veterinärwesen, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Prof. Dr. Reinhard Straubinger, Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen,
Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie, Ludwig-Maximilians-Universität,
München

Tag der Verteidigung: 27.04.2021

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	2
2.1 Die Geschichte der Leptospirose	2
2.2 Morphologie und Übertragungswege der Erreger	2
2.3 Taxonomie	3
2.4 Haupt- und Nebenwirte	3
2.5 Die Erkrankung beim Menschen	5
2.5.1 Vorkommen.....	5
2.5.2 Klinik und Therapie	5
2.6 Die Erkrankung beim Tier	6
2.6.1 Bei Nutztieren	6
2.6.2 Bei Haustieren	8
2.6.3 Bei Wildtieren	9
2.7 Diagnostik.....	11
2.8 Die Umweltstabilität der Erreger.....	11
2.8.1 In Erde	12
2.8.2 In Wasser.....	12
2.8.3 In Urin	13
3. Publikationen.....	14
3.1 Publikation Nr. 1.....	14
3.2 Publikation Nr. 2.....	28
4. Diskussion und Schlussfolgerung	41
5. Zusammenfassung	48
6. Summary	50
7. Literaturverzeichnis.....	52
8. Danksagung	62

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
bzw.	beziehungsweise
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EMJH	Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris
ERU	Equine rezidivierende Uveitis
et al.	et alia/und andere
h	Stunde(n)
IfSG	Infektionsschutzgesetz
<i>L.</i>	<i>Leptospira</i>
µm	Mikrometer
max.	maximal
m/s	Meter pro Sekunde
PCR	Polymerase Chain Reaction/Polymerase Kettenreaktion
sek	Sekunde(n)
spp.	mehrere Spezies
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Die Leptospirose des Menschen ist die am weitesten verbreitete Zoonose mit weltweit jährlich geschätzten 1,03 Millionen Fällen. Circa 5 % dieser Leptospirosefälle verlaufen tödlich (COSTA et al. 2015). Es wird jedoch davon ausgegangen, dass durch den häufig asymptomatischen oder unspezifischen Krankheitsverlauf, welcher bei milder Verlaufsform mit grippeähnlichen Symptomen einhergeht, sehr viele Infektionen nicht erkannt werden und die Dunkelziffer hoch ist (HAAKE et al. 2015; ADLER et al. 2010). Am häufigsten tritt die Leptospirose des Menschen in Ländern mit tropischem oder subtropischem Klima und in Entwicklungsländern mit schlechten hygienischen Bedingungen auf. Schwere Regenfälle und Überflutungsereignisse erhöhen dabei die Gefahr einer Ansteckung mit Leptospiren (LAU et al. 2010). In Deutschland tritt die Erkrankung vor allem als saisonale Erkrankung mit Häufung im Sommer und im Frühherbst auf und ist oft mit Wassersportaktivitäten assoziiert. In den Jahren 2009 - 2019 wurden in Deutschland pro Jahr zwischen 65 und 196 humane Leptospirosefälle gemeldet (<https://survstat.rki.de>, Abfragedatum: 26.03.2020). Somit ist die Leptospirose zwar eine seltene Erkrankung, aber ein Anstieg der Fallzahlen in den nächsten Jahren auf Grund der sich ändernden klimatischen Bedingungen ist denkbar (LAU et al. 2010). Daher war das erste Ziel dieser Arbeit die Veröffentlichung eines Übersichtsartikels über die Leptospirose, um Ärzte in Deutschland für diese häufig unerkannt bleibende Erkrankung zu sensibilisieren. Hauptwirte des Erregers sind meist Nagetiere und Kleinsäuger, jedoch können alle Säugetiere mit Leptospiren infiziert sein. Einige der in Deutschland gehaltenen Haus- und Nutztiere fungieren für bestimmte Leptospirenserovare als Hauptwirte und sind damit potentielle Überträger der Leptospirose auf den Menschen. Die Hauptwirte sind meist chronisch infiziert und können die Leptospiren mit ihrem Urin ausscheiden (LEVETT 2001). Am häufigsten stecken sich Menschen über direkten Tierkontakt oder indirekten Kontakt mit dem Urin infizierter Tiere, zum Beispiel über kontaminierte Gewässer oder Erde, an (HAAKE et al. 2015). Auf Grund dieses Übertragungswegs ist insbesondere das Überleben der Leptospiren in der Umwelt für das humane Infektionsrisiko von Bedeutung. Das zweite Ziel dieser Arbeit war es, das Überleben eines der wichtigsten Leptospirenserovare in Deutschland unter verschiedenen, der Umwelt nachempfundenen, Bedingungen zu untersuchen. Da zuvor beschrieben wurde, dass Labor- und Feldstämme der Leptospiren sich in ihrer Morphologie und Zellgesundheit unterscheiden können, wurden die Versuche mit einem Laborstamm und einem Feldstamm von *Leptospira kirschneri* Serovar Grippytyphosa durchgeführt.

2. Literaturübersicht

2.1 Die Geschichte der Leptospirose

Adolph Weil beschrieb 1886 erstmals eine Krankheit, die durch Ikterus, Splenomegalie, Niereninsuffizienz, Konjunktivitis und Hautausschläge gekennzeichnet war (WEIL 1886). Diese Erkrankung wurde Weil'sche Krankheit genannt. Jedoch berichten schon Texte aus dem antiken China und Japan von einem Krankheitsbild mit ähnlichen Symptomen (KITAMURA et al. 1918). Je nach epidemiologischer Situation wurde die Krankheit dort als Herbstfieber, Reisfieber oder Minenfieber bezeichnet; in Europa auch als Schweinehüterkrankheit, Schlammfieber oder Erbsenpflückerfieber (ADLER 2015).

Bereits 1907 gelang Stimson die Darstellung einer Leptospire durch die Levaditi-Silberfärbung in einer menschlichen Niere. Er nannte den Organismus *Spirocheta interrogans*, da sein Aussehen einem Fragezeichen ähnelte (STIMSON 1907). Eine erste Isolation des Organismus aus Meerschweinchenblut fand nur wenige Jahre später fast zeitgleich in Europa und Japan statt (ADLER 2015; INADA et al. 1916). Der Erreger der Weil'schen Krankheit wurde erstmals 1917 von Noguchi zur Abgrenzung von anderen Spirochäten als Leptospire (griechisch lepto = dünn / fein ; spira = gewunden) bezeichnet (NOGUCHI 1917).

2.2 Morphologie und Übertragungswege der Erreger

Ausgelöst wird die Leptospirose durch spiralförmige, an den Enden kleiderhakenähnlich gebogene, circa 6 - 20 µm lange und im Durchmesser circa 0,1 µm dicke Bakterien aus der Gruppe der Spirochäten (LEVETT 2001; ADLER et al. 2010). Ihre Ultrastruktur ist ähnlich der gramnegativer Bakterien (CAMERON 2015). Durch im Periplasma befindliche Endoflagellen erhalten Leptospiren ihre besondere Spiralförmigkeit und können sich eigenständig fortbewegen (CHARON et al. 2002; WOLGEMUTH et al. 2006). Ihre Fortbewegungsgeschwindigkeit wird dabei abhängig von der Viskosität ihrer Umgebung mit Geschwindigkeiten von circa 20 µm / 2 - 3 sek. in Standardmedium beschrieben (FAINE et al. 1999; TAKABE et al. 2013; SCHNEIDER et al. 1974). Pathogene Leptospiren zeigen ein Wachstumsoptimum bei Temperaturen von 28 - 30 °Celsius und einem pH-Wert von 7,2 - 7,6 (ADLER et al. 2010; CAMERON 2015).

Die Übertragung des Erregers auf den Menschen erfolgt zumeist durch direkten Tierkontakt oder indirekten Kontakt mit dem Urin infizierter Tiere, zum Beispiel über kontaminierte Erde oder Gewässer (HAAKE et al. 2015). Die Leptospiren gelangen dabei über die Schleimhäute oder über kleine Hautverletzungen in den Körper (HAAKE et al. 2015). Infektionen von Mensch zu Mensch sind zwar sehr selten, aber eine Übertragung beim Geschlechtsverkehr (HARRISON et al. 1988), beim Stillen (BOLIN et al. 1988) und transplazentar während der Schwangerschaft wurden bereits beschrieben (CHUNG et al. 1963; COGHLAN et al. 1969).

2.3 Taxonomie

Die Taxonomie von *Leptospira* spp. ist sehr komplex, da es zwei verschiedene Klassifizierungssysteme gibt. Leptospiren können zum einen anhand ihrer serologischen Eigenschaften in apathogene, saprophytische *Leptospira biflexa* und pathogene *Leptospira interrogans* mit 24 Serogruppen und mindestens 300 Serovaren eingeteilt werden (COSATE et al. 2017; ZHANG et al. 2015; THIBEAUX et al. 2018b). Zum anderen werden Leptospiren anhand ihrer molekulargenetischen Eigenschaften in verschiedene Genomospezies unterteilt. Bei der genotypischen Klassifikation kann aktuell zwischen mindestens 65 pathogenen, intermediären oder apathogenen Genomospezies unterschieden werden (THIBEAUX et al. 2018b; THIBEAUX et al. 2018a; VINCENT et al. 2019). Obwohl die beiden Einteilungsmöglichkeiten nicht deckungsgleich sind und zum Beispiel Serovare derselben Serogruppe unterschiedlichen Genomospezies zugeordnet werden können, werden heutzutage noch beide Systematiken benutzt. In der human- und veterinärmedizinischen Diagnostik ist aufgrund des Einsatzes des Mikroagglutinations-Tests vor allem die serologische Einteilung üblich, während bei der Untersuchung von Erreger-ausscheidenden Reservoirwirten oder dem Erregernachweis in Umweltproben meist molekularbiologischen Methoden zur genotypischen Klassifizierung genutzt werden.

2.4 Haupt- und Nebenwirte

Fast jedes Säugetier, einschließlich der Meeressäuger und Beuteltiere, kann von Leptospiren infiziert werden (ADLER et al. 2010). Es wird davon ausgegangen, dass global in der Mehrzahl der Säugetierfamilien die durchschnittliche Prävalenz von Leptospireninfektionen bei etwa 15 % liegt (ANDERSEN-RANBERG et al. 2016). Unterschiedliche Leptospirenserovare

Literaturübersicht

sind jedoch an bestimmte Tierarten adaptiert, welche als Reservoirwirte / Hauptwirte fungieren (LEVETT 2001; MÜNKER 1963). Die Hauptwirte sind typischerweise hochempfindlich gegenüber dem adaptierten Serovar und bleiben nach einer meist symptomlosen Infektion lebenslang infiziert. Durch eine chronische Infektion der Nierentubuli und der dadurch möglichen Ausscheidung von Leptospiren über den Urin fungieren die Hauptwirte als natürliches Reservoir und spielen eine wichtige Rolle in der Infektionskette (LEVETT 2001). Im Gegensatz zu der direkten Erregerverbreitung von Tier zu Tier bei den Hauptwirten infizieren sich Nebenwirte in der Regel indirekt (LEVETT 2001). Nebenwirte haben meist eine deutlich geringere Empfindlichkeit gegenüber dem nicht-adaptiertem Serovar und erkranken in der Regel schwerer bis hin zum tödlichen Verlauf. Jedes Tier kann zugleich Hauptwirt für ein oder mehrere Serovare und Nebenwirt für andere Serovare sein. Vor allem Nagetiere und Kleinsäuger fungieren als Reservoirwirte der *Leptospira* spp..

Eine Übersicht über die relevantesten Serovare und ihre Hauptwirte gibt Tabelle 1.

Tabelle 1: Wichtige Leptospiren-Serovare und deren Hauptwirte (modifiziert nach (GREENE 2008); (STRAUBINGER 2015); (LEVETT 2001))

Leptospiren Serovar	Hauptwirt(e)
Hardjo	Rind, Schaf
Hardjobovis	Rind
Pomona	Rind, Schwein, Schaf, Skunk, Opossum
Icterohaemorrhagiae	Ratte
Grippotyphosa	Maus, Hamster
Mozdok	Brandmaus
Canicola	Hund
Tarassovi	Schwein
Autumnalis	Maus
Bratislava	Ratte, Schwein, Pferd
Bataviae	Hund, Ratte, Maus

2.5 Die Erkrankung beim Menschen

2.5.1 Vorkommen

Die Leptospirose ist eine auf jedem Kontinent – außer der Antarktis – vorkommende Erkrankung mit geschätzten 1,03 Millionen humanen Fällen pro Jahr (COSTA et al. 2015; ADLER et al. 2010). Die höchste Inzidenz tritt dabei in Ländern mit tropischem oder subtropischem Klima auf, die dem Erreger optimale feuchtwarmer Überlebensbedingungen bieten (COSTA et al. 2015). Des Weiteren erhöht sich die Gefahr einer Infektion mit Leptospiren in Gebieten mit schlechten hygienischen Bedingungen, bei Überflutungsgeschehen oder nach extremen Regenfällen (LAU et al. 2010). Dadurch kommt es vor allem in Entwicklungsländern wie Thailand oder Indien häufiger zu Ausbruchsgeschehen (DAN et al. 2019; THAIPADUNGPANIT et al. 2007).

In Deutschland gehört die seit 2001 meldepflichtige Leptospirose zu den seltenen Erkrankungen mit 65 - 196 pro Jahr gemeldeten humanen Fällen in den Jahren 2009 - 2019 (Robert Koch-Institut: SurvStat@RKI 2.0, <https://survstat.rki.de>, Abfragedatum: 26.03.2020). Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass es eine hohe Dunkelziffer nicht diagnostizierter Leptospirosefälle gibt (COSTA et al. 2015). In Deutschland handelt es sich um eine saisonale Erkrankung, die vor allem im Sommer und im Frühherbst auftritt. Ein erhöhtes Risiko für eine Erkrankung mit Leptospiren haben Menschen mit einer gehäuften Exposition gegenüber Tieren, deren Ausscheidungen, Oberflächenwasser oder dem Erdreich, wie zum Beispiel Waldarbeiter, Tierärzte oder Erntehelfer (JANSEN et al. 2005; DREESMAN et al. 2016). Auch Freizeitaktivitäten wie Wassersport oder die Haltung von Farbratten sind mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko verbunden (BROCKMANN et al. 2010; JANSEN et al. 2005; BROCKMANN et al. 2016). In den letzten Jahren gab es in Deutschland mehrere große Ausbruchsgeschehen. Im Jahr 2007 und im Jahr 2014 erkrankten Arbeitskräfte auf Erdbeerfeldern und im Jahr 2006 erkrankten mehrere Teilnehmer eines Triatlons. Bei diesen Ausbrüchen handelte es sich nahezu ausnahmslos um Infektionen mit *L. kirschneri* Serovar Grippotyphosa (FIECEK et al. 2017; DESAI et al. 2009; DREESMAN et al. 2016; BROCKMANN et al. 2010).

2.5.2 Klinik und Therapie

Die Leptospirose beim Menschen kann sich mit einer Vielzahl von unterschiedlichen Symptomen manifestieren und variiert im Verlauf von häufig asymptomatischem oder sehr

mildem Krankheitsgeschehen bis hin zu schwerwiegenden Verläufen mit einer Mortalität von bis zu 50 % (HAAKE et al. 2015). Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) teilt die Leptospirose nach ihrer klinischen Symptomatik in vier Kategorien ein (WHO 2003).

- leichte, grippeähnliche Erkrankung
- Morbus Weil (gekennzeichnet durch Gelbsucht, Nierenversagen, Blutungen und Myokarditis mit Arrhythmien)
- Meningitis/ Meningoenzephalitis
- Pulmonale Hämorrhagien mit respiratorischer Insuffizienz

Die Erkrankung verläuft häufig biphasisch. Nach einer Inkubationszeit von meist 7 - 12 Tagen kommt es in der akuten Phase typischerweise zum plötzlichen Anstieg der Körpertemperatur (HAAKE et al. 2015; LEVETT 2001). Zusätzlich klagen Patienten häufig über unspezifische Symptome wie Schüttelfrost, Kopf- und Muskelschmerzen. Auch gastrointestinale Symptome und Husten wurden beschrieben (HAAKE et al. 2015). Nach circa einer Woche lassen die initialen Symptome in der Phase der Antikörperbildung nach, es kann jedoch nach 3 - 4 Tagen erneut zu einem Anstieg der Körpertemperatur kommen (LEVETT 2001). Je nach Verlauf können Symptome wie zum Beispiel Blutungen, Zeichen eines Nierenversagens, neurologische Symptome, Ikterus oder Zeichen einer Pankreatitis auftreten (LEVETT 2001; HAAKE et al. 2015). Als Spätfolge der Leptospirose wird häufig eine Uveitis beschrieben, aber auch chronische Müdigkeit, Myalgien, Kopfschmerzen, Schwächegefühl, Unwohlsein und kardiale Veränderungen (HAAKE et al. 2015).

Die Therapie der Leptospirose erfolgt durch die intravenöse Gabe von Antibiotika, wie zum Beispiel Penicillin G. Bei leichten Verläufen ist auch eine orale Gabe von Amoxycillin, Ampicillin, Doxycyclin oder Erythromycin möglich (WHO 2003).

2.6 Die Erkrankung beim Tier

2.6.1 Bei Nutztieren

Die Symptome bei infizierten Nutztieren sind sehr unterschiedlich und können von einem häufig vorkommenden subklinischen Verlauf bis hin zum letalen Verlauf variieren, je nach auslösendem Serovar, Alter und Konstitution der Tiere.

Bei Rindern können perakute bis chronische Verläufe festgestellt werden, die in unterschiedlich ausgeprägter Form mit Fieber, Störung des Allgemeinbefindens, Hämoglobinurie, Ikterus,

Literaturübersicht

Anämie, Mastitis, Fruchttod und Abort einhergehen können. Bei adulten Tieren spielt vor allem der Einfluss auf die Reproduktionsleistung eine Rolle, während bei Jungtieren klinische Erkrankungsfälle von Bedeutung sind. (MORI et al. 2017; SALGADO et al. 2015; CHANTON-GREUTMANN et al. 2002; ELLIS 1994)

Obwohl beim Schwein die meisten Infektionen mit Leptospiren subklinisch verlaufen, spielt die chronische Form der Leptospirose als Auslöser von Aborten, Totgeburten und Konzeptionsstörung eine Rolle. Darüber hinaus werden Apathie, Fieber, Ikterus, Hämaturie und Anämie als klinische Symptome genannt. Bei Schlachttieren können interstitielle Nephritiden festgestellt werden (STRUTZBERG-MINDER et al. 2011).

Neben dem von infizierten Nutztieren ausgehenden Infektionsrisiko für den Menschen, hat die Leptospirose daher auch bei Schweinen eine wirtschaftliche Bedeutung. Das Schwein gilt als Reservoirwirt für Serovare der Serogruppen Pomona, Tarassovi und Australis (STRUTZBERG-MINDER et al. 2011). In Deutschland waren laut SCHÖNBERG et al. (1987) die häufigsten Serovare in der Schweinepopulation Saxkoebing und Grippytyphosa.

Schafe sind gegenüber einer Infektion mit Leptospiren weniger empfindlich. In deutschen Schafbeständen dominieren die Serovare Hardjo, Sejroe, Grippytyphosa und Saxkoebing (SCHÖNBERG et al. 1987). Hierzulande ist fast ausschließlich mit subklinischen Infektionen zu rechnen, die sich durch entsprechende Antikörpertiter nachweisen lassen (BOSTEDT et al. 2018). Dennoch kann eine Leptospiren-Infektion bei Schafen zu unterschiedlich stark ausgeprägten Symptomen wie Fieber, Benommenheit, Gangstörungen, gestörter Futteraufnahme, erhöhter Atem- und Herzfrequenz, ikterische Schleimhäute, hämolytischer Anämie sowie zu Spätaborten und der Geburt lebensschwacher Lämmer führen (ELLIS 2015; CICERONI et al. 2000; TAGLIABUE et al. 2016).

Die Leptospirose bei Schweinen und Schafen ist entsprechend der Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten, zuletzt geändert am 31.08.2015, meldepflichtig.

In Deutschland haben circa 17,2 % der Warmblutpferde einen Antikörpertiter gegen Leptospiren. Am häufigsten weisen diese Tiere Antikörper gegen die Serovare Icterohaemorrhagiae, Bratislava und Grippytyphosa auf (PIKALO et al. 2016). Als möglicher Auslöser der Equinen Rezidivierenden Uveitis (ERU) kommt der Leptospirose beim Pferd besondere Bedeutung zu. Bei dieser auch als Mondblindheit bekannten Erkrankung kommt es zu einer wiederkehrenden Entzündung der mittleren Augenhaut. Von dieser Erkrankung sind bis zu 10 % der Pferde in Deutschland betroffen und in einer Studie von 2013 gelang bei 56 %

der erkrankten Tiere ein positiver Leptospirennachweis (KULBROCK et al. 2013; BÅVERUD et al. 2009; HARTSKEERL et al. 2004; DORREGO-KEITER et al. 2016).

Insgesamt gibt es nur sehr wenige Studien zur Leptospirenprävalenz bei Nutztieren in Deutschland. Bei einer großflächigen Untersuchung von Antikörperprävalenzen gegen Leptospiren im Jahre 1984 in Deutschland zeigte sich, dass circa 1,6 % der Rinder, 1,2 % der Schweine, 14,4 % der Schafe und 0,3 % der Ziegen ein positives Ergebnis im Mikroagglutinationstest aufwiesen (SCHÖNBERG et al. 1987).

In einer jüngeren Studie zeigte sich in bayerischen Rinderbeständen eine Antikörperprävalenz von 1,5 % bis 2,2 % (SCHMID 2005). Bei dieser Studie wurde am häufigsten das Serovar Hardjo nachgewiesen (55 %), für welches das Rind den Hauptwirt darstellt und gegen das es in Deutschland einen zugelassenen Impfstoff gibt. Das Serovar Grippotyphosa wurde in 18 % der Fälle, Serovar Icterohaemorrhagiae in 13 %, Serovar Bratislava in 8 % und Serovar Canicola in nur 5 % der Fälle nachgewiesen (SCHMID 2005).

2.6.2 Bei Haustieren

Haustiere können an Leptospirose erkranken und ein Risiko als mögliche Infektionsquelle für den Menschen darstellen (BROCKMANN et al. 2016).

Bei Hunden können die klinischen Symptome abhängig vom auslösenden Serovar, dem Alter des Tieres und der individuellen Immunitätslage von keinen oder sehr milden Symptomen bis hin zum tödlichen Verlauf, variieren. Häufig werden die Tiere unter anderem mit Anorexie, Apathie, Vomitus, Diarrhoe und Anzeichen eines Ikterus vorgestellt. Allgemein sollte bei fieberhaften Erkrankungen und Symptomen von Leber- oder Nierenerkrankungen eine Leptospirose in Betracht gezogen werden (GEISEN et al. 2007; KNÖPFLER et al. 2017; SCHULLER et al. 2015a; SYKES et al. 2011).

In Deutschland wurden in zwei Studien Hunde mit Leptospirose-verdächtigen Krankheitssymptomen auf das Vorhandensein von Leptospiren-spezifischen Antikörpern untersucht (GERLACH et al. 2007; GEISEN et al. 2008). Bei diesen Hunden variierte die Prozentzahl mit einem positiven Antikörpernachweis zwischen 44 % und 48 %. Am häufigsten wurden die Serovare Grippotyphosa und Sejroe in Süddeutschland sowie die Serovare Australis und Copenhageni in Norddeutschland nachgewiesen (GEISEN et al. 2008; GERLACH et al. 2007). Allerdings wurde in diesen Studien nicht zwischen geimpften und ungeimpften Hunden unterschieden, so dass die hohen Prozentzahlen von Tieren mit Antikörpern wahrscheinlich nicht ausschließlich auf natürliche Infektionen zurückzuführen sind. Auch in einer jüngeren

Literaturübersicht

Studie in Berlin fanden sich bei erkrankten Hunden vor allem die Serovare Australis (28 %), Grippotyphosa (18 %) und Pomona (14 %) (MAYER-SCHOLL et al. 2013). Vor Einführung der Impfung ging man davon aus, dass die zwei häufigsten Serogruppen, die zu einer Infektion des Hundes geführt haben, Icterohaemorrhagiae und Canicola waren. Dies lässt vermuten, dass es durch die Einführung der Vakzinierung in Deutschland gegen die Serovare Icterohaemorrhagiae und Canicola und seit 2011 zusätzlich gegen die Serovare Grippotyphosa und Australis zu einer Verschiebung bezüglich der infektiösauslösenden Serovare in der Hundepopulation kam (MAYER-SCHOLL et al. 2013; SYKES et al. 2011).

Obwohl sich im Gegensatz zum Hund bei der Katze meist keine klinische Manifestation zeigt, sollte bei der aktuellen in Deutschland ermittelten Antikörperprävalenz von 16 % (im Raum Berlin/Brandenburg) bis 17,9 % (in München und Umgebung) die Katze als möglicher Überträger der Leptospirose nicht außer Acht gelassen werden. Der Vergleich der gefundenen Serovarprävalenzen lässt vermuten, dass es eine geographisch unterschiedliche Verteilung der Serovare innerhalb der Katzenpopulationen gibt: Ist in Berlin und Brandenburg das Serovar Pomona (48,9 %), gefolgt von den Serovaren Grippotyphosa (15,6 %) und Javanica (11,1 %), vorherrschend, so sind in München und Umgebung die Serovare Australis und Bratislava mit 57,4 % am häufigsten an einer Infektion beteiligt (ROSE 2018; WEIS 2016).

Sowohl bei Hunden, als auch bei Katzen wurde in zwei – in Deutschland durchgeführten – Studien gezeigt, dass sie durch eine Ausscheidung des Erregers mittels ihres Urins als möglicher Überträger der Leptospirose auf Tier und Mensch fungieren können (WEIS et al. 2017; LLEWELLYN et al. 2016).

Auch wenn es einige Beschreibungen der experimentellen Infektion von Meerschweinchen, Kaninchen, Hamstern oder Hausratten mit Leptospiren gibt, sind Berichte von natürlichen Infektionen bei domestizierten Formen dieser Tierarten sehr selten (PISCHKE et al. 2010; SCHULLER et al. 2015b; JIN et al. 2016). Jedoch wurde schon von teils schwer verlaufenden Fällen des Morbus Weil bei Patienten berichtet, die eine *L. interrogans* Serovar Icterohaemorrhagiae-Infektion über sogenannte Schmuserratten akquirierten (ROCZEK et al. 2008).

