

Ausscheidung von Leptospiren über den Urin bei gesunden
Hunden aus Oberbayern

von Julia-Rebecca Llewellyn

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

Ausscheidung von Leptospiren über den Urin bei gesunden
Hunden aus Oberbayern

von Julia-Rebecca Llewellyn

aus München

München 2016

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Innere Medizin der kleinen Haustiere und Heimtiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

Korreferenten: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger

Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Manfred Gareis

Tag der Promotion: 16.Juli 2016

Meiner Familie

„In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern, die am Rande des Wissens hier und da einen Kiesel aufheben, während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.“

Sir Isaac Newton (1634 – 1727)

Erste Ergebnisse dieser Arbeit wurden im Vortrag auf dem ECVIM-CA-Kongress in Liverpool am 12.09.2013 mit dem Titel „Prevalence of *Leptospira* urinary shedding in healthy dogs from Southern Germany“ und am 31.01.2014 auf der Tagung der Fachgruppe Innere Medizin und Klinische Labordiagnostik in Gießen im Vortrag mit dem Titel „Ausscheidung von Leptospiren im Urin von gesunden Hunden aus Süddeutschland“ vorgestellt.

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|-------------|---|-----------|
| I. | EINLEITUNG | 1 |
| II. | LITERATURÜBERSICHT | 2 |
| 1. | Epidemiologie der Leptospirose..... | 2 |
| 1.1. | Geographische Verbreitung..... | 2 |
| 1.2. | Wirtsspektrum und Reservoir..... | 3 |
| 1.3. | Übertragung von Leptospiren..... | 5 |
| 1.4. | Prävalenz der humanen Leptospirose..... | 6 |
| 2. | Diagnose der Leptospirose..... | 7 |
| 2.1. | Canine Leptospirose | 8 |
| 2.1.1. | Direkter Erregernachweis..... | 8 |
| 2.1.1.1. | Kultureller Nachweis..... | 8 |
| 2.1.1.2. | Mikroskopischer Nachweis | 9 |
| 2.1.1.3. | Polymerase-Kettenreaktion | 10 |
| 2.1.1.4. | Multilocus-Sequenztypisierung..... | 12 |
| 2.1.2. | Indirekter Erregernachweis | 14 |
| 2.1.2.1. | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay | 15 |
| 2.1.2.2. | Mikroagglutinationstest..... | 16 |
| 2.2. | Humane Leptospirose..... | 19 |
| 2.2.1. | Direkter Erregernachweis..... | 19 |
| 2.2.2. | Indirekter Erregernachweis | 20 |
| 3. | Prophylaxe | 21 |
| 3.1. | Prophylaxe beim Hund..... | 22 |
| 3.2. | Prophylaxe beim Menschen | 23 |
| III. | PUBLIKATION | 26 |
| | Urinary shedding of leptospire and presence of <i>Leptospira</i> antibodies in healthy dogs from Upper Bavaria | 26 |
| IV. | DISKUSSION | 34 |
| V. | ZUSAMMENFASSUNG | 44 |
| VI. | SUMMARY..... | 45 |

| | | |
|--------------|-----------------------------------|-----------|
| VII. | LITERATURVERZEICHNIS | 46 |
| VIII. | DANKSAGUNG | 75 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|----------------|--|
| °C | Grad Celsius |
| 6L | 6-Lokus-Schema |
| 7L | 7-Lokus-Schema |
| AK | Antikörper |
| ALT | Alanin-Aminotransferase |
| AP | Alkalische Phosphatase |
| BfR | Bundesinstitut für Risikobewertung |
| bp | Basenpaar/-e |
| BRD | Bundesrepublik Deutschland |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| DDR | Deutsche Demokratische Republik |
| DIC | disseminated intravascular coagulopathy (disseminierte intravasale Koagulopathie) |
| DNA | deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure) |
| ECVIM-CA | European College of Veterinary Internal Medicine - Companion Animals |
| <i>et. al.</i> | <i>et alii</i> (und andere) |
| ELISA | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay |
| EMJH | Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris-Medium |
| FAM | 6-Carboxy-Fluorescein |
| FRET | Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer |
| hpf | high-power field (Haupt Gesichtsfeld) |
| IgG | Immunglobulin G |
| IgM | Immunglobulin M |
| KBR | Komplementbindungsreaktion |
| kg | Kilogramm |
| KGW | Körpergewicht |
| <i>L.</i> | <i>Leptospira</i> |
| <i>ligA</i> | immunoglobulin-like protein A (Immunglobulin-ähnliches Protein A) |
| <i>ligB</i> | immunoglobulin-like protein B (Immunglobulin-ähnliches Protein B) |

| | |
|---------------|--|
| <i>lipL32</i> | Lipoprotein L32 |
| LMU | Ludwig-Maximilians-Universität |
| MAT | Mikroagglutinationstest |
| mg | Milligramm |
| ml | Milliliter |
| MLST | multilocus sequence typing (Multilocus-Sequenztypisierung) |
| PBS | phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung) |
| PCR | polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion) |
| qPCR | real-time polymerase chain reaction (Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion) |
| <i>p. i.</i> | <i>post infectionem</i> |
| RKI | Robert Koch-Institut |
| rRNA | ribosomal ribonucleic acid (ribosomale Ribonukleinsäure) |
| spp. | <i>species pluralis</i> (mehrere Spezies) |
| StIKo Vet | ständige Impfkommision Veterinär |
| TAMRA | 6-Carboxy-Tetramethylrhodamin |
| TH1 | Typ1-T-Helferzellen |
| USA | United States of America (Vereinigte Staaten von Amerika) |
| WHO | World Health Organization |
| z. B. | zum Beispiel |

I. EINLEITUNG

Leptospirose ist eine weltweit vorkommende Zoonose, die durch Bakterien der Ordnung *Spirochaetales* hervorgerufen wird (LEVETT, 2001, 2015). Die Krankheit wurde beim Hund erstmals 1852 von HOFER beschrieben und als Hundetyphus bezeichnet (HOFER, 1852). Beim Menschen wurden 1886 das erste Mal klinische Symptome der Leptospirose beschrieben (WEIL, 1886) und zwei Jahre später als „Weil’sche Erkrankung“ bezeichnet (FIEDLER, 1888). Derzeit sind über 250 verschiedene pathogene *Leptospira* (*L.*)-Serovare bekannt (LEVETT, 2001). Zehn Serovaren kommt eine besondere Bedeutung beim Hund zu. Zu diesen Serovaren zählen *L. Australis*, *L. Autumnalis*, *L. Bratislava*, *L. Canicola*, *L. Grippotyphosa*, *L. Hardjo*, *L. Icterohaemorrhagiae*, *L. Pomona*, *L. Saxkoebing* und *L. Sejroe* (BRENNER *et al.*, 1999). Aufgrund weltweit steigender Fallzahlen innerhalb des letzten Jahrzehntes zählt die Leptospirose zu den “re-emerging diseases“ beim Menschen (MESLIN, 1997; LEVETT, 2001; BHARTI *et al.*, 2003) und bei Hunden (RENTKO *et al.*, 1992; WARD *et al.*, 2002; ALTON *et al.*, 2009). Auch in Europa nimmt die Zahl der an Leptospirose erkrankten Hunde zu (MAJOR *et al.*, 2014). Eine Studie aus Irland ergab eine Leptospirurie bei 7,1 % der untersuchten Hunde (ROJAS *et al.*, 2010). Dies deckt sich mit den Ergebnissen einer Studie aus den Vereinigten Staaten von Amerika (USA), in der bei 8,2 % der Hunde Leptospiren im Urin nachgewiesen wurden (HARKIN *et al.*, 2003). Bisher ist nicht bekannt, wie hoch die Ausscheidungsprävalenz bei Hunden in Deutschland ist.

Ziele dieser Arbeit waren, die Prävalenz der Leptospirurie bei gesunden Hunden aus Oberbayern zu ermitteln und somit das Risiko einer Ansteckung für Mensch und Tier zu bewerten. Hierfür wurde der Urin von 200 Hunden mittels einer für das Lipoprotein-L32-Gen (*lipL32*-Gen) spezifischen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (*real-time polymerase chain reaction*, qPCR) untersucht. Nachfolgend wurde die Genospezies der ausgeschiedenen Leptospiren mittels Multilocus-Sequenztypisierung (MLST) ermittelt. Zusätzlich wurde die Antikörperprävalenz mit Hilfe eines Mikroagglutinationstest (MAT) bestimmt, um die Ergebnisse der qPCR mit den Ergebnissen des MAT zu vergleichen.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Epidemiologie der Leptospirose

Die Leptospirose ist eine der weltweit am häufigsten vorkommenden Zoonosen (SMYTHE, 1999). Infektionen bei Menschen und Tieren erfolgen meist durch direkten oder indirekten Kontakt mit dem Urin eines infizierten Tieres (LEVETT, 2001).

1.1. Geographische Verbreitung

Leptospirose ist in Ländern mit subtropischem und tropischem Klima häufiger als in Ländern mit gemäßigttem Klima (EVERARD und EVERARD, 1993; RATNAM, 1994). Leptospiren überleben in der Umwelt am besten in feuchter Umgebung bei Temperaturen von 0 bis 25 °C (GREENE *et al.*, 2012). Es scheint eine Korrelation zwischen dem Wassergehalt des Bodens und der Infektionsrate von Mäusen zu geben (TWIGG *et al.*, 1969). So treten Leptospireninfektionen in Ländern mit gemäßigttem Klima, im Sommer und Herbst saisonal gehäuft auf (LEVETT, 2001). Die Serovarverteilung unterscheidet sich von Region zu Region und hängt unter anderem mit der geographischen Verbreitung der Haupt- und Nebenwirte zusammen (SCHWARZ, 1960; TWIGG *et al.*, 1969). In Europa sind Hunde am häufigsten den *L.-interrogans*-Serovaren Australis, Canicola, und Icterohaemorrhagiae, dem *L.-kirschneri*-Serovar Grippotyphosa und den *L.-borgpetersenii*-Serovaren Saxkoebing und Sejroe ausgesetzt (ELLIS, 2010). Speziell in Deutschland kommen, basierend auf MAT-Ergebnissen beim Hund, die *L.-interrogans*-Serovare Australis, Bratislava, Canicola, Icterohaemorrhagiae und Pomona, das *L.-kirschneri*-Serovar Grippotyphosa und die *L.-borgpetersenii*-Serovare Sejroe und Saxkoebing am häufigsten vor (GEISEN *et al.*, 2007; GERLACH und STEPHAN, 2007; KOHN *et al.*, 2010; MAYER-SCHOLL *et al.*, 2013). In den USA treten die *L.-interrogans*-Serovare Autumnalis, Bratislava und Pomona sowie das *L.-kirschneri*-Serovar Grippotyphosa besonders oft auf (ADIN und COWGILL, 2000; PRESCOTT *et al.*, 2002; WARD *et al.*, 2004; GOLDSTEIN *et al.*, 2006). In Asien sind das *L.-interrogans*-Serovare Lai, das *L.-kirschneri*-Serovar Cynopteri und das *L.-borgpetersenii*-Serovar Sejroe vorherrschend (LEVETT, 2001; ODONTSETSEG *et al.*, 2005; JUNG *et al.*,

2008).

1.2. Wirtsspektrum und Reservoirre

Leptospireninfektionen konnten bei Säugetieren, auch bei marinen Arten, Vögeln, Reptilien und Amphibien nachgewiesen werden (HOAG *et al.*, 1953; DIESCH *et al.*, 1966; VAN DER HOEDEN, 1966; LEVETT, 2001; COLAGROSS-SCHOUTEN *et al.*, 2002; COLEGROVE *et al.*, 2005). Entscheidend für die Verbreitung der Leptospiren in der Umwelt sind Säugetiere. Diese werden in Haupt- oder Reservoirwirte und in Nebenwirte unterteilt (LEVETT, 2001). Bei Reservoirwirten sind die Nierentubuli chronisch infiziert, was zu einer anhaltenden Ausscheidung von Leptospiren über den Urin führt (BABUDIERY, 1958). In der Regel zeigen diese Tiere keine Krankheitssymptomatik (BOLIN und ALT, 2001; LEVETT, 2001). Im Gegensatz dazu zeigen Nebenwirte oft akute oder subakute Krankheitsverläufe und meistens eine nur kurze Ausscheidungsdauer (RENTKO *et al.*, 1992; BOLIN, 1996). Jedoch werden auch bei Nebenwirten subklinische Infektionen beschrieben (SONGER und THIERMANN, 1988). Kleine Säugetiere, wie wildlebende Nagetiere, spielen die wichtigste Rolle als Reservoirwirte für Leptospiren (PLANK und DEAN, 2000; ADLER *et al.*, 2002). Leptospiren zeigen eine Reservoirwirtsbindung (Tabelle 1), die jedoch weltweit variiert (BOLIN, 1996; STEGER-LIEB *et al.*, 1999).

Die Wanderratte (*Rattus norvegicus*) wird für die Einschleppung des *L. interrogans*-Serovars Copenhageni von Asien nach Westeuropa im 18. Jahrhundert verantwortlich gemacht (ALSTON und BROOM, 1958). Je nach Jahreszeit beträgt der Anteil infizierter Wanderratten weltweit zwischen 10,0 und 90,0 % (DEDIE *et al.*, 1993; VINETZ *et al.*, 1996; SUNBUL *et al.*, 2001). Ratten (*Rattus* spp.) spielen als Ansteckungsquelle die größte Rolle, da neben dem Serovar Copenhageni eine Vielzahl an Leptospirenservaren diese Nagetiere als Reservoirwirt nutzen (PLANK und DEAN, 2000; LEVETT, 2001). Eine deutsche Studie ergab eine Prävalenz an Antikörpern (AK) von 92,0 % bei 26 untersuchten Igel (*Erinaceus europeus*) (HORSCH *et al.*, 1970). Igel in menschlicher Obhut könnten daher ein Infektionspotenzial für deren Pfleger darstellen. Für eine urbane Verbreitung sorgen unter anderem Wildschweine (*Sus scrofa*) und Füchse (*Vulpes vulpes*) (TWIGG *et al.*, 1969). Die Prävalenz von AK bei Wildschweinen in Deutschland liegt bei 24,0 % (SCHÖNBERG *et al.*, 1999). Bei Füchsen beträgt sie 2,0 % (MULLER und WINKLER, 1994; JANSEN *et al.*, 2007).