2.6.3 Bei Wildtieren

Bei den wenigen Untersuchungen zur Prävalenz von Leptospiren in Wildtierspezies in Deutschland zeigt sich, dass eine Vielzahl heimischer Tierarten mit Leptospirose infiziert sein

kann. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Leptospirenprävalenz bei Wildtieren in Deutschland.

Tabelle 2: Leptospirenprävalenz und häufig gefundene Serovare/Genomospezies bei Wildtieren in Deutschland:

Tierart	Anzahl positiver Tiere/Gesamtzahl (%)	Häufige Serovare bzw. Genomospezies falls angegeben	Studie
Wildschwein (<i>Sus scrofa</i>)	22/125* (18 %)	Pomona, Bratislava	(JANSEN et al. 2007)
	10/131*** (7,6 %)	Grippotyphosa, Bratislava	(HORSCH et al. 1970)
Füchse (<i>Vulpes vulpes</i>)	24/1253* (1,9 %)	Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae ,Bratislava	(MÜLLER et al. 1994)
Waschbär (<i>Procyon lotor</i>)	6/457** (1,3 %)		(ANHEYER-BEHMENBURG 2013)
Igel (<i>Erinaceus europaeus</i>)	24/26* (92,3 %)	Bratislava, Poi	(HORSCH et al. 1970)
Hase (<i>Lepus europaeus</i>)	67/280*** (23,93 %)	Grippotyphosa	(HORSCH et al. 1970)
Reh (<i>Capreolus capreolus</i>)	3/81*** (3,69 %)	Grippotyphosa	(HORSCH et al. 1970)
Rothirsch (<i>Cervus elaphus</i>)	2/18*** (11,11 %)	Grippotyphosa	(HORSCH et al. 1970)
Damhirsch (<i>Dama dama</i>)	1/8*** (12,5 %)	Grippotyphosa	(HORSCH et al. 1970)

*Serologische Untersuchung

**PCR-Untersuchung

*** Zusammenfassung verdächtiger und positiver Tiere in serologischen Untersuchungen

Bei vielen anderen Tierarten, wie zum Beispiel Wildkatze (*Felis silvestris silvestris*), Luchs (*Lynx lynx*) und Dachs (*Meles meles*), wurden Studien außerhalb Deutschlands zum Vorkommen von Leptospiren durchgeführt. Da die Länder, in denen diese Studien durchgeführt wurden, häufig direkt an Deutschland angrenzen, kann davon ausgegangen werden, dass es auch bei Untersuchungen dieser Tiere in Deutschland zu Leptospirennachweisen kommen würde (ŽMUDZKI et al. 2016; BANDOUCHOVA et al. 2007; MILLÁN et al. 2014; AYRAL et al. 2016).

Auch in zoologischen Gärten gehaltene einheimische und exotische Tiere kommen mit Leptospiren in Kontakt. In einer umfangreichen Studie wurden Seroprävalenzen zwischen 10,7 % und 25 % in deutschen Zoos gefunden. Das häufigste Serovar war Copenhageni und die Antikörper wurden vor allem bei Raubtieren und Unpaarhufern festgestellt (STRAUBE 2007).

2.7 Diagnostik

Der Nachweis von Leptospiren kann sowohl mit direkten als auch mit indirekten Nachweismethoden erfolgen. Die Wahl der Nachweismethode ist dabei unter anderem abhängig von der Art des Probenmaterials, der Menge der Leptospiren im Untersuchungsmaterial und dem Ziel der Untersuchung (MUSSO et al. 2013; FAINE et al. 1982). Zu den direkten Nachweismethoden gehört der mikroskopische Nachweis unter einem Dunkelfeldmikroskop, die Anfärbung der Leptospiren mit immunchemischen bzw. immunhistochemischen Methoden, die Silberimprägnierung (Fontana-Färbung), die kulturelle Anzucht in Spezialmedium (z.B. modifiziertes EMJH-Medium) und der Nachweis mittels molekularbiologischer Methoden (Polymerase-Kettenreaktion, Sequenzierung, Multi-Lokus Sequenz Typisierung) (MUSSO et al. 2013; FAINE et al. 1982; VIJAYACHARI et al. 2001; RODRÍGUEZ et al. 2013; SLACK et al. 2006; WILKS 2013; CUNHA et al. 2015). Bei den indirekten Nachweismethoden wird unterschieden zwischen dem Mikroagglutinationstest, welcher in der Humandiagnostik noch immer als Goldstandard gilt, und dem Nachweis mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (DIKKEN et al. 1978).

Im Allgemeinen werden Erkrankungen des Menschen und der Tiere meistens über indirekte Nachweismethoden diagnostiziert. Molekularbiologische Nachweismethoden finden dagegen meist ihre Anwendung bei dem Nachweis von Leptospiren in Umweltproben.

2.8 Die Umweltstabilität der Erreger

Leptospiren werden häufig durch indirekten Kontakt mit dem Urin infizierter Tiere über kontaminierte Böden oder Gewässer auf den Menschen übertragen. Deshalb hat die Überlebenszeit des Erregers ex vivo eine erhebliche Auswirkung auf das Infektionsrisiko von Mensch und Tier. Außerhalb des Wirtes haben sowohl biotische als auch abiotische Faktoren einen Einfluss auf das Überleben des Bakteriums. Zu diesen Faktoren gehören unter anderem Temperatur, Feuchtigkeit, pH-Wert, UV-Strahlung, Mineralstoffe, Salze und das Vorkommen anderer Mikroorganismen. Im Allgemeinen wurde beobachtet, dass die Überlebenszeit von

Leptospiren in Umweltproben stark von der Temperatur abhängig ist. Mehrere Studien zeigten, dass im Temperaturbereich von 4 - 37 °C die Leptospiren länger bei niedrigeren als bei höheren Temperaturen überlebensfähig waren (BIERQUE et al. 2020). Jedoch gab es auch Ausnahmen. So zeigte sich bei einer Studie von ANDRE-FONTAINE et al. (2015), dass das Serovar Icterohaemorrhagiae in Mineralwasser länger bei 30 °C als bei 4 °C überlebensfähig war. Des Weiteren scheint UV-Strahlung die Überlebenszeit der Bakterien in Umweltproben zu verkürzen (KARASEVA et al. 1973; KHAIRANI-BEJO et al. 2004). Auch der pH-Wert der Umgebung beeinflusst die Überlebenszeit der Leptospiren. Grundsätzlich wurde ein neutraler oder leicht alkalischer pH-Wert als optimal für den Erreger beschrieben (BIERQUE et al. 2020). Neben abiotischen Faktoren haben aber auch andere, in der Umwelt vorkommende, Mikroorganismen eine Auswirkung. KIRSCHNER et al. (1957) und OKAZAKI et al. (1957) verglichen die Überlebenszeiten von Leptospiren in unbehandeltem und in sterilem Wasser. Bei beiden Studien überlebten die Erreger länger in sterilem Wasser als in unsterilem Wasser. Im Gegensatz dazu wurde beobachtet, dass Leptospiren mit anderen Bakterien einen Biofilm bilden können und in diesem Biofilm schädlichen Einflüssen besser standhalten können (KUMAR et al. 2015). Bei allen möglichen Einflussfaktoren muss immer ein möglicher Unterschied in deren Auswirkung auf verschiedene Leptospiren-Serovare bedacht werden.

2.8.1 In Erde

Der Feuchtigkeitsgehalt der Erde hat einen erheblichen Einfluss auf die Überlebenszeit von Leptospiren. Bereits 1957 untersuchten OKAZAKI et al. (1957) die Überlebenszeit von Leptospiren in trockener, feuchter und übersättigter Erde. Während die Leptospiren bei Raumtemperatur in trockener Erde nur bis zu 2 Stunden überlebten, konnten sie in übersättigter Erde noch nach 183 Tagen wieder aus der Erde kultiviert werden (OKAZAKI et al. 1957). Spätere Untersuchungen von KARASEVA et al. (1973) und KHAIRANI-BEJO et al. (2004) bestätigten eine positive Korrelation zwischen höheren Feuchtigkeitsgehalten und einer längeren Überlebenszeit. Bei der Untersuchung verschiedener Erdtypen zeigte sich, dass bei 27 °C und 33 % Feuchtigkeit *L. interrogans* Serovar Hardjo länger in lehmiger oder tonhaltiger Erde überlebte, als in sandigem Erdboden (KHAIRANI-BEJO et al. 2004).

2.8.2 In Wasser

Da die Ausübung von Wassersportarten das Risiko an Leptospirose zu erkranken erhöht, ist die Überlebenszeit von Leptospiren in Wasser wichtig zur Ermittlung des Infektionsrisikos für den Menschen. In einer Studie von ANDRE-FONTAINE et al. (2015) hatte das Serovar

Icterohaemorrhagiae eine Überlebensdauer von bis zu 593 Tagen in Mineralwasser. Andere Studien untersuchten die Überlebenszeit von Leptospiren in verschiedenen Wassertypen. Dabei zeigte sich, dass eine starke Verschmutzung oder ein hoher Salzgehalt des Wassers unvorteilhaft für das Überleben der Erreger sein kann und die Überlebenszeit je nach Wassertyp stark variieren kann (BIERQUE et al. 2020).

2.8.3 In Urin

Nur sehr wenige Studien haben bisher die Überlebenszeit von Leptospiren in Urin ex vivo untersucht. KHAIRANI-BEJO et al. (2004) untersuchten die Überlebenszeit von *L. interrogans* Serovar Hardjo in verdünntem (1:10 in destilliertem Wasser) und unverdünntem Rinderurin. Je nach Temperatur überlebte Serovar Hardjo in unverdünntem Urin zwischen 0 - 2 Stunden (32 °C) und 48 Stunden (4 °C). In verdünntem Rinderurin waren die Überlebenszeiten deutlich länger (48 - 984 Stunden), aber auch hier zeigte sich deutlich eine Verlängerung der Überlebenszeit bei niedrigen Temperaturen (KHAIRANI-BEJO et al. 2004). Auch bei einer Studie von LEONARD et al. (1992) war das Serovar Hardjo nur für maximal 18 Stunden in unverdünntem Rinderurin unter einem Dunkelfeldmikroskop auffindbar.

3. Publikationen

3.1 Publikation Nr. 1

Leptospirose in Deutschland: Aktuelle Erkenntnisse zu Erregerspezies, Reservoirwirten und Erkrankungen bei Mensch und Tier

Lisa H. Nau¹, Duygu Emirhar², Anna Obiegala¹, Maren Mylius³, Martin Runge⁴, Jens Jacob⁵, Nadja Bier², Karsten Nöckler², Christian Imholt⁵, Diana Below⁵, Christina Princk³, Johannes Dreesman³, Rainer G. Ulrich^{6,7}, Martin Pfeffer¹, Anne Mayer-Scholl⁸

¹ Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen, Universität Leipzig, Leipzig, Deutschland

² Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, Deutschland

³ Niedersächsisches Landesgesundheitsamt (NLGA), Hannover, Deutschland

⁴ Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Hannover, Deutschland

⁵ Institut für Pflanzenschutz in Gartenbau und Forst, Wirbeltierforschung, Julius – Kühn - Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Münster, Deutschland

⁶ Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger, Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Greifswald – Insel Riems, Deutschland

⁷ Standort Hamburg – Lübeck – Borstel – Insel Riems, Deutsches Zentrum für Infektionsforschung (DZIF), Braunschweig, Deutschland

⁸ Konsiliarlabor für Leptospiren, Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, Deutschland

Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz 62, (2019), 1510–1521

Stellungnahme zum Eigenanteil an der Publikation:

Die Literaturrecherche sowie die Erstellung der Einleitung und des Abschnitts zum Vorkommen der Leptospirose bei Tieren und Reservoirwirten sowie der dazu gehörenden Tabellen führte ich eigenständig durch. Die restlichen Abschnitte des Manuskripts wurden von meinen Mitautoren geschrieben. Das gesamte Manuskript wurde von allen beteiligten Autoren Korrektur gelesen und überarbeitet. Es wurden keine weiteren als die angegebenen Quellen verwendet.

Originalien und Übersichten

Bundesgesundheitsbl 2019 · 62:1510–1521
<https://doi.org/10.1007/s00103-019-03051-4>
 Online publiziert: 19. November 2019
 © Der/die Autor(en) 2019



Lisa H. Nau¹ · Duygu Emirhar² · Anna Obiegala¹ · Maren Mylius³ · Martin Runge⁴ · Jens Jacob⁵ · Nadja Bier² · Karsten Nöckler² · Christian Imholt⁵ · Diana Below⁵ · Christina Princk³ · Johannes Dreesman³ · Rainer G. Ulrich^{6,7} · Martin Pfeffer¹ · Anne Mayer-Scholl⁸

¹ Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen, Universität Leipzig, Leipzig, Deutschland

² Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, Deutschland

³ Niedersächsisches Landesgesundheitsamt (NLGA), Hannover, Deutschland

⁴ Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Hannover, Deutschland

⁵ Institut für Pflanzenschutz in Gartenbau und Forst, Wirbeltierforschung, Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsanstalt für Kulturpflanzen, Münster, Deutschland

⁶ Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger, Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsanstalt für Tiergesundheit, Greifswald – Insel Riems, Deutschland

⁷ Standort Hamburg – Lübeck – Borstel – Insel Riems, Deutsches Zentrum für Infektionsforschung (DZIF), Braunschweig, Deutschland

⁸ Konsiliarlabor für Leptospiren, Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, Deutschland

Leptospirose in Deutschland: Aktuelle Erkenntnisse zu Erregerspezies, Reservoirwirten und Erkrankungen bei Mensch und Tier

Einleitung

Die Leptospirose ist eine weltweit bedeutende Zoonose mit geschätzt einer Million Humanfällen pro Jahr [1]. Obwohl die Leptospirose in tropischen und subtropischen Ländern die höchsten Inzidenzen aufweist, zeigt sich ein geringes, jedoch konstantes Vorkommen auch in Ländern mit gemäßigttem Klima. Laut Schätzungen erkranken in Europa jährlich ca. 24.000 Menschen an einer Leptospirose, wobei 5 % der Fälle tödlich enden [1].

Leptospiren gehören zu der Familie der Spirochäten und weisen eine charakteristische spiralförmige, an den Enden kleiderhakenähnlich gebogene Form auf. Sie sind circa 6–20 µm lange und im Durchmesser circa 0,1 µm dicke, gramnegative Bakterien [2]. Ursprünglich wurden die Leptospiren anhand ihrer serologischen Eigenschaften in apathogene, saprophytische *Leptospira biflexa* und pa-

thogene *Leptospira interrogans* mit mindestens 300 Serovaren (Variationen, die mit serologischen Tests unterscheidbar sind) eingeteilt [2]. Die aktuelle Taxonomie basiert auf molekulargenetischen Unterschieden und differenziert mindestens 22 verschiedene pathogene, intermediäre oder apathogene Genomspezies [3]. Allerdings wird in der Routinediagnostik noch immer die veraltete serologische Klassifizierung parallel zur molekulargenetischen genutzt.

Die Leptospirose ist bei Mensch und Tier eine akut verlaufende Infektionskrankheit, die sehr unterschiedliche Symptome aufweisen kann. Im Gegensatz zum Menschen gibt es bei einer Vielzahl von Tieren auch chronische Verläufe, die mit verringerten Reproduktionsraten und damit ökonomischen Verlusten einhergehen. In Deutschland besteht gemäß § 7 Infektionsschutzgesetz (IfSG) seit 2001 eine Meldepflicht für den direkten oder indirekten Labornachweis

von humanpathogenen *Leptospira* spp., sofern dieser auf eine akute Infektion hinweist. Die Leptospirose der Schweine und Schafe ist in Deutschland eine meldepflichtige Tierkrankheit.

Die Übertragung der Leptospiren auf Mensch und Tier erfolgt zumeist durch den direkten oder indirekten Kontakt mit dem Urin infizierter Tiere, z. B. über kontaminierte Gewässer oder Erde. Die Leptospiren gelangen über die Schleimhäute von Auge, Nase und Mund und über kleine Hautverletzungen in den Körper (Abb. 1). Infektionen von Mensch zu Mensch sind sehr selten. Übertragungen durch Geschlechtsverkehr und transplazentar während der Schwangerschaft mit Fehl- und Totgeburten als Folge sind allerdings beschrieben [4].

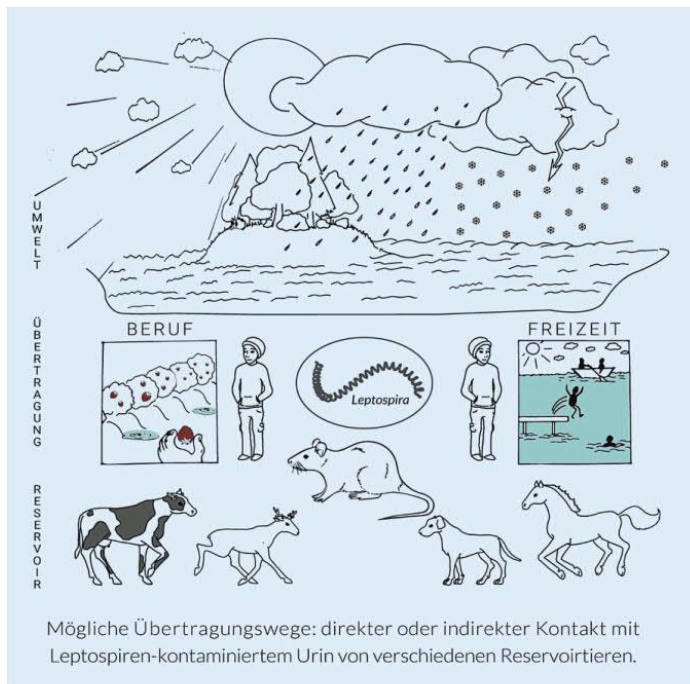


Abb. 1 ▲ Übertragungswege von Leptospiren. Die Ansteckung des Menschen mit Leptospiren erfolgt über Schleimhäute oder kleine Verletzungen. Dies geschieht entweder direkt durch Kontakt mit Urin, Blut oder Gewebe infizierter Tiere oder indirekt z. B. durch urinkontaminiertes Wasser. Wenn berufsbedingt Kontakt zu Reservoirtieren besteht oder das Freizeitverhalten zur Exposition führt (z. B. Wassersport), kann das Infektionsrisiko erhöht sein. Auch Wetterbedingungen (z. B. Niederschlag) können das Infektionsrisiko erhöhen, da warme und feuchte Umgebungsbedingungen das Überleben der Leptospiren in der Umwelt fördern

Leptospiren – Vorkommen bei Tieren und Reservoirtieren

Leptospiren wurden bei einer Vielzahl verschiedener Säugetiere beschrieben, wobei die durchschnittliche Prävalenz bei der Mehrzahl der untersuchten Säugetierfamilien bei etwa 15% lag [5]. Unterschiedliche Leptospirenserovare sind an bestimmte Tierarten adaptiert. Die für ein Serovar hoch empfänglichen Hauptwirte sind lebenslang infiziert und zeigen meist keine Symptome. Sie fungieren aber durch eine chronische Infektion der Nierentubuli und der dadurch möglichen Ausscheidung von Leptospiren über den Urin als natürliches Reservoir. Nebenwirte haben meist eine deutlich geringere Empfänglichkeit für das Serovar, erkranken jedoch in der Regel schwerer bis hin zum tödlichen Verlauf. Jedes

Tier kann zugleich Hauptwirt für ein oder mehrere Serovare und Nebenwirt für andere Serovare sein [2]. ■ **Tab. 1** gibt Informationen zur Leptospirose bei ausgewählten Haus- und Nutztieren.

Haustiere

Auch Haustiere können an einer Leptospirose erkranken und eine mögliche Infektionsquelle für Menschen darstellen. In zwei Studien lag die leptospirenspezifische Antikörperprävalenz bei Hunden, die klinische Anzeichen einer Leptospirose aufwiesen, bei 44% bzw. 48%. Am häufigsten wurden in Süddeutschland die Serovare Grippotyphosa und Sejroe, in Norddeutschland die Serovare Australis und Copenhageni nachgewiesen. Allerdings wurde nicht zwischen geimpften und ungeimpften Hunden un-

terschieden, sodass die hohe Seroprävalenz wahrscheinlich nicht ausschließlich auf natürliche Infektionen zurückzuführen ist [6, 7]. In Berlin fanden sich bei erkrankten Hunden vor allem die Serovare Australis (28%), Grippotyphosa (18%) und Pomona (14% [8]).

Bei Katzen zeigt sich meist keine klinische Manifestation. Dennoch sollte bei einer Antikörperprävalenz von 16–17,9% auch die Katze als möglicher Überträger von Leptospiren auf den Menschen in Betracht gezogen werden. Waren in Berlin und Brandenburg die Serovare Pomona (48,9%), Grippotyphosa (15,6%) und Javanica (11,1%) vorherrschend, so waren in München und Umgebung die Serovare Australis und Bratislava mit 57,4% am häufigsten an einer Infektion beteiligt [9, 10].

Nutztiere

Bei einer großflächigen Untersuchung im Jahre 1984 in Deutschland wiesen ca. 1,6% der Rinder, 1,2% der Schweine, 14,4% der Schafe und 0,3% der Ziegen leptospirenspezifische Antikörper auf [11].

In der Schweinepopulation Deutschlands waren laut Schönberg et al. [11] die häufigsten Serovare Saxkoebing und Grippotyphosa. In der Studie von Strutzberg-Minder et al. (2018) [12], bei der zwischen 2011 und 2016 fast 30.000 Blutproben von Schweinen in Deutschland untersucht wurden, stellte man eine Antikörperprävalenz von 20,2% fest. Am häufigsten wurden die Serovare Bratislava (11,6%) und Australis (7,3%) identifiziert. Laut Tiergesundheitsbericht des Friedrich-Loeffler-Instituts (FLI) werden trotz dieser hohen Seroprävalenzen jährlich nur ca. 80 Fälle einer klinischen Leptospirose beim Schwein gemeldet [13].

In einer Studie in bayerischen Rinderbeständen wurde eine Seroprävalenz von 1,5–2,2% beschrieben [14]. Am häufigsten wurden Antikörper gegen das Serovar Hardjo nachgewiesen (55%), für welches das Rind den Hauptwirt darstellt. Weitere nachgewiesene Serovare waren Grippotyphosa (18%), Icterohaemorrhagiae (13%), Bratislava (8%) und Canicola (5%; [14]).

Zusammenfassung · Abstract

Bundesgesundheitsbl 2019 · 62:1510–1521 <https://doi.org/10.1007/s00103-019-03051-4>
 © Der/die Autor(en) 2019

L. H. Nau · D. Emirhar · A. Obiegala · M. Mylius · M. Runge · J. Jacob · N. Bier · K. Nöckler · C. Imholt · D. Below · C. Princk · J. Dreesman · R. G. Ulrich · M. Pfeffer · A. Mayer-Scholl

Leptospirose in Deutschland: Aktuelle Erkenntnisse zu Erregerspezies, Reservoirwirten und Erkrankungen bei Mensch und Tier

Zusammenfassung

Die Leptospirose ist eine Zoonose, die bei Mensch und Tier eine große Bandbreite von Krankheitssymptomen mit sehr milden bis hin zu sehr schweren Verläufen aufweisen kann. In Deutschland ist der Labornachweis einer akuten Infektion meldepflichtig: beim Menschen gemäß Infektionsschutzgesetz und bei Schweinen und Schafen gemäß der Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten. Die Übertragung erfolgt über direkten und indirekten Kontakt mit dem Urin infizierter Tiere, wobei Nagetiere als Hauptreservoir gelten. Mit einer durchschnittlichen jährlichen Inzidenz von 0,1 gemeldeten Fällen pro 100.000 Einwohner ist die Leptospirose in Deutschland eine seltene Erkrankung.

Im Rahmen des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Projekts „Verbesserung der Öffentlichen Gesundheit durch ein besseres Verständnis der Epidemiologie nagetierübertragener Krankheiten“ (RoBoPub) werden in diesem Übersichtsartikel aktuelle Kenntnisse zur Leptospirose in Deutschland dargestellt. In einem One-Health-Ansatz werden Informationen zum klinischen Bild, verfügbare Prävalenzdaten bei Mensch und Tier und Erkenntnisse über die Erregerverbreitung, die Wirtsassoziation, die Übertragung des Erregers sowie die Umweltstabilität zusammengefasst. Darüber hinaus werden erste Erkenntnisse zum Einfluss von Populationschwankungen in Nagetierpopulationen

auf das Auftreten der Leptospirose diskutiert. Ziel des Übersichtsartikels ist es, die Wahrnehmung für diese gegenwärtig noch vernachlässigte Erkrankung in Deutschland zu erhöhen.

In Zukunft sollten auch die im Zuge des Klimawandels möglicherweise vermehrt auftretenden erhöhten Temperaturen und starken Regenfälle und die damit einhergehende häufigere Exposition des Menschen mit den Erregern berücksichtigt werden.

Schlüsselwörter

Leptospiren · Leptospira · Zoonose · Nagetiere · One Health

Leptospirosis in Germany: current knowledge on pathogen species, reservoir hosts, and disease in humans and animals

Abstract

Leptospirosis is a zoonotic disease with a wide spectrum of clinical symptoms in humans and animals, ranging from subclinical infections to severe signs of multiorgan dysfunction. In Germany, laboratory confirmation of acute human infection is notifiable based on the Protection Against Infection Act. Disease or occurrence of the pathogen in pigs and sheep must be reported according to the regulation on reportable animal diseases. Transmission occurs via direct and indirect contact with the urine of infected animals, with rodents acting as the main reservoir. With an average annual incidence of 0.1 notified cases per 100,000

inhabitants, leptospirosis is a rare disease in Germany. This review article presents the current knowledge on leptospirosis in Germany in the framework of the project “Improving public health through a better understanding of the epidemiology of rodent-transmitted diseases” (RoBoPub) funded by the Ministry of Education and Research. In a One-Health approach, information about clinical manifestation, available prevalence data in humans and animals, knowledge of pathogen distribution, host association, mode of transmission, and survival in the environment

is summarized. Preliminary findings on the influence of fluctuations in rodent populations on the occurrence of leptospirosis are also discussed. The aim of the article is to increase the awareness of this currently neglected disease in Germany.

In future, higher temperatures and more frequent heavy rainfalls, which could occur due to climate change, should be taken into account.

Keywords

Leptospirosis · Leptospira · Zoonosis · One-Health · Rodents

In Deutschland gibt es sowohl für Rinder als auch für Schweine zugelassene Impfstoffe gegen Leptospiren. Wegen der gering geschätzten Impfraten (Rinder <1%; Schweine <5%) sind die oben angegebenen Seroprävalenzen jedoch wahrscheinlich, zumindest zum größten Teil, auf natürliche Infektionen zurückzuführen.

Bei Pferden steht das Serovar Grippotyphosa in Verdacht, das ätiologische Agens der Equinen rezidivierenden Uveitis (ERU) zu sein. In einer Studie in Mit-

teldeutschland wiesen 17,2% der Warmblutpferde einen positiven Antikörpertiter gegen Leptospiren auf, am häufigsten gegen die Serovare Icterohaemorrhagiae, Bratislava und Grippotyphosa [15]. In einer weiteren Studie in Mitteldeutschland wurden bei Pferden mit ERU vor allem Antikörper gegen die Serovare Grippotyphosa und Bratislava gefunden. Bei 16% der Tiere gelang die Isolierung von Leptospiren aus dem Glaskörper. Auch hier war das vorherrschende Serovar Gripp-

otyphosa, aber es konnten ebenfalls die Serovare Bratislava und Pomona isoliert werden [16].

Wildtiere und Hauptreservoirtiere

Eine Vielzahl der heimischen Wildtierarten kann mit Leptospiren infiziert sein. Die größte Bedeutung als Überträger der Erreger auf andere Tiere und den Menschen haben frei lebende Nagetiere und andere Kleinsäuger. Unterschiedliche Nagetierspezies fungieren dabei als

Tab. 1 Informationen zur Leptospirose bei ausgewählten Haus- und Nutztieren [7, 11, 12, 15]

<i>Allgemein</i>	Meldepflicht in Deutschland bei Schwein und Schaf
	Subklinischer bis letaler Verlauf, je nach auslösendem Serovar, Alter und Konstitution der Tiere
	Meist unspezifische Symptome
	Impfung in Deutschland bei Rind, Hund und Schwein
<i>Hund</i>	Nicht meldepflichtig
	Subklinischer bis letaler Verlauf
	Unspezifische Symptome (z. B. Fieber, Anorexie, Apathie, Vomitus, Diarrhö, Ikterus, Symptome einer Nieren- oder Lebererkrankung)
	Impfung in Deutschland gegen Serovare Icterohaemorrhagiae, Canicola, Grippotyphosa und Australis
<i>Katze</i>	Nicht meldepflichtig
	Meist keine klinische Manifestation
	Kein Impfstoff in Deutschland zugelassen
<i>Rind</i>	Nicht meldepflichtig
	Subklinischer bis letaler Verlauf
	Mögliche Symptome: Fieber, Ikterus, Mastitiden, Aborte, Anämie
	Besondere wirtschaftliche Bedeutung durch Beeinträchtigung der Reproduktionsleistung
<i>Schwein</i>	Impfung in Deutschland gegen Serovar Hardjo
	Meldepflichtige Erkrankung in Deutschland
	Meist subklinischer Verlauf
	Chronische Form: Auslöser von Aborten, Totgeburten und Konzeptionsstörung
<i>Pferd</i>	Impfung in Deutschland gegen Serovare Canicola, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, Pomona, Tarassovi und Australis
	Nicht meldepflichtig
	Besondere Bedeutung als möglicher Auslöser der Equinen rezidivierenden Uveitis – einer wiederkehrenden Entzündung der mittleren Augenhaut
	Kein Impfstoff in Deutschland zugelassen

Reservoirwirte für verschiedene Serovare [5]. Auch wenn es derzeit nur wenige Studien zur Prävalenz und Leptospirenartenzusammensetzung bei heimischen wild lebenden Kleinsäugetern gibt, so zeichnet sich doch ab, dass einige dieser Tierarten (z. B. Waldmaus, Gelbhalsmaus, Rötelmaus) Träger verschiedener Leptospirenarten sind. Bei anderen Tierarten hingegen (Brandmaus, Feldmaus, Erdmaus) wurde bisher nur eine Leptospirenart gefunden, was auf ein unterschiedliches Maß an Wirtsadaptation oder Ökoexposition schließen lässt.

Die Übertragung auf den Menschen kann direkt über den Kontakt mit Nagetieren erfolgen (z. B. Bissverletzungen), häufiger ist jedoch die Infektion über Urin in der Umwelt. Besondere Bedeutung hat hier das Verhalten von Nagetieren, zur Reviermarkierung häufig kleine Urinröpfchen abzugeben, was

zur großflächigen Umweltkontamination mit dem Erreger führt [17].

Die ermittelten Prävalenzen und gefundenen Serovare in den verschiedenen Tierarten in Deutschland sind in **Tab. 2** dargestellt.

Bei vielen nagetierübertragenen Pathogenen ist die Prävalenz in Wildtieren hoch dynamisch. Das trifft auch auf Leptospiren zu, deren Prävalenz im Wirt je nach Jahreszeit, Wirtsabundanz, Biodiversität potenzieller Wirte und Nichtwirte und anderen Faktoren stark schwanken kann [18]. Aufgrund der komplexen Struktur von *Leptospiragenotypen* in Kombination mit der großen Bandbreite an potenziellen Wirten im natürlichen und urbanen Raum sind Prävalenzuntersuchungen in Mitteleuropa zu einem bestimmten Zeitpunkt lediglich ein erster Anhaltspunkt, um die Rolle einer Wildtierart als Wirt einzuschätzen.

Vorkommen der Leptospirose beim Menschen

Seit 2001 wurden in Deutschland pro Jahr 37–166 Leptospirosefälle gemeldet. Mit einer durchschnittlichen Inzidenz von 0,1 Erkrankungen pro 100.000 Personen zwischen 2001–2018 ist die Leptospirose mit überwiegend sporadisch auftretenden Fällen eine seltene Krankheit in Deutschland [19]. Hierzulande handelt es sich um eine saisonale Erkrankung mit Häufungen im Sommer und Frühherbst. Ferner sind unter den gemeldeten Fällen hauptsächlich Männer [20]. Im Durchschnitt sind mehr als drei Viertel der gemeldeten Erkrankungen in Deutschland erworben. Diese lassen sich u. a. auf Expositionen im Zusammenhang mit Wassersportaktivitäten und Haltung von Farbratten als Heimtiere zurückführen. Weitere Risikofaktoren sind Auslandsaufenthalte in tropischen und subtropischen Regionen [21].

In einer Querschnittsstudie aus den Jahren 2008–2009 in Baden-Württemberg wurden bei 4,2 % der Studienteilnehmenden Antikörper gegen Leptospiren nachgewiesen. Bei keinem der Teilnehmenden war eine Leptospirose diagnostiziert worden; allerdings wurden spezifische Antikörper dreimal häufiger (Relatives Risiko (RR) 3,4) bei Personen gefunden, bei denen in der Vergangenheit nieren- und leberspezifische Symptome diagnostiziert worden waren [22]. Daraus wurde extrapoliert, dass etwa 10 % der seropositiven Studienteilnehmenden eine nichtdiagnostizierte Leptospirose durchlaufen hatten. Diese Studie und eine internationale Metaanalyse [1] weisen auf eine hohe Dunkelziffer nichtdiagnostizierter Leptospirosefälle hin.

In einer epidemiologischen Studie zur Auswertung der nach dem Bundesseuchengesetz bundesweit gemeldeten Fälle von 1997–2000 wurde eine geografische Häufung von Leptospirosefällen im Nordosten Deutschlands beschrieben. Dies wurde mit der ausgedehnten Seenlandschaft und einer Häufung des Vorkommens von Wanderratten in der fischverarbeitenden Industrie in Verbindung gebracht [21]. Hierbei ist in Betracht zu ziehen, dass aufgrund der Dunkelziffer die Meldezahlen auch re-

Publikationen

Originalien und Übersichten

Tab. 2 Nachweis von Leptospiren in verschiedenen Wildtierarten, Deutschland					
Ordnung	Familie	Tierart	Anzahl positiver Tiere/Gesamtzahl (%)	Serovar bzw. Genomospezies (Sequenztyp, ST)	Studie
Eulipotyphla	Erinaceidae	Igel (<i>Erinaceus europaeus</i>)	24/26 (92,3 %)	Serovare Poi, Grippotyphosa	Horsch <i>et al.</i> [51]
Artiodactyla	Cervidae	Damhirsch (<i>Dama dama</i>)	1/8 (12,5 %)	Nicht untersucht	Horsch <i>et al.</i> [51]
	Cervidae	Reh (<i>Capreolus capreolus</i>)	3/81 (3,7 %)	Nicht untersucht	Horsch <i>et al.</i> [51]
	Cervidae	Rothirsch (<i>Cervus elaphus</i>)	2/18 (11,1 %)	Nicht untersucht	Horsch <i>et al.</i> [51]
	Suidae	Wildschwein (<i>Sus scrofa</i>)	10/131 (7,6 %) 22/125 (18 %)	Nicht untersucht Serovare Pomona, Bratislava	Horsch <i>et al.</i> [51] Jansen <i>et al.</i> [52]
Lagomorpha	Leporidae	Feldhase (<i>Lepus europaeus</i>)	67/280 (23,9 %)	Nicht untersucht	Horsch <i>et al.</i> [51]
Carnivora	Canidae	Rotfuchs (<i>Vulpes vulpes</i>)	24/1253 (1,9 %)	Serovare Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Bratislava	Müller und Winkler [53]
	Procyonidae	Waschbär (<i>Procyon lotor</i>)	29/240 (12 %) 6/457 (1,3 %)	<i>L. interrogans</i> Nicht untersucht	Rentería Solís [54] Anheyer-Behnenburg [55]
Rodentia	Muridae	Wanderratte (<i>Rattus norvegicus</i>)	55/320 (17,2 %)	<i>L. interrogans</i> (ST17)	Heuser <i>et al.</i> [50]
			125/586 (21,3 %)	Nicht untersucht	Runge <i>et al.</i> [56]
		Brandmaus (<i>Apodemus agrarius</i>)	6/44 (13,6 %)	<i>L. kirschneri</i> (ST117)	Fischer <i>et al.</i> [18]
			3/7 (42,9 %)	<i>L. kirschneri</i>	Obiegala <i>et al.</i> [57]
			23/190 (12,1 %)	<i>L. kirschneri</i>	Mayer-Scholl <i>et al.</i> [49]
			122/925 (13,2 %)	<i>L. borgpetersenii</i> (ST197), <i>L. kirschneri</i> (ST110), <i>L. interrogans</i> (ST24)	Fischer <i>et al.</i> [18]
		Gelbhalsmaus (<i>Apodemus flavicollis</i>)	71/792 (9 %)	<i>L. interrogans</i> , <i>L. kirschneri</i> , <i>L. borgpetersenii</i>	Mayer-Scholl <i>et al.</i> [49]
			2/4 (50 %)	Nicht untersucht	Obiegala <i>et al.</i> [58]
			15/247 (6,1 %)	<i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. kirschneri</i>	Obiegala <i>et al.</i> [57]
			9/105 (8,6 %)	<i>L. kirschneri</i> (ST24)	Fischer <i>et al.</i> [18]
	27/154 (17,5 %)		<i>L. interrogans</i> , <i>L. kirschneri</i>	Mayer-Scholl <i>et al.</i> [49]	
	Apodemus spp.	12/184 (6,5 %)	<i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. kirschneri</i> , <i>L. interrogans</i>	Obiegala <i>et al.</i> [57]	
	Cricetidae	Feldmaus (<i>Microtus arvalis</i>)	113/377 (30 %)	<i>L. kirschneri</i> (ST110, ST230)	Fischer <i>et al.</i> [18]
			1/1 (100 %)	<i>L. kirschneri</i>	Obiegala <i>et al.</i> [58]
			3/7 (42,9 %)	<i>L. kirschneri</i>	Obiegala <i>et al.</i> [57]
			24/174 (13,8 %)	<i>L. kirschneri</i>	Mayer-Scholl <i>et al.</i> [49]
		Erdmaus (<i>Microtus agrestis</i>)	62/209 (29,7 %)	<i>L. kirschneri</i> (ST110)	Fischer <i>et al.</i> [18]
			64/517 (12,4 %)	<i>L. kirschneri</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. interrogans</i>	Mayer-Scholl <i>et al.</i> [49]
		Rötelmaus (<i>Myodes glareolus</i>)	66/1016 (6,5 %)	<i>L. kirschneri</i> , <i>L. interrogans</i>	Mayer-Scholl <i>et al.</i> [49]
			39/737 (5,3 %)	<i>L. kirschneri</i> , <i>L. interrogans</i>	Obiegala <i>et al.</i> [57]
			27/660 (4,1 %)	Nicht untersucht	Obiegala <i>et al.</i> [58]
			123/1578 (7,8 %)	<i>L. interrogans</i> (ST24), <i>L. kirschneri</i> (ST110), <i>L. borgpetersenii</i> (ST146, ST197)	Fischer <i>et al.</i> [18]
		Bisam (<i>Ondatra zibethicus</i>)	171/2913 (5,9 %)	Nicht untersucht	Hurd <i>et al.</i> [59]
Castoridae		Europäischer Biber (<i>Castor fiber</i>)	4/26 (15,4 %)	<i>L. interrogans</i> (ST24)	Woll <i>et al.</i> [60]



Tab. 2 (Fortsetzung)

Ordnung	Familie	Tierart	Anzahl positiver Tiere/Gesamtzahl (%)	Serovar bzw. Genomospezies (Sequenztyp, ST)	Studie
Soricomorpha	Soricidae	Waldspitzmaus (<i>Sorex araneus</i>)	81/521 (15,5%)	<i>L. kirschneri</i> (ST110, ST320)	Fischer <i>et al.</i> [18]
			3/22 (14%)	Nicht untersucht	Obiegala <i>et al.</i> [58]
			2/36 (5,6%)	Nicht untersucht	Mayer-Scholl <i>et al.</i> [49]
		Schabrackenspitzmaus (<i>Sorex coronatus</i>)	3/101 (3%)	<i>L. borgpetersenii</i> (ST146)	Fischer <i>et al.</i> [18]
			8/44 (18%)	Nicht untersucht	Obiegala <i>et al.</i> [58]
		Zwergspitzmaus (<i>Sorex minutus</i>)	5/73 (6,8%)	Nicht untersucht	Fischer <i>et al.</i> [18]
		Weißzahnpitzmäuse (<i>Crocidura leucodon</i> , <i>C. russula</i> , <i>C. suaveolens</i>)	6/30 (20%)	<i>L. kirschneri</i>	Mayer-Scholl <i>et al.</i> [49]

gional unterschiedlich stark ausfallen können. Daher sind räumliche Muster in den Meldedaten mit Vorsicht zu interpretieren. Wie aus **Abb. 2** ersichtlich, sind bei den wenigen Studien zum Vorkommen von Leptospiren bei Nagetieren keine räumlichen Muster und insbesondere keine Zusammenhänge zwischen dem Nachweis in Nagetieren und der Häufigkeit humaner Erkrankungen erkennbar.

Leptospiroseausbrüche in Deutschland

In der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts waren Leptospiroseausbrüche hauptsächlich mit landwirtschaftlichen Expositionen assoziiert und traten eher in ländlich geprägten Regionen auf (**Tab. 3**). Sie betrafen vorwiegend Arbeitskräfte, die Erntetätigkeiten auf Feldern durchführten, die von mit Leptospiren infizierten Feldmäusen oder Feldhamstern besiedelt waren [21]. Exemplarisch wird auf die Jahre 1949, 1952 und 1955 verwiesen, in denen es unter Beschäftigten auf Erbsenfeldern in der Umgebung von Braunschweig zu größeren Leptospiroseausbrüchen mit bis zu 232 laborbestätigten Fällen kam. Auch damals war die Leptospirose keine häufig gestellte Diagnose, sondern wurde nur aufgrund der auffälligen gemeinsamen Exposition in Betracht gezogen. Leptospiren konnten sowohl in den Patientenproben als auch in den gefangenen Feldmäusen nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu anderen Leptospiroseausbrüchen, die fast immer in Verbindung

mit Starkregen oder Überschwemmungen aufgetreten sind, herrschte in den Jahren 1949 und 1952 zum Zeitpunkt der Ausbrüche, im jeweiligen Epidemiemonat Juli, eine auffallende Trockenheit. Die Übertragung der Leptospiren wurde hier vor allem durch das hohe Vorkommen von Feldmäusen erklärt, die nachweislich mit Leptospiren infiziert waren [23]. Ebenfalls für das Jahr 1952 wurde ein Leptospiroseausbruch in Schleswig-Holstein berichtet, der durch eine hohe Feldmausdichte in Verbindung mit einem hohen Feuchtigkeitsgehalt in Luft und Boden sowie mit häufigem Nebel und Morgentau erklärt wurde [24].

In den folgenden Jahren nahm, vor allem durch die zunehmende Mechanisierung der Landwirtschaft, die Bedeutung von landwirtschaftlichen Expositionen als Ursache für Leptospiroseausbrüche ab [21]. Nachdem über fast 50 Jahre in Deutschland keine landwirtschaftlichen Expositionen mehr als Ursache für Leptospiroseausbrüche berichtet wurden, ereigneten sich in jüngerer Vergangenheit zwei größere Ausbrüche unter Arbeitskräften auf Erdbeerfeldern.

2007 kam es in Nordrhein-Westfalen zu einem Ausbruch unter den Beschäftigten, bei dem vor allem Arbeitskräfte aus Rumänien, Slowenien und Polen betroffen waren. Die anschließende Ausbruchsuntersuchung, bei der 153 Saisonkräfte einbezogen wurden, ergab 13 laborbestätigte Leptospirosefälle und 11 Verdachtsfälle mit entsprechender Symptomatik. Die meisten Betroffenen zeigten einen milden Krankheitsverlauf. Als Hauptrisikofaktor wurde der Kontakt zu Nagetie-

ren identifiziert. Ein ansteigendes Risiko wurde für jeden Tag, den die Arbeitskräfte im Regen mit offenen Wunden an den Händen gearbeitet hatten, beobachtet. In 7 von 11 auf den Erdbeerfeldern gefangenen Feldmäusen konnten ebenfalls Leptospiren mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nachgewiesen werden. Zum Zeitpunkt des Ausbruchs wurde eine hohe Feldmausdichte auf betroffenen Erdbeerfeldern beobachtet. Zudem gab es starke Niederschläge und relativ hohe durchschnittliche Tagestemperaturen zwischen 18,4°C und 23,1°C [25].

Ein ähnlicher Ausbruch ereignete sich 2014 in Niedersachsen. In einem Erdbeeranbaugelände mit über 30 Erdbeererzeugern waren zwei Betriebe betroffen. Der Ausbruch trat zum Ende der Erntesaison auf. Bei 45 Mitarbeitenden wurden die Erkrankungen noch in Deutschland festgestellt und behandelt, bei 10 weiteren Personen erst nach der Rückkehr in Polen. Die Wetterbedingungen ähnelten denen des Ausbruchs in Nordrhein-Westfalen von 2007 und eine Laboruntersuchung bestätigte auch hier den Infektionsweg von Feldmäusen auf die Arbeitskräfte [26, 27].

Als potenzielle Risikofaktoren für Leptospiroseausbrüche sind mittlerweile auch Freizeitaktivitäten, vor allem verschiedene Wassersportarten bekannt geworden [28]. Einer der ersten dokumentierten Ausbrüche innerhalb Deutschlands, der mit Wassersport in Zusammenhang gebracht wurde, ereignete sich im August 2006 unter den Teilnehmenden eines Triatlons in Heidelberg. Von 142 Personen konnten Informationen zu

Originalien und Übersichten

Tab. 3 Leptospiroseausbrüche in Deutschland

Monat/Jahr	Region	Fälle: laborbestätigt/gesamt	Leptospirenserovar(e)	Exposition	Risikofaktor	Wetterbedingungen vor der Exposition	Studie
1) Sommer 1949 2) Sommer 1952 3) Sommer 1955	Niedersachsen	1) 118/281 2) 78/116 3) 232/499	Grippotyphosa	Erbseernte	Enger Kontakt mit oberen Bodenschichten bei der Ernte	1) 17,3 l/m ² /17,3 °C ^h /73 % ^c 2) 25,2 l/m ² /17,2 °C ^h /70 % ^c 3) 168,1 l/m ² /17,7 °C ^h /82 % ^c (Werte jeweils für Juli)	Popp [23]
August 1952	Schleswig-Holstein	37/300	Grippotyphosa	Erbseernte, Kohlernte	Regionale umwelt- und berufsbedingte Exposition	Hoher Feuchtigkeitsgehalt von Luft und Boden, häufiger Nebel und Morgentau	Hermansen [24]
August 2006	Baden-Württemberg	5/5	Grippotyphosa	Triathlon (Fluss)	Offene Wunden	148 l/m ² 18 °C ^e	Brockmann et al. [28]
September 2007	Nordrhein-Westfalen	13/24	Grippotyphosa	Erbseernte	Arbeiten mit Wunden an den Händen	18,4–23,1 °C ^e 10,5 l/m ² (10 Tage vor Ausbruchsbeginn)	Desai et al. [24]
Juni–August 2014	Niedersachsen	21/55	Grippotyphosa	Erbseernte	Regionale umwelt- und berufsbedingte Exposition	Warmes Wetter mit hohen Niederschlägen	Dreesman et al. [27]; Fiecek et al. [26]

^aNiederschläge pro Monat in l/m² (Summenangabe)
^bDurchschnittliche Temperatur pro Monat
^cDurchschnittliche relative Luftfeuchtigkeit pro Monat
^dDurchschnittlicher Niederschlag pro Tag
^eDurchschnittliche Temperatur pro Tag

Symptomen und Risikofaktoren erhoben und Serumproben untersucht werden. Insgesamt 5 Fälle wurden labordiagnostisch bestätigt. Signifikanter Risikofaktor war das Vorhandensein von Wunden. In den Tagen vor dem Triathlon hatte es heftige Niederschläge gegeben, wodurch möglicherweise die Leptospiren vom Ufer in den Neckar eingeschwemmt wurden [28].

Wie sich der **Tab. 3** entnehmen lässt, waren von den Ausbrüchen zwar unterschiedlich exponierte Gruppen betroffen, es ergeben sich aber auch eine Reihe von Übereinstimmungen. So ereigneten sich die Ausbrüche überwiegend bei sommerlich warmen Temperaturen und nach Regenfällen. Es handelte sich meistens um Infektionen mit *L. kirschneri* Serovar Grippotyphosa. Sofern Nager untersucht wurden, konnte bei diesen das gleiche Serovar nachgewiesen werden.

Das klinische Bild der Leptospirose beim Menschen

Die Infektion mit Leptospiren kann sich mit ganz unterschiedlichen Symptomen manifestieren. Dies erschwert die Diagnose der Leptospirose und je nach Verlauf sind eine ganze Reihe unterschiedlicher Differenzialdiagnosen einzubeziehen. Die Erkrankung weist zudem eine große Bandbreite an Verläufen auf, die von sehr mild bis sehr schwer reichen, dann verbunden mit einer hohen Mortalität von bis zu 50 % [4]. Es ist nicht bekannt, welche Faktoren den symptomatischen Verlauf nach einer Infektion bestimmen. Das Auftreten einer Oligurie, eine pulmonale Beteiligung und steigendes Lebensalter gehen allerdings mit einer höheren Mortalität einher [4, 29]. Mit geschätzten 90 % verläuft die Mehrheit der Infektionen beim Menschen subklinisch oder mild [2, 20]. Die Inkubationszeit beträgt überwiegend 7–14 Tage, kann aber von 2–30 Tagen reichen.

Einteilung nach vorherrschendem Krankheitsbild

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) gliedert die Erkrankung nach klinischer Symptomatik in vier Kategorien [29]:

- grippeähnliche Symptome,
- Morbus Weil (Gelbsucht, akutes Nierenversagen, Blutungen),
- Meningitis/Meningoenzephalitis,
- pulmonale Hämorrhagien mit respiratorischer Insuffizienz.

Grippeähnliche Symptome

Die Erkrankung ist häufig durch einen biphasischen Verlauf gekennzeichnet. Nach der Infektion setzt zunächst im Rahmen der Streuung des Erregers über das Blut akut hohes Fieber ($>39^{\circ}\text{C}$) ein, das mehrere Tage anhalten kann. Es treten Myalgien auf, die besonders ausgeprägt den unteren Rückenbereich und die Wadenmuskulatur betreffen [2, 20, 30]. Typisch ist ein zumeist schwerer, bitemporaler oder frontal betonter Kopfschmerz, der von retroorbitalem Schmerz und Lichtscheue begleitet wird. Gastrointestinale Symptome wie Übelkeit, Bauchschmerzen und Durchfall sind ebenfalls häufig [31]. Auch das Auftreten von unproduktivem Husten wurde in 20–57 % von Leptospirosefällen beschrieben [4, 32]. Mit der Phase der Antikörperbildung lassen die initialen Symptome nach. Das Fieber kann allerdings bei einem biphasischen Verlauf nach 3–4 Tagen erneut auftreten.

Morbus Weil

Durch eine Vasodilatation kommt es zu einer intensiven Rötung der Schleim- und Bindehäute. Flächenhafte Einblutungen der Bindehäute treten auf und gelten in Verbindung mit einem skleralen Ikterus als pathognomonisch für den Morbus Weil, wie der schwere Verlauf der ikterischen Leptospirose auch bezeichnet wird. Ein Exanthem ist eher selten bei der Leptospirose und besteht dann zumeist nur für wenige Stunden. Der ikterische Verlauf mit akutem Nierenversagen und dem Auftreten von Blutungen wurde vormals, bei einer Mortalität von 5–15 %, als die schwere Verlaufsform der Lepto-

spirose betrachtet [4, 29, 30]. Die Weil-Erkrankung kann als 2. Phase der Leptospirose auftreten oder auch als alleinige Manifestationsform [31]. Im Gegensatz zur Virushepatitis geht die Gelbsucht bei der Leptospirose mit einer Verschlechterung der Allgemeinverfassung einher [30]. Der Ikterus ist allerdings nicht durch einen Untergang der Leberzellen bedingt, sondern vermutlich durch eine Schädigung des Sekretionsvorgangs von konjugiertem Bilirubin, einem Abbaustoff des Blutes, in der Leber. Die Leberfunktion normalisiert sich vollständig nach Genesung. Das akute Nierenversagen manifestiert sich zumeist mit einer Polyurie und dem Leitsymptom des Anstiegs des Serumkreatinins. In 16–40 % der Leptospirosefälle wird über ein akutes Nierenversagen berichtet. Das Auftreten einer Oligurie beim Nierenversagen geht signifikant häufiger mit tödlichen Verläufen einher. Eine Thrombozytopenie zeigt sich häufig im Blutbild und ist ebenfalls mit einer schlechteren Prognose assoziiert [31].