Tabelle 1: Leptospirenserovare und ihre Reservoirwirte (modifiziert nach GREENE *et al.*, 2006; GERLACH und STEPHAN, 2007)

| Serovar | Hauptwirt |
|---------------------------------|--|
| Bratislava | Ratte, Schwein, Pferd, Igel |
| Canicola | Hund |
| Hardjo | Wiederkäuer |
| Copenhageni/Icterohaemorrhagiae | Ratte |
| Pomona | Rind, Schwein, Skunk, Opossum |
| Autumnalis | Maus |
| Bataviae | Hund, Ratte, Maus |
| Grippotyphosa | Wühlmaus, Waschbär, Skunk, Opossum, Bisamratte |
| Ballum | Maus |
| Saxkoebing | Gelbhalsmaus, Rötelmaus |
| Sejroe | Hausmaus, Ährenmaus, Schwein |

Hunde sind Reservoirwirte für die *L.-interrogans*-Serovare Canicola und Bataviae (GREENE *et al.*, 2006). Bis zur Einführung einer bivalenten Impfung im Jahr 1961 waren die Serovare Canicola und Icterohaemorrhagiae am häufigsten für Infektionen beim Hund verantwortlich (ELLIS, 2010). Derzeit existieren in Europa neben den *L.-interrogans*-Serovaren Canicola und Bataviae vor allem die *L.-interrogans*-Serovare Bratislava und Pomona sowie das *L.-kirschneri*-Serovar Grippotyphosa und das *L.-borgpetersenii*-Serovar Saxkoebing (ELLIS, 2010).

AK-Prävalenz-Studien zeigen, dass sich auch Katzen mit Leptospiren infizieren können. So konnten AK gegen Leptospiren bei 10,0 % der Katzen in Schottland, bei 20,0 % der Katzen in Deutschland und bei 33,3 % der Katzen in Griechenland nachgewiesen werden (BATZA und WEISS, 1987; AGUNLOYE und NASH, 1996; MYLONAKIS *et al.*, 2005). Dabei sind die am häufigsten bei der Katze vorkommenden *L.-interrogans*-Serovare Australis, Autumnalis, Canicola und Hardjo sowie das *L.-kirschneri*-Serovar Grippotyphosa und das *L.-borgpetersenii*-Serovar Sejroe (DICKESON und LOVE, 1993; AGUNLOYE und NASH, 1996; LUCIANI, 2004; MYLONAKIS *et al.*, 2005).

Rinder und Schafe beherbergen hauptsächlich das *L.-interrogans*-Serovar Hardjo (GERRITSEN *et al.*, 1994; BOLIN und ALT, 2001). Beim Schwein haben die *L.-interrogans*-Serovare Pomona und Bratislava weltweit die größte Bedeutung

(VICENTE *et al.*, 2002; JANSEN *et al.*, 2007). Bei Pferden werden am häufigsten das *L.-interrogans*-Serovar Bratislava und das *L.-kirschneri*-Serovar Grippotyphosa nachgewiesen (CERRI *et al.*, 2003; CURLING, 2011). Erkrankungen durch Leptospiren sind bei Vögeln nicht bekannt. Vögel können jedoch auch AK gegen Leptospiren aufweisen (VAN DER HOEDEN, 1966). So wurden in einer Studie AK gegen Leptospiren bei 1,5 % der untersuchten Zoovögel in Deutschland gefunden (KADLEC *et al.*, 1983). Wasservögel können den Erreger wochenlang ausscheiden und so zu einer Kontamination von Badeseen führen (DEDIE *et al.*, 1993) und damit eine potenzielle Gefahr für den Menschen darstellen.

Der Mensch kann sich mit vielen verschiedenen Serovaren infizieren; er gilt dabei immer als Zufallswirt (LEVETT, 2001). Am häufigsten werden die *L.-interrogans*-Serovare Canicola und Icterohaemorrhagiae sowie das *L.-kirschneri*-Serovar Grippotyphosa nachgewiesen (JANSEN *et al.*, 2005; GAUDIE *et al.*, 2008; EHSANOLLAH und GHOLAM, 2011; DUPOUEY *et al.*, 2014), aber auch Ballum (ESTEVEZ *et al.*, 2014), Hardjo (MCLEAN *et al.*, 2014), Hebdomadis (MILNER *et al.*, 1980) und Pyrogenes (PATIL *et al.*, 2014).

1.3. Übertragung von Leptospiren

Leptospiren werden insbesondere über den Urin infizierter Tiere ausgeschieden (LANGSTON und HEUTER, 2003), aber auch über Speichel, Milch, Fruchtwasser, Nachgeburt und Sperma übertragen (ELLIS und MICHNA, 1976; BOLIN und KOELLNER, 1988; DURA, 1993). Eine Infektion kann direkt oder indirekt erfolgen. Die direkte Übertragung findet über den Deckakt (venerisch), Bisse, transplazentar oder durch Aufnahme von infiziertem Gewebe statt (TURNER, 1967; LEVETT, 2001). Die indirekte Ansteckung findet über den Kontakt mit durch Urin kontaminiertem Wasser, Erde, Nahrung oder Einstreu statt (TURNER, 1967). Die Eintrittspforten sind hierbei meist Hautwunden oder auch intakte Schleimhäute (TURNER, 1967; LEVETT, 2001).

Bei Menschen sind die Berufsgruppen Landwirt, Tierarzt und Fleischbeschauer einem besonderen Infektionsrisiko ausgesetzt (LEVETT, 2001). Sie infizieren sich meist durch direkten Kontakt mit infizierten Tieren (BLACKMORE *et al.*, 1979; KINGSCOTE, 1986; CHAN *et al.*, 1987; CAMPAGNOLO *et al.*, 2000). Auch Minenarbeiter, Reisfeldarbeiter und Wassersportler können sich anstecken,

wobei dieses vor allem durch indirekten Kontakt geschieht (INADA *et al.*, 1916; PADRE *et al.*, 1988; MUMFORD, 1989). Infektionen beim Menschen durch Hunde wurden bei insgesamt 30 Fällen in den USA dokumentiert (HAUNZ und CARDY, 1952; BARKIN und GLOSSER, 1973; FEIGIN *et al.*, 1973; FRASER *et al.*, 1973).

1.4. Prävalenz der humanen Leptospirose

Weltweit erkranken jährlich etwa 853.000 Menschen an Leptospirose; 48.000 von ihnen sterben an dieser Infektion (BANDARA *et al.*, 2014). Global betrachtet ist die Inzidenz auf den Seychellen am höchsten (432,1 Erkrankungen/1 Million Einwohner) (PAPPAS *et al.*, 2008). Humane Leptospirosefälle sind in ganz Europa beschrieben (PAPPAS *et al.*, 2008). Portugal, Dänemark und Frankreich sind die Länder mit den höchsten Inzidenzen in Europa (6,8 Erkrankungen/1 Million Einwohner, 6,0 Erkrankungen/1 Million Einwohner beziehungsweise (bzw.) 3,9 Erkrankungen/1 Million Einwohner im Jahr 2008) (JANSEN *et al.*, 2005; PAPPAS *et al.*, 2008).

Die humane Leptospirose war in der Deutschen Demokratischen Republik (DDR) seit 1958 und in der Bundesrepublik Deutschland (BRD) seit 1962 meldepflichtig. Nach der Wiedervereinigung wurden 1990 schließlich beide Meldestellen kombiniert; sie obliegen nun dem Robert Koch-Institut (RKI) (JANSEN *et al.*, 2005). In den Jahren 1962 bis 2003 wurden durchschnittlich 59 humane Leptospirosefälle in Deutschland gemeldet (JANSEN *et al.*, 2005). In den Jahren 1991 und 1997 wurden mit 25 die wenigsten und 2007 und 2014 mit 165 und 160 die meisten Fälle gemeldet (JANSEN *et al.*, 2005; ROBERT KOCH-INSTITUT, 2008; ROBERT KOCH-INSTITUT, 2015). Wie der Abbildung 1 zu entnehmen ist, schwankt die Anzahl der jährlich in Deutschland durchschnittlich gemeldeten Fälle. Die Inzidenz in Deutschland liegt derzeit bei 0,2 Erkrankungen/100.000 Einwohner (ROBERT KOCH-INSTITUT, 2015).

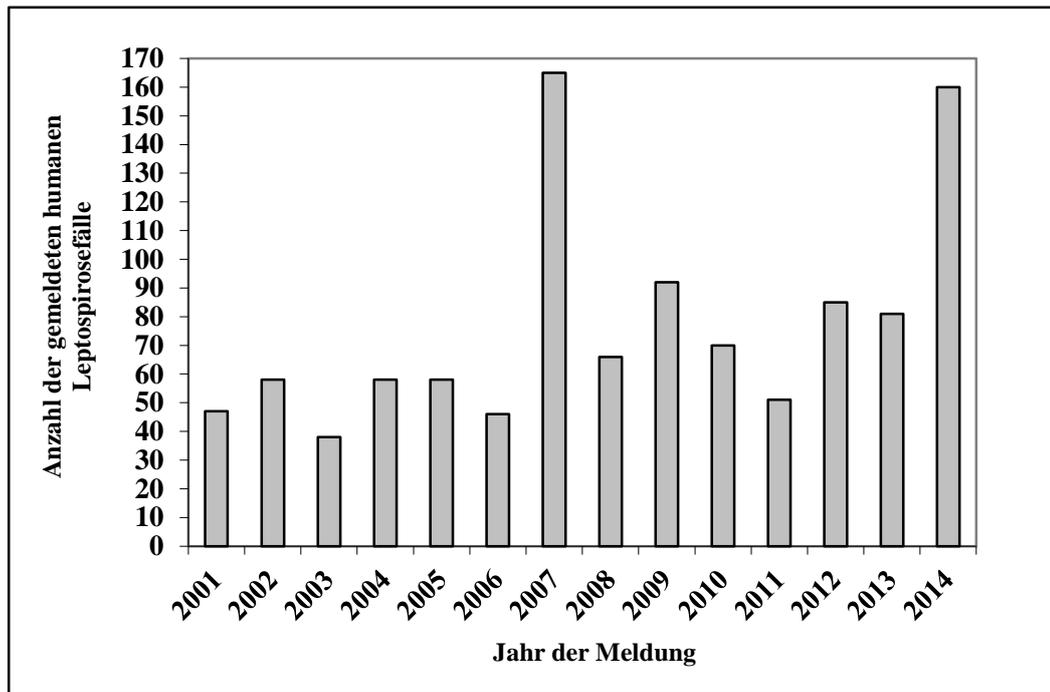


Abbildung 1: Anzahl der gemeldeten, humanen Leptospirosefälle in Deutschland, im Zeitraum von 2001 bis 2014 (erstellt nach ROBERT KOCH-INSTITUT, 2002 bis 2015)

Zu Leptospirose-Ausbrüchen kam es in Deutschland bereits zweimal bei Erdbeerpflückern. Dabei erkrankten im Jahr 2007 33 Menschen und im Jahr 2014 45 Menschen. Bei beiden Ausbrüchen wurde von einer Infektion über den Urin von infizierten Mäusen ausgegangen, da sowohl bei den erkrankten Menschen als auch bei den vor Ort gefangenen Feldmäusen (*Microtus arvalis*) das *L.-kirschneri*-Serovar Grippotyphosa nachgewiesen wurde (ROBERT KOCH-INSTITUT, 2008; DESAI et al., 2009; ROBERT KOCH-INSTITUT, 2015). In den Jahren 2001 bis 2014 wurden in Deutschland insgesamt elf Todesfälle im Zusammenhang mit Leptospirose gemeldet (ROBERT KOCH-INSTITUT, 2001 bis 2015).

2. Diagnose der Leptospirose

Zur Diagnose der Leptospirose eignen sich direkte und indirekte Nachweisverfahren. Die aussagekräftigsten Ergebnisse werden mittels einer Kombination mehrerer Verfahren wie Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und dem MAT erzielt (THIERMANN, 1984; WAGENAAR et al., 2000). Leptospiren können anhand ihrer Oberflächenmerkmale serologisch klassifiziert werden (CERQUEIRA und PICARDEAU, 2009); die Einteilung erfolgt dabei in Serovare und Serogruppen (LEVETT, 2001). Serogruppen umfassen antigenetisch

verwandte Serovarietäten (LEVETT, 2001). Eine neuere Klassifizierung erfolgt anhand genetischer Merkmale. Dabei werden die Leptospiren in bisher 21 verschiedene Genospezies unterteilt (LEVETT, 2015). Auffällig dabei ist, dass es keine Korrelation zwischen Serogruppen und Genospezies gibt (LIM, 2011).

2.1. Canine Leptospirose

Die wichtigsten Nachweisverfahren der caninen Leptospirose sind der MAT und die PCR (GOLDSTEIN *et al.*, 2006; OIE, 2014). Der MAT gilt immer noch als diagnostischer Goldstandard (LANGSTON und HEUTER, 2003).

2.1.1. Direkter Erregernachweis

Der direkte Erregernachweis ist mittels Mikroskopie, Immunfluoreszenztest, kultureller Isolierung, PCR oder MLST möglich (LANGSTON und HEUTER, 2003; LEVETT, 2001). Auf Grund der langen Dauer eines kulturellen Nachweises und der niedrigen Sensitivität eines mikroskopischen Nachweises wird heutzutage vor allem die PCR zur Diagnostik der Leptospirose verwendet. Direkte Nachweismethoden gelten nur im positiven Fall als beweisend. Ein negatives Ergebnis schließt eine Infektion nicht aus (LEVETT, 2001).