Meningitis/Meningoenzephalitis

Neurologische Symptome wie ausgeprägte Kopfschmerzen, Fotophobie und Nackensteife treten infolge einer Hirnhautentzündung (Meningitis), zum Teil unter Mitbeteiligung des Großhirns (Meningoenzephalitis) in bis zu 25 % der Fälle auf. Eine aseptische Meningitis betrifft im Durchschnitt häufiger jüngere Personen [2]. Allerdings ist es eher selten, dass sich die Leptospirose primär als neurologische Erkrankung manifestiert [31].

Pulmonale Hämorrhagien mit respiratorischer Insuffizienz

Pulmonale Manifestationen in Form von Lungenblutungen mit respiratorischer Insuffizienz bzw. einem akuten Lungenversagen können ebenfalls auftreten und sind dann mit einer hohen Mortalität behaftet [4]. Pulmonale Hämorrhagien können sowohl bei ikterischen als auch bei anikterischen Verläufen der Leptospirose auftreten [2]. Das klinische Bild reicht von Husten, Aushusten bluthalti-

gen Sekrets und Atembeschwerden bis zur schweren Atemnot.

Weitere Symptome und Spätmanifestationen

Im Blutbild zeigen sich neben einer häufigen Thrombozytopenie eine Leukozytose und Neutrophilie mit Linksverschiebung, Erhöhungen der Kreatinkinase und nur eine leichte Erhöhung der Serumtransaminasen. Je nach betroffenem Organsystem können sich weitere Blutbildveränderungen ergeben [31]. Viele weitere Symptome und Begleiterscheinungen einer Leptospirose sind beschrieben, wie zum Beispiel kardiale Beteiligungen mit Arrhythmien, Zeichen einer Pankreatitis sowie Aortenverengung, reaktive Arthritis, Guillain-Barré-Syndrom und andere, die insgesamt aber eher selten auftreten [2]. Unter den Spätmanifestationen und Folgeerkrankungen ist vor allem die Uveitis relevant, die bis zur Erblindung führen kann. Auch andere Strukturen des Augenapparates können in der Folge einer Leptospirose betroffen sein. Das Auftreten von chronischer Müdigkeit, Schwächegefühl, Myalgien und Kopfschmerzen sowie kardiale Veränderungen sind ebenfalls beschrieben [4].

Therapie

Neben supportiver Therapie erfolgt die Behandlung insbesondere in der Frühphase der Septikämie durch eine antibiotische intravenöse Behandlung mittels beispielsweise Penicillin G oder eines Cephalosporins der 3. Generation, bei leichten Verläufen auch mit der oralen Gabe von Doxycyclin. Da der Verlauf durch die rechtzeitige Verabreichung eines Antibiotikums wesentlich mitbestimmt wird, sollte dies bereits bei klinischem Verdacht auf eine Leptospirose erfolgen [30].

Prophylaxe

Die Gabe von Doxycyclin als effektive Präexpositionsprophylaxe ist in der Literatur beschrieben, wenn Hochrisikoexpositionen nicht vermeidbar sind [4]. Auch die Gabe als Postexpositionss-

Originalien und Übersichten

Tab. 4 Risikofaktoren und Expositionen bei humanen Leptospireninfektionen in Deutschland

Risikofaktoren	OR bzw. RR (95 % KI)	Anzahl Fälle/ Gesamtzahl Fälle (%)	Studie
Berufliche Tätigkeit als Waldarbeiter	RR 9,2 (2,6–21,4)	–	Brockmann et al. [22] Jurke et al. [35]
	OR 0,52 (0,29–0,92)		
Freizeitaktivitäten im Wald mit mehr als 10 h pro Woche	OR 1,81 (1,07–3,06)	–	Jurke et al. [35]
Häufiger oder gelegentlicher direkter Kontakt zu Haus- und Nutztieren			
Farbratten	RR 13,9 (4,8–25,3)	–	Brockmann et al. [22]
Rinder	RR 3,7 (1,3–9,6)		
Geflügel	RR 3,6 (1,3–8,6)		
Mäuse	RR 3,3 [0,9–9,8]		
Meerschweinchen	RR 3,0 (1,1–7,4)		
Nutztiere im Allgemeinen	RR 2,3 (1,1–4,9)		
Berufsbedingte Tätigkeiten			
Davon: Landwirt mit Tieren		5/31 (16)	
Landwirt ohne Tiere		7/31 (23)	
Kanalarbeiter		6/31 (19)	
Freizeitaktivitäten		31/102 (30)	
Davon: Verreisen		16/31 (52)	
Schwimmen		6/31 (19)	
Fischen		5/31 (16)	
Tätigkeiten im häuslichen Umfeld		40/102 (39)	
Davon: Haustierbesitz		11/40 (28)	
Arbeiten an privatem Teich		9/40 (23)	
Gartenarbeiten		6/40 (15)	
Unfälle (Tierbiss, ins Wasser fallen)		3/40 (8)	

KI Konfidenzintervall, RR Relative Risk, OR Odds Ratio

prophylaxe (200 mg/Woche per os) nach schweren Niederschlägen und Überschwemmungen in Leptospiroseendemiegebieten konnte, abhängig vom Zeitpunkt der Gabe, in einer Studie zu einer Reduzierung auftretender Fälle führen [33]. Ein Cochrane-Review von 2010 kommt zu dem Schluss, dass der Nutzen einer Prä- bzw. Postexpositionsprophylaxe im Sinne einer Minderung des Infektionsrisikos bzw. einer Milderung des klinischen Verlaufs unklar ist. Es liegt bisher keine hinreichende Evidenz zur Beurteilung vor [34].

Prävention

Gegebenenfalls können Maßnahmen sinnvoll sein, die das Eindringen von Nagetieren in Wohnräume oder Überflutungen von siedlungsnahen Gebieten verhindern [4]. Für berufliche Risikogruppen ist insbesondere wasserdichte Schutzbekleidung, Schutzbrille, Handschuhe und geeignetes Schuhwerk zur Expositionsprophylaxe entscheidend [20, 27]. Im Rahmen von risikobehafteten Freizeitaktivitäten (siehe Abschnitt Leptospiroseausbrüche in Deutschland) kann die wasserdichte Abdeckung von Wunden das Infektionsrisiko minimie-

ren. Ein Impfstoff zur Anwendung beim Menschen ist in Deutschland nicht zugelassen [20].

Differenzialdiagnosen

Bei den Differenzialdiagnosen sollten bei einer reiseassoziierten Leptospirose die im Ursprungsland häufig auftretenden Erkrankungen mit einbezogen werden. Zu den Differenzialdiagnosen gehören zahlreiche Erkrankungen, die ebenfalls mit hohem Fieber einhergehen, wie beispielsweise Malaria, Typhus abdominalis, Denguefieber, Gelbfieber, Rickettsiosen, aber auch Infektionen mit dem humanen Immundefizienzvirus, Influenzaviren sowie mit Erregern verschiedener hämorrhagischer Erkrankungen. Insbesondere bei pulmonalen Hämorrhagien muss an eine Hantavirusinfektion gedacht werden.

Epidemiologie der Leptospirose beim Menschen

Eine Leptospireninfektion sowie die Entwicklung schwerer Verlaufsformen der Leptospirose sind multifaktorielle Geschehen, in denen sowohl wirts- und erregerspezifische Faktoren als auch Umweltfaktoren eine Rolle spielen.

Wirtsspezifische Faktoren

Das Infektionsrisiko mit Leptospiren hängt maßgeblich vom menschlichen Verhalten ab [4]. So sind bestimmte Berufsgruppen, deren Tätigkeit mit einer gehäuften Exposition gegenüber Tieren und deren Ausscheidungen, Fleisch und Organen, Erdreich und Oberflächenwasser verbunden ist, besonders gefährdet. In Deutschland ist die Leptospirose eine anerkannte Berufskrankheit. In **Tab. 4** sind Faktoren aufgeführt, die mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit einer Leptospireninfektion beim Menschen in Deutschland assoziiert sind. Diese wurden in serologischen Querschnittstudien und bei einer Auswertung der zwischen 1997–2000 in Deutschland gemeldeten Fälle identifiziert [21, 22, 35]. So wurde der Beruf Waldarbeitskraft in einer süddeutschen Querschnittstudie (n=1007) als bedeutender Expositi-

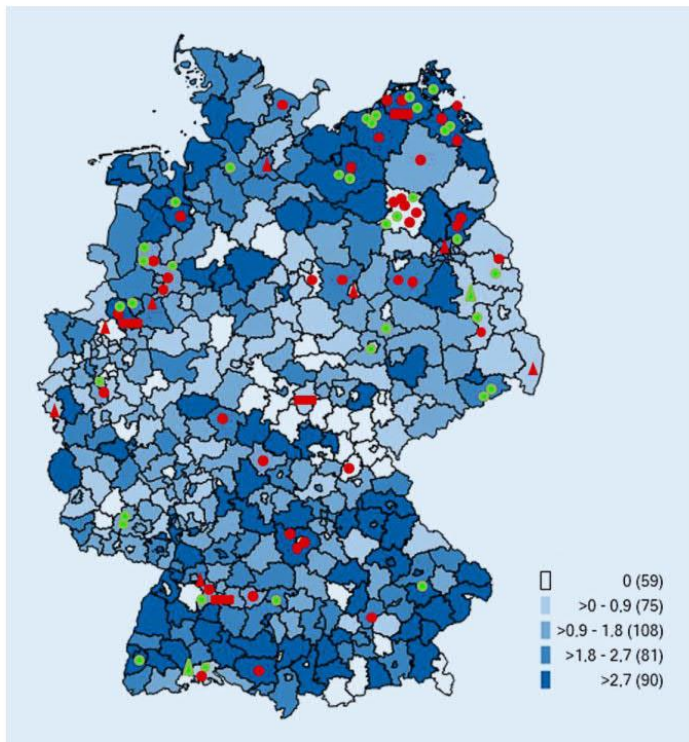


Abb. 2 ▲ Humane Leptospiroseinzidenz pro 100.000 Einwohner für die Landkreise und kreisfreien Städte Deutschlands in den Jahren 2001–2018 [19] sowie molekularer Nachweis von Leptospiren bei Nagetieren und anderen Kleinsäugetern. (Werte in den Klammern: Zahl der Landkreise bzw. kreisfreien Städte in der entsprechenden Inzidenzklasse. Kreise: Nagetierpopulationen aus der Studie von Mayer-Scholl et al. [49], Dreiecke: Rattenpopulationen aus der Studie von Heuser et al. [50], Rechtecke: Nagetierpopulationen aus der Studie von Fischer et al. [18], rote Symbole: Leptospira-positive Populationen, grüne Symbole: Leptospira-negative Populationen)

onsfaktor identifiziert [22]. In einer Studie unter 722 Mitarbeitenden von Forstbetrieben konnte ein Zusammenhang zwischen Seropositivität und der Beschäftigung als Waldarbeitskraft allerdings nicht bestätigt werden, da die Bürobeschäftigten der Forstbetriebe hier eine höhere Seroprävalenz aufwiesen [35].

Erregerspezifische Faktoren

Trotz jahrelanger Forschung auf dem Gebiet der Erreger-Wirt-Interaktionen sind diese bei Leptospiren noch unzureichend beschrieben. Erste Virulenzfaktoren wurden im Stadium des Eindringens des Erregers in den Wirtorganismus (Motilität und Überwindung

von Zellbarrieren), der Persistenz im Wirtorganismus (Nährstoffaufnahme und Überleben in Immunzellen) und der Zerstörung des Wirtsgewebes identifiziert. Für detailliertere Informationen wird auf eine aktuelle Übersichtsarbeit verwiesen [36].

Umweltfaktoren

Die Überlebenszeit der Leptospiren außerhalb des Wirtes hat einen maßgeblichen Einfluss auf das Expositionsrisiko für Mensch und Tier. Sobald die Erreger über den Wirt in die Umwelt gelangen, beeinflussen biotische sowie abiotische Faktoren wie Temperatur, pH-Wert, Feuchtigkeit, UV-Strahlung, Salz- und Mineralstoffkonzentrationen sowie

die Anwesenheit anderer Mikroorganismen das Überleben der Leptospiren [37]. In Wasserproben aus unterschiedlichen Quellen zeigten die Leptospiren eine Überlebenszeit von 10 Monaten bei einer Temperatur von 4°C bzw. 20 Monaten bei 30°C [38, 39]. Leptospiren sind auch in der Lage, in feuchten Böden zu überleben. Die Überlebenszeit ist dabei positiv mit der Feuchtigkeit des Bodens korreliert. Studien berichten von Überlebenszeiten zwischen 15 und 43 Tagen [40]. Neuere Untersuchungen zeigten, dass Leptospiren einen Nährstoffmangel innerhalb eines Biofilms überdauern können und dieser einen schützenden Einfluss auf die Zellen hat [41].

Prognosemodelle zur Vorhersage von humanen Leptospirosefällen

Die Vorhersage von Leptospiroseausbrüchen ist eine der vier Säulen des One-Health-Ansatzes [42]. Daneben liegen Schwerpunkte auf Vorbeugung, Diagnose und Intervention, um die Auswirkungen von Leptospiroseausbrüchen auf die Human- und Tiergesundheit sowie negative sozioökonomische Konsequenzen zu mindern. Prognosen erfordern detaillierte Kenntnisse der Schlüsselfaktoren, die mit Leptospiroseausbrüchen in Verbindung stehen. Wichtige Parameter bei der Entwicklung von Prognosesystemen sind z. B. Klima bzw. Wetter [43], Verbreitung und Abundanz von Reservoirwirten, leptospirenspezifische Eigenschaften, Habitatfaktoren wie das Vorhandensein von Gewässern und Überflutungen [44] sowie berufliche Exposition. Bisher sind Prognoseansätze vor allem aus (tropischen) Entwicklungsländern bekannt, wo Humanfälle etwa 200-mal häufiger sind als in Europa [4].

Durch die relativ geringe Anzahl von Humaninfektionen, die Vielfalt der Leptospirenserovaren und durch die Komplexität der zahlreichen Einflussfaktoren ist die Ableitung von Vorhersagemodellen für Humaninfektionen in gemäßigten Klimazonen problematisch. Allerdings bietet die räumliche Struktur der Verteilung der Humanfälle die Möglichkeit, Gebiete mit unterschiedlichen Infektionsrisiken anhand

Originalien und Übersichten

der Humaninzidenzen der letzten Jahrzehnte zu identifizieren. So lassen sich die räumlichen Cluster von Risikogebieten in den Niederlanden auf bestimmte Landnutzungsformen und Bodentypen zurückführen, die mit bestimmten Bedingungen zur Erregerpersistenz in der Umwelt und dem Vorkommen von Reservoiren korrelieren könnten [45].

Speziell im Norden und Süden Deutschlands finden sich viele Landkreise, in denen die langfristigen Humaninzidenzen 2001–2017 bei >2,7 gemeldeten Infektionen pro 100.000 Personen liegen (Abb. 2). Dort könnten in ausgewählten Kreisen die statischen Faktoren (z. B. Landnutzung, Habitatbeschaffenheit) und die dynamischen Faktoren (z. B. Wetter, Kleinsäugervorkommen) identifiziert werden, die Humaninzidenzen maßgeblich beeinflussen und als Vorhersageparameter in Prognosesysteme einfließen. Dafür ist es unabdingbar, dass entsprechende Grundlagendaten in der notwendigen Auflösung vorliegen. Das ist bei Wetterdaten und Landnutzung der Fall. Demgegenüber fehlen aber für viele Regionen Informationen zur Kleinsäugerbundanz, da kein deutschlandweites Monitoringsystem existiert. Lediglich für einige Nagetierarten erfolgen langfristig und kontinuierlich harmonisierte Erhebungen in einzelnen Bundesländern für den Landwirtschafts- und Forstbereich [46]. Solche Daten sind ideal für die Entwicklung von Prognosesystemen, bei denen die Abundanz von Wirtstieren eine Rolle spielt [47], und dürften auch für die Vorhersage von humanen Leptospireninfektionen hilfreich sein.

Fazit

Die Leptospire ist eine Erkrankung, bei der das Infektionsrisiko und die klinische Ausprägung maßgeblich von wirts- und erregerspezifischen Faktoren sowie Umweltfaktoren abhängen. Das Infektions- und Erkrankungsrisiko ist beim Menschen mit dessen Beruf- und Freizeitverhalten, den Erregereigenschaften, klimatischen Faktoren sowie der Verbreitung und Abundanz relevanter Reservoire, v. a. Nagetiere, assoziiert. Die wenigen Studien zum Vorkommen von Leptospiren bei heimischen, wild lebenden Na-

getieren zeigen eine teilweise sehr hohe Prävalenz mit einer Vielzahl unterschiedlicher pathogener Leptospirenspezies.

Trotzdem ist die Leptospire aufgrund eines begrenzten Expositionsrisikos des Menschen gegenüber Nagetieren und gemäßigter klimatischer Bedingungen in Deutschland eine selten gemeldete Erkrankung. Nationale und internationale Studien weisen auf eine hohe Dunkelziffer nichtdiagnostizierter Leptospirefälle hin. Dies liegt einerseits an den derzeitigen Möglichkeiten der Labordiagnostik, welche aufgrund der Vielzahl vorhandener Leptospirenserovare und Kreuzreaktionen eine unzureichende Sensitivität bzw. Spezifität aufweisen und häufig Speziallaboratorien vorbehalten sind [48].

Andererseits muss ärztliches Fachpersonal die Leptospire als Differenzialdiagnose überhaupt erst berücksichtigen, um eine entsprechende Diagnostik zu veranlassen. Milde Verläufe und unspezifische Symptome mit einer Vielzahl möglicher Differenzialdiagnosen können die Diagnose erschweren. Umso wichtiger ist es, in der medizinischen Versorgung Risikofaktoren für eine Leptospireninfektion zu kennen und die Diagnose in Betracht zu ziehen. Der Öffentliche Gesundheitsdienst kann insbesondere in Regionen mit höherer Leptospireinzidenz auf die Risiken hinweisen. Berufsgruppen, die besonders gefährdet sind, sowie Menschen mit einem Freizeitverhalten, das mit höherem Risiko verbunden ist, sollten dabei gezielt über Präventionsmöglichkeiten aufgeklärt und zielgruppengerecht angesprochen werden.

In der Vergangenheit waren Leptospire Ausbrüche in Deutschland und Europa mit warmen Temperaturen und dem Auftreten von starken Regenfällen assoziiert. Im Zuge des Klimawandels können steigende Luft- und Wassertemperaturen sowie ein vermehrtes Auftreten von starken Regenfällen und Überschwemmungen das Überleben und die Verbreitung der Leptospiren in der Umwelt fördern. Gleichzeitig kann die zeitliche Ausdehnung sommerlicher Temperaturen zu verstärktem Badetourismus und wassersportlichen Aktivitäten führen und somit zu einer erhöhten Exposition. Diese Faktoren sollten in Zu-

kunft durch den Öffentlichen Gesundheitsdienst in Deutschland in Betracht gezogen werden.

Korrespondenzadresse

Anne Mayer-Scholl

Konsiliarlabor für Leptospiren, Bundesinstitut für Risikobewertung
Diedersdorfer Weg 1, 12277 Berlin, Deutschland
anne.mayer-scholl@bfr.bund.de

Förderung. Die Untersuchungen der Autoren werden im Rahmen des Forschungsnetzes zoonotische Infektionskrankheiten im Verbund RoBoPub durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (FKZ 01KI1721A, FKZ 01KI1721F, 01KI1721H, 01KI1721B, 01KI1721D), vom Deutschen Zentrum für Infektionsforschung (DZIF) in der Thematischen Translationalen Forschungseinheit (TTU) „Emerging Infections“ (Netzwerk „Rat-borne pathogens“) und vom Umweltbundesamt (UBA) durch den Umweltforschungsplan des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz, Bau und Reaktorsicherheit (BMUB; FKZ 3709 41 401 und 3713 48 401, JJ) gefördert.

Einhaltung ethischer Richtlinien

Interessenkonflikt. L.H. Nau, D. Emirhar, A. Obiegala, M. Mylius, M. Runge, J. Jacob, N. Bier, K. Nöckler, C. Imholt, D. Below, C. Princk, J. Dreesman, R.G. Ulrich, M. Pfeffer und A. Mayer-Scholl geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Für diesen Beitrag wurden von den Autoren keine Studien an Menschen oder Tieren durchgeführt. Für die aufgeführten Studien gelten die jeweils dort angegebenen ethischen Richtlinien.

Open Access. Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>) veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden.

Literatur

- Costa F, Hagan JE, Calcagno J et al (2015) Global morbidity and mortality of Leptospirosis: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* 9:e3898
- Levett PN (2001) Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 14:296–326
- Thibeaux R, Iraola G, Ferrer I et al (2018) Deciphering the unexplored *Leptospira* diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence. *Microb Genom*. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000144>
- Haake DA, Levett PN (2015) Leptospirosis in humans. *Curr Top Microbiol Immunol* 387:65–97
- Andersen-Ranberg EU, Pipper C, Jensen PM (2016) Global patterns of leptospira prevalence in vertebrate reservoir hosts. *J Wildl Dis* 52:468–477