2.1.1.1. Kultureller Nachweis

Die Anzucht von Leptospiren aus klinischem Probenmaterial erfordert selektive Spezialmedien, ist zeitintensiv und gelingt meist nur, wenn das Material frisch ist (THIERMANN, 1984; LANGSTON und HEUTER, 2003). Blutproben sollten während der Phase der Leptospirämie, in der ersten Woche nach Infektion, genommen werden (MCCRUMB *et al.*, 1957). Eine Anzucht aus Urinproben kann erst ab der zweiten Woche nach Ansteckung erfolgen. Die Dauer der Ausscheidung der Leptospiren über den Urin variiert individuell und kann bis zu mehrere Wochen betragen (BAL *et al.*, 1994). Da Leptospiren nicht lange in saurem Urin überleben können, sollte der Urin schnellstmöglich zentrifugiert und der Niederschlag, das sogenannte Pellet, mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) versetzt werden, um den pH-Wert anzuheben (FAINE, 1982; LEVETT, 2001). Falsch-negative Ergebnisse können sich durch zuvor verabreichte Antibiotika ergeben (TURNER, 1970).

Als Medium eignen sich flüssige oder halbfeste Spezialmedien, denen entweder bovines Serumalbumin (BSA) und Polysorbat 80 (Tween® 80) oder eine

Kombination aus Polysorbat 80 und 40 (Tween[®] 80 und 40) zugegeben werden (ELLIS, 1986). Beides ist in dem von ELLINGHAUSEN und MCCULLOUGH (1965) entwickelten und von JOHNSON und HARRIS (1967) modifizierten Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris-Medium (EMJH) enthalten (ELLINGHAUSEN und MCCULLOUGH, 1965; JOHNSON und HARRIS, 1967). Wegen des extrem langsamen Wachstums der Leptospiren sind Kulturen sehr anfällig für bakterielle Kontaminationen, die die Leptospiren meist überwuchern (TURNER, 1970). Eine Reduktion dieser potenziellen bakteriellen Kontamination kann durch das Umsetzen von Teilkulturen in mit Antibiotika versetzte Zellkulturmedien, durch Subkultivierungen oder das Erstellen von geometrischen Verdünnungsreihen der jeweiligen Kultur gelingen (TURNER, 1970; FAINE, 1982). Antibiotika, die Selektivmedien zugesetzt werden, sind beispielsweise 5-Fluoruracil (JOHNSON und ROGERS, 1964) oder eine Mischung aus Rifamycin, Polymyxin, Neomycin, 5-Fluoruracil, Bacitracin und Actidion (ADLER *et al.*, 1986). Die Kultivierung erfolgt bei 28 – 30 °C (TURNER, 1970). Die Inkubationszeit beträgt mindestens 16 Wochen. Bevor eine Probe als sicher negativ bewertet werden kann, sollte 26 Wochen gewartet werden (ELLIS, 1986). Die Kulturen werden über diesen Zeitraum wöchentlich mittels Dunkelfeldmikroskopie auf das Vorhandensein von Leptospiren überprüft (TURNER, 1970). Isolierte Leptospiren werden schließlich gegebenenfalls mittels antigenetischer oder molekulartechnischer Verfahren genauer identifiziert (FAINE, 1982; LEVETT, 2001). Die Sensitivität der Kultur ist abhängig vom Krankheitsverlauf und dem verwendeten Probenmaterial und liegt je nach Studie bei 5,0 – 50,0 %. Die Spezifität beträgt 100 % (LEVETT, 2001).

2.1.1.2. Mikroskopischer Nachweis

Die Dunkelfeldmikroskopie aus Körperflüssigkeiten wie Blut, Urin, Liquor sowie Peritonealflüssigkeit ist im Hinblick auf die Diagnose einer Leptospirose wenig sensitiv und wenig spezifisch (LEVETT, 2001). Um eine Leptospire pro Haupt Gesichtsfeld (*high power field*, hpf) sehen zu können, ist eine Mindestmenge von 1×10^4 bis 2×10^4 Leptospiren pro Milliliter (ml) nötig (TURNER, 1970). Die mikroskopische Untersuchung von Blutproben ist nur während der ersten Tage einer akuten Infektion erfolgsversprechend (LEVETT, 2001). Die Interpretation der Präparate ist oft schwierig, da die Bakterien mit Fibrin oder Proteinfäden, die eine brownische Molekularbewegung zeigen, verwechselt

werden können (TURNER, 1970). So kann es zu falsch-positiven Ergebnissen kommen (TURNER, 1970). Auch die Sensitivität der Methode ist niedrig. Sie kann durch Färbemethoden gesteigert werden. Dazu zählt zum Beispiel (z. B.) die Immunfluoreszenz (HENRY *et al.*, 1971; HODGES und EKDAHL, 1973; ELLIS *et al.*, 1982; BOLIN *et al.*, 1989). Bei dieser Methode werden Antiseren gegen definierte *L.*-Serovare, die mit Fluoreszenz-Farbstoffen konjugiert sind, versetzt und unter einem Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet (HODGES und EKDAHL, 1973; BOLIN *et al.*, 1989). Diese Nachweismethode ist serovarspezifisch (HODGES und EKDAHL, 1973). Weitere Methoden zur Färbung sind Immunperoxidasefärbung (TRIPATHY und HANSON, 1974; TERPSTRA *et al.*, 1983), Silberfärbung (MURRAY und FIELDING, 1936) und Immunhistochemie (UIP *et al.*, 1992; ZAKI und SHIEH, 1996; HAAKE *et al.*, 2000; WILD *et al.*, 2002).

2.1.1.3. Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR ist eine Methode um spezifische Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Fragmente millionenfach zu amplifizieren. Kleinste Mengen genetischen Materials reichen somit aus, um eine für herkömmliche Messmethoden bestimmbare Menge zu synthetisieren (SAIKI *et al.*, 1985). In einem zweiten Schritt werden die Amplifikate mittels Hybridisierung mit Sonden oder Agarosegelelektrophorese visualisiert (GARIBYAN und AVASHIA, 2013). Im Jahr 1992 wurde die qPCR von HIGUCHI und Mitarbeitern etabliert. Mit einer qPCR kann die gewonnene DNA schon während der Amplifikation quantifiziert werden (HIGUCHI *et al.*, 1992). Für die qPCR werden Fluoreszenzfarbstoffe, wie Ethidiumbromid (HIGUCHI *et al.*, 1992) oder SYBR[®] Green I, verwendet (LEVETT *et al.*, 2005). Eine andere Variante ist das Prinzip des Fluoreszenz-Resonanzenergietransfers (FRET), wie sie bei TaqMan[®]-Sonden Anwendung findet. Diese Sonden sind an einem Ende mit einem Quencher (Akzeptor) und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Donor), wie 6-Carboxy-Tetramethylrhodamin (TAMRA) bzw. 6-Carboxy-Fluorescein (FAM), markiert (LEUTENEGGER, 2001). Durch die räumliche Nähe zwischen Quencher und Reporter-Fluoreszenzfarbstoff wird die Fluoreszenz unterdrückt. Wenn die Taq-Polymerase die Sonde während der Synthese des Gegenstranges abbaut, entfernen sich dadurch der Quencher und die fluorogene Sonde voneinander, wodurch eine steigende Fluoreszenz gemessen werden kann (LEUTENEGGER, 2001). Je mehr

Amplifikate entstehen, umso stärker wird das Signal der Fluoreszenz (LEUTENEGGER, 2001).

Zum Nachweis von Leptospiren bei Mensch und Tier wurden in der Vergangenheit viele verschiedene PCR-Assays beschrieben (VAN EYS *et al.*, 1989; WAGENAAR *et al.*, 1994; BROWN *et al.*, 1995). Es gibt PCR-Protokolle, die auf der Detektion von Zielsequenzen für die 16S-ribosomale Ribonukleinsäure (-rRNA), ein in Bakterien universell vorkommendes Gen (MERIEN *et al.*, 1992), oder die 23S-rRNA (WOO *et al.*, 1997) beruhen. Andere PCR-Verfahren nutzen repetitive Elemente oder Endoflagellin-Gene als Zielbereiche (WOODWARD und REDSTONE, 1993; SAVIO *et al.*, 1994). Mit diesen Verfahren werden sowohl pathogene als auch apathogene Leptospiren nachgewiesen. Gerade für die klinische Diagnostik wurde daher nach Genen gesucht, die spezifisch für pathogene Leptospiren sind. PCR-Protokolle, die das *lipL32*-Gen (LEVETT *et al.*, 2005) oder *immunoglobulin-like proteins A* oder *B* (*ligA* oder *ligB*) (PALANIAPPAN *et al.*, 2005) nachweisen, sind spezifisch für pathogene *Leptospira* spp.

Es gibt bisher keine allgemein gültige Übereinkunft, welche Gene oder Primer für die Leptospirendiagnostik beim Tier verwendet werden sollten. Am häufigsten werden Protokolle die spezifisch für das *lipL32*-Gen sind verwendet (OIE, 2014). QPCR-Protokolle sind schneller und weniger empfindlich gegenüber Kontaminationen, verglichen mit konventionellen PCR-Protokollen (PICARDEAU, 2013). Bisher wurden drei qPCR-Protokolle zur Leptospirendiagnostik validiert (SLACK *et al.*, 2007; AHMED *et al.*, 2009; THAIPADUNGPANIT *et al.*, 2011).

Als Untersuchungsmaterial für die PCR eignet sich Urin, Sperma (MASRI *et al.*, 1997), Vollblut, Liquor (BROWN *et al.*, 1995), Serum (GRAVEKAMP *et al.*, 1993) und Organmaterial, insbesondere Material von der Niere (SAVIO *et al.*, 1994). Urin stellt ein sehr gutes Probenmaterial dar, da es in großen Mengen gewonnen werden kann (BAL *et al.*, 1994). Außerdem lassen sich schon während der ersten sieben Tage der Infektion Leptospiren im Urin nachweisen (BAL *et al.*, 1994). Für Blut wurde eine Nachweisgrenze von 10 – 100 Leptospiren/ml angegeben (AHMED *et al.*, 2009; STODDARD *et al.*, 2009) und für Urin 5 – 172,6 Leptospiren/ml (GERRITSEN *et al.*, 1991; MERIEN *et al.*, 1992; ROJAS *et al.*, 2010). Die Spezifität der PCR variiert zwischen den Protokollen und je

nach verwendeten Untersuchungsmaterialien und liegt zwischen 93,0 % und 100 % (AHMED *et al.*, 2009; STODDARD *et al.*, 2009). Zu beachten ist, dass die Anwesenheit von Inhibitoren in klinischen Proben zu falsch-negativen Ergebnissen führen kann (Tabelle 2). Eine Beeinflussung durch Inhibitoren ist vor allem in Proben, die durch Kot oder Autolyseprodukte verunreinigt wurden, möglich (OIE, 2014).

Tabelle 2: Inhibitoren der Polymerase-Kettenreaktion in klinischem Probenmaterial

| Probenmaterial | Inhibitoren | Autoren |
|----------------|---------------------------|-------------------------------|
| Blut | Hämoglobin, Laktoferrin | AL-SOUD und RADSTROM, 2001 |
| | Komplexverbindung Häme | AKANE <i>et al.</i> , 1994 |
| | Immunglobulin G | SHUTLER <i>et al.</i> , 1999 |
| Gewebe | Kollagen | KIM <i>et al.</i> , 2001 |
| Kot | Gallensalze | LANTZ <i>et al.</i> , 1997 |
| | komplexe Polysaccharide | MONTEIRO <i>et al.</i> , 1997 |
| Urin | Harnstoff | KHAN <i>et al.</i> , 1991 |

2.1.1.4. Multilocus-Sequenztypisierung

Die MLST wurde erstmals 1998 zur Untersuchung des Meningokokken-Meningitis Erregers (*Neisseria meningitidis*) beschrieben (MAIDEN *et al.*, 1998). Das Verfahren dient der Analyse bakterieller Populationsstrukturen. Üblicherweise werden sechs bis acht interne Fragmente (450 – 500 Basenpaare, bp) sogenannter Haushaltsgene („*housekeeping genes*“) sequenziert, die für den Organismus essentiell und selektionsneutral sind (ENRIGHT und SPRATT, 1999). Bei den untersuchten Loci handelt es sich um hoch konservierte Regionen von Haushaltsgenen, die eine gewisse Variabilität aufweisen (ENRIGHT und SPRATT, 1999). Anhand der Sequenzvariationen können verschiedene Isolate der gleichen Spezies unterschieden und verschiedenen Sequenztypen zugeordnet werden (ENRIGHT und SPRATT, 1999). Die Sequenzen können anschließend genutzt werden, um phylogenetische Stammbäume zu entwickeln oder populationsgenetische Analysen zu vollziehen (AHMED *et al.*, 2006). Diese MLST-Technik beinhaltet eine PCR-Amplifikation und anschließende DNA-

Sequenzierung (MAIDEN *et al.*, 1998; AHMED *et al.*, 2006) und dient der Einteilung der Leptospiren in Genospezies (Tabelle 3). Die einzelnen Genospezies können anhand ihrer Pathogenität in pathogen, apathogen und intermediär pathogen unterteilt werden (CERQUEIRA *et al.*, 2010). Bei den intermediär pathogenen Genospezies ist die Pathogenität unklar. So wurden z. B. die Genospezies *L. inadai* und *L. licherasiae* von an Leptospirose erkrankten Menschen isoliert, eine Übertragung auf Hamster führte allerdings zu keinerlei Symptomen (SCHMID *et al.*, 1986, MATTHIAS *et al.*, 2008). Eine weitere Unterteilung in Serogruppen oder Serovare ist mittels MLST nicht möglich (AHMED *et al.*, 2006).

Tabelle 3: Genospezies und ihre Pathogenität innerhalb der Familie *Leptospiraceae* (nach LEVETT, 2015)

L. = *Leptospira*

| Genospezies | Pathogenität |
|--------------------------|-------------------------------|
| <i>L. alexanderi</i> | pathogen |
| <i>L. alstonii</i> | pathogen |
| <i>L. biflexa</i> | apathogen |
| <i>L. borgpetersenii</i> | pathogen |
| <i>L. broomii</i> | unklar (intermediär pathogen) |
| <i>L. fainei</i> | unklar (intermediär pathogen) |
| <i>L. idonii</i> | unklar (intermediär pathogen) |
| <i>L. inadai</i> | unklar (intermediär pathogen) |
| <i>L. interrogans</i> | pathogen |
| <i>L. kirschneri</i> | pathogen |
| <i>L. kmetyi</i> | pathogen |
| <i>L. licherasiae</i> | unklar (intermediär pathogen) |
| <i>L. meyeri</i> | apathogen |
| <i>L. noguchii</i> | pathogen |
| <i>L. santarosai</i> | pathogen |
| <i>L. terpstrae</i> | apathogen |
| <i>L. vanthielii</i> | apathogen |
| <i>L. weilii</i> | pathogen |
| <i>L. wolbachii</i> | apathogen |
| <i>L. wolffii</i> | unklar (intermediär pathogen) |
| <i>L. yanagawae</i> | apathogen |

Für die Genotypisierung von *Leptospira* spp. sind unterschiedliche MLST-Schemata verfügbar, die anhand der Analyse verschiedener Haushaltsgene eine Differenzierung von pathogenen Genospezies erlauben (AHMED *et al.*, 2006; THAIPADUNGPANIT *et al.*, 2007; BOONSILP *et al.*, 2013). Tabelle 4 zeigt die vorhandenen MLST-Schemata mit den verwendeten Haushaltsgenen und den damit nachweisbaren Genospezies.

Tabelle 4: Multilocus Sequenztypisierungs-Schemata zur Differenzierung pathogener *Leptospira*-Genospezies

6L = 6-Lokus-Schema; 7L = 7-Lokus-Schema; *L.* = *Leptospira*; modifiziertes 7L= Haushaltsgen *fadD* ersetzt durch *caiB*

| MLST-Schema | Genospezies | Haushaltsgene | Autoren |
|------------------|---|---|---|
| 6L | alle pathogenen Genospezies | <i>adk</i> , <i>icdA</i> , <i>rrs2</i> , <i>secY</i> , <i>lipL42</i> , <i>lipL32</i> | AHMED <i>et al.</i> , 2006 |
| 7L | <i>L. interrogans</i> , <i>L. kirschneri</i> | <i>pntA</i> , <i>sucA</i> , <i>pfkB</i> , <i>glmU</i> , <i>mreA</i> , <i>tpiA</i> , <i>fadD</i> | THAIPADUNGPANIT <i>et al.</i> , 2007 |
| modifiziertes 7L | <i>L. interrogans</i> , <i>L. kirschneri</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. alexanderi</i> | <i>pntA</i> , <i>sucA</i> , <i>pfkB</i> , <i>glmU</i> , <i>mreA</i> , <i>tpiA</i> , <i>caiB</i> | BOONSILP <i>et al.</i> , 2013 |

Nur mit dem 7-Lokus-Schema (7L) ist eine Zuordnung zu Sequenztypen möglich (AHMED *et al.*, 2015). Ein Vergleich der Genauigkeit bei der Identifizierung von Genospezies zwischen dem 7L-Schema und dem 6L-Schema, zeigt übereinstimmende Ergebnisse der beiden Schemata (AHMED *et al.*, 2011). Sie sind somit gleichermaßen zur Identifizierung von *L.*-Genospezies geeignet (AHMED *et al.*, 2011).

2.1.2. Indirekter Erregernachweis

Der indirekte Erregernachweis ist mittels MAT, Objektträgeragglutinations-Schnelltest, Komplementsbindungsreaktion (KBR) und Enzyme-Linked

Immunsorbent Assay (ELISA) möglich. Mit der Einführung des ELISA in der Leptospirendiagnostik wurde die KBR ersetzt (LEVETT, 2001).

2.1.2.1. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Der ELISA ist ein sehr sensitiver und spezifischer Test zum Nachweis von AK gegen Leptospiren (DEY *et al.*, 2004; DEY *et al.*, 2007). Die AK aus dem zu testenden Serum werden mit dem an eine Mikrotiterplatte fixierten Antigen in Kontakt gebracht. Nach anschließender Inkubationszeit und mehreren Waschvorgängen wird ein zu dem Testserum gehörender Enzym-gebundener anti-Spezies-AK hinzugefügt (GAN und PATEL, 2013). Die Enzymaktivität wird schließlich mittels eines spezifischen, chromogenen Substrats ermittelt. Die Intensität der Farbreaktion ist dabei proportional zu der Menge der AK im Serum (GAN und PATEL, 2013). Die Durchführung eines ELISA ist standardisierbar, schnell und einfach. Die Auswertung erfolgt photometrisch (GAN und PATEL, 2013) und ist dadurch objektiver als die Auswertung beim MAT (WHO, 2003).

Es gibt Immunglobulin-G (IgG)- und Immunglobulin-M (IgM)-spezifische ELISA und solche, die beide AK-Gruppen nachweisen (HARTMAN *et al.*, 1984; HARTMAN *et al.*, 1986). IgM-AK gegen Leptospiren steigen innerhalb der ersten Woche *post infectionem* (*p. i.*) an, erreichen ihr Maximum zwei Wochen *p. i.* und sinken danach wieder ab (LANGSTON und HEUTER, 2003). IgG-AK-Spiegel steigen zwei Wochen *p. i.* an und erreichen ihr Maximum vier Wochen *p. i.* (LANGSTON und HEUTER, 2003). Nach einer Impfung steigen IgM-AK mäßig und IgG-AK deutlich an (HARTMAN *et al.*, 1984). IgG-AK persistieren über Monate (HARTMAN *et al.*, 1984). Die Anwendung eines kombinierten IgM-/IgG-ELISA ist daher, bei nur einer Serumprobe, besser geeignet um zwischen akuter Infektion und länger zurückliegender Impfung zu unterscheiden, als der MAT (HARTMAN *et al.*, 1984; CUMBERLAND *et al.*, 1999). Ein IgM-ELISA kann 24 – 48 Stunden vor dem MAT AK nachweisen; dies entspricht Tag 8 bis 10 nach der Infektion (HARTMAN *et al.*, 1984; LEVETT, 2001).

Die Sensitivität von IgG-ELISA zum Nachweis von *Leptospira*-AK wird mit 95,9 % und 96,9 % im Vergleich zum MAT angegeben (DEY *et al.*, 2004; DEY *et al.*, 2007). Die Spezifität mit 93,8 % und 97,3 % (DEY *et al.*, 2004; DEY *et al.*, 2007). In Europa ist ein Schnelltest-IgG-ELISA zum semi-quantitativen Nachweis der Serovare Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae und Pomona

erhältlich (SCHULLER *et al.*, 2015). Diese patientennahen Schnelltests, auch Point-of-care-Test genannt, ermöglichen eine Untersuchung beim Patienten. Die Bedeutung von Point-of-care-Tests zur Leptospirendiagnostik nimmt zu, da sie wenig zeitaufwendig sind (DEY *et al.*, 2007; ABDOEL *et al.*, 2011); sie ermöglichen so eine Diagnose innerhalb weniger Minuten (ABDOEL *et al.*, 2011). Die Sensitivität eines IgM-Schnelltest-ELISA zum Nachweis einer akuten Infektion liegt bei 100 % und die Spezifität bei 95,3 % im Vergleich zu einem IgM/IgG-ELISA der als Referenzmethode verwendet wurde (ABDOEL *et al.*, 2011).

2.1.2.2. Mikroagglutinationstest

Der MAT wurde von MARTIN und PETTIT entwickelt (MARTIN und PETTIT, 1918) und wurde später mehrfach modifiziert (SCHÜFFNER und MOCHTAR, 1926; COLE *et al.*, 1973; WATT *et al.*, 1988a). Die Methode basiert auf der Bildung von mikroskopisch sichtbaren Agglutinaten, die durch Reaktionen zwischen den Serum-AK und den Antigenen der Leptospiren entstehen. Im MAT werden sowohl IgG-AK als auch IgM-AK nachgewiesen (NILOOFA *et al.*, 2015). Eine Unterscheidung zwischen IgG-AK und IgM-AK ist dabei nicht möglich (LEVETT, 2001). Ebenso ist bei diesem Test eine Unterscheidung zwischen Impf-AK und solchen, die infolge einer Infektion produziert wurden, unmöglich (BOLIN, 1996).

Bei diesem Nachweisverfahren wird das zu testende Serum mit einer Suspension lebender oder abgetöteter Leptospiren vermischt. Die entstehenden Agglutinate werden mittels Dunkelfeldmikroskop beurteilt (TURNER, 1968). Der Grad der Agglutination wird anhand der Proportion noch frei vorhandener Leptospiren ermittelt. Er variiert von 100 % (keine freien Leptospiren zwischen den Agglutinaten sichtbar) über unterschiedliche Abstufungen bis zu 0 % (ausschließlich freie Leptospiren und keine Agglutinate sichtbar) (TURNER, 1968).

Bei dem MAT werden zwei Schritte durchgeführt, zum einen ein Screening auf die vorhandenen Serogruppen und zum anderen ein quantitativer Test, um die Höhe der Titer zu ermitteln (TURNER, 1968). Jedes Serum, das eine Agglutination von mindestens 50,0 % der Leptospiren verursacht, wird als positiv beurteilt (TURNER, 1968; LANGSTON und HEUTER, 2003). Im Anschluss

folgt die Quantifizierung mit jeweils zweifacher Verdünnung des Serums (TURNER, 1968). In der Regel werden folgende Verdünnungen untersucht: 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1.600, 1:3.200, 1:6.400, 1:12.800, 1:25.600, 1:51.200, 1:102.400 und 1:240.800. Bei den meisten Laboratorien werden Titer $\geq 1:100$ als positiv angegeben (FAINE, 1982; LEVETT, 2001).

Der MAT ist serogruppen- und nicht serovarspezifisch, da die AK zwischen den einzelnen Serovaren der gleichen Serogruppe stark kreuzreagieren (LEVETT, 2001). Für den MAT werden entweder Serovare verwendet, die in der Region am häufigsten vorkommen, oder repräsentative Serovare aus jeder Serogruppe (WHO, 2003). MAT zur Diagnostik bei Hunden enthalten in der Regel fünf bis acht Serovare (Tabelle 5) (WHO, 2003; SYKES *et al.*, 2011; SCHULLER *et al.*, 2015).

Tabelle 5: Serogruppen mit ihren Serovaren, die in einem Mikroagglutinationstest zur Leptospirendiagnostik bei Hunden in Europa enthalten sein sollten (nach SCHULLER *et al.*, 2015)

| Serogruppe | Serovar |
|---------------------|---------------------|
| Australis | Australis |
| Autumnalis | Autumnalis |
| Canicola | Canicola |
| Grippotyphosa | Grippotyphosa |
| Icterohaemorrhagiae | Copenhageni |
| | Icterohaemorrhagiae |
| Pomona | Pomona |
| Pyrogenes | Pyrogenes |
| Sejroe | Sejroe |

Auch die Zuordnung zu einer Serogruppe ist mittels MAT nicht immer eindeutig möglich. Studien haben gezeigt, dass die durch den MAT ermittelte Serogruppe in weniger als der Hälfte aller Fälle mit der in der Kultur ermittelten Serogruppe übereinstimmt (LEVETT, 2003; MILLER *et al.*, 2011). Erklärungen hierfür sind das Auftreten von Kreuzreaktionen, paradoxen Reaktionen und die Verwendung von verunreinigten Kulturen (MILLER *et al.*, 2011). Kreuzreaktionen entstehen sowohl dadurch, dass der MAT IgM- und IgG-AK nachweist als auch dadurch, dass unterschiedliche Serovare die gleichen Antigene aufweisen können (LEVETT, 2001). Treten höhere Kreuzreaktionstiter gegen Serovare auf, die nicht

an der Infektion beteiligt sind, spricht man von „paradoxen Reaktionen“. Paradoxe Reaktionen findet man häufiger bei frühen Infektionen und wenn viele verschiedene Serovare in der Population vorkommen (LEVETT, 2001; MACIEL *et al.*, 2008; SYKES *et al.*, 2011). Der MAT ist in der Regel zehn bis zwölf Tage nach dem Auftreten der ersten Krankheitsanzeichen positiv. Ein einmalig gemessener AK-Titer lässt jedoch nicht auf das Vorliegen einer Leptospirose schließen. Nur ein vierfacher Titeranstieg (zwei Titer-Stufen) innerhalb von ein bis zwei Wochen, bei einem nicht kürzlich geimpften Tier, ist beweisend für eine akute Infektion (MILLER *et al.*, 2011; FRAUNE *et al.*, 2013). Titer, die durch früheren Erreger-Kontakt, chronische Infektionen oder länger zurückliegende Impfungen entstanden sind, verändern sich nur langsam oder gar nicht (SYKES *et al.*, 2011).

Der MAT kann nicht standardisiert werden, da lebende Leptospirenkulturen benötigt werden und unterschiedliche Faktoren, wie z. B. Alter und Dichte der Antigenkulturen, die Agglutination beeinflussen können (BORG-PETERSEN und FAGROEUS, 1949; CARBREY, 1960). Regelmäßige Qualitätskontrollen sollten durchgeführt werden, um sicher zu gehen, dass die Kulturen der unterschiedlichen Serovare nicht vermischt werden (WHO, 2003; CHAPPEL *et al.*, 2004; CERQUEIRA *et al.*, 2010). Falsch-negative Ergebnisse können auftreten wenn das infizierende Serovar nicht in der Serovar-Auswahl des MAT enthalten ist (SYKES *et al.*, 2011). Falsch-positive Ergebnisse entstehen durch das Vorhandensein von Agglutinaten anderer Ursachen. Dies ist unter anderem dann möglich, wenn sogenannte „Brutnester“ oder Schwebstoffe im Serum vorhanden sind, wobei letztere zu einer Adhäsion der Leptospiren führen können (TURNER, 1968). Dabei werden unter Brutnestern Ansammlungen miteinander verwickelter lebender und toter Leptospiren verstanden (LARSON *et al.*, 1959). Außerdem kann es zu Spontanagglutinationen bei mit Formalin behandelten Suspensionen kommen, was ebenso die Aussagekraft des Ergebnisses beeinflussen kann (TURNER, 1968). Vorteile des MAT sind, dass er weit verbreitet und kostengünstig ist und viele Daten zu seiner Verwendung existieren; dadurch sind Ergebnisse relativ gut miteinander vergleichbar (SYKES *et al.*, 2011).