6. Gerlach T, Stephan I (2007) Epidemiologische Situation der kaninen Leptospirose in Norddeutschland in den Jahren 2003–2006. *Tierarztl Prax* 35:421–429
7. Geisen V, Stengel C, Hartmann K (2008) Epidemiologische Situation der Leptospirose beim Hund in Süddeutschland. *Tierarztl Prax* 36:329–336
8. Mayer-Scholl A, Luge E, Draeger A, Nöckler K, Kohn B (2013) Distribution of leptospira serogroups in dogs from Berlin, Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis* 13:200–202
9. Rose L (2018) Die Bedeutung der Leptospirose bei Katzen in Berlin und Brandenburg. Seroprävalenz, Risikofaktoren und klinische Verdachtsfälle
10. Weis S (2016) Leptospirose bei Freigängerkatzen in Deutschland: Prävalenz von Ausscheidung und Antikörpern
11. Schönberg A, Staak C, Kämpe U (1987) Leptospirose in der Bundesrepublik Deutschland: Ergebnisse eines Untersuchungsprogrammes auf Leptospirose bei Tieren im Jahre 1984. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 34:98–108
12. Strutzberg-Minder K, Tschentscher A, Beyerbach M, Homuth M, Krienbrock L (2018) Passive surveillance of Leptospira infection in swine in Germany. *Porcine Health Manag* 4:10
13. FLI (2017) Tiergesundheitsjahresbericht 2017. <https://www.fli.de/de/publikationen/tiergesundheitsjahresberichte/>. Zugegriffen: 1. Apr. 2019
14. Schmid M (2005) Prävalenz von Leptospiroenantikörpern in bayerischen Rinderherden und von Leptospirose bei abortierten Rinderfeten
15. Pikalo J, Sattler T, Eichinger M et al (2016) Vorkommen von Antikörpern gegen Leptospirose bei Pferden im mitteldeutschen Raum (Occurrence of antibodies against Leptospira in horses in Middle Germany). *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 129:202–208
16. Dorrego-Keiter E, Tóth J, Dikler L, Sielhorst J, Schusser GF (2016) Kultureller Nachweis von Leptospirose in Glaskörperflüssigkeit und Antikörpernachweis gegen Leptospirose in Glaskörperflüssigkeit und Serum von 225 Pferden mit equiner rezidivierender Uveitis (ERU). *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 129:209–2015
17. Faulde M, Freise J (2014) Public health pests. Arthropods and rodents as causative disease agents as well as reservoirs and vectors of pathogens. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 57:495–503
18. Fischer S, Mayer-Scholl A, Imholt C et al (2018) Leptospira genomspecies and sequence type prevalence in small mammal populations in Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis* 18:188–199
19. *SurvStat@RKI2.0* (2019) Webpräsenz. <https://survstat.rki.de>. Zugegriffen: 4. März 2019
20. RKI (2015) Leptospirose. RKI-Ratgeber für Ärzte
21. Jansen A, Schoneberg I, Frank C, Alpers K, Schneider T, Stark K (2005) Leptospirosis in Germany, 1962–2003. *Emerg Infect Dis* 11:1048–1054
22. Brockmann SO, Ulrich L, Piechotowski I et al (2016) Risk factors for human Leptospira seropositivity in South Germany. *SpringerPlus* 5:1796
23. Popp L (1960) The epidemiology of field fever in the foothills of Lower Saxony. *Arch Hyg Bakteriol* 144:345–374
24. Hermanssen J (1954) A swamp fever epidemic in the west coast region of Schleswig-Holstein. *Dtsch Med Wochenschr* 79:245–246
25. Desai S, van Treeck U, Lierz M et al (2009) Resurgence of field fever in a temperate country: an epidemic of leptospirosis among seasonal strawberry harvesters in Germany in 2007. *Clin Infect Dis* 48:691–697
26. Fiecek B, Chmielewski T, Sadkowska-Todys M et al (2017) An outbreak of leptospirosis imported from Germany to Poland. *Adv Clin Exp Med* 26:415–419
27. Dreesman J, Hamschmidt L, Toikkanen S et al (2016) Leptospirose-Ausbruch bei Saisonarbeitern in der Erdbeerernte in Niedersachsen, 2014. *Gesundheitswesen*. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1578892>
28. Brockmann S, Piechotowski I, Bock-Hensley O et al (2010) Outbreak of leptospirosis among triathlon participants in Germany, 2006. *BMC Infect Dis* 10:91
29. WHO (2003) Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control
30. Herold G (Hrsg) (2019) *Innere Medizin*. Gerd Herold Verlag, Köln
31. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN et al (2003) Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 3:757–771
32. Schreiber PW, Aceto L, Korach R, Marreros N, Ryser-Degjorgis M-P, Günthard HF (2015) Cluster of leptospirosis acquired through river surfing in Switzerland. *Open Forum Infect Dis* 2:ofv102
33. Schneider MC, Velasco-Hernandez J, Min KD et al (2017) The use of chemoprophylaxis after floods to reduce the occurrence and impact of leptospirosis outbreaks. *Int J Environ Res Public Health* 14(6):E594. <https://doi.org/10.3390/ijerph14060594>
34. Brett-Major DM, Coldren R (2012) Antibiotics for leptospirosis. *Cochrane Database Syst Rev*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008264.pub2>
35. Jurke A, Bannert N, Brehm K et al (2015) Serological survey of bartonella spp., borrelia burgdorferi, brucella spp., coxiella burnetii, francisella tularensis, leptospira spp., echinococcus, hanta-, TBE- and XMR-virus infection in employees of two forestry enterprises in North Rhine-Westphalia, Germany, 2011–2013. *Int J Med Microbiol* 305:652–662
36. Murray GL (2015) The molecular basis of leptospiral pathogenesis. *Leptospira and leptospirosis*. *Curr Top Microbiol Immunol* 387:139–185
37. Thibeaux R, Girault D, Bierque E et al (2018) Biodiversity of environmental leptospira: improving identification and revisiting the diagnosis. *Front Microbiol* 9:816–816
38. Andre-Fontaine G, Aviat F, Thorin C (2015) Waterborne leptospirosis: survival and preservation of the virulence of pathogenic leptospira spp. in fresh water. *Curr Microbiol* 71:136–142
39. Parker J, Walker M (2011) Survival of a pathogenic leptospira serovar in response to combined in vitro pH and temperature stresses. *Vet Microbiol* 152:146–150
40. Smith DJ, Self HR (1955) Observations on the survival of leptospira australis A in soil and water. *J Hyg (Lond)* 53:436–444
41. Kumar KV, Lall C, Raj RV, Vedhagiri K, Vijayachari P (2015) Coexistence and survival of pathogenic leptospires by formation of biofilm with azospirillum. *Fems Microbiol Ecol* 91(6):fiv51. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv051>
42. Durski KN, Janclous M, Chowdhary T, Bertherat E (2014) A global, multi-disciplinary, multi-sectorial initiative to combat leptospirosis: Global Leptospirosis Environmental Action Network (GLEAN). *Int J Environ Res Public Health* 11:6000–6008
43. Weinberger D, Baroux N, Grangeon JP, Ko AI, Goarant C (2014) El Niño southern oscillation and leptospirosis outbreaks in new Caledonia. *PLoS Negl Trop Dis* 8:e2798
44. Leduc J, Sorn S, Hem S et al (2017) Assessing the performance of remotely-sensed flooding indicators and their potential contribution to early warning for leptospirosis in Cambodia. *PLoS ONE* 12:e181044
45. Rood EJJ, Goris MGA, Pijnacker R, Bakker MI, Hartskeerl RA (2017) Environmental risk of leptospirosis infections in the Netherlands: spatial modelling of environmental risk factors of leptospirosis in the Netherlands. *PLoS ONE* 12:e186987
46. Sonnenburg ED, Smits SA, Tikhonov M, Higginbottom SK, Wingreen NS, Sonnenburg JL (2016) Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations. *Nature* 529:212–215
47. Reil D, Imholt C, Eccard JA, Jacob J (2015) Beech fructification and bank vole population dynamics—combined analyses of promoters of human puumala virus infections in Germany. *PLoS ONE* 10:e134124
48. Simon J, Lubnow M, Reng CM et al (2015) Diagnostik der Leptospirose – Schwierigkeiten und Limitationen. *Mikrobiologie* 25(3):100–106
49. Mayer-Scholl A, Hammerl JA, Schmidt S et al (2014) Leptospira spp. in rodents and shrews in Germany. *Int J Environ Res Public Health* 11:7562–7574
50. Heuser E, Fischer S, Ryll R et al (2017) Survey for zoonotic pathogens in Norway rat populations from Europe. *Pest Manag Sci* 73:341–348
51. Horsch F, Klockmann J, Janetzky B, Drechsler H, Lobnitz P (1970) Leptospirosis in wild animals. *Monatsh Veterinarmed* 25:634–639
52. Jansen A, Luge E, Guerra Betal (2007) Leptospirosis in urban wild boars, Berlin, Germany. *Emerging Infect Dis* 13:739–742
53. Müller H, Winkler P (1994) Ergebnisse serologischer Untersuchungen auf Leptospira-Antikörper bei Füchsen (Results of serological studies of Leptospira antibodies in foxes). *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 107(3):90–93
54. Renteria Solis ZM (2015) Disease occurrence in free-ranging raccoons (procyon lotor) from rural and urban populations in north-eastern Germany
55. Anheyer-Behnenburg HE (2013) Untersuchungen zum Vorkommen von Zoonoseerregern und dem kaninen Staupevirus in der Waschbärpopulation Niedersachsens 2011–2013
56. Runge M, von Keyserlingk M, Braune S et al (2013) Distribution of rodenticide resistance and zoonotic pathogens in Norway rats in Lower Saxony and Hamburg, Germany. *Pest Manag Sci* 69:403–408
57. Obiegala A, Woll D, Karnath C et al (2016) Prevalence and genotype allocation of pathogenic leptospira species in small mammals from various habitat types in Germany. *PLoS Negl Trop Dis* 10:e4501
58. Obiegala A, Albrecht C, Dafalla M et al (2017) Leptospira spp. in small mammals from areas with low and high human hantavirus incidences in south-west Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis* 17:312–318
59. Hurd J, Berke O, Poljak Z, Runge M (2017) Spatial analysis of leptospira infection in muskrats in Lower Saxony, Germany, and the association with human leptospirosis. *Res Vet Sci* 114:351–354
60. Woll D, Karnath C, Pfeffer M, Allgower R (2012) Genetic characterization of leptospira spp. from beavers found dead in south-west Germany. *Vet Microbiol* 158:232–234

3.2 Publikation Nr. 2

Survival time of *Leptospira kirschneri* serovar Grippotyphosa under different environmental conditions

Lisa H. Nau¹, Anna Obiegala¹, Nina Król¹, Anne Mayer-Scholl², Martin Pfeffer^{1*+}

¹ Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, University of Leipzig, Leipzig, Germany

² Department Biological Safety, German Federal Institute for Risk Assessment, Berlin, Germany

PLoS ONE 15(7): e0236007. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236007>

Stellungnahme zum Eigenanteil an der Publikation:

Das Konzept der Studie entwarfen Martin Pfeffer, Anne Mayer Scholl und ich gemeinsam. Alle Laboruntersuchungen und Auswertungen führte ich allein durch. Anna Obiegala erstellte die statistische Auswertung. Martin Pfeffer unterstützte mich bei der Interpretation der Ergebnisse. Die Literaturrecherche erfolgte durch mich. Das Manuskript für die Publikation wurde unter Anleitung von Martin Pfeffer selbständig durch mich verfasst und in Zusammenarbeit mit allen Koautoren fertig gestellt. Es wurden keine weiteren als die angegebenen Quellen verwendet.

RESEARCH ARTICLE

Survival time of *Leptospira kirschneri* serovar Grippotyphosa under different environmental conditions

L. H. Nau¹, A. Obiegala¹, N. Król¹, A. Mayer-Scholl², M. Pfeffer^{1*}

1 Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, University of Leipzig, Leipzig, Germany, **2** Department Biological Safety, German Federal Institute for Risk Assessment, Berlin, Germany

* pfeffer@vetmed.uni-leipzig.de

Abstract

Leptospirosis is a re-emerging zoonotic disease of high medical importance that affects humans worldwide. Humans or animals acquire an infection with pathogenic leptospires either by direct contact with infected animals or by indirect contact to contaminated environment. Survival of *Leptospira* spp. in the environment after having been shed via animal urine is thus a key factor to estimate the risk of infection, but not much is known about the tenacity of pathogenic leptospires. Here, the survival time of both a laboratory strain and a field strain of *L. kirschneri* serovar Grippotyphosa in animal urine and their tenacity while drying was investigated and compared at different temperatures (15°C–37°C). *Leptospira* spp. are also often found in rivers and ponds. As the infection risk for humans and animals also depends on the spreading and survival of *Leptospira* spp. in these environments, the survival of *L. kirschneri* serovar Grippotyphosa was investigated using a 50-meter-long hose system simulating a water stream. Both strains did not survive in undiluted cattle or dog urine. Comparing different temperatures and dilution media, the laboratory strain survived the longest in diluted cattle urine with a slightly alkaline pH value (3 days), whilst the field strain survived in diluted dog urine with a slightly acid pH value up to a maximum of 24 h. Both strains did not survive drying on a solid surface. In a water stream, leptospires were able to move faster or slower than the average velocity of the water due to their intrinsic mobility but were not able to survive the mechanical damage caused by running water in the hose system. From our results we conclude, that once excreted via animal urine, the leptospires immediately need moisture or a water body to survive and stay infectious.

OPEN ACCESS

Citation: Nau LH, Obiegala A, Król N, Mayer-Scholl A, Pfeffer M (2020) Survival time of *Leptospira kirschneri* serovar Grippotyphosa under different environmental conditions. PLoS ONE 15(7): e0236007. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236007>

Editor: Odir A. Dellagostin, UFPL, BRAZIL

Received: May 11, 2020

Accepted: June 26, 2020

Published: July 15, 2020

Copyright: © 2020 Nau et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript.

Funding: This study is part of the joined research project "Improving public health through a better understanding of the epidemiology of rodent-transmitted diseases" (RoBoPub) and was funded by the German Federal Ministry of Education and Research (grant number 01KI1721F). First author's salary was funded by the German Federal Ministry of Education and Research. We acknowledge support from the German Research Foundation (DFG) and Leipzig University within the program of

Introduction

Pathogenic spirochetes of the genus *Leptospira* are the cause of a febrile zoonosis called leptospirosis which affects approximately more than 1 million people annually [1]. Although the risk of becoming infected is highest in tropical and subtropical regions, there are also around 24,000 human cases per year in Europe, with 5% having a fatal outcome [1]. The infection may manifest in humans with a high variability of symptoms, ranging from subclinical infections over mild often flu-like symptoms to severe illnesses with signs of multi-organ dysfunction.

Open Access Publishing by covering the publication fees. The funders had no role in study design, data collection, and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Due to unspecific clinical signs, a very large number of undetected leptospiral infections is assumed [2]. Symptoms of animals with leptospirosis are also very variable and depend not only on the species but also on the constitution, age and leptospiral serovar. Infections of adult livestock like cattle or swine with leptospirosis have a major economic significance by causing various forms of reproductive failure [3].

Leptospira spp. are small (6–20 µm long with an average diameter of 0.1 µm), highly motile, spiral-shaped bacteria with hooked ends [4, 5]. There are two taxonomic classification systems of *Leptospira* spp., one based on serological features dividing the pathogenic *Leptospira* spp. into 24 serogroups with at least 300 serovars and the other based on differences in the genome distinguishing currently 65 *Leptospira* species. [6–8]. Although the two classification systems are not congruent, for example, serovars of the same serogroup can be assigned to different genome species, both are used today [8–10]. *Leptospira kirschneri* serovar Grippotyphosa is one of the most important infectious agents associated with human leptospirosis outbreaks in Germany [11, 12]. Additionally, *Leptospira* spp. of the serogroup Grippotyphosa are one of the main causes of canine leptospirosis in Europe and can also be found in many other mammals like cattle, swine, sheep, horses and rodents [2, 13–15]. As these animals are often living in close proximity to humans their infections do not only play an economic role but are also important for the assessment of the human infection risk. Rodents and other small mammals are well known reservoir hosts for *Leptospira* and play a major role in the dissemination of many leptospiral species [16, 17].

Humans usually get infected with *Leptospira* spp. through direct contact with an infected animal or through indirect contact with the urine of these animals via contaminated soil or water. Mucous membranes, abrasions or cuts in the skin are usual portals of entry [2].

Thus, the survival of *Leptospira* spp. in the environment is a crucial factor influencing the risk of infection for humans and animals. The survival time of *Leptospira* spp. in the environment depends on various factors, for example, the pH value of the urine, the temperature of the environment, UV radiation, the leptospiral strain, the type of surface the leptospires are excreted on (water, soil, etc.), and its chemical and bacterial composition [18–23].

There are many reports of *Leptospira* spp. found in rivers or creeks and outbreaks of human leptospirosis acquired by contact to water sources [24–26]. Therefore, also the distribution and the survival of the pathogen in water streams are of importance to estimate the risk of human infections.

Thus far, examinations of the survival time of *Leptospira* spp. in the environment have been scarce despite its importance to human leptospiral infections. Existing studies mostly consider the survival time of *Leptospira* spp. in different types of soil or water (under various conditions) [18, 19, 22, 24]. There are only very few studies examining the survival time of *Leptospira* spp. in animal urine ex vivo or its distribution in the environment [18, 27]. To our knowledge, no research so far has compared the survival of these bacteria in different kinds of animal urine and the possible differences in survival time between a laboratory and a field strain.

The achieved aims of the study were to examine the survival time of *Leptospira kirschneri* (a laboratory and a field strain) outside the host under different conditions imitating possible environmental scenarios: (1) its survival in dog and cattle urine, (2) the effect of dilution after the excretion, (3) its distribution and survival in a water stream, and (4) its tenacity while drying.

Material and methods

Leptospiral isolates

The leptospiral isolates used in this study were obtained from the German national consultant laboratory for leptospirosis at the Federal Institute for Risk Assessment in Berlin. The choice

of *L. kirschneri* serovar Grippytyphosa was based on its frequent appearance and its detection in two recent (2007 and 2014) human outbreaks of leptospirosis in Germany [11, 12]. Leptospiral strains were maintained at room temperature in liquid Ellinghausen and McCullough medium (EMJH) as modified by Johnson and Harris (BD-Difco EMJH Medium Base and Enrichment, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Germany) [28]. Subcultures were incubated in liquid EMJH medium at 29°C for 3–4 days and then stored at 23°C in the dark until use. The number of viable organisms per ml of culture was analyzed using a Thoma cell counting chamber (0.1 mm depth). All experiments were conducted with a one-week-old laboratory strain of *L. kirschneri* serovar Grippytyphosa (Strain Moska, passages 93–97) and a field strain of *L. kirschneri* serovar Grippytyphosa (LA1-RoBo-Pub, passages 5–8) isolated in 2017. Mechanical damage and UV-light exposure of the leptospires during the handling was avoided as much as possible.

Collection and processing of urine samples

Because both cattle and dogs can be infected with *L. kirschneri* serovar Grippytyphosa, their urine was selected for the experiments. Furthermore, these animals were chosen as there are interesting differences between their urine, e.g. in pH values and biochemical composition, exemplifying the urine of herbivore and carnivore species. Urine samples were collected as middle stream samples from healthy untreated animals, which showed no signs of leptospirosis. The cattle urine was obtained from cows of the Clinic for Ruminants and Swine of the University of Leipzig. The dog urine was obtained from one privately kept pet dog (9 years old, male Magyar Vizsla). After collection, the urine was sterile filtrated and kept frozen in aliquots at -20°C until usage. The animals urinated spontaneously and the urine was only used as matrix and not investigated further. Therefore, no ethical approval was necessary. Neither cattle nor the dog were manipulated in any way during urine collection. As the dog's owner is part of the Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health in Leipzig and volunteered to provide the dog's urine for the experiments no further consent was necessary.

DNA-extraction and real-time PCR

DNA was extracted from samples using the commercial QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). A real-time PCR targeting the *LipL32* gene was conducted according to Stoddard et al. [29] with slight modifications (as described by Woll et al. [30] without the use of the internal control).

Survival of *L. kirschneri* serovar Grippytyphosa in animal urine

The experiments were conducted with undiluted and diluted urine. Dilution (1:10) was done either in phosphate-buffered saline (PBS) or in purified water. Then, 225 µl of urine (diluted or undiluted) was placed in 96-well-plates and 25 µl of a leptospiral culture was added (field strain with a concentration of $4.7\text{--}5.5 \times 10^7$ bacteria/ml; laboratory strain with a concentration of $3.1\text{--}3.53 \times 10^8$ bacteria/ml). After sample incubation at 15°C, 23°C, 29°C, and 37°C for different periods (1 min, 5 min, 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 24 h, and then daily until day 7), a 200 µl aliquot was taken from each well and added to 4 ml of fresh EMJH medium. The cultures were then incubated at 29°C for at least 28 days and checked weekly for motile *Leptospira* under the dark field microscope. All experiments were conducted in triplicate.

As a positive growth control during each experiment, the same number of leptospires was put into 225 µl PBS and incubated for 1 min and 24 h at four different temperatures (15°C, 23°C, 29°C, and 37°C). These controls were handled and tested for leptospiral growth exactly as described for the urine samples. Controls were done for both strains at all tested temperatures.

Furthermore, to prove that failed cultivation attempts did not arise from negative influences of PBS or handling, cultures of *L. kirschneri* serovar Grippytyphosa (10^8 leptospores/ml) in EMJH medium were stored at 15°C, 23°C, 29°C, and 37°C for one week. After 7 days, 200 µl of culture was taken from each tube and put into 4 ml EMJH medium. The tubes were incubated at 29°C and checked for leptospiral growth.

Distribution and survival of *L. kirschneri* serovar Grippytyphosa in a water stream

In order to investigate the distribution and the survival of *L. kirschneri* serovar Grippytyphosa in rivers or creeks, a water stream system containing a water reservoir filled with tap water and a 50-meter-long hose with a point for adding leptospiral cultures was built (Fig 1). The hose system had two outlet valves: one after 25 m (Fig 1, point b) and the second after 50 m (Fig 1, point c) for the withdrawal of samples. A constant flow velocity of 0.01 m/sec on average was generated by regulating the water efflux at the endpoint of the system and an elevation difference of 140 cm between the beginning and the end of the tube.

As the speed of leptospores due to their intrinsic mobility in the water stream was not predictable, samples were taken after different time intervals at the two mentioned outlet valves (Fig 1: time points: X1, X2, X3, and respectively X4, X5, X6). The time points X1 (37 min 30 sec) and X4 (79 min 12 sec) were chosen due to the assumption that leptospores moved faster than the regular water stream, X2 (41 min 36 sec) and X5 (83 min 18 sec) that they were as fast as the water stream, and points X3 (45 min 48 sec) and X6 (87 min 30 sec) presuming leptospores moved slower than the regular water stream because of their intrinsic mobility in the opposite direction. For each partial experiment, 1 ml leptospiral culture in EMJH medium (containing 2.1×10^8 – 3.6×10^8 leptospores) was added into the hose system (Fig 1, point a) filled with tap water. At all time points (X1–X6), 2 ml of water was carefully withdrawn at the sampling point b or c. After filtration through filters (pore size 0.22 µm, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland), to eliminate contamination, 200 µl of sample was taken for an examination by real-time PCR and 400 µl of each sample was added to 4 ml of modified EMJH medium. The tubes were incubated at 29°C for at least 28 days and checked weekly for motile leptospores

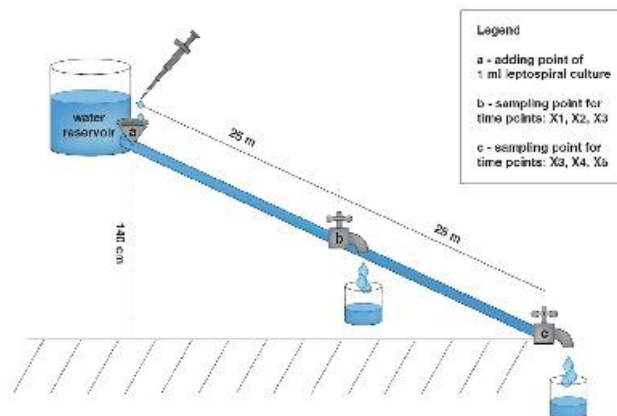


Fig 1. Schematic overview of the 50-meter-long hose system. Between point a and c there is an altitude difference of 140 cm. Time points for taking water samples: X1: 37 min 30 sec; X2: 41 min 36 sec; X3: 45 min 48 sec; X4: 79 min 12 sec; X5: 83 min 18 sec; X6: 87 min 30 sec.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236007.g001>

under the dark field microscope. Each experiment was conducted for the field and laboratory strain.

As a control, 500 µl of the same leptospiral cultures used for the water stream experiment was added into 20 ml stagnant tap water and left at room temperature for at least two hours. Afterwards, samples were taken, filtrated and handled identically as the samples taken from the hose system and cultivation attempts were done in triplicate. This step was conducted to prove that any failed attempts of cultivation did not arise from the damage of the leptospire due to the contents of the tap water or during filtration but only due to mechanical damage during passage in the hose system.

Stability of *L. kirschneri* serovar Grippotyphosa while drying

To determine the stability of the different strains of *L. kirschneri* serovar Grippotyphosa against drying, 50 µl of leptospiral culture (containing 7.2×10^7 – 7.9×10^7 bacteria/ml) was placed on sterilized steel discs (20 mm in diameter) and left to dry up at 15°C, 23°C, 29°C, and 37°C. Every 30 min the discs were checked for their drying condition. The time point “completely dry” was defined as the time when there was no liquid visible on the steel discs and the time point “almost dry” was defined as the last time point tested before complete drying, i.e. 30 min less. The discs were rinsed off with 1 ml of modified EMJH medium and added into tubes with 3 ml of EMJH medium and incubated at 29°C. For at least 28 days the tubes were checked weekly under a dark field microscope for the appearance of motile *Leptospira*. All experiments were conducted in triplicate.

Fig 2 shows a flowchart of the study design for all experiments conducted with *L. kirschneri* serovar Grippotyphosa.

Statistical analysis

The two-tailed Mann-Whitney-U test was used to determine differences in the survival time comparing incubation temperatures, media in which *L. kirschneri* serovar Grippotyphosa was

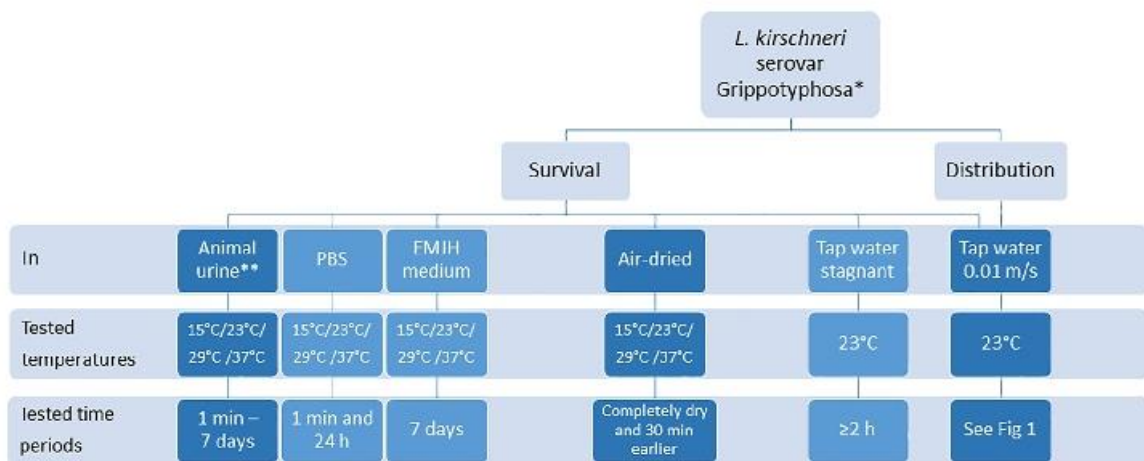


Fig 2. Schematic flowchart of the study design. * laboratory strain or field strain. ** cattle or dog urine, undiluted or diluted 1:10 in either PBS or purified water. Experiments shown in dark blue; controls shown in light blue.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236007.g002>

diluted in, and different leptospiral strains with a standard error ($\alpha = 0.05$) (IBM SPSS Statistics 25, Armonk, New York, United States).

Results

Survival of *L. kirschneri* serovar Grippytyphosa in animal urine

In diluted urine, both strains of *L. kirschneri* serovar Grippytyphosa were able to survive for a period between 1 hour and three days (see Table 1 for all survival times). The laboratory strain

Table 1. Survival time of *Leptospira kirschneri* serovar Grippytyphosa (field strain and laboratory strain) in different media at different temperatures (15°C, 23°C, 29°C, 37°C).

Sample type	pH value of sample	Temperature [°C]	Maximal duration after which cultivation of leptospires was successful [h]	
			Laboratory strain— <i>L. kirschneri</i> serovar Grippytyphosa (Strain Moska)	Field strain— <i>L. kirschneri</i> serovar Grippytyphosa (LA1-RoBo-Pub)
Cattle urine undiluted	8.4	15	0	0
		23	0	0
		29	0	0
		37	0	0
Dog urine undiluted	5.8	15	0	0
		23	0	0
		29	0	0
		37	0	0
Cattle urine diluted in PBS (1:10)	7.7	15	4	4
		23	4	4
		29	4	2–4
		37	1	2
Cattle urine diluted in purified water (1:10)	7.3	15	48–72*	4
		23	24	4
		29	4	4
		37	2	4
Dog urine diluted in PBS (1:10)	6.7	15	4	4–24*
		23	2	4
		29	2	4
		37	2	4
Dog urine diluted in purified water (1:10)	5.5	15	4	4–24*
		23	4	4
		29	4	4
		37	2	4
PBS	7.3	15	≥ 24**	≥ 24**
		23	≥ 24**	≥ 24**
		29	≥ 24**	≥ 24**
		37	≥ 24**	≥ 24**
EMJH medium	7.4	15	≥ 168**	≥ 168**
		23	≥ 168**	≥ 168**
		29	≥ 168**	≥ 168**
		37	≥ 168**	≥ 168**

* Cultivation attempts were done in triplicate—in 1 of three tubes a cultivation attempt was successful at the last time point

** last time point tested

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236007.t001>

survived significantly longer in diluted cattle urine compared to the field strain ($p = 0.027$), while the field strain survived significantly longer than the laboratory strain in diluted dog urine ($p = 0.028$). Both strains had the shortest survival time in cattle urine diluted in PBS at 37°C. The survival time of the laboratory strain in cattle urine diluted with PBS was significantly longer than in urine diluted with distilled water ($p = 0.039$). In contrast, the field strain survived significantly longer in cattle or dog urine which was diluted in distilled water ($p = 0.013$, $p = 0.013$, respectively). The temperature was a crucial influencing factor as the field, as well as the laboratory strain, survived significantly longer at 15°C temperature when compared to 37°C ($p < 0.001$, $p = 0.041$, respectively). Neither the laboratory nor the field strain of *L. kirschneri* serovar Grippytyphosa survived in undiluted dog or cattle urine at any examined temperature.

All positive controls at all temperatures showed leptospiral growth and all cultivation attempts of leptospires in culture stored at different temperatures were successful (Table 1).

Distribution and survival of *L. kirschneri* serovar Grippytyphosa in a water stream

Leptospires were detected with the real-time PCR at all time points (Fig 1, X1-X6). However, cultivation attempts failed for all samples (laboratory and field strain). In contrast, in the control experiment conducted with stagnant tap water, the cultivation of leptospires was possible for all samples.