Die Sensitivität und die Spezifität sind von der gewählten Toleranzgrenze, auch Cut-off genannt, und der gewählten Methode abhängig. Der Cut-off legt fest, ab welchem Wert ein Untersuchungsergebnis als positiv oder negativ bewertet

werden soll (SHARMA und JAIN, 2014). Bezüglich der Sensitivität des MAT mit abgetöteten Leptospiren gibt es widersprüchliche Untersuchungsergebnisse. TURNER (1968) beschreibt eine niedrigere Sensitivität und vermutet eine Interaktion mit dem zum Abtöten verwendeten Formalin (TURNER, 1968). PALMER und Mitarbeiter (1987) konnten bei der Verwendung von abgetöteten Leptospiren hingegen eine höhere Sensitivität nachweisen (PALMER *et al.*, 1987). Dies könnte daran liegen, dass die Agglutinate, die sich durch abgetötete Leptospiren bilden, auffälliger und damit im Dunkelfeldmikroskop besser zu erkennen sind (TURNER, 1968). Tests mit abgetöteten Leptospiren haben zusätzlich den Vorteil, sicherer für das Laborpersonal zu sein (LEVETT, 2001). Eine Studie mit 42 Hunden mit Verdacht auf Leptospirose hat die Sensitivität und Spezifität eines einmalig gemessenen Titers mit der einer Serokonversion (mindestens vierfacher Titeranstieg) verglichen. Die Sensitivität des MAT zum Nachweis einer Infektion bei einem einmalig gemessenen Titer $\geq 1:800$ lag bei 50,0 % im Vergleich zu einem vierfachen Titeranstieg. Die Spezifität lag bei 100 % im Vergleich zu einer Serokonversion (FRAUNE *et al.*, 2013). Die Sensitivität eines Titerpaares mit mindestens 4fachem Anstieg lag bei 100 % und die Spezifität bei 92,0 % (FRAUNE *et al.*, 2013). Eine andere Untersuchung zeigte eine laborabhängige Sensitivität und Spezifität. Die Sensitivität eines einmalig gemessenen Titers $\geq 1:800$ zur Diagnose einer Leptospirose lag hier je nach verwendetem Laboratorium zwischen 22,0 % und 67,0 % im Vergleich zu einem 4fachen Titeranstieg oder einer positiven Urin-PCR (MILLER *et al.*, 2008). Die Spezifität eines einmalig gemessenen Titers $\geq 1:800$ lag zwischen 69,0 % und 100 % (MILLER *et al.*, 2008).

2.2. Humane Leptospirose

Eine Diagnosestellung ist bei der humanen Leptospirose oft schwierig, da die Krankheitssymptome sehr vielfältig sind (GUERRA, 2009). Die gesicherte Diagnose wird mit Hilfe der Kombination aus Anamnese, klinischen Symptomen, labordiagnostischen Veränderungen und einem direkten oder indirekten Erregernachweis gestellt (LEVETT, 2001; GUERRA, 2009).

2.2.1. Direkter Erregernachweis

Ein Nachweis von Leptospiren beim Menschen mittels PCR ist drei bis sieben Tage nach dem Auftreten klinischer Symptome aus Vollblut und nach zehn bis 14

Tagen aus Urin möglich (LEVETT, 2001). Bisher wurden nur wenige PCR-Assays zur Leptospirendiagnostik beim Menschen validiert (PICARDEAU *et al.*, 2014). Die Sensitivität liegt zwischen 43,0 % und 96,4 % und die Spezifität zwischen 87,0 % und 99,5 % im Vergleich zu einer positiven Kultur und/oder MAT (SLACK *et al.*, 2007; THAIPADUNGPANIT *et al.*, 2011). Darüber hinaus ist eine kulturelle Anzucht aus Blut und Urin möglich (LEVETT, 2001). Auf Grund des sehr langsamen Wachstums der Leptospiren ist die Kultur allerdings nicht für den schnellen Nachweis einer Infektion geeignet (GUERRA, 2009).

2.2.2. Indirekter Erregernachweis

In der humanen Leptospirendiagnostik gilt der MAT immer noch als Goldstandard (MUSSO und LA SCOLA, 2013). Ein ELISA kann zunächst als Screeningtest durchgeführt werden, der jedoch im positiven Falle mittels MAT bestätigt werden muss (WHO, 2003). IgM-AK können bereits nach vier bis fünf Tagen nach Infektion mittels ELISA nachgewiesen werden und sind damit drei Tage früher nachweisbar als IgG-AK (SILVA *et al.*, 1995; BAJANI *et al.*, 2003; DOUNGCHAWEE *et al.*, 2008). IgM-ELISA werden vor allem in Endemiegebieten als Point-of-Care Test verwendet, da sie eine hohe Sensitivität und Spezifität zeigen (BAJANI *et al.*, 2003). Die Sensitivität der IgM-Schnelltest-ELISA liegt zwischen 86,5 % und 93,2 % im Vergleich zum MAT (BAJANI *et al.*, 2003). Die Spezifität liegt zwischen 89,6 % und 98,8 % (BAJANI *et al.*, 2003). Außerdem können die Ergebnisse innerhalb weniger Minuten abgelesen und eine Therapie schnellstmöglich begonnen werden (GOARANT *et al.*, 2013).

Für die humane Leptospirendiagnostik werden in der Regel 19 bis 20 Serovare für einen MAT verwendet (Tabelle 6) (WHO, 2003). AK-Titer > 1:200 in einer einzelnen Probe gelten als verdächtig für eine Leptospirose (GUERRA, 2009). In Endemiegebieten wird ein höherer Cut-off empfohlen. Hier finden sich auf Grund früherer Infektionen häufig niedrige Titer innerhalb der gesamten Population (GUERRA, 2009). Ein mindestens vierfacher Titeranstieg zwischen zwei Serumproben innerhalb von zwei Wochen gilt als beweisend für eine akute Infektion (LEVETT, 2001; GUERRA, 2009).

Die Sensitivität des MAT zur Diagnose einer Leptospirose, mit einem Cut-off-Titer > 1:800, liegt in frühen Krankheitsstadien (\leq sieben Tage) bei 30,0 %, in späteren Krankheitsstadien (\geq 15 Tage) bei 89,0 % und in der

Rekonvaleszenzphase bei 76,0 % (CUMBERLAND *et al.*, 1999). Die Spezifität beträgt 95,0 – 100 % (CUMBERLAND *et al.*, 1999; LEVETT und BRANCH, 2002; PALANIAPPAN *et al.*, 2007).

Tabelle 6: Serogruppen mit ihren Serovaren, die in einem Mikroagglutinationstest zur Leptospirendiagnostik beim Menschen enthalten sein sollten (nach WHO, 2003)

MAT = Mikroagglutinationstest

| Serogruppe | Serovar |
|---------------------|---------------------|
| Australis | Australis |
| Autumnalis | Autumnalis |
| Ballum | Castellonis |
| Bataviae | Bataviae |
| Canicola | Canicola |
| Cynopteri | Cynopteri |
| Grippotyphosa | Grippotyphosa |
| Hebdomadis | Hebdomadis |
| Icterohaemorrhagiae | Copenhageni |
| | Icterohaemorrhagiae |
| Javanica | Javanica |
| Panama | Panama |
| Pomona | Pomona |
| Pyrogenes | Pyrogenes |
| Sejroe | Hardjo |
| | Sejroe |
| | Wolffi |
| Tarassovi | Tarassovi |
| Semaranga | Patoc |

3. Prophylaxe

Da es sich bei der Leptospirose um eine potenziell tödlich verlaufende Infektionskrankheit handelt, sollten geeignete Maßnahmen zur Prophylaxe getroffen werden. Die Aufklärung von Risikogruppen, insbesondere Tierhaltern, denen die Rolle von Haustieren als Infektionsquelle häufig nicht bewusst ist, ist hierbei besonders wichtig (DAMBORG *et al.*, 2015). Studien haben gezeigt, dass ein hoher Prozentsatz von Tierhaltern (33,0 – 40,0 %) ihren Haustierarzt als wichtigste Quelle für Aufklärung bezüglich Zoonosen angeben (PFUKENYI *et*

al., 2010; SANDHU und SINGH, 2014). Eine Studie aus den USA befasste sich mit dem Kenntnisstand von Tierheim-Mitarbeitern im Hinblick auf Zoonosen. Diese Studie ergab, dass das geringste Wissen über Ansteckungswege beim Menschen und beim Tier sowie bezüglich empfänglicher Arten und klinischer Symptome über Leptospirose vorhanden war (STENERODEN *et al.*, 2011). In einer anderen Studie aus den USA gaben 80,0 % der Hundehalter an, ihre Tiere nicht gegen Leptospirose impfen zu lassen (SANDHU und SINGH, 2014). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Aufklärung über das Zoonosepotenzial von Leptospirose sehr wichtig ist.

3.1. Prophylaxe beim Hund

In der Veterinärmedizin werden inaktivierte Impfstoffe gegen Leptospirose zur Prophylaxe eingesetzt (LEVETT, 2001). Die Immunität, die sich gegen Leptospiren bildet, ist überwiegend humoral und Serogruppen-spezifisch (ADLER und FAINE, 1977). Daher ist es wichtig, dass die eingesetzten Impfstoffe die in der Region üblichen Serogruppen enthalten (LEVETT, 2001). Weltweit gibt es verschiedene mono-, bi-, tri- und quadrivalente Einzelimpfstoffe, sowie eine Vielzahl an Kombinationsvakzinen. In Deutschland sind Leptospirose-Impfstoffe für Rinder und Hunde zugelassen (PAUL-EHRLICH-INSTITUT, 2016). Die Tabelle 7 zeigt die für Hunde in Deutschland zugelassenen Einzelimpfstoffe gegen Leptospirose.

Nach den Leitlinien der ständigen Impfkommision Veterinär (StIKo Vet) in Deutschland gehört die Leptospiroseimpfung beim Hund zu den sogenannten Core-Komponenten. Core-Komponenten sind Krankheiten, gegen die Hunde immer geimpft sein sollten. Für einen möglichst umfassenden Impfschutz sollte ein quadrivalenter Impfstoff verwendet werden (STIKO VET, 2013). Die Grundimmunisierung besteht aus einer zweiphasigen Impfung im Abstand von drei bis vier Wochen ab der achten Lebenswoche. Abschließend erfolgt eine weitere Impfung nach zwölf Monaten. Anschließend wird eine jährliche, in Endemiegebieten sogar halbjährliche, Wiederholungsimpfung empfohlen (STIKO VET, 2013).

Tabelle 7: In Deutschland für Hunde zugelassene Einzelimpfstoffe gegen Leptospirose

| Impfstoffname | Serovar | Zulassungsinhaber |
|--------------------------------|--|--------------------------------|
| Eurican [®] L | Icterohaemorrhagiae Canicola | MERIAL GmbH |
| Eurican [®] Lmulti | Icterohaemorrhagiae Canicola Grippotyphosa | MERIAL GmbH |
| Nobivac [®] Lepto | Icterohaemorrhagiae Canicola | MSD Tiergesundheit Deutschland |
| Nobivac [®] L4 | Icterohaemorrhagiae Canicola Bratislava Grippotyphosa | MSD Tiergesundheit Deutschland |
| Vanguard [®] Lepto ci | Icterohaemorrhagiae Canicola | Zoetis Deutschland GmbH |
| Versican [®] L3 | Icterohaemorrhagiae Canicola Grippotyphosa | Zoetis Deutschland GmbH |
| Versican [®] Plus L4 | Icterohaemorrhagiae Canicola Grippotyphosa Bratislava | Zoetis Belgium SA |
| Virbagen [®] Lepto | Icterohaemorrhagiae Canicola | VIRBAC Tierarzneimittel GmbH |

3.2. Prophylaxe beim Menschen

Impfungen beim Menschen sind ebenfalls möglich. 1978 wurde in China ein bivalenter Impfstoff entwickelt, über dessen Wirksamkeit im Jahr 2003 eine Studie veröffentlicht wurde. In einem Gebiet in dem Leptospirose endemisch ist, wurden in der Landwirtschaft arbeitende Menschen in zwei Gruppen aufgeteilt. Die eine Gruppe erhielt einen bivalenten Impfstoff (Icterohaemorrhagiae und Hebdomadis), die Kontrollgruppe wurde nicht geimpft. Eine erfolgreiche Impfung bestand bei einem vierfachen Titeranstieg vier Wochen nach der Impfung; ein Titer $\geq 1:20$ wurde als protektiv gewertet. Eine erfolgreiche Impfung gegen Icterohaemorrhagiae lag bei 79,2 % der Menschen und gegen Hebdomadis bei

77,9 % der Menschen vor (YAN *et al.*, 2003). Die Protektionsrate lag bei beiden Serogruppen bei 100 %. Die Effektivität der Impfung wurde aus der Inzidenz einer Leptospirose bei ungeimpften *versus* geimpften Studienteilnehmern errechnet und lag bei 75,2 % (YAN *et al.*, 2003). In Frankreich ist ein monovalenter Impfstoff für den Menschen zugelassen (LEVETT, 2001; RODRIGUEZ-GONZALEZ *et al.*, 2004). In Kuba wurde ein trivalenter Impfstoff entwickelt (MARTINEZ SANCHEZ *et al.*, 1998). Der Anteil der Menschen, der AK nach einer Impfung mit vax-SPIRAL® bildeten, lag bei 29,0 % (MARTINEZ SANCHEZ *et al.*, 1998). Tabelle 8 zeigt die weltweit für den Menschen zugelassenen Impfstoffe gegen Leptospirose.

Tabelle 8: Für den Menschen zugelassene Impfstoffe gegen Leptospirose und die darin enthaltenen Serovare

| Impfstoffname | Serogruppe/Serovar | Zulassungsort |
|------------------------------|---|---------------|
| vax-SPIRAL® | Canicola/Canicola Icterohaemorrhagiae/Copenhageni Pomona/Mozdok | Kuba |
| SPIROLET® | Icterohaemorrhagiae/Icterohaemorrhagiae | Frankreich |
| (kein Handelsname vorhanden) | Icterohaemorrhagiae/Icterohaemorrhagiae Hebdomadis/Hebdomadis | China |

Als Kurzzeit-Prophylaxe in Hochrisikogebieten, wie z. B. auf den Andamanen Inseln, wird eine Doxycyclingabe (200 mg oral pro Erwachsener, einmal wöchentlich) empfohlen (TAKAFUJI *et al.*, 1984; GONSALEZ *et al.*, 1998; SEHGAL *et al.*, 2000). Durch die prophylaktische Gabe von Doxycyclin wurde beispielsweise das Risiko von Soldaten in Panama an Leptospirose zu erkranken von 4,9 auf 0,6 % gesenkt (GUIDUGLI *et al.*, 2000).

Weitere prophylaktische Maßnahmen sind das Vermeiden von Hautkontakt zu kontaminiertem Wasser sowie von Trinken von nicht aufbereitetem Wasser in Risikogebieten (KOUTIS, 2007; ZAVITSANOOU und BABATSIKOU, 2008). Das Abkochen des Trinkwassers stellt eine effektive Maßnahme zum Abtöten von Leptospiren dar (SCHOENEN, 2002). Eine Dezimierung von Ratten und Mäusen kann ebenfalls zu einer reduzierten Ansteckung führen (FAINE, 1982). Bei den Hauptrisikogruppen (z. B. Landwirte) können verschiedene Maßnahmen zum

Schutz vor einer Ansteckung ergriffen werden. Diese Schutzmaßnahmen umfassen das Tragen von wasserfesten Schuhen und Handschuhen bei der Arbeit mit potenziell infektiösem Material (KOUTIS, 2007; ZAVITSANOU und BABATSIKOU, 2008). Für Tierärzte wird eine regelmäßige und gründliche Handhygiene und, falls nötig, das Tragen von Handschuhen, Mundschutz, Schutzbrille und Schutzkleidung empfohlen (NASPHV, 2010). In jedem Fall sollen Handschuhe bei Kontakt zu potenziell infizierten Tieren und bei Kontakt mit Urin, Kot, Körperflüssigkeiten, Blut, Se- und Exkreten und Exsudaten getragen werden (NASPHV, 2010). Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) gab 2014 eine Mitteilung heraus, demzufolge insbesondere Menschen aus Risikogruppen beim Auftreten unklarer fieberhafter Erkrankungen frühzeitig an eine Leptospirose denken und einen Arzt konsultieren sollten (BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG, 2014).

III. PUBLIKATION

Urinary shedding of leptospire and presence of *Leptospira* antibodies in healthy dogs from Upper Bavaria

Julia-Rebecca Llewellyn

Clinic of Small Animal Internal Medicine, Ludwig-Maximilians-Universitaet Munich, Veterinaerstrasse 13, 80539 Munich, Germany

Inke Krupka-Dyachenko, Dr. med. vet.

Bacteriology and Mycology, Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, Department of Veterinary Sciences, Ludwig-Maximilians-Universitaet Munich, Veterinaerstrasse 13, 80539 Munich, Germany

Anna Rettinger, Dr. med. vet.

Bacteriology and Mycology, Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, Department of Veterinary Sciences, Ludwig-Maximilians-Universitaet Munich, Veterinaerstrasse 13, 80539 Munich, Germany

Viktor Dyachenko, Dr. med. vet.

Bacteriology and Mycology, Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, Department of Veterinary Sciences, Ludwig-Maximilians-Universitaet Munich, Veterinaerstrasse 13, 80539 Munich, Germany

Ivonne Stamm, Dr. med. vet.

Vet Med Labor GmbH, Division of IDEXX Laboratories, Moerikestraße 28/3, 71636 Ludwigsburg, Germany

Peter Kopp, Dr. med. vet.

Vet Med Labor GmbH, Division of IDEXX Laboratories, Moerikestraße 28/3, 71636 Ludwigsburg, Germany

Reinhard Straubinger, Prof., Dr. med. vet.

Bacteriology and Mycology, Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, Department of Veterinary Sciences, Ludwig-Maximilians-Universitaet Munich, Veterinaerstrasse 13, 80539 Munich, Germany

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

Department of Small Animal Medicine, Ludwig-Maximilians-Universitaet Munich, Veterinaerstrasse 13, 80539 Munich, Germany

Publikation in der Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift

Berl Münch Tierärztl Wochenschr 129, 251 – 257 (2016)

Berl Münch Tierärztl Wochenschr 129,
Seitenzahlen noch nicht bekannt (2016)
DOI Noch nicht bekannt

© 2016 Schlütersche
Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG
ISSN 0005-9366

Korrespondenzadresse:
julia.r.llewellyn@googlemail.com

Eingegangen: 16.06.2015
Angenommen: 20.10.2015

Clinic of Small Animal Internal Medicine, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany¹
Bacteriology and Mycology, Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, Department of Veterinary Sciences, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany²
Vet Med Labor GmbH, Division of IDEXX Laboratories³

Urinary shedding of leptospire and presence of *Leptospira* antibodies in healthy dogs from Upper Bavaria

Ausscheidung von Leptospiren im Urin und Vorkommen von Leptospira-Antikörpern bei gesunden Hunden aus Oberbayern

Julia-Rebecca Llewellyn¹, Inke Krupka-Dyachenko², Anna Lena Rettinger², Viktor Dyachenko², Ivonne Stamm³, Peter Andreas Kopp³, Reinhard Konrad Straubinger², Katrin Hartmann¹

Summary

Leptospirosis is classified as a re-emerging zoonotic disease with global importance. The aim of this study was to determine urinary shedding of leptospire species in healthy dogs and to identify the shedded leptospire species. Furthermore, antibody presence against leptospire species was evaluated. In a prospective study urine samples of 200 healthy dogs from Upper Bavaria were randomly collected and evaluated by real-time polymerase chain reaction (PCR) specific for the *lipL32* gene of pathogenic *Leptospira* (*L.*) spp. Positive samples were further characterized via multilocus sequence typing (MLST) to identify the *Leptospira* species. Microagglutination test (MAT) was performed to determine serum antibody titers. Three of 200 urine samples were found to be PCR-positive resulting in a urinary shedding prevalence of 1.5% (95% confidence interval 0.3–4.5%). All three dogs had been vaccinated before with a bivalent vaccine, covering the serogroups Canicola and Icterohaemorrhagiae. One dog shed leptospire of the species *L. borgpetersenii*, and two of the species *L. interrogans*. Of all dogs, 17.0% had antibody titers \geq 1:100, and 3.5% titers \geq 1:400 to serovars of non-vaccinal serogroups.

Healthy dogs that shed leptospire represent a possible risk for humans and other animals. The study emphasizes the importance of general hygiene measures in veterinary practice while handling urine of all dogs, and the use of vaccines that protect against a broader range of serogroups and that prevent urinary shedding.

Keywords: canine leptospirosis, leptospiuria, microagglutination test

Zusammenfassung

Leptospirose ist eine „Re-emerging“-Zoonose mit globaler Bedeutung. Das Ziel dieser Studie war es, die Ausscheidung von Leptospiren im Urin von gesunden Hunden zu ermitteln und die Spezies der ausgeschiedenen Leptospiren zu bestimmen. Zusätzlich wurde die Antikörperprävalenz gegen Leptospiren ermittelt. Im Rahmen einer prospektiven Studie wurden Urinproben von 200 gesunden Hunden aus Oberbayern randomisiert gesammelt und mittels einer real-time Polymerase-Kettenreaktion (PCR), die spezifisch für das *lipL32* Gen von pathogenen *Leptospira* spp. ist, untersucht. Positive Proben wurden mittels Multilocus Sequenzanalyse (MLST) auf die *Leptospira*-Spezies untersucht. Zusätzlich wurden Antikörper mittels Mikroagglutinationstest (MAT) nachgewiesen.

Drei von 200 Urinproben waren in der PCR positiv, die Prävalenz der Leptospiroseauscheidung lag damit bei 1,5 % (95 % Konfidenzintervall 0,3–4,5 %). Alle drei Hunde waren zuvor mit einem bivalenten Impfstoff, der die Serogruppen Canicola und Icterohaemorrhagiae enthielt, geimpft. Ein Hund schied Leptospiren der Genospezies *L. borgpetersenii* und zwei Hunde der Genospezies *L. interrogans* aus. Von allen Hunden hatten 17,0 % Antikörpertiter \geq 1:100, und 3,5 % Antikörpertiter \geq 1:400 gegen Serogruppen, die nicht in Impfstoffen enthalten waren.

U.S. Copyright Clearance Center
Code Statement:
0005-9366/2016/12905 \$ 15.00/0

Gesunde Hunde, die Leptospiren ausscheiden, stellen ein mögliches Risiko für die Gesundheit von Menschen und anderen Tieren dar. Diese Studie unterstreicht die Wichtigkeit von generellen Hygienemaßnahmen in der tierärztlichen Praxis beim Arbeiten mit Hundeurin und die Verwendung von Impfstoffen die gegen ein breiteres Spektrum an Serogruppen und vor der Ausscheidung über den Urin schützen.

Schlüsselwörter: Canine Leptospirose, Leptospirurie, Mikroagglutinationstest

Introduction

Leptospirosis is one of the most widespread zoonotic diseases in the world and has been recognized as a re-emerging infectious disease in humans as well as in dogs (Levett, 2001; Langston and Heuter, 2003). Pathogenic *Leptospira* spp. cause a broad spectrum of clinical signs in dogs, which range from asymptomatic forms to severe diseases with high mortality (Langston and Heuter, 2003). Contact to dogs is reported as a risk factor for human infection (Weekes et al., 1997; Levett, 2001; Jansen et al., 2005; Hoenigl et al., 2014). Asymptomatic as well as sick dogs can shed leptospires in their urine and can be responsible for environmental contamination and infection of their owners (Levett, 2001). Human as well as canine leptospirosis is of growing importance in Germany (Geier-Doemling et al., 2003; Jansen et al., 2005). *Leptospira* spp. are widespread in the German wildlife population, e. g., with antibody prevalences of 24.0% in wild boars, and 2.0% in foxes (Muller and Winkler, 1994; Schönberg et al., 1999; Geier-Doemling et al., 2003) and leptospiral DNA found in 10.0% of rodents and small mammals (Mayer-Scholl et al., 2014). These species serve as maintenance hosts or reservoirs. Based on antibody detection in the microagglutination test (MAT) in dogs with suspected leptospirosis, the serogroups of importance in Germany are assumed to be Bratislava, Grippotyphosa, Saxkoebing, Sejroe, and Pomona (Geier-Doemling et al., 2003; Gerlach and Stephan, 2007; Geisen et al., 2008). The most common serogroups in dogs suspicious for leptospirosis in Germany belong to the species *L. interrogans* (Australis, Pomona), *L. kirschneri* (Grippotyphosa), and *L. borgpetersenii* (Saxkoebing, Sejroe) (Geisen et al., 2007; Gerlach and Stephan, 2007).

Recently, it was shown that 7.1% of dogs in Ireland (Rojas et al., 2010) and 8.2% of dogs in the United States (Harkin et al., 2003b) shed leptospiral organisms in their urine. The prevalence of asymptotically infected and *Leptospira*-shedding dogs in Germany is unknown. Therefore, the aim of this study was to evaluate urinary shedding of leptospiral organisms in healthy dogs from Upper Bavaria using real-time PCR. Multilocus sequence typing was applied to identify the species of the shed leptospires. In addition, prevalence of antibodies against leptospires in healthy dogs was assessed using MAT.

Material and Methods

Dogs

200 healthy dogs that were presented to the Clinic of Small Animal Internal Medicine, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany, and to the Small Animal Hospital Ismaning, Germany, were included in this

study. The dogs were randomly selected. Dogs were presented for routine preanesthetic examination or a routine health check, and had blood and urine samples drawn for these purposes. Health status was determined based on the results of physical examination and history. Dogs with a history of any disease or that had received antibiotics within four weeks prior to presentation were excluded from the study.

The study population consisted of 72 crossbreed dogs and 128 pure breeds, with the most common breeds represented by Siberian Huskies (n = 18), Labrador Retrievers (n = 15), Golden Retrievers (n = 8), Flat Coated Retrievers (n = 6), and Australian Shepherds (n = 5). 105 dogs were female (55 neutered), and 95 male (34 neutered) with a median age of 4.9 years (range: 0.5–16 years).

The vaccination status of the study population was known in 145 out of 200 dogs; 144 of the 145 dogs had been vaccinated previously with a bivalent vaccine (Canicola and Icterohaemorrhagiae) against leptospirosis within the last year.

Sample collection

A complete blood count (CBC) and a serum biochemical panel, including urea, creatinine as well as alkaline phosphatase (ALP) and alanine transaminase (ALT) activities were evaluated. Serum samples were stored at –20°C until determination of *Leptospira* antibody titers by MAT.