Stability of *L. kirschneri* serovar Grippytyphosa while drying

At all tested temperatures it was possible to cultivate leptospires at the time point when the culture was almost dried on the steel discs. That was after 90 min at 15°C, 60 min at 23°C, and 30 min both at 29°C and 37°C. After complete drying, which was exactly 30 min after the time points just mentioned, it was impossible to cultivate leptospires at any temperature. The results of the experiments with the field strain of *L. kirschneri* serovar Grippytyphosa and the laboratory strain did not differ.

Discussion

Survival of *L. kirschneri* serovar Grippytyphosa in animal urine

In this study, we tested and compared the survival time of a laboratory and a field strain of *L. kirschneri* serovar Grippytyphosa under different environmental conditions. It has been described that freshly isolated pathogenic *Leptospira* species are usually shorter and more tightly coiled than strains that have undergone more than 20 passages in a laboratory [31, 32]. This morphological change is often connected to decreased motility and "poor cell health" [32]. Our results demonstrated that both tested strains of *L. kirschneri* serovar Grippytyphosa were not able to survive in undiluted cattle or dog urine even for the shortest period tested, i.e. 1 min. The few earlier studies examining the survival of *Leptospira* spp. in animal urine used different study conditions, making a direct comparison of our results difficult. In a study conducted by Khairani-Bejo et al. [18] *L. interrogans* serovar Hardjo survived 0–6 h at similar temperatures in undiluted cattle urine. The reason for these non congruent findings could be the tested leptospiral species, their adaptation to different animals or the capability to resist possible harmful effects of the urine. In contrast to serogroup Grippytyphosa, the main reservoir of serogroup Hardjo is cattle [33]. Also, a different biochemical composition of the urine used may have influenced survival time [34]. It has been described that feeding habits, physical activities, body size, and even the climate of the resident location alter the chemical

composition of cattle urine [34]. Another reason for the different survival time could be the distinct methods used to determine the endpoint of survival in the study of Khairani-Bejo et al. [18] and ours. In our research, the survival time was defined as the longest period after which the cultivation in the modified EMJH medium was possible. Khairani-Bejo et al. [18] tested hamsters for leptospirosis after inoculation and equated the survival time with the latest time point when leptospires were still infectious. Whilst there are so many variables, it is hard to reliably compare the results of in vivo and in vitro tests. As a congruency of in vitro test results and results of experimental infections regarding the viability of the bacteria has not yet been proven, further tenacity studies should focus on the comparability of these test methods.

In any case this suggests that contaminated urine needs fast dilution in order to guarantee leptospiral survival. Among animals shedding *Leptospira* spp. adapted to this particular host species, this may differ. Here, a direct infection route through for example sniffing, licking and maybe grooming may make a long survival in urine unnecessary.

In diluted cattle urine, the laboratory strain of *L. kirschneri* serovar Grippotyphosa was able to survive for 72 h (maximum tested period of 7 days) at 15°C. This observation of maximal survival time at the lowest tested temperature is in accordance with the findings of Khairani-Bejo et al. [18]. In their study, *L. interrogans* serovar Hardjo survived the longest in diluted cattle urine at 4°C (48–984 h) and had the shortest survival time at the highest temperature tested (48 h at 32°C) [18].

In the current study, the laboratory strain survived longer in diluted cattle urine with an almost neutral or slightly alkaline pH of 7.3–7.7 which is in line with the description of an optimal pH range for leptospiral growth of 7.2–7.6 [32]. In contrast, the field strain of *L. grippotyphosa* survived the longest in diluted dog urine with a more acidic pH value of 5.5–6.7.

Leptospira kirschneri serovar Grippotyphosa is often the causative agent of canine leptospirosis hence these differences could occur from an adaption of the field strain to the acidic urine of dogs (pH < 7), whereas the laboratory strain may have lost this ability by being maintained for many life cycles in special medium with a pH value of 7.4 [13, 32].

The longer survival of both strains in a colder environment could be explained by harmful reactions of enzymes present in the urine and their increased activity at higher temperatures [35]. Another possible explanation may be the precipitation of salts, like struvite in the urine at lower temperatures [36]. Despite some exceptions, *Leptospira* spp. have been described to be susceptible to higher concentrations of salts in the environment [18, 37, 38]. A study by Alban et al. [36] showed a greater crystal size of salts in animal urine stored at lower temperatures. This increased size could result in a faster descent of these salt particles and therefore a lower likelihood of contact between salt crystals and leptospires, which are normally found on the upper surface of fluids. The long maintenance of the laboratory strain in an optimized medium without harmful substances for the leptospires could lead to a possible loss of their capability to resist them. It may also explain the different influences of temperature between the field and the laboratory strain [32]. This loss of resistance and the previously described susceptibility to salt is also a probable explanation for the differences in survival time of the laboratory strain depending on the dilution of the urine in either PBS or purified water. In all experiments conducted with animal urine, a decreased viability could be the result of the residual urine in the EMJH medium during the incubation period.

Distribution and survival of *L. kirschneri* serovar Grippotyphosa in a water stream

In consequence of the necessity to dilute the urine, we investigated how efficient leptospires might be transported in a water current. Leptospires were detected by PCR at all time points

tested in the 50-meter-long hose system. Although the detection of the *Lipl 32* gene by real-time PCR does not necessarily mean that there were still live *Leptospira* cells in the tested samples, these results suggest that the leptospires were not only dragged with the water stream at the same speed but also traveled faster and slower than the average velocity (0.1 m/s) of the water. These findings are explainable by the intrinsic mobility of *Leptospira* spp. either in the same or against the direction of the water stream. Our data are in line with the experimental findings of Okazaki and Ringen where migration of leptospires up a slow-moving stream was suggested [19]. The speed of leptospires has been described to be dependent on the viscosity of the surrounding medium and is approximately 20 μm in 2–3 sec in regular medium [39]. These findings could be fundamental in risk assessment for leptospiral outbreaks.

As the cultivation of leptospires from the hose system was not possible in contrast to leptospires kept in stagnant water (for the same time), mechanical damage of the leptospires in the hose system is the most likely explanation. Although the use of the 0.22 μm filter could have also reduced or eliminated leptospiral cells in the samples and therefore be responsible for the failed cultivation attempts, mechanical damage seems to be a more likely explanation, as also the leptospires kept in stagnant water were filtrated the same way and cultivation was possible afterwards. Hence, we postulate that the survivability of leptospires could increase when excreted into stagnant water in the environment, but excretion of *Leptospira* spp. into a stream with high velocity in nature could be harmful to *Leptospira* spp., because of a greater chance of mechanical impairment.

Stability of *L. kirschneri* serovar Grippotyphosa while drying

Leptospira kirschneri serovar Grippotyphosa was not able to survive complete drying on a surface in our experiments. Other studies described a correlation between the humidity of the surroundings and the viability of leptospires [18, 19, 40]. For example, Karaseva et al. showed increasing survival times of leptospires connected with rising moisture in the soil, which suggests that leptospiral survival in the environment depends on a sufficient level of humidity [40].

Conclusions

In this study *L. kirschneri* serovar Grippotyphosa survived up to three days in diluted animal urine and did not survive in undiluted cattle or dog urine. Therefore, the most crucial point regarding the survivability of leptospires seems to be a fast dilution in the environment after having been excreted via urine or a direct intake of infected urine by naïve animals. Comparing different temperatures both strains survived longer in diluted animal urine at lower temperatures. *Leptospira kirschneri* serovar Grippotyphosa did not survive drying on a solid surface. Hence, lower temperatures, as well as humid environments, appear to prolong the tenacity of leptospires against detrimental influences, while drought does not allow survival of the leptospires. In a water stream, leptospires were able to move faster or slower than the average velocity of the water due to their intrinsic mobility but were not able to survive the mechanical damage caused by running water in the hose system. Thus, a dilution in stagnant water or a slow stream without mechanical damage could favor the survival of viable bacteria and due to their proper motion, leptospires are likely to spread from the place of their excretion. However, the speed, distance of their spread and survival have to be investigated further. Our findings show differences in the survivability between strains from the laboratory and the field. This suggests that future studies should focus not only on the cultures maintained in the laboratories but also on freshly isolated *Leptospira* spp.

Acknowledgments

The authors like to thank Duygu Emirhar and Enno Luge from the Federal Institute for Risk Assessment in Berlin for the provision of *Leptospira* spp. and the sharing of their expertise. The authors thank the Clinic for Ruminants and Swine of the University of Leipzig and Prof. Dr. Uwe Truyen for the provision of the animal urine. Furthermore, the authors like to especially thank Dr. Stephanie Speck and the medical-laboratory assistants from the Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health in Leipzig for their help whenever needed.

Author Contributions

Conceptualization: L. H. Nau, A. Mayer-Scholl, M. Pfeffer.

Data curation: L. H. Nau.

Formal analysis: A. Obiegala.

Funding acquisition: A. Mayer-Scholl, M. Pfeffer.

Methodology: L. H. Nau, M. Pfeffer.

Project administration: M. Pfeffer.

Supervision: M. Pfeffer.

Validation: L. H. Nau, M. Pfeffer.

Visualization: L. H. Nau.

Writing – original draft: L. H. Nau.

Writing – review & editing: A. Obiegala, N. Król, A. Mayer-Scholl, M. Pfeffer.

References

- Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis* 2015; 9(9):e0003898. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898> PMID: 26379143
- Haake DA, Levett PN. Leptospirosis in humans. *Curr Top Microbiol Immunol* 2015; 387:65–97. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_5 PMID: 25388133
- Ellis W.A. Animal Leptospirosis. In: Adler B, editor. *Leptospira and Leptospirosis*. Berlin, Heidelberg, s. l.: Springer Berlin Heidelberg; 2015. p. 99–137 (Current Topics in Microbiology and Immunology; vol. 387).
- Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(2):296–326. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.296-326.2001> PMID: 11292640
- Adler B, La Peña Moctezuma A de. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol* 2010; 140(3–4):287–96. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012> PMID: 19345023
- Cosate MRV, Sakamoto T, Oliveira Mendes TA de, Moreira EC, Regis da Silva CG, Brasil BSAF et al. Molecular typing of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo isolates from leptospirosis outbreaks in Brazilian livestock. *BMC Vet Res* 2017; 13(1):177. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1081-9> PMID: 28619055
- Zhang C, Yang H, Li X, Cao Z, Zhou H, Zeng L et al. Molecular Typing of Pathogenic *Leptospira* Serogroup Icterohaemorrhagiae Strains Circulating in China during the Past 50 Years. *PLoS Negl Trop Dis* 2015; 9(5).
- Thibeaux R, Iraola G, Ferrés I, Bierque E, Girault D, Soupé-Gilbert M-E et al. Deciphering the unexplored *Leptospira* diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence. *Microb Genom* 2018; 4(1).
- Thibeaux R, Girault D, Bierque E, Soupé-Gilbert M-E, Rettinger A, Douyère A et al. Biodiversity of Environmental *Leptospira*: Improving Identification and Revisiting the Diagnosis. *Front Microbiol* 2018; 9:816. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00816> PMID: 29765361

10. Vincent AT, Schiettekatte O, Goarant C, Neela VK, Bernet E, Thibeaux R et al. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS Negl Trop Dis* 2019; 13(5):e0007270. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007270> PMID: 31120895
11. Desai S, van Treeck U, Lierz M, Espelage W, Zota L, Sarbu A et al. Resurgence of field fever in a temperate country: an epidemic of leptospirosis among seasonal strawberry harvesters in Germany in 2007. *Clin Infect Dis* 2009; 48(6):691–7. <https://doi.org/10.1086/597036> PMID: 19193108
12. Fiecek B, Chmielewski T, Sadkowska-Todys M, Czerwiński M, Zalewska G, Roguska U et al. An outbreak of leptospirosis imported from Germany to Poland. *Adv Clin Exp Med* 2017; 26(3):415–9. <https://doi.org/10.17219/acem/62022> PMID: 28791815
13. Mayer-Scholl A, Luge E, Draeger A, Nöckler K, Kohn B. Distribution of *Leptospira* serogroups in dogs from Berlin, Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2013; 13(3):200–2. <https://doi.org/10.1089/vbz.2012.1121> PMID: 23428087
14. Delooz L, Czaplicki G, Gregoire F, Dal Pozzo F, Pez F, Kodjo A et al. Serogroups and genotypes of *Leptospira* spp. strains from bovine aborted fetuses. *Transbound Emerg Dis* 2018; 65(1):158–65. <https://doi.org/10.1111/tbed.12843> PMID: 28342208
15. Soares PM, Gomes DO, Macedo FP, Soares MM, Lemes KR, Jaeger LH et al. Serological and molecular characterization of *Leptospira kirschneri* serogroup Grippytyphosa isolated from bovine in Brazil. *Microb Pathog* 2020; 138:103803. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103803> PMID: 31626918
16. Mayer-Scholl A, Hammerl JA, Schmidt S, Ulrich RG, Pfeffer M, Woll D et al. *Leptospira* spp. in rodents and shrews in Germany. *Int J Environ Res Public Health* 2014; 11(8):7562–74. <https://doi.org/10.3390/ijerph110807562> PMID: 25062275
17. Obiegala A, Woll D, Karnath C, Silaghi C, Schex S, Eßbauer S et al. Prevalence and Genotype Allocation of Pathogenic *Leptospira* Species in Small Mammals from Various Habitat Types in Germany. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10(3):e0004501. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004501> PMID: 27015596
18. Khairani-Bejo S, Bahaman AR, Zamri-Saad M, Mutalib AR. The Survival of *Leptospira interrogans* Serovar Hardjo in the Malaysian Environment. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 2004; 3(3):123–9.
19. Okazaki W, Ringen LM. Some effects of various environmental conditions on the survival of *Leptospira pomona*. *Am J Vet Res* 1957; 18(66):219–23. PMID: 13394849
20. Kumar KV, Lall C, Raj RV, Vedhagiri K, Vijayachari P. Coexistence and survival of pathogenic leptospires by formation of biofilm with *Azospirillum*. *FEMS Microbiol Ecol* 2015; 91(6).
21. Parker J, Walker M. Survival of a pathogenic *Leptospira* serovar in response to combined in vitro pH and temperature stresses. *Vet Microbiol* 2011; 152(1–2):146–50. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.04.028> PMID: 21592682
22. Stoddard RA, Bui D, Haberling DL, Wuthiekanun V, Thaipadungpanit J, Hoffmaster AR. Viability of *Leptospira* isolates from a human outbreak in Thailand in various water types, pH, and temperature conditions. *Am J Trop Med Hyg* 2014; 91(5):1020–2. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0748> PMID: 25200260
23. Ristow P, Bourhy P, Kermeis S, Schmitt C, Prevost M-C, Lilienbaum W et al. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. *Microbiology (Reading, Engl)* 2008; 154(Pt 5):1309–17.
24. Emilie Bierque, Roman Thibeaux, Dominique Girault, Marie-Estelle Soupé-Gilbert, Cyrille Goarant. A systematic review of *Leptospira* in water and soil environments. *PLOS ONE* 2020; 15(1):e0227055. Available from: URL: <https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0227055&type=printable>. PMID: 31986154
25. Brockmann S, Piechotowski I, Bock-Hensley O, Winter C, Oehme R, Zimmermann S et al. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants in Germany, 2006. *BMC Infect Dis* 2010; 10(1):91.
26. Pagès F, Larrieu S, Simoes J, Lenabat P, Kurtkowiak B, Guernier V et al. Investigation of a leptospirosis outbreak in triathlon participants, Réunion Island, 2013. *Epidemiol Infect* 2016; 144(3):661–9. <https://doi.org/10.1017/S0950268815001740> PMID: 26211921
27. Leonard F, Quinn P, Ellis W. Possible effect of pH on the survival of leptospires in cattle urine. *Veterinary Record* 1992; 131(3):53–4. <https://doi.org/10.1136/vr.131.3.53> PMID: 1441163
28. Johnson RC, Harris VG. Differentiation of Pathogenic and Saprophytic *Leptospira* I. Growth at Low Temperatures. *J Bacteriol* 1967; 94(1):27–31. PMID: 6027998
29. Stoddard RA, Gee JE, Wilkins PP, McCaustland K, Hoffmaster AR. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 64(3):247–55. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.03.014> PMID: 19395218

30. Woll D, Karnath C, Pfeffer M, Allgöwer R. Genetic characterization of *Leptospira* spp. from beavers found dead in south-west Germany. *Vet Microbiol* 2012; 158(1–2):232–4. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.02.022> PMID: 22410308
31. Ellis WA, Hovind-Hougen K, Möller S, Birch-Andresen A. Morphological changes upon subculturing of freshly isolated strains of *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. 1. Abt. Originale. A, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie* 1983; 255(2–3):323–35.
32. Cameron CE. Leptospiral structure, physiology, and metabolism. *Curr Top Microbiol Immunol* 2015; 387:21–41. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_3 PMID: 25388131
33. Loureiro AP, Lilenbaum W. Genital bovine leptospirosis: A new look for an old disease. *Theriogenology* 2020; 141:41–7. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.011> PMID: 31518727
34. Prabhu M, Mutnuri S. Cow urine as a potential source for struvite production. *Int J Recycl Org Waste Agricult* 2014; 3(1):215.
35. Bisswanger H. Enzyme assays. *Perspectives in Science* 2014; 1(1–6):41–55.
36. Albasan H, Lulich JP, Osborne CA, Lekcharoensuk C, Ulrich LK, Carpenter KA. Effects of storage time and temperature on pH, specific gravity, and crystal formation in urine samples from dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc* 2003; 222(2):176–9. <https://doi.org/10.2460/javma.2003.222.176> PMID: 12555980
37. Trueba G, Zapata S, Madrid K, Cullen P, Haake D. Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. *Int Microbiol* 2004; 7(1):35–40. PMID: 15179605
38. Grune Löffler S, Rago V, Martínez M, Uhart M, Florin-Christensen M, Romero G et al. Isolation of a Sea-water Tolerant *Leptospira* spp. from a Southern Right Whale (*Eubalaena australis*). *PLoS ONE* 2015; 10(12):e0144974. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144974> PMID: 26714322
39. Goarant C, Trueba G, Bierque E, Thibeaux R, Davis B, De la Peña Moctezuma A. *Leptospira* and Leptospirosis. In: Rose JB, Jiménez-Cisneros B, editors. *Global Water Pathogen Project*. Michigan State University; 2019 (Bacteria; vol. 3).
40. Karaseva EV, Chernukha YG, Piskunova LA. Results of studying the time of survival of pathogenic *Leptospira* under natural conditions. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 1973; 17(3):339–45. PMID: 4795565

4. Diskussion und Schlussfolgerung

Die Leptospirose ist eine der wichtigsten zoonotischen Erkrankungen weltweit. Durch den Verbreitungszyklus der pathogenen *Leptospira* spp. hat ihre Überlebenszeit in der Umwelt einen erheblichen Einfluss auf die Infektionsgefahr für Mensch und Tier. Trotzdem ist über die Tenazität von *Leptospira* spp. außerhalb des Wirts bislang wenig bekannt.

Obwohl es in der Literatur viele Studien gibt, die Leptospiren in Umweltproben mittels Polymerase-Kettenreaktion nachweisen, gibt es bisher nur sehr wenige Studien, die das Überleben von pathogenen *Leptospira* spp. in der Umwelt untersuchen (BIERQUE et al. 2020; RAWLINS et al. 2014; SCHNEIDER et al. 2018; BENACER et al. 2013). Die meisten dieser Tenazitätsuntersuchungen konzentrieren sich dabei auf die Überlebenszeit von Leptospiren in Wasser oder Erde und nur Wenige untersuchten die Überlebenszeit von *Leptospira* spp. in Tierurin, mit dem sie in der Regel in die Umwelt gelangen (BIERQUE et al. 2020; KHAIRANI-BEJO et al. 2004; ANDRE-FONTAINE et al. 2015).

Ziel dieser Arbeit war es daher, das Überleben eines der wichtigsten Leptospirenserovare in Deutschland unter verschiedenen Umweltbedingungen zu untersuchen.

Da es sich bei der Leptospirose um eine häufig unterdiagnostizierte Erkrankung mit einer hohen Dunkelziffer handelt, war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit durch die Veröffentlichung eines Übersichtsartikels Ärzte in Deutschland für diese Erkrankung zu sensibilisieren.

Bei Publikation 1 handelt es sich um eine Übersicht bisheriger Erkenntnisse zur Leptospirose in Deutschland. Sie beleuchtet dabei aktuelle Erkenntnisse zu den Erregerspezies, das Vorkommen von *Leptospira* spp. bei Tier und Mensch und die Epidemiologie und Klinik beim Menschen. Des Weiteren beleuchtet sie die neuesten humanen Ausbruchsgeschehen der Leptospirose in Deutschland und gibt Auskünfte zu Prognosemodellen, die der Vorhersage von humanen Leptospirosefällen dienen. Der Versuch durch diese Publikation den Bekanntheitsgrad der Leptospirose bei Ärzten in Deutschland zu erhöhen ist besonders wichtig, da die Leptospirose hier eine eher unbekannte Krankheit darstellt. Sie wird deswegen und auch wegen ihrer häufig unspezifischen Krankheitssymptome oft nicht durch Humanmediziner erkannt und diagnostiziert (HAAKE et al. 2015). Darüber hinaus ist die Leptospirose nicht wie viele andere Infektionskrankheiten (wie zum Beispiel die Frühsommer-Meningoenzephalitis) mit bestimmten Risikogebieten assoziiert, wodurch eine gezielte Sensibilisierung von Ärzten in bestimmten Gebieten unzureichend wäre. Außerdem ist es aufgrund der Klimaerwärmung wie bereits beschrieben sehr wahrscheinlich, dass es in den nächsten Jahren zu einem weiteren

Anstieg der Leptospirosefälle in Deutschland kommen wird (LAU et al. 2010). Auch ein vermehrtes Infektionsgeschehen durch eine Zunahme von Reisen in stärker betroffene Länder ist sehr wahrscheinlich (BANDARA et al. 2014). Da ein Anstieg der Infektionszahlen in Deutschland bereits jetzt erkennbar ist (Abbildung 1), ist eine Erweiterung des Wissens der Ärzteschaft zu dieser Erkrankung unerlässlich.

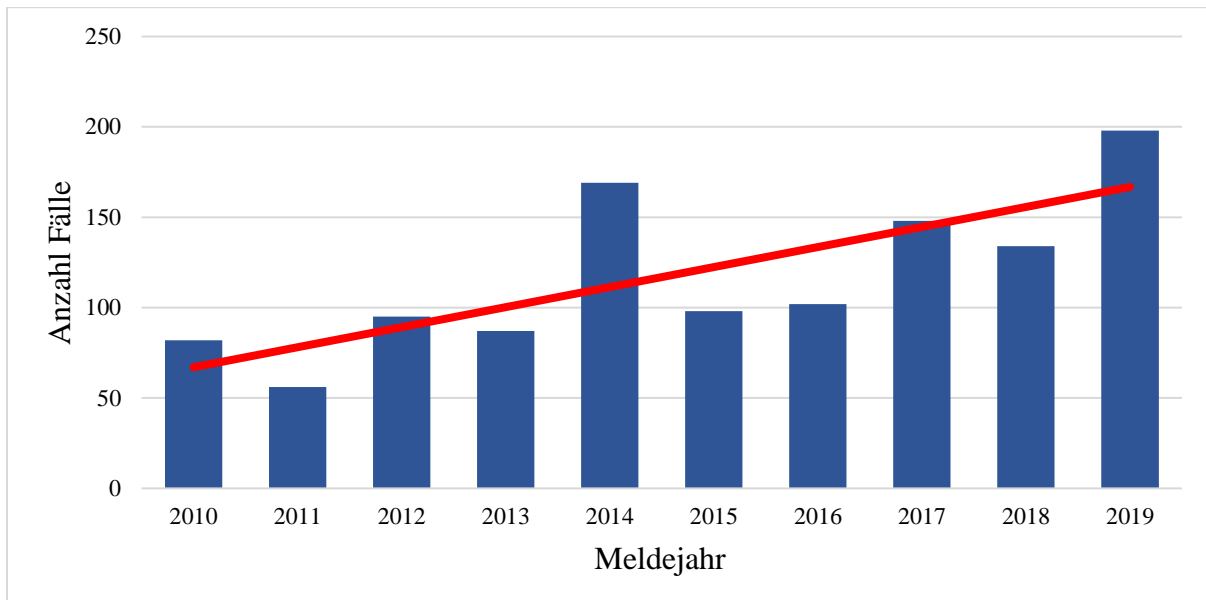


Abbildung 1: Anzahl der bestätigten Leptospiroseinfektionen in Deutschland von 2010 - 2019 durch humanpathogene *Leptospira* spp. gemäß § 7 ABS. 1 IfSG, Quelle SurvStat 2.0 RKI, Stand Juni 2020, Trendlinie in rot dargestellt

In Publikation 2 wurde der Einfluss von verschiedenen Faktoren auf die Überlebenszeit von *Leptospira kirschneri* Serovar Grippytyphosa außerhalb des Wirtes untersucht: (1) sein Überleben in Hunde- und Rinderurin, (2) der Einfluss einer Verdünnung des Urins nach der Ausscheidung, (3) sein Überleben und seine Verbreitung in einem Wasserlauf und (4) seine Widerstandsfähigkeit gegenüber Trocknung. Da zuvor beschrieben wurde, dass Labor- und Feldstämme sich in ihrer Morphologie und Zellgesundheit unterscheiden können, wurden die Versuche sowohl mit einem Laborstamm als auch mit einem selten passagierten Feldstamm von *Leptospira kirschneri* Serovar Grippytyphosa durchgeführt.

Beide getesteten Stämme von *L. kirschneri* Serovar Grippytyphosa überlebten weniger als 1 Minute in unverdünntem Rinder- oder Hundeurin. Vergleicht man diese Ergebnisse mit einer der wenigen durchgeführten Studien zum Überleben von Leptospiren in Tierurin von KHAIRANI-BEJO et al. (2004), so kann man erkennen, dass auch dort die Überlebenszeit eines

Diskussion und Schlussfolgerung

Leptospirensеровars in unverdünntem Urin sehr gering war. Bei ihrer Untersuchung von *L. interrogans* Serovar Hardjo überlebte dieses 0-6 Stunden bei ähnlichen Temperaturen in unverdünntem Rinderurin. Der Grund für diese teilweise längere Überlebenszeit im Vergleich zu den hier erhobenen Ergebnissen könnten die verschiedenen getesteten leptospiralen Spezies, ihre Anpassung an verschiedene Tiere und ihre Fähigkeit den schädlichen Wirkungen des Urins zu widerstehen, sein. Da im Gegensatz zur Serogruppe Grippotyphosa Rinder das Hauptreservoir der Serogruppe Hardjo sind (LOUREIRO et al. 2020), könnte die Anpassungsfähigkeit dieses Serovars an Rinderurin besser sein. Darüber hinaus könnte eine unterschiedliche biochemische Zusammensetzung des verwendeten Urins die Überlebenszeit beeinflusst haben. Es wurde beschrieben, dass Ernährungsgewohnheiten, körperliche Aktivitäten, Körpergröße und sogar das vorherrschende Klima die chemische Zusammensetzung von Rinderurin beeinflussen (PRABHU et al. 2014). Ein weiterer Grund für die verschiedenen Überlebenszeiten könnten die verwendeten unterschiedlichen Methoden zur Bestimmung des maximalen Überlebenszeitpunktes sein, welche in der Studie von KHAIRANI-BEJO et al. (2004) und in unserer Studie angewandt wurden. In unseren Untersuchungen wurde die Überlebenszeit als der längste Zeitraum definiert, nach dem eine Kultivierung der Leptospiren in modifiziertem EMJH-Medium noch möglich war. KHAIRANI-BEJO et al. (2004) testeten Hamster nach einer Inokulation auf Leptospirose und setzten die Überlebenszeit mit dem letzten Zeitpunkt gleich, bei dem die Leptospiren noch zu einer Infektion der Hamster führten. Es gibt nicht genug Untersuchungen um in vitro- und in vivo-Tests zuverlässig miteinander vergleichen und eine Aussage über deren Korrelation treffen zu können. Daher sollten zukünftige Studien bei Tenazitätsuntersuchungen beide Methoden anwenden und so einen Vergleich der Ergebnisse ermöglichen.

In verdünntem Tierurin überlebten der Labor- und Feldstamm in unserer Studie zwischen einer Stunde und 3 Tagen. Die maximale Überlebensdauer zeigte dabei der Laborstamm von *L. kirschneri* Serovar Grippotyphosa in verdünntem Rinderurin mit einem pH-Wert von 7,3 bei 15 °C (72 Stunden Überlebenszeit bei einem maximalen Testzeitraum von 7 Tagen). Insgesamt war die Temperatur ein entscheidender Einflussfaktor auf die Überlebenszeit der Leptospiren. Beide Stämme überlebten signifikant länger bei 15 °C im Vergleich zu 37 °C ($p < 0,001$, bzw. $p = 0,041$). Diese Beobachtung der maximalen Überlebenszeit bei der niedrigsten getesteten Temperatur stimmt mit den Ergebnissen von KHAIRANI-BEJO et al. (2004) überein. In ihrer Studie überlebte *L. interrogans* Serovar Hardjo am längsten in verdünntem Rinderurin bei 4 °C

Diskussion und Schlussfolgerung

(48 - 984 Stunden) und hatte die kürzeste Überlebenszeit bei der höchsten getesteten Temperatur (48 Stunden bei 32 °C) (KHAIRANI-BEJO et al. 2004).

Das längere Überleben in einer kälteren Umgebung könnte durch schädliche Reaktionen der im Urin vorhandenen Enzyme und deren erhöhter Aktivität bei höheren Temperaturen erklärbar sein (BISSWANGER 2014). Eine andere mögliche Erklärung könnte die verstärkte Ausfällung von Salzen wie zum Beispiel Struvit bei niedrigeren Temperaturen im Urin sein (ALBASAN et al. 2003). Es wurde beschrieben, dass mit wenigen Ausnahmen Leptospiren empfindlich gegenüber höheren Salzkonzentrationen in der Umwelt sind (GRUNE LOFFLER et al. 2015; KHAIRANI-BEJO et al. 2004; SMITH et al. 1961). Eine Studie von ALBASAN et al. (2003) zeigte, dass Salze in Tierurin, der bei niedrigeren Temperaturen gelagert wurde, eine Zunahme der Kristallgröße aufwies. Diese Größenzunahme könnte zu einem schnelleren Absinken der Salzpartikel im Urin führen und damit zu einer geringeren Wahrscheinlichkeit des Kontakts zwischen Salzkristallen und Leptospiren, welche sich normalerweise im oberen Bereich von Flüssigkeiten befinden.

In unserer Studie überlebte der Laborstamm signifikant länger in verdünntem Rinderurin mit einem nahezu neutralen oder leicht alkalischen pH-Wert von 7,3 - 7,7 welcher der Beschreibung eines optimalen pH-Bereichs für das leptospirale Wachstum von 7,2 - 7,6 entspricht als in verdünntem Hundeurin (CAMERON 2015). Im Gegensatz dazu überlebte der Feldstamm von *L. kirschneri* Serovar Grippytyphosa am längsten in verdünntem Hundeurin mit einem saureren pH-Wert von 5,5 - 6,7.

Leptospira kirschneri serovar Grippytyphosa ist ein häufiger Erreger der Leptospirose bei Hunden. Diese Unterschiede könnten demnach durch eine Anpassungsfähigkeit des Feldstamms an sauren Hundeurin ($\text{pH} < 7$) verursacht werden, welche der Laborstamm möglicherweise durch ein häufiges Passagieren in einem Spezialmedium (zum Beispiel EMJH-Medium mit einem für Leptospiren optimierten pH-Wert von 7,4) verloren haben könnte (MAYER-SCHOLL et al. 2013; CAMERON 2015).

Bei allen Ergebnissen dieser Untersuchungen muss beachtet werden, dass es zu einer verminderten Überlebensfähigkeit der Leptospiren durch Urinrückstände im EMJH-Medium während der Inkubationsperiode gekommen sein kann. Jedoch dürfte dieser Einfluss auf Grund des starken Verdünnungseffekts als eher gering eingestuft werden.

Da sich in diesen Experimenten zur Überlebenszeit in Tierurin herauskristallisierte, dass für das Überleben der Leptospiren in der Umwelt eine Verdünnung nach der Ausscheidung mittels Urin essentiell zu sein scheint, wurden des Weiteren Untersuchungen zur Verbreitung und

Diskussion und Schlussfolgerung

Überleben von *L. kirschneri* Serovar Grippotyphosa in einem Wasserstrom durchgeführt. Die dabei erhobenen Ergebnisse zeigten, dass zu allen untersuchten Zeitpunkten ein Nachweis von leptospiraler DNA mittels real-time PCR in den Wasserproben möglich war. Diese Resultate sprechen dafür, dass die Leptospiren sich nicht nur mit der gleichen Geschwindigkeit wie das Wasser im Schlauchsystem fortbewegt haben, sondern auch schneller und langsamer als die angelegte Fließgeschwindigkeit von 0,01 m / s waren, obwohl dieser positive DNA-Nachweis nicht bedeutet, dass sich in den untersuchten Wasserproben auch lebensfähige Leptospiren befanden. Diese Ergebnisse lassen sich durch eine Eigenbewegung der *Leptospira* spp. entweder in die gleiche oder entgegengesetzt der Fließrichtung des Wassers erklären. Dass Leptospiren eine deutliche Eigenbewegung zeigen, ist schon lange bekannt und ihre Geschwindigkeit wurde abhängig von der Viskosität der Umgebung mit 20 µm in 2 – 3 Sekunden in Standardmedium beschrieben (GOARANT et al. 2019). Diese Erklärung unserer Versuchsergebnisse stimmen mit denen von OKAZAKI et al. (1957) überein, welche bei ihrer Studie eine Bewegung von Leptospiren stromaufwärts eines langsam fließenden Wasserstroms als Erklärung ihrer Resultate für wahrscheinlich hielten. Da für die Risikoeinschätzung von Leptospiroseausbrüchen das Wissen von der Verbreitungsgeschwindigkeit von Leptospiren in Wasser eine wichtige Rolle spielen kann, könnten diese Ergebnisse von enormer Bedeutung sein. Weitere Studien sollten deshalb zu dieser Thematik durchgeführt werden, um bessere Prognosen zum Infektionsrisiko abgeben zu können.

Trotz eines positiven DNA-Nachweises war es in unserer Studie nicht möglich aus den Wasserproben, die das Schlauchsystem durchflossen hatten, wieder Leptospiren zu kultivieren. Im Gegensatz dazu war eine Kultivierung von Leptospiren, welche sich für die gleiche Zeitspanne im stehenden Wasser befanden, möglich. Zwar ist es denkbar, dass es durch die Filterung des Wassers durch einen 0,22 µm Filter vor der Überimpfung in EMJH-Medium zu einer Reduktion oder Eliminierung der Leptospiren in den Proben kam und dies die negativen Kultivierungsergebnisse bedingte, jedoch wurde die Proben aus dem stehenden Wasser auf die genau gleiche Art filtriert und inkubiert. Deshalb ist eine mechanische Schädigung der Leptospiren während des Schlauchdurchflusses die wahrscheinlichste Erklärung für die gescheiterten Kultivierungsversuche. Es wurde kein Unterschied der Widerstandsfähigkeit gegenüber einer mechanischen Schädigung zwischen dem Labor- und dem Feldstamm von *L. kirschneri* Serovar Grippotyphosa festgestellt.

Diskussion und Schlussfolgerung

Aufgrund dieser Ergebnisse postulieren wir, dass die Überlebensfähigkeit von Leptospiren stark von ihrer mechanischen Schädigung in der Umwelt abhängig ist. Eine Ausscheidung in ein stehendes oder langsam fließendes Gewässer könnte die Überlebenswahrscheinlichkeit der *Leptospira* spp. erhöhen, wohingegen ihre Ausscheidung in einen Strom mit hoher Fließgeschwindigkeit für sie tödlich sein könnte, da die Wahrscheinlichkeit einer mechanischen Beeinträchtigung größer ist.

Ein weiteres Szenario, welches in dieser Studie untersucht wurde, war der Einfluss einer Trocknung auf die Überlebensfähigkeit von Leptospiren.

Dabei stellte sich heraus, dass sowohl der Labor- als auch der Feldstamm von *L. kirschneri* Serovar Grippotyphosa nicht fähig waren, eine vollständige Trocknung auf einer Oberfläche zu überleben. Die dabei herrschende Temperatur und dadurch resultierende Geschwindigkeit der Trocknung hatten dabei keinen Einfluss auf das Überleben der Leptospiren. Eine halbe Stunde vor der vollständigen Trocknung war es jedoch bei jeder getesteten Temperatur möglich, die Leptospiren wieder zu kultivieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Feuchtigkeit ein limitierender Faktor für die Überlebenszeit der *Leptospira* spp. in der Umwelt darstellt und stimmen mit anderen Studien überein, die eine Korrelation zwischen dem Feuchtigkeitsgehalt der Umgebung und der Lebensfähigkeit von Leptospiren beschreiben (OKAZAKI et al. 1957; KARASEVA et al. 1973; KHAIRANI-BEJO et al. 2004). KARASEVA et al. (1973) wiesen zum Beispiel in ihrer Studie nach, dass Leptospiren längere Überlebenszeiten in Erde mit höheren Feuchtigkeitsgehalten hatten, als in Erde mit niedrigeren.

Insgesamt lässt sich aus all den in dieser Studie erhobenen Ergebnissen schlussfolgern, dass das Überleben von Leptospiren in der Umwelt von vielen verschiedenen Einflussfaktoren abhängig ist. Am wichtigsten scheint dabei ein schneller Verdünnungseffekt nach einer Ausscheidung mit dem Urin zu sein. Diese Einschränkung der Überlebensfähigkeit in Urin könnte jedoch für Leptospirensereovare, die von einem Tier, an welches dieses Serovar adaptiert ist, ausgeschieden werden, eine geringere Bedeutung haben. Bei diesen Tieren ist auch ein direkter Übertragungsweg von Tier zu Tier denkbar und könnte die Hauptroute der leptospiralen Verbreitung darstellen. Niedrige Temperaturen und eine feuchte Umgebung scheinen die Widerstandsfähigkeit von Leptospiren gegen schädliche Einflüsse zu verbessern. Trockenheit dagegen scheint für ein Überleben der *Leptospira* spp. limitierend zu sein. Auch mechanische Schäden, welche zum Beispiel in einem Fluss oder einer anderen Wasserquelle auftreten könnten, könnten das Überleben der Leptospiren einschränken. Daher würde eine Verdünnung in einem stehenden Gewässer oder einem langsamen Wasserstrom das Überdauern

Diskussion und Schlussfolgerung

lebensfähiger Bakterien begünstigen. Aufgrund ihrer Eigenbewegung ist eine Ausbreitung der Leptospiren von dem Ort ihrer Ausscheidung auch ohne eine Eigenbewegung ihres umgebenden Mediums wahrscheinlich und hat einen großen Einfluss auf das Infektionsrisiko von Mensch und Tier. Die Geschwindigkeit und Reichweite ihrer Ausbreitung sowie ihr Überleben dabei müssen jedoch weiter untersucht werden. Da unsere Untersuchungen Unterschiede in der Überlebensfähigkeit zwischen Labor- und Feldstämmen zeigten, sollten zukünftige Studien nicht nur Tenazitätsstudien mit bereits seit langer Zeit im Labor passagierten Kulturen, sondern auch mit frisch isolierten *Leptospira* spp. durchführen.

Abbildung 2 stellt den Einfluss verschiedener Umweltfaktoren auf das Überleben von *Leptospira* spp. außerhalb des Wirtes schematisch dar.

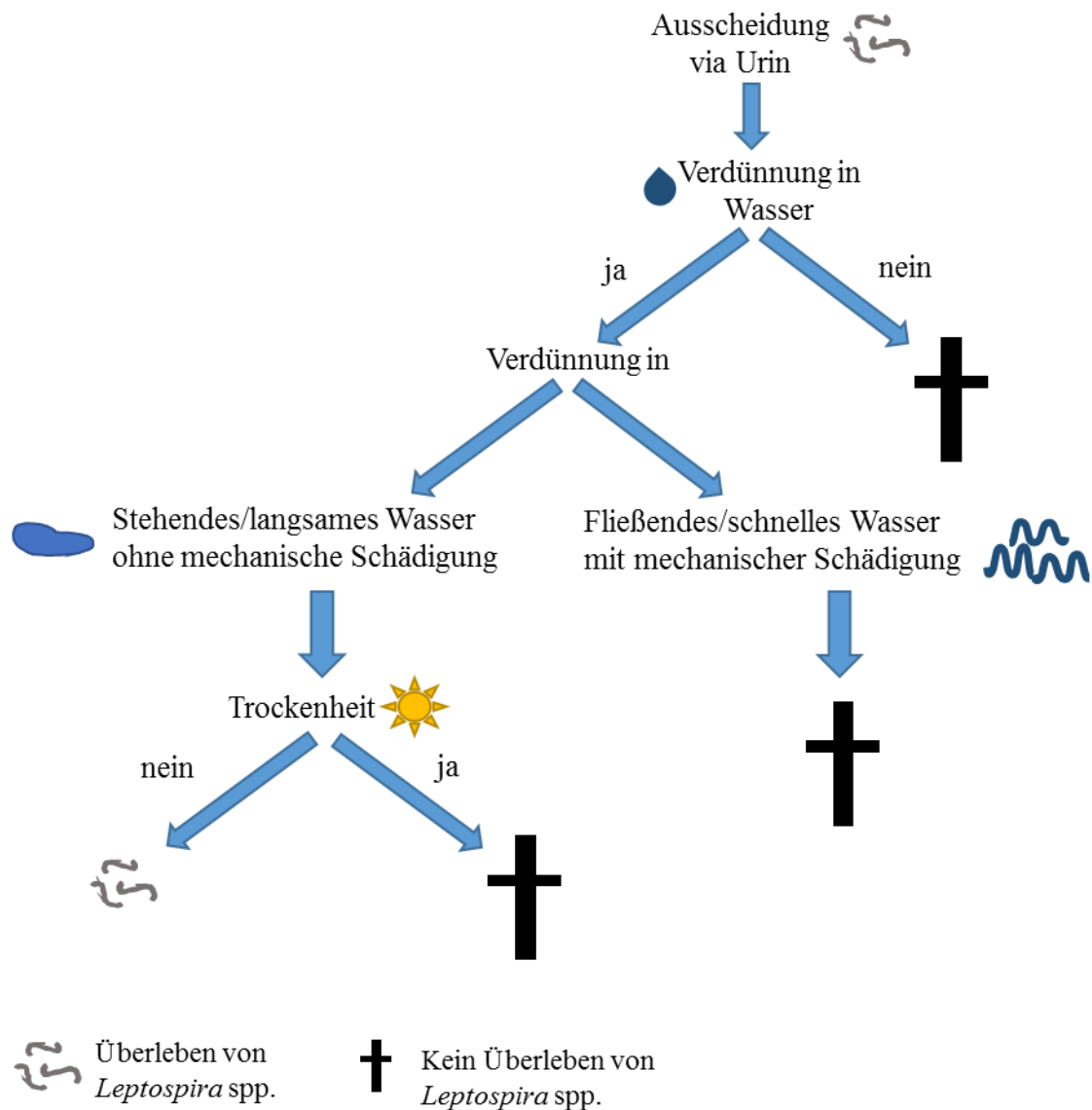


Abbildung 2: Einfluss verschiedener Umweltfaktoren auf das Überleben von *Leptospira* spp. außerhalb des Wirtes

5. Zusammenfassung

Lisa Hanne Nau

Umweltstabilität von *Leptospira* spp.

Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen, Veterinärmedizinische Fakultät,
Universität Leipzig

Eingereicht im August 2020

51 Seiten, 2 Abbildungen, 2 Tabellen, 2 Publikationen, 104 Literaturangaben

Schlüsselwörter: *Leptospira kirschneri* Serovar Grippytyphosa, Überlebenszeit, Tierurin,
Trocknung, Wasser, Schlauchsystem, Laborstamm, Feldstamm

Einleitung

Die Leptospirose ist eine der weltweit bedeutendsten Zoonosen. Durch den häufig asymptomatischen oder unspezifischen Krankheitsverlauf, wird von einer hohen Dunkelziffer ausgegangen. Menschen können sich über direkten Tierkontakt oder indirekten Kontakt mit dem Urin infizierter Tiere, zum Beispiel über kontaminierte Gewässer oder Erde, anstecken. Die Infektion erfolgt dabei über den Eintritt des Erregers in Schleimhäute oder Hautwunden.

Ziel der Untersuchungen

Obwohl die Überlebenszeit von Leptospiren in der Umwelt einen entscheidenden Einfluss auf das Infektionsrisiko des Menschen hat, wurden bisher nur sehr wenige Untersuchungen dazu durchgeführt. Diese konzentrierten sich dabei vor allem auf das Überleben der Erreger in Erde oder Wasser. Daher war es Ziel dieser Arbeit die Umweltstabilität eines häufig in Deutschland gefundenen Leptospirensеровars unter verschiedenen Umweltbedingungen zu untersuchen. Zusätzlich zu diesen Untersuchungen war es Ziel dieser Arbeit, durch die Veröffentlichung eines Übersichtsartikels über die Leptospirose Ärzte in Deutschland für diese häufig unerkannt bleibende Erkrankung zu sensibilisieren.

Material und Methoden

Ein jahrelang an Kulturmedium adaptierter Labor- und ein erst vor 3 Jahren isolierter Feldstamm von *Leptospira kirschneri* Serovar Grippytyphosa wurden auf ihr Überleben in der Umwelt untersucht. Es wurde ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber verschiedenen Umwelteinflüssen, wie z.B. Tierurin als umgebendes Medium bei verschiedenen Temperaturen oder auch der Einfluss einer Trocknung, untersucht. Nachdem die Leptospiren den

Zusammenfassung

Umwelteinflüssen für unterschiedliche Zeitspannen ausgesetzt waren, wurde versucht sie in EMJH-Medium wieder zu kultivieren. Während einer Inkubationszeit von mindestens 28 Tagen bei 29 °C wurden diese Kulturen wöchentlich unter dem Dunkelfeldmikroskop auf das Vorhandensein motiler Leptospiren untersucht. Zusätzlich wurde durch Kultivierungsversuche in EMJH-Medium das Überleben der Leptospiren in einem Wasserstrom mit einer definierten Fließgeschwindigkeit und ihre Verbreitung in diesem Strom mittels real-time PCR untersucht. Alle Versuche wurden im Dreifachansatz durchgeführt. Statistische Untersuchungen wurden mittels eines zweiseitigen Mann-Whitney-U Tests (Fehler 1. Art $\alpha = 0,05$) durchgeführt.

Ergebnisse

Die beiden untersuchten Stämme von *L. grippityphosa* überlebten nicht in unverdünntem Tierurin. In verdünntem Tierurin überlebten die Stämme, je nach Temperatur und Verdünnungsmedium, zwischen 1 - 72 Stunden (Laborstamm) und 4 - 24 Stunden (Feldstamm). Beide Stämme überlebten signifikant länger bei 15 °C als bei 37 °C ($p < 0,001$, bzw. $p = 0,041$). Der Laborstamm überlebte signifikant länger in verdünntem Rindereurin (max. 72 h bei 15 °C) als in verdünntem Hundeurin (max. 4 h; $p = 0,027$). Im Gegensatz dazu, überlebte der Feldstamm signifikant länger in Hundeurin (max. 24 h bei 15 °C) als in Rinderurin (max. 4 h; $p = 0,028$). Das vollständige Trocknen auf einer festen Oberfläche war bei Temperaturen zwischen 15 °C und 37 °C für beide Stämme letal. Jedoch war, unabhängig von der untersuchten Temperatur, eine halbe Stunde vor der vollständigen Trocknung eine Kultivierung der *Leptospira* spp. noch möglich. In einem Wasserstrom konnten sich die Leptospiren aufgrund ihrer Eigenbewegung schneller und langsamer als die Durchschnittsgeschwindigkeit (0,01 m/s) des Wassers bewegen, überlebten jedoch die mechanischen Schäden während des Schlauchdurchflusses nicht.

Schlussfolgerungen

Das Überleben von *Leptospira* spp. ist offensichtlich von vielen Faktoren abhängig. Eine schnelle Verdünnung nach der Ausscheidung mit dem Urin scheint dabei essentiell zu sein. Niedrigere Temperaturen sowie eine feuchte Umgebung verbessern ihre Widerstandsfähigkeit gegen schädliche Einflüsse, während Trockenheit oder mechanische Schädigung ihr Überleben nicht ermöglichen. Wegen der großen Bedeutung der leptospiralen Überlebenszeit in der Umwelt für das Infektionsrisiko von Mensch und Tier sind weitere Untersuchungen auf diesem Forschungsgebiet in der Zukunft nötig.

6. Summary

Lisa Hanne Nau

Environmental stability of *Leptospira* spp.

Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine,
University of Leipzig

Submitted in August 2020

51 pages, 2 figures, 2 tables, 2 publications, 104 references

Keywords: *Leptospira kirschneri* serovar Grippotyphosa, survival time, animal urine, drying, water, hose system, laboratory strain, field strain

Introduction

Leptospirosis is one of the most important zoonosis worldwide. Due to the often asymptomatic or non-specific course of the disease, a high number of unreported cases is assumed. Humans can get infected through direct contact with animals or indirect contact with the urine of infected animals, for example through contaminated water or soil. The infection occurs via entry of the pathogen through mucous membranes or skin wounds.

Aims of the study

Although the survival time of *Leptospira* spp. in the environment has a crucial influence on the human infection risk, very few studies have been carried out so far. These studies focused primarily on the survival of the pathogens in soil or water. It was therefore the aim of this study to investigate the environmental stability of a leptospiral serovar that is frequently found in Germany under different environmental conditions. In addition to these investigations, the aim of this work was to raise the awareness of physicians in Germany for this often undetected and neglected disease by publishing a review article on leptospirosis.

Material and Methods

The survival in the environment of both a laboratory strain, which has been adapted to culture medium for years and a field strain, which was isolated only 3 years ago, of *Leptospira kirschneri* Serovar Grippotyphosa was studied. Their resistance to various environmental influences, such as animal urine as surrounding medium at different temperatures or the influence of drying, were examined. After the leptospires were exposed to these influences for various time periods, an attempt was made to cultivate them in EMJH medium. During an

Summary

incubation period of at least 28 days at 29 °C, the cultures were examined weekly for the presence of motile leptospires under the darkfield microscope. In addition, the survival of the leptospires in a water stream with a defined velocity and their distribution in this stream were examined by real-time PCR and cultivation experiments in EMJH medium. All experiments were carried out in triplicate. The statistical analysis was done using a two-tailed Mann-Whitney U test (type-1-error $\alpha = 0.05$).

Results

Both examined strains of *L. grippityphosa* did not survive in undiluted animal urine. In diluted animal urine, the strains survived between 1-72 hours (laboratory strain) and 4-24 hours (field strain), depending on the temperature and dilution medium. Both strains survived significantly longer at 15 °C than at 37 °C ($p < 0.001$ or $p = 0.041$). The laboratory strain survived significantly longer in diluted cattle urine (max. 72 h at 15 °C) than in diluted dog urine (max. 4 h) ($p = 0.027$) while the field strain survived significantly longer in dog urine (max. 24 h at 15 °C) than in cattle urine (max. 4 h) ($p = 0.028$). Complete drying on a solid surface at temperatures between 15 °C and 37 °C was lethal for both strains. However, regardless of the temperature examined, *Leptospira* spp. were still cultivatable half an hour before the time point of complete drying. In a water stream, leptospires were able to move faster or slower than the average velocity of the water (0.01 m / s) due to their intrinsic mobility but were not able to survive the mechanical damage caused by running water in the hose system.

Conclusions

Overall, it can be concluded that the survival of *Leptospira* spp. depends on many factors. Rapid dilution after urine excretion appears to be essential. Lower temperatures and a humid environment improve their survival time, while drought or mechanical damage is lethal to them. Because of the great importance of leptospiral survival in the environment for the infection risk of humans and animals, further studies in this research area will be necessary in the future.

7. Literaturverzeichnis

Adler B. History of leptospirosis and leptospira. *Curr Top Microbiol.* 2015;387:1–9. doi: 10.1007/978-3-662-45059-8_1.

Adler B, La Peña Moctezuma A de. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol.* 2010;140(3-4):287–96. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.03.012.