Urine samples were collected by cystocentesis (n = 77) or free-catch (n = 123), with sample volumes of a minimum of 10.0 ml and a maximum of 30.0 ml. Urinalysis was performed on all samples, including urine specific gravity, dipstick, and microscopic sediment analysis. Urine was stored at 4°C for a maximum of 24 hours. Polycarbonate screw cap bottles (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) with a maximal filling volume of 40.0 ml were used to centrifuge the collected urine. Urine samples were centrifuged at 13 000 x g for 10 minutes, the supernatant was discharged, and the pellets were transferred into 1.5-ml tubes (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Samples were centrifuged a second time at 13 000 x g for 10 minutes to separate and remove the remaining urine. The resulting pellets were re-suspended in 180 µl animal tissue lysis (ATL) buffer (Qiagen, Hilden, Germany) and stored at –20°C until further preparation.

DNA extraction

DNA from urine pellets was extracted with the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions but applying an extended incubation time of 90 minutes and 54.0 µl AE buffer (Qiagen, Hilden, Germany) to elute isolated DNA. A negative control for the extraction (sterile water) was included in each process batch of ten samples. DNA

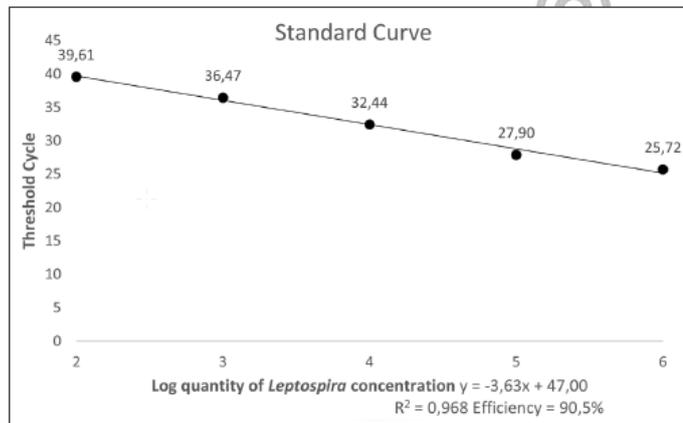


FIGURE 1: Analytical sensitivity of the *lipL32* real-time polymerase chain reaction assay with DNA extracted from ten-fold serial dilutions of *Leptospira interrogans* serovars *Canicola* and *Icterohaemorrhagiae* diluted in negative dog urine. The standard curve graph associated with the amplification are shown. The assay was performed with a range of 1.0×10^6 to 1.0×10^1 leptospires/ml of extracted DNA as template. No amplification was detected in reaction of 1.0×10^1 leptospires/ml.

concentrations were quantified using a spectrophotometer (NanoDrop ND-1000, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany).

Quantification of *Leptospira* spp. organisms

A standard curve was generated by spiking a urine sample of a dog not infected with *Leptospira* with known numbers of *Leptospira interrogans* organisms belonging to the serogroups *Icterohaemorrhagiae* and *Canicola* (Fig. 1). The dog was antibody-negative by MAT and was euthanized due to a hemangiosarcoma. At necropsy the dog showed no signs of liver or kidney disease. The concentration of both *Leptospira* serovars in a six-week-old culture in liquid Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris Medium (EMJH, Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) was determined using a Petroff-Hausser Chamber (EMS, Hatfield, Pennsylvania).

TABLE 1: Signalment, vaccination status (all dogs were vaccinated with vaccines containing *Canicola* and *Icterohaemorrhagiae*), reasons for presentation at the clinic, and microagglutination test titers of urine PCR-positive dogs

| No. | Breed | Gender | Age (years) | Last vaccination against leptospirosis | Reasons for presentation | MAT titer |
|-----|--------------------|-----------------|-------------|--|--------------------------|--|
| 1 | Irish Setter | female neutered | 2 | 11 months before presentation, previously yearly | hip radiographs | 1:100 Australis, 1:100 Icterohaemorrhagiae |
| 2 | Jack Russell | female | 6 | 14 months before presentation, previously yearly | neutering | 1:1,600 Icterohaemorrhagiae, 1:200 Grippotyphosa, 1:200 Sejroe, 1:400 Canicola |
| 3 | Ratonero Bodeguero | male neutered | 4 | 2 months before presentation, previously yearly | routine health check | negative |

A mix of equal volumes of *Leptospira* from serogroups *Icterohaemorrhagiae* and *Canicola* was prepared by adding the appropriate number of leptospires into 1.0 ml urine, so that the final concentration was 1×10^6 leptospires per ml. Ten-fold dilutions were prepared. DNA was extracted as described above.

Real-time PCR

The PCR assay was designed to amplify the *lipL32* gene of pathogenic *Leptospira* spp. The TaqMan protocol and primers (forward primer, 5'-AAG CAT TAC CGC TTG TGG TG-3'; reverse primer, 5'-GAA CTC CCA TTT CAG CGA TT-3'; probe, FAM-5'-AA AGC CAG GAC AAG CGC CG-3'-BHQ1) described by Stoddard et al. (2009) was used. Specificity of primers and probe was confirmed by BLAST (see: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi> [accessed 13 January 2012]; Altschul et al., 1997). The real-time PCR was performed using the Mx3000P and the Mx3005P cycler (Stratagene, Agilent Technologies GmbH & Co. KG, Waldbronn, Germany) and TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Final reaction conditions were 900 nmol/l of each primer, 400 nmol/l of the probe, 2.5 µl of DNA extract from spiked or clinical specimens in a final volume of 25.0 µl. The amplification protocol consisted of 2 minutes at 50°C, then 10 minutes at 95°C, followed by 45 cycles of amplification (95°C for 15 seconds and 60°C for 60 seconds), finishing with a cooling cycle at 25°C for 10 minutes. Each urine sample was tested in triplicates and each dilution of the standard curve in duplicates. Each run included a negative control.

The assay allowed the detection of 1×10^2 leptospires/ml in urine with a Ct value of 39.6 (Fig. 1). A sample was considered positive if three out of three assay results were positive in the triplicate test, and if Ct values were < 39.0. All PCR controls, that contained no *Leptospira* organisms, tested negative. Assay optimization comprising evaluation of the primer concentrations (forward and reverse) for a given template, testing different probe concentrations and different annealing temperatures, did not improve the efficiency of the assay.

Genotyping

Genotyping was performed on the basis of MLST targeting six genes as described by Ahmed et al. (2006). In this MLST, six target genes are included, namely *adk* (adenylate kinase), *icdA* (isocitrate dehydrogenase), *lipL32* (outer membrane lipoprotein *lipL32*), *rns2* (16S rRNA), *secY* (pre-protein translocase SecY protein), and *lipL41* (outer membrane Lipoprotein LipL41). Amplifications were performed using the Master

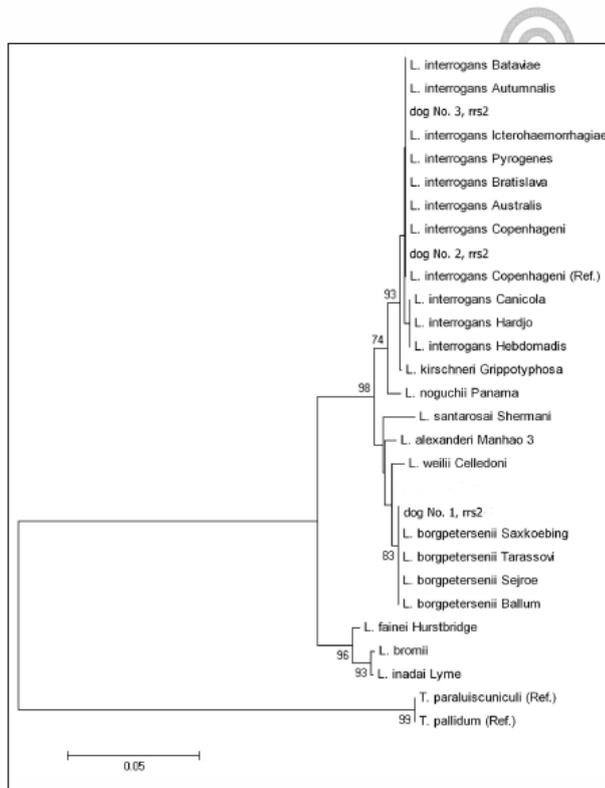


FIGURE 2: Neighbor Joining tree based on *rrs2* gene sequence. The bar indicates 0.05 estimated substitution per sequence position. Neighbor Joining trees were constructed for each gene and for each leptospiral strain according to Ahmed et al. (2006). Dog No. 1 clusters within the genomospecies *L. borgpetersenii*. Dog No. 2 and dog No. 3 are clustered within the genomospecies *L. interrogans*.

Cycler pro system (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) and the following reaction conditions: 15 mM MgCl₂ (included in the 10 x standard reaction buffer, NEB, Frankfurt am Main, Germany), 0.3 pmol of each primer, 0.2 mM dNTPs (NEB), 1 U Taq DNA Polymerase (NEB), and 5.0 µl template DNA in a total volume of 50 µl. The amplification protocol consisted of 5 minutes at 95°C, followed by 35 cycles of amplification (94°C for 30 seconds and 58°C for 30 seconds, 72°C for 60 seconds), finishing with 7 minutes at 72°C. The amplification products were visualized by gel electrophoresis in 1.6% agarose gels and purified using the peqGOLD Gel Extraction kit (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany) according to the manufacturer's instructions. Purified PCR products were sequenced by Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany). For sequencing DNA was diluted to a final concentration of 5.0 ng/µl. Sequence analyses were performed using the software MEGA 4 and Neighbor Joining trees were constructed for each gene and each positive sample according to Ahmed et al. (2006). Figure 2 shows a representative of these Neighbor Joining trees, the *rrs2* gene displays a housekeeping gene.

Microagglutination test (MAT)

The MAT was performed as described by Cole et al. (1973). Serum samples were analyzed for antibodies against eight locally common *Leptospira* serovars: Australis (serogroup Australis), Autumnalis (serogroup Autumnalis), Bratislava (serogroup Australis), Canicola (serogroup Canicola), Copenhageni (serogroup Icterohaemorrhagiae), Grippotyphosa (serogroup Grippotyphosa), Pomona (serogroup Pomona), and Saxkoebing (serogroup Sejroe). Two-fold dilutions of serum from 1:100 to 1:6400 were tested with the MAT, and the titer was recorded as the reciprocal of the highest dilution of serum that agglutinated more than 50.0% of the leptospire.

Statistical methods

An a priori power analysis using GraphPad StatMate (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) was performed to determine an appropriate sample size to achieve adequate power. A prevalence of urinary shedding of leptospire of between 3.5% and 7.0% was expected, and a confidence level of 95% was used. The a priori power analysis showed that a sample size of 200 dogs would be necessary to achieve adequate power (> 90.0%). Data were recorded on-site using a commercial spreadsheet program (Excel 2010, Microsoft, Redmond, USA). Confidence intervals were calculated using the GraphPad QuickCalcs website (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/ConfInterval1.cfm> [accessed September 2012]; GraphPad Software Inc., La Jolla, USA). Statistical significance was set as $p \leq 0.05$.

Results

Leptospira spp. shedding

Leptospiral DNA was amplified in urine samples from three out of 200 dogs. Thus prevalence of urinary shedding in healthy dogs was 1.5% (95%; CI 0.3–4.5%). Leptospire found in urine samples belonged to *L. borgpetersenii* (one dog) and *L. interrogans* (two dogs; Tab. 2). All three dogs had been vaccinated against leptospirosis (with vaccines that contain the serogroups Canicola and Icterohaemorrhagiae). CBC, serum biochemical panel, and urinalysis in all three dogs were unremarkable.

Antibody detection

MAT testing revealed antibody titers of $\geq 1:100$ to any serogroup in 94 dogs (47.0%; 95% CI 40.2–53.9%), and titers of $\geq 1:400$ in 19 dogs (9.5%; 95% CI 6.1–14.4%; Tab. 3). Titers of $\geq 1:100$ to non-vaccinal serogroups were present in 34 animals (17.0%; 95% CI 12.3–22.8%); whereas titers of $\geq 1:400$ to non-vaccinal serogroups were found in seven dogs (3.5%; 95% CI 1.5–7.1%; Tab. 3). 106 dogs (53.0%) had no antibodies against *Leptospira* spp.

Of the PCR-positive dogs, dog No 1 had antibody titers of 1:100 against serogroup Australis and Icterohaemorrhagiae (Tab. 1). Dog No 2 had antibody titers of 1:1,600 against serogroup Icterohaemorrhagiae, 1:200 against Grippotyphosa and Sejroe and 1:400 against Canicola (Tab. 1). Dog No 3 had no detectable antibodies (Tab. 1).

TABLE 2: Extracted DNA, Ct values, leptospire/ml, and *Leptospira* species based on MLST results of urine PCR-positive dogs

| No. | Extracted DNA | Ct value | Leptospire/ml | <i>Leptospira</i> species |
|-----|---------------|----------|------------------------|---------------------------|
| 1 | 3.9 ng/µl | 35.67 | 2.57 x 10 ⁶ | <i>L. borgpetersenii</i> |
| 2 | 20.9 ng/µl | 24.70 | 2.03 x 10 ⁹ | <i>L. interrogans</i> |
| 3 | 1.9 ng/µl | 24.08 | 1.73 x 10 ⁹ | <i>L. interrogans</i> |

One dog (one year old, male castrated crossbreed) was highly suspicious for an acute infection with *Leptospira* based on MAT results. This dog had an antibody titer against Grippotyphosa of ≥ 1:6,400, but was negative for leptospiral DNA in the urine sample. This dog was presented for a routine health check and was vaccinated against leptospirosis four months prior to presentation.