Albasan H, Lulich J, Osborne C, Lekcharoensuk C, Ulrich L, Carpenter K. Effects of storage time and temperature on pH, specific gravity, and crystal formation in urine samples from dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc.* 2003;222(2):176–9. doi: 10.2460/javma.2003.222.176.

Andersen-Ranberg E, Pipper C, Jensen P. Global patterns of leptospira prevalence in vertebrate reservoir hosts. *J Wildl Dis.* 2016;52(3):468–77. doi: 10.7589/2014-10-245.

Andre-Fontaine G, Aviat F, Thorin C. Waterborne Leptospirosis: Survival and Preservation of the Virulence of Pathogenic *Leptospira* spp. in Fresh Water. *Curr Microbiol.* 2015;71(1):136-42. doi: 10.1007/s00284-015-0836-4.

Anheyer-Behmenburg, H. E. Untersuchungen zum Vorkommen von Zoonoseerregern und dem kaninen Staupevirus in der Waschbärpopulation Niedersachsens, 2011-2013. [Dissertation med. vet.]. Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover 2013.

Ayral F, Djelouadji Z, Raton V, Zilber A-L, Gasqui P, Faure E, et al. Combes B. Hedgehogs and Mustelid Species: Major Carriers of Pathogenic *Leptospira*, a Survey in 28 Animal Species in France (20122015). *PloS one.* 2016;11(9):e0162549. doi: 10.1371/journal.pone.0162549.

Bandara M, Ananda M, Wickramage K, Berger E, Agampodi S. Globalization of leptospirosis through travel and migration. *Glob Health.* 2014;10 :61. doi: 10.1186/s12992-014-0061-0.

Bandouchova H, Treml F, Pikula H, Horakova J. European brown hare as a potential source of zoonotic agents. *Vet Med (Praha).* 2007;52(10):451–6. doi: 10.1007/s00284-015-0836-4.

Båverud V, Gunnarsson A, Engvall E, Franzén P, Egenvall A. *Leptospira* seroprevalence and associations between seropositivity, clinical disease and host factors in horses. *Acta Vet Scand.* 2009;51:15. doi: 10.1186/1751-0147-51-15.

Benacer D, Woh P, Mohd Zain S, Amran F, Thong K. Pathogenic and saprophytic *Leptospira* species in water and soils from selected urban sites in peninsular Malaysia. *Microbes Environ.* 2013;28(1):135–40. doi: 10.1264/jsme2.me12154.

- Bierque E, Thibeaux R, Girault D, Soupé-Gilbert M-E, Goarant C. A systematic review of *Leptospira* in water and soil environments. *PloS one*. 2020;15(1):e0227055. doi: 10.1371/journal.pone.0227055.
- Bisswanger H. Enzyme assays. *Perspect Sci*. 2014;1:41–55. doi: 10.1016/j.pisc.2014.02.005.
- Bolin C, Koellner P. Human-to-human transmission of *Leptospira interrogans* by milk. *J Infect Dis*. 1988;158(1):246–7. doi: 10.1093/infdis/158.1.246.
- Bostedt, H., Ganter, M., Hiepe, T. *Klinik der Schaf- und Ziegenkrankheiten*. 1. Aufl. Stuttgart, 2018.
- Brockmann S, Piechotowski I, Bock-Hensley O, Winter C, Oehme R, Zimmermann S, et al. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants in Germany, 2006. *BMC Infect Dis*. 2010;10:91. doi:10.1186/1471-2334-10-9.1
- Brockmann S, Ulrich L, Piechotowski I, Wagner-Wiening C, Nöckler K, Mayer-Scholl A, Eichner M. Risk factors for human *Leptospira* seropositivity in South Germany. *SpringerPlus*. 2016;5(1):1796. doi: 10.1186/s40064-016-3483-8.
- Cameron C. Leptospiral structure, physiology, and metabolism. *Curr Top Microbiol*. 2015;387:21–41. doi: 10.1007/978-3-662-45059-8_3.
- Chanton-Greutmann H, Thoma R, Corboz L, Borel N, Pospischil A. Aborte beim kleinen Wiederkäuer in der Schweiz: Untersuchungen während zwei Ablammperioden (1996-1998) unter besonderer Beachtung des Chlamydienabortes. *Schweiz Arch Tierheilkd*. 2002;144(9):483–92. doi: 10.1024/0036-7281.144.9.483.
- Charon N, Goldstein S. Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: the spirochetes. *Annu Rev Genet*. 2002;36:47–73. doi: 10.1146/annurev.genet.36.041602.134359.
- Chung H-L, Ts'ao W-C, Chih Y. Transplacental or Congenital Infection of Leptospirosis. Clinical and Experimental Observations. *Chin Med J*. 1963;82(12):777–82.
- Ciceroni L, Lombardo D, Pinto A, Ciarrocchi S, Simeoni J. Prevalence of antibodies to *Leptospira* serovars in sheep and goats in Alto Adige-South Tyrol. *J Vet Med. B, Infectious diseases and veterinary public health*. 2000;47(3):217–23. doi: 10.1046/j.1439-0450.2000.00333.x.

- Coghlan J, Bain A. Leptospirosis in human pregnancy followed by death of the foetus. *Br Med J.* 1969;1(5638):228–30. doi: 10.1136/bmj.1.5638.228.
- Cosate M, Sakamoto T, Oliveira Mendes T de, Moreira É, Regis da Silva C, Brasil B, Oliveira C, Azevedo V de, Ortega J, Leite R, Haddad J. Molecular typing of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo isolates from leptospirosis outbreaks in Brazilian livestock. *BMC Vet Res.* 2017;13(1):177. doi: 10.1186/s12917-017-1081-9.
- Costa F, Hagan J, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira M, et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Neglect Trop D.* 2015;9(9):e0003898. doi: 10.1371/journal.pntd.0003898.
- Cunha, MV; Inácio J. *Veterinary infection biology. Molecular diagnostics and high-throughput strategies.* 1. Aufl. New York: Springer Verlag;2015.
- Dan A, Waghmare M, Samuel P, Kumar S, Achhelal P. Leptospirosis in Ernakulam District of Kerala in India: Post Flood Surveillance. *Int J Contemp Med.* 2019;7 (2):31-5. doi: 10.5958/2321-1032.2019.00027.5.
- Desai S, van Treeck U, Lierz M, Espelage W, Zota L, Sarbu A, Czerwiński M, Sadkowska-Todys M, Avdicová M, Reetz J, Luge E, Guerra B, Nöckler K, Jansen A. Resurgence of field fever in a temperate country: an epidemic of leptospirosis among seasonal strawberry harvesters in Germany in 2007. *Clin Infect Dis.* 2009;48(6):691–7. doi: 10.1086/597036.
- Dikken H, Kmety E. Chapter VIII Serological Typing Methods of Leptospire. In: Bergan T, Hrsg. *Methods in microbiology.* 11 Aufl. New York: Academic Press; 1978. p. 259–307.
- Dorrego-Keiter E, Tóth J, Dikker L, Sielhorst J, Schusser GF. Kultureller Nachweis von Leptospiren in Glaskörperflüssigkeit und Antikörpernachweis gegen Leptospiren in Glaskörperflüssigkeit und Serum von 225 Pferden mit equiner rezidivierender Uveitis (ERU). *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2016;129(5):209–2015. doi: 10.2376/0005-9366-129-15085.
- Dreesman J, Hamschmidt L, Toikkanen S, Runge M, Lüsse B, Freise J, Ehlers J, Nöckler K, Knorr C, Keller B, Mayer-Scholl A. Leptospirose-Ausbruch bei Saisonarbeitern in der Erdbeerernte in Niedersachsen, 2014. *Gesundheitswesen.* 2016;78(4). doi: 10.1055/s-0036-1578892.
- Ellis W. Leptospirosis as a Cause of Reproductive Failure. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1994;10(3):463–78. doi: 10.1016/S0749-0720(15)30532-6.

Ellis W. Animal leptospirosis. *Curr Top Microbiol.* 2015;387 :99–137. doi: 10.1007/978-3-662-45059-8_6.

Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira and leptospirosis*. 2. Aufl. Melbourne: MediSci.;1999.

Faine S, World Health Organization. *Guidelines for the control of leptospirosis*. edited by S. Faine 1. Aufl. Geneva: World Health Organisation.1982.

Fiecek B, Chmielewski T, Sadkowska-Todys M, Czerwiński M, Zalewska G, Roguska U, Tylewska-Wierzbanowska S. An outbreak of leptospirosis imported from Germany to Poland. *Adv Clin Exp Med.* 2017;26(3):415–9. doi: 10.17219/acem/62022.

Geisen V, Stengel C, Brem S, Müller W, Greene C, Hartmann K. Canine leptospirosis infections - clinical signs and outcome with different suspected *Leptospira* serogroups (42 cases). *J Small Anim Pract.* 2007;48(6):324–8. doi: 10.1111/j.1748-5827.2007.00324.x.

Geisen V, Stengel C, Hartmann K. Epidemiologische Situation der Leptospirose beim Hund in Süddeutschland. *Tierarztl Prax Ausg K.* 2008;36(05):329–36. doi: 10.1055/s-0038-1622693.

Gerlach T, Stephan I. Epidemiologische Situation der kaninen Leptospirose in Norddeutschland in den Jahren 2003–2006. *Tierarztl Prax Ausg K.* 2007;35(06):421–9. doi: 10.1055/s-0038-1622648.

Goarant C, Trueba G, Bierque E, Thibeaux R, Davis B, De la Peña Moctezuma A. *Leptospira and Leptospirosis*. In: J.B. Rose and B. Jiménez-Cisneros, Hrsg. *Global Water Pathogen Project Part 3 Bacteria*. 1. Aufl. Michigan: Michigan State University. 2019. doi: 10.14321/waterpathogens.

Greene C. *Enfermedades Infecciosas del Perro y el Gato*, Vol. 1. Buenos Aires, Inter-Medica. 2008;40:411–24.

Grune Löffler S, Rago V, Martínez M, Uhart M, Florin-Christensen M, Romero G, Brihuega B. Isolation of a Seawater Tolerant *Leptospira* spp. from a Southern Right Whale (*Eubalaena australis*). *PloS one.* 2015;10(12):e0144974. doi: 10.1371/journal.pone.0144974.

Haake D, Levett P. Leptospirosis in Humans. *Curr Top Microbiol.* 2015;387:65–97. doi: 10.1007/978-3-662-45059-8_5.

Harrison N, Fitzgerald W. Leptospirosis--can it be a sexually transmitted disease? *Postgrad Med J.* 1988;64(748):163–4. doi: 10.1136/pgmj.64.748.163.

- Hartskeerl R, Goris M, Brem S, Meyer P, Kopp H, Gerhards H, Wollanke B. Classification of leptospira from the eyes of horses suffering from recurrent uveitis. *J Vet Med. B, Infectious diseases and veterinary public health.* 2004;51(3):110–5. Doi: 10.1111/j.1439-0450.2004.00740.x.
- Horsch F, Klockmann J, Janetzky B, Drechsler H, Lobnitz P. Leptospirosis in wild animals. *Monatsh Veterinaermed.* 1970;25(16):634–9.
- Inada R, Ido Y, Hoki R, Kaneko R, Ito H. The etiology, mode of infection, and specific therapy of Weil`s disease (Spirochaetosis icterohaemorrhagica). *J Exp Med.* 1916;23(3):377–402. doi: 10.1084/jem.23.3.377.
- Jansen A, Luge E, Guerra B, Wittschen P, Gruber A, Loddenkemper C, et al. Leptospirosis in Urban Wild Boars, Berlin, Germany. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(5):739–42. doi: 10.3201/eid1305.061302.
- Jansen A, Schöneberg I, Frank C, Alpers K, Schneider T, Stark K. Leptospirosis in Germany, 1962-2003. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(7):1048–54. doi: 10.3201/eid1107.041172
- Jin X, Zhang W, Ding Z, Wang H, Wu D, Xie X, et al. Efficacy of the Rabbit Polyclonal Anti-leptospira Antibody against Homotype or Heterotype Leptospira Infection in Hamster. *PLoS Neglect Trop D.* 2016;10(12). doi: 10.1371/journal.pntd.0005191
- Karaseva E, Chernukha Y, La Piskunova. Results of studying the time of survival of pathogenic leptospira under natural conditions. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.* 1973;17(3):339–45.
- Khairani-Bejo S, Bahaman A, Zamri-Saad M, Mutalib A. The survival of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo in the Malaysian environment. *J Anim Vet Adv.* 2004;3(3):123–9.
- Kitamura H, Hara H. Ueber den Erreger von “Akiyami”. *Tokyo Med J.* 1918;2056 :57.
- Knöpfler S, Mayer-Scholl A, Luge E, Klopffleisch R, Gruber A, Nöckler K, Kohn B. Evaluation of clinical, laboratory, imaging findings and outcome in 99 dogs with leptospirosis. *J Small Anim Pract.* 2017;58(10):582–8. doi: 10.1111/jsap.12718.
- Kulbrock M, Lehner S, Metzger J, Ohnesorge B, Distl O. A genome-wide association study identifies risk loci to equine recurrent uveitis in German warmblood horses. *PloS one.* 2013;8(8):e71619. doi: 10.1371/journal.pone.0071619.
- Kumar K, Lall C, Raj R, Vedhagiri K, Vijayachari P. Coexistence and survival of pathogenic leptospire by formation of biofilm with *Azospirillum*. *FEMS Microbiol ecol.* 2015;91(6). doi: 10.1093/femsec/fiv051

- Lau C, Smythe L, Craig S, Weinstein P. Climate change, flooding, urbanisation and leptospirosis: fuelling the fire? *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2010;104(10):631–8. doi: 10.1016/j.trstmh.2010.07.002.
- Leonard F, Quinn P, Ellis W. Possible effect of pH on the survival of leptospire in cattle urine. *Vet Rec.* 1992;131(3):53–4. doi: 10.1136/vr.131.3.53.
- Levett P. Leptospirosis. *Clin Microbiol Revi.* 2001;14(2):296–326. doi: 10.1128/CMR.14.2.296-326.2001.
- Llewellyn JR, Krupka-Dyachenko I, Rettinger A, Dyachenko V, Stamm I, Kopp P, et al. Urinary shedding of leptospire and presence of *Leptospira* antibodies in healthy dogs from Upper Bavaria. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2016;129(5-6):251–7.
- Loureiro A, Lilenbaum W. Genital bovine leptospirosis: A new look for an old disease. *Theriogenology.* 2020;141:41–7. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.09.011.
- Mayer-Scholl A, Luge E, Draeger A, Nöckler K, Kohn B. Distribution of *Leptospira* serogroups in dogs from Berlin, Germany. *Vector-Borne Zoonotic Dis. (Larchmont, N.Y.).* 2013;13(3):200–2. doi: 10.1089/vbz.2012.1121.
- Millán J, García E, Oleaga Á, López-Bao J, Llaneza L, Palacios V, et al. Using a top predator as a sentinel for environmental contamination with pathogenic bacteria: the Iberian wolf and leptospire. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014;109(8):1041–4. doi: 10.1590/0074-0276140258.
- Mori M, Bakinahe R, Vannoorenberghe P, Maris J, Jong E de, Tignon M, Marin M, Desqueper D, Fretin D, Behaeghel I. Reproductive Disorders and Leptospirosis: A Case Study in a Mixed-Species Farm (Cattle and Swine). *Vet Sci.* 2017;4(4):64. doi: 10.3390/vetsci4040064.
- Müller H, Winkler P. Ergebnisse serologischer Untersuchungen auf *Leptospira*-Antikörper bei Füchsen. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 1994;107(3):90–3.
- Münker W. Die Leptospirosen der Haustiere und ihre Bedeutung als Infektionsquelle für den Menschen. *Zentralbl Vet B.* 1963;10(3):256–62. doi: 10.1111/j.1439-0450.1963.tb00187.x.
- Musso D, La Scola B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: a challenge. *J Microbiol Immunol Infect.* 2013;46 (4):245–52. doi: 10.1016/j.jmii.2013.03.001.
- Noguchi H. *Spirochaeta icterohaemorrhagiae* in american wild rats and its relation to the japanese and european strains: first paper. *J Exp Med.* 1917;25(5):755–63.

- Okazaki W, Ringen L. Some effects of various environmental conditions on the survival of *Leptospira pomona*. *Am J Vet Res.* 1957;18(66):219–23.
- Pikalo J, Sattler T, Eichinger M, Loitsch A, Sun H, Schmoll F, Schusser GF. Vorkommen von Antikörpern gegen Leptospiren bei Pferden im mitteldeutschen Raum. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2016;129(5-6):202–8. doi: 10.2376/0005-9366-129-15079.
- Pischke S, Ehmer U, Schedel I, Gratz W, Wedemeyer H, Ziesing S, et al. Of guinea pigs and men--an unusual case of jaundice. *Z Gastroenterol.* 2010;48(1):33–7. doi: 10.1055/s-0028-1109776.
- Prabhu M, Mutnuri S. Cow urine as a potential source for struvite production. *Int. J Recycl Org Waste Agric.* 2014;3(1):49. doi: 10.1007/s40093-014-0049-z.
- Rawlins J, Portanova A, Zuckerman I, Loftis A, Ceccato P, Willingham A, et al. Molecular detection of leptospiral DNA in environmental water on St. Kitts. *Int J Env Res Pub He.* 2014;11(8):7953–60. doi: 10.3390/ijerph110807953.
- Roczek A, Forster C, Raschel H, Hörmansdorfer S, Bogner K-H, Hafner-Marx A, Lepper H, Dobler G, Büttner M, Sing A. Severe course of rat bite-associated Weil's disease in a patient diagnosed with a new *Leptospira*-specific real-time quantitative LUX-PCR. *J Med Microbiol.* 2008;57(5):658–63. doi: 10.1099/jmm.0.47677-0.
- Rodríguez I, Rodríguez I, Fernández C, Rodríguez J, Cantillo J. Detection of leptospires from infected urine and tissue samples in vitro by modified Fontana silver stain. *J Bras Patol Med Lab.* 2013;49(1):39–45. doi: 10.1590/S1676-24442013000100006.
- Rose, L. Die Bedeutung der Leptospirose bei Katzen in Berlin und Brandenburg. Seroprävalenz, Risikofaktoren und klinische Verdachtsfälle [Dissertation med. vet.]. Berlin: Freie Univ. Berlin; 2018.
- Salgado M, Otto B, Moroni M, Sandoval E, Reinhardt G, Boqvist S, Encina C, Muñoz-Zanzi C. Isolation of *Leptospira interrogans* serovar Hardjoprajitno from a calf with clinical leptospirosis in Chile. *BMC Vet Res.* 2015;11:66. doi: 10.1186/s12917-015-0369-x.
- Schmid, M. Prävalenz von Leptospirenantikörpern in bayerischen Rinderherden und von Leptospiren bei abortierten Rinderfeten [Dissertation med. vet.]. München: Ludwig-Maximilians-Universität; 2005.

- Schneider A, Casanovas-Massana A, Hacker K, Wunder E, Begon M, Reis M, et al. Quantification of pathogenic *Leptospira* in the soils of a Brazilian urban slum. *PLoS Neglect Trop D*. 2018;12(4):e0006415. doi: 10.1371/journal.pntd.0006415.
- Schneider W, Doetsch R. Effect of viscosity on bacterial motility. *J Bacteriol* 1974;117(2):696–701.
- Schönberg A, Staak C, Arbeitsgruppe U. Leptospirose in der Bundesrepublik Deutschland: Ergebnisse eines Untersuchungsprogrammes auf Leptospirose bei Tieren im Jahre 1984. *J Vet Med. Series B*. 1987;34(1-10):98–108. doi: 10.1111/j.1439-0450.1987.tb00375.x.
- Schuller S, Francey T, Hartmann K, Hugonnard M, Kohn B, Nally J, Sykes J. European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. *J Small Anim Pract*. 2015a;56(3):159–79. doi: 10.1111/jsap.12328.
- Schuller S, Sergeant K, Renaut J, Callanan J, Scaife C, Nally J. Comparative proteomic analysis of lung tissue from guinea pigs with leptospiral pulmonary haemorrhage syndrome (LPHS) reveals a decrease in abundance of host proteins involved in cytoskeletal and cellular organization. *J Proteom*. 2015b;122:55–72. doi: 10.1016/j.jprot.2015.03.021.
- Slack A, Symonds M, Dohnt M, Smythe L. Identification of pathogenic *Leptospira* species by conventional or real-time PCR and sequencing of the DNA gyrase subunit B encoding gene. *BMC Microbiol*. 2006;6:95. doi:10.1186/1471-2180-6-95.
- Smith C, Turner L. The effect of pH on the survival of leptospires in water. *Bull World Health Organ*. 1961;24(1):35.
- Stimson A. Note on an organism found in yellow-fever tissue. *Public Health Rep. (1896-1970)*. 1907;22(18):541.
- Straube, M. Vorkommen von Leptospiren in Tierbeständen zoologischer Gärten [Dissertation med.vet]. Giessen; 2007.
- Straubinger R. 6.4 Gattung *Leptospira*. In: Selbitz, H.-J./ Truyen, U./ Valentin-Weigand, P. Hrsg. *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. 10. Aufl. Stuttgart: Enke Verlag, 2015. pp. 146-50.
- Strutzberg-Minder K, Kreienbrock L. Leptospireninfektionen beim Schwein. *Epidemiologie, Diagnostik und weltweites Vorkommen*. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 2011;124(9):345-59. doi: 10.2376/0005-9366-124-345.

- Sykes J, Hartmann K, Lunn K, Moore G, Stoddard R, Goldstein R. 2010 ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention. *J Vet Intern Med.* 2011;25(1):1–13. Doi: 10.1111/j.1939-1676.2010.0654.x.
- Takabe K, Nakamura S, Ashihara M, Kudo S. Effect of osmolarity and viscosity on the motility of pathogenic and saprophytic *Leptospira*. *Microbiol Immunol.* 2013;57(3):236–9. doi: 10.1111/1348-0421.12018.
- Thaipadungpanit J, Wuthiekanun V, Chierakul W, Smythe L, Petkanchanapong W, Limpaboon R, et al. A dominant clone of *Leptospira interrogans* associated with an outbreak of human leptospirosis in Thailand. *PLoS Neglect Trop D.* 2007;1 (1):e56. doi: 10.1371/journal.pntd.0000056.
- Thibeaux R, Girault D, Bierque E, Soupé-Gilbert ME, Rettinger A, Douyère A, et al. Biodiversity of Environmental *Leptospira*: Improving Identification and Revisiting the Diagnosis. *Front Microbiol.* 2018a;9:816. doi: 10.3389/fmicb.2018.00816.
- Thibeaux R, Iraola G, Ferrés I, Bierque E, Girault D, Soupé-Gilbert ME, et al. Deciphering the unexplored *Leptospira* diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence. *Microb Genom.* 2018b;4(1): e000144. doi: 10.1099/mgen.0.000144.
- Vijayachari P, Sugunan A, Umapathi T, Sehgal S. Evaluation of darkground microscopy as a rapid diagnosis procedure in leptospirosis. *Indian J Med Res.* 2001;114:54-8.
- Vincent A, Schiettekatte O, Goarant C, Neela V, Bernet E, Thibeaux R, et al. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS Neglect Trop D.* 2019;13(5):e0007270. doi: 10.1371/journal.pntd.0007270.
- Weil, A. Über eine eigenthümliche mit Milztumor, Icterus und Nephritis einhergehende acute Infektionskrankheit, *Deutsches Archiv für klinische Medizin.* 1886;39:209-32.
- Weis S, Rettinger A, Bergmann M, Llewellyn J, Pantchev N, Straubinger R, Hartmann K. Detection of *Leptospira* DNA in urine and presence of specific antibodies in outdoor cats in Germany. *J Feline Med Surg.* 2017;19(4):470–6. doi: 10.1177/1098612X16634389.
- Weis, S. *Leptospiren bei Freigängerkatzen in Deutschland: Prävalenz von Ausscheidung und Antikörpern* [Dissertation med. vet.]. München: Ludwig-Maximilian-Universität; 2016.
- Weltgesundheitsorganisation (WHO). Human leptospirosis. Guidance for diagnosis, surveillance and control. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Geneva, 2003.

Literaturverzeichnis

Wilks M. PCR detection of microbial pathogens. 2. Aufl. New York: Springer Verlag; 2013

Wolgemuth C, Charon N, Goldstein S, Goldstein R. The flagellar cytoskeleton of the spirochetes. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2006;11(3-5):221–7. Doi: 10.1159/000094056.

Zhang C, Yang H, Li X, Cao Z, Zhou H, Zeng L, Xu J, Xu Y, Chang Y-F, Guo X, Zhu Y, Jiang X. Molecular Typing of Pathogenic *Leptospira* Serogroup Icterohaemorrhagiae Strains Circulating in China during the Past 50 Years. *PLoS Neglect Trop D*. 2015;9(5): e0003762. doi: 10.1371/journal.pntd.0003762.

Żmudzki J, Jabłoński A, Arent Z, Zębek S, Nowak A, Stolarek A, et al. First report of *Leptospira* infections in red deer, roe deer, and fallow deer in Poland. *J Vet Res*. 2016;60(3):257–60. doi: 10.1515/jvetres-2016-0039.

8. Danksagung

Die Erstellung dieser Doktorarbeit wäre ohne die vielen Leute, die mich während ihrer Entstehung unterstützt haben, nicht möglich gewesen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. Martin Pfeffer für die Bereitstellung des Themas, seine Geduld und seine fachliche und moralische Unterstützung während der gesamten Zeit.

Zudem danke ich dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) für die Bereitstellung der finanziellen Mittel im Rahmen des Forschungsnetzes zoonotischer Infektionskrankheiten im Verbund RoBoPub.

Des Weiteren danke ich allen meinen Mitstreitern aus dem RoBoPub Verbund für ihre fachliche Unterstützung und die gute Zusammenarbeit während der letzten Jahre.

Ein großer Dank geht an meine lieben Kollegen des Instituts für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen. Ohne ihre Unterstützung, sei es im Labor oder während der Schreibphasen, wäre diese Doktorarbeit wahrscheinlich nie fertig geworden. Danke für die inspirierenden Gespräche, die tolle Zusammenarbeit und eine wunderschöne Zeit. Besonders Anna Obiegala und Nina Król danke ich für ihr unermüdliches Korrekturlesen und ihr immer offenes Ohr.

Abschließend geht ein besonderer Dank an meine Familie und meine Freunde, die mich während der gesamten Zeit unermüdlich unterstützt haben. Sie haben immer an mich geglaubt, mich stets aufs Neue motiviert und mir Kraft gegeben.