Discussion

There is evidence for an increasing number of dogs with leptospirosis in Germany (Jansen et al., 2005), but the role of infected dogs with no clinical signs as a source of environmental contamination is unknown. No studies evaluating the antibody prevalence or the urinary *Leptospira* shedding in healthy dogs from Germany are available so far. This study detected shedding of leptospire in 1.5% of healthy dogs from Upper Bavaria. This finding is of high relevance as leptospirosis is a zoonotic disease. Infection of humans with leptospire usually occurs via abrasions or cuts in the skin or the conjunctiva (Levett, 2001). Studies from Central Europe and Barbados report activities in the woods, wet areas, gardening, and exposure to rodents (17.0% and 46.0%), as well as contact with dogs (7.0% and 18.0%) as risk factors for human leptospirosis (Douglin et al., 1997; Jansen et al., 2005; Hoenigl et al., 2014). The survival of leptospire in undiluted dog urine is limited due to the low pH of the urine (Levett, 2001). However, leptospire can survive for weeks or even months in moist soil and water after excretion in the urine (Twiggg et al., 1969; Karaseva et al., 1973; Trueba et al., 2004). A leptospirosis outbreak among strawberry harvester in Germany 2007 occurred due to contact between wounds on hands and water-logged soil contaminated by vole urine (Desai et al., 2009). Many

dogs urinate in their owners' garden, so one can speculate that the same route of transmission may be possible through gardening. Also puppies seem to be at greater risk of getting leptospirosis (Major et al., 2014). While they are not house-trained, it is more likely for dog owners to have direct contact with their urine.

Duration and intensity of urinary shedding vary from dog to dog and with the infecting serogroup and can be intermittent (van de Maele et al., 2008). Therefore, false-negative results are possible. Despite intermittent shedding, urine is a useful sample to test for leptospire, because urinary shedding occurs before antibody titers reach detectable levels, and there are a number of studies suggesting that antibody-negative dogs can actively shed leptospire (Turner, 1969; Feigin et al., 1973; Clegg and Heath, 1975; Levett, 2003). Several PCR assays to detect leptospiruria have been described (Bal et al., 1994; Harkin et al., 2003a; Stoddard et al., 2009; Rojas et al., 2010). Some studies used a real-time PCR technique to detect the *lipL32* gene (Stoddard et al., 2009; Rojas et al., 2010). The *lipL32* gene encodes the most abundant cell surface protein in pathogenic *Leptospira* spp., which is not present in non-pathogenic species (Haake et al., 2000; Cullen et al., 2002; Yang et al., 2002; Cullen et al., 2005). In the present study, this PCR was chosen because it is highly sensitive to detect leptospire in urine samples (Stoddard et al., 2009). The assay used in this study was able to detect as low as 100 leptospire per ml urine, demonstrating a good sensitivity. In the present study, the relatively high Ct value of < 39.0 was chosen, because even low numbers of pathogenic leptospire can cause an infection, and shedding occurs intermittently. The specificity of the assay had been determined when the assay was first published, and was 100% for pathogenic *Leptospira* spp. (Stoddard et al., 2009). In the three *Leptospira* shedding dogs false-positive results are unlikely, since MLST results were positive as well and showed antigenetic variation. However, prevalence of urinary shedding of leptospire reported in this study is lower than the 7.1% of urine PCR-positive animals previously reported in Ireland (Rojas et al., 2010) and the 8.2% reported in the United States (Harkin et al., 2003b). The most likely reason for this difference is that in the present study all dogs were healthy, whereas dogs in Ireland and the United States were presented to a small animal hospital because of different diseases. In these patients, likelihood of leptospirosis was probably higher. It is also possible that the

TABLE 3: Number and percentage of dogs with serogroup-specific antibody titers among 200 clinically healthy dogs; some dogs had titers to more than one serogroup

| Serogroup | Titer | | | | | | | | | Total of dogs with titer ≥ 1:100 | Percentage of dogs with titer ≥ 1:100 (95% CI) ^a | Total of dogs with titer ≥ 1:400 | Percentage of dogs with titer ≥ 1:400 (95% CI) ^a |
|--|------------------|--------|--------|--------|--------|----------|----------|----------|---|----------------------------------|---|----------------------------------|---|
| | 1:100 < negative | 1: 100 | 1: 200 | 1: 400 | 1: 800 | 1: 1,600 | 1: 3,200 | 1: 6,400 | | | | | |
| Australis | 190 | 8 | 5 | 4 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 | 10.0% (6.5–15.0) | 7 | 3.5% (1.5–7.2) |
| Autumnalis | 197 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1.5% (0.3–4.5) | 1 | 0.5% (0–3.0) |
| Canicola | 183 | 10 | 4 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 17 | 8.5% (5.3–13.3) | 3 | 1.5% (0.3–4.5) |
| Grippotyphosa | 177 | 8 | 13 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 23 | 11.5% (7.7–16.7) | 2 | 1.0% (0.04–3.8) |
| Icterohaemorrhagiae | 128 | 43 | 18 | 7 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 72 | 36.0% (29.6–42.9) | 11 | 5.5% (3.0–9.7) |
| Pomona | 199 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0.5% (0–3) | 1 | 0.5% (0–3.0) |
| Sejroe | 193 | 3 | 1 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 3.5% (1.5–7.2) | 3 | 1.5% (0.3–4.5) |
| Total | 106 | 74 | 41 | 19 | 7 | 1 | 0 | 1 | | | | | |
| Number of dogs with titers against non-vaccinal serogroups | | 14 | 13 | 3 | 3 | 0 | 0 | 1 | | 34 | 17.0% (12.3–22.8) | 7 | 3.5% (1.5–7.1) |

^a95% CI, 95% Confidence Interval

prevalence of infection in these countries is higher than in Germany due to the different local climate conditions and different vaccination strategies.

Results of PCR and MAT differ in many animals. In a clinical setting, diagnosis of leptospirosis is usually based on detecting antibodies based on MAT. In this context it is important to stress the fact that the MAT is a serogroup- and not a serovar-specific test (Levett, 2001). Consequently, in this paper the term "serogroup" is used, even if in cited publications the term "serovar" appears frequently. The presence of specific antibodies does not confirm the diagnosis leptospirosis, because MAT does not discriminate between antibodies induced by vaccination or after natural exposure (Bolin, 1996). Vaccinated dogs can have high titers (> 1:6400) to both vaccinal and non-vaccinal serogroups (Midence et al., 2012; Martin et al., 2014). Therefore, presence of high MAT titers alone do not confirm the diagnosis "leptospirosis", even if they are against a serogroup not contained in the vaccine. In one study, only a 50% correlation was found between the estimated infecting serogroup on the basis of MAT and that on the basis of bacterial culture and isolation (Levett, 2003). To date, dogs in Germany have been routinely vaccinated against the serogroups Canicola and Icterohaemorrhagiae. Since 2014, vaccines including the serogroups Canicola, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa and Australis are licensed in Germany, but none of the study dogs was vaccinated with one of these new vaccines.

Of the three positive dogs, the Irish Setter (Tab. 1) had low titers to Bratislava (1:100), Australis (1:100), and Icterohaemorrhagiae (1:100), which all belong to the genomospecies *L. interrogans*, but the dog shed leptospires of the genomospecies *L. borgpetersenii*. Only one serogroup of that genomospecies was tested in the MAT, namely Sejroe. Consequently, the reason for an absent titer to Sejroe might be an early infection or an infection with another serogroup of that genomospecies. The Icterohaemorrhagiae-specific titer can be interpreted as a vaccinal titer; the low titers to the other serogroups are likely unspecific reactions, cross reactions or evidence of prior exposure. The Jack Russell Terrier (Tab. 1) had a high antibody titer against Icterohaemorrhagiae (1:1600), suggesting an infection with Icterohaemorrhagiae. The shed leptospires belong to the genomospecies *L. interrogans* which is in agreement with the MAT results. This dog had been vaccinated 14 months prior to presentation, thus, the high titer is probably not vaccination-related. This dog also had low titers against Grippotyphosa (1:200), Sejroe (1:200), and Canicola (1:400). These titers can be interpreted as cross- or unspecific reactions. The Ratonero Bodeguero (Tab. 1) had no antibodies in the MAT. According to the owner, the dog had been vaccinated against leptospirosis two months prior to presentation. Usually, there is a rapid increase in titers during twelve to 16 weeks after vaccination, beyond which titers decrease to 1:200 or below (Andre-Fontaine et al., 2003; Klaasen et al., 2003). However, a lack of association between vaccine-induced protective immunity and MAT titers has been described (Klaasen et al., 2003). Possible reasons for the absence of antibodies despite recent vaccination are immunosuppression and therefore inability to mount an antibody response or inappropriate use of the vaccine (e. g., misinjection, inappropriate storage). The fact that the dog had no antibodies despite current shedding could be explained by early infection or infection with a serogroup that was not detected by MAT. As the MLST

showed, the dog shed leptospires of the genomospecies *L. interrogans*, but in MAT not all relevant serogroups of that genomospecies were tested. The crossbreed dog with a titer to Grippotyphosa of $\geq 1: 6,400$, that was highly suspicious for an acute leptospiral infection, had a negative urine PCR. It is possible, that the amount of shed leptospires was below the detection level of 1×10^2 leptospires/ml and therefore, the PCR was negative. Another explanation is the intermitted shedding of leptospires with the urine, and therefore, no leptospiral DNA might have been detectable at presentation. This dog was vaccinated against serogroup Canicola and Icterohaemorrhagiae. The dog stayed asymptomatic during the following weeks, thus, likely had a subclinical infection.

Limitations of this study include that just one urine sample from each dog was tested, that there was no follow-up of the positive dogs, and that there was no convalescent antibody test. A limitation of PCR-based diagnosis of leptospirosis is the inability to distinguish between infectious or non-infectious shed leptospires (e. g. dead leptospires or leptospiral DNA). For detecting living leptospires and identification of the true infecting serovar, a bacterial culture of the urine would have been necessary. However, the study was designed to determine the prevalence of shedding of leptospire DNA, and further studies should be performed to evaluate the clinical relevance of these findings.

In conclusion 1.5% of healthy dogs from Upper Bavaria shed *Leptospira* with their urine. As healthy dogs can shed leptospires, a potential risk of infection for owners and other animals exists. The study emphasizes the importance of hygiene measures in veterinary practice (e. g. wearing gloves, disinfect surfaces that became contaminated with urine) while handling urine. In addition, there is need for the use of vaccines that prevent urinary shedding of leptospires and that contain the geographically relevant representatives of serogroups of *Leptospira* spp. for all at-risk dogs.

Conflict of interest

There are no known conflicts of interest associated with this publication and there has been no significant financial support for this work that could have influenced its outcome. Ivonne Stamm and Peter Andreas Kopp are employees of Vet Med Labor GmbH, Division of IDEXX Laboratories.

References

- Ahmed N, Devi SM, Valverde Mde L, Vijayachari P, Machang'u RS, Ellis WA, Hartskeerl RA (2006): Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 5: 28.
- Altschul SE, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389–3402.
- Andre-Fontaine G, Branger C, Gray AW, Klaasen HL (2003): Comparison of the efficacy of three commercial bacterins in preventing canine leptospirosis. *Vet Rec* 153: 165–169.
- Bal AE, Gravekamp C, Hartskeerl RA, De Meza-Brewster J, Korver H, Terpstra WJ (1994): Detection of leptospires in urine

- by PCR for early diagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol* 32: 1894–1898.
- Bolin CA (1996):** Diagnosis of leptospirosis: a reemerging disease of companion animals. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 11: 166–171.
- Clegg FG, Heath PJ (1975):** Subclinical *L. Icterohaemorrhagiae* infection in dogs associated with a case of human leptospirosis. *Vet Rec* 96: 385.
- Cole JR, Jr., Sulzer CR, Pursell AR (1973):** Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. *Appl Microbiol* 25: 976–980.
- Cullen PA, Cordwell SJ, Bulach DM, Haake DA, Adler B (2002):** Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. *Infect Immun* 70: 2311–2318.
- Cullen PA, Xu X, Matsunaga J, Sanchez Y, Ko AI, Haake DA, Adler B (2005):** Surfaceome of *Leptospira* spp. *Infect Immun* 73: 4853–4863.
- Desai S, van Treeck U, Lierz M, Espelage W, Zota L, Sarbu A, Czerwinski M, Sadowska-Todys M, Avdicova M, Reetz J, Luge E, Guerra B, Nockler K, Jansen A (2009):** Resurgence of field fever in a temperate country: an epidemic of leptospirosis among seasonal strawberry harvesters in Germany in 2007. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 48: 691–697.
- Douglin CP, Jordan C, Rock R, Hurley A, and Levett PN (1997):** Risk factors for severe leptospirosis in the parish of St. Andrew, Barbados. *Emerging infectious diseases* 3: 78–80.
- Feigin RD, Lobes LA, Jr., Anderson D, Pickering L (1973):** Human leptospirosis from immunized dogs. *Ann Intern Med* 79: 777–785.
- Geier-Doemling D, Heil-Franke G, Mueller E (2003):** Nachweis von Leptospirenantikörpern bei Hunden. *Kleintierprax* 48: 725–792.
- Geisen V, Stengel C, Brem S, Muller W, Greene C, Hartmann K (2007):** Canine leptospirosis infections - clinical signs and outcome with different suspected *Leptospira* serogroups (42 cases). *J Small Anim Pract* 48: 324–328.
- Geisen V, Stengel C, Hartmann K (2008):** Epidemiologische Situation der Leptospirose beim Hund in Süddeutschland. *Tieraerztl Prax* 36 (K): 329–336.
- Gerlach T, Stephan I (2007):** Epidemiologische Situation der kaninen Leptospirose in Norddeutschland in den Jahren 2003–2006 – Eine retrospektive Studie. *Tieraerztl Prax* 35 (K): 421–429.
- Haake DA, Chao G, Zuermer RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, Matsunaga J, Levett PN, Bolin CA (2000):** The leptospiral major outer membrane protein lipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun* 68: 2276–2285.
- Harkin KR, Roshto YM, Sullivan JT (2003a):** Clinical application of a polymerase chain reaction assay for diagnosis of leptospirosis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 222: 1224–1229.
- Harkin KR, Roshto YM, Sullivan JT, Purvis TJ, Chengappa MM (2003b):** Comparison of polymerase chain reaction assay, bacteriologic culture, and serologic testing in assessment of prevalence of urinary shedding of leptospires in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 222: 1230–1233.
- Hoeningl M, Wallner C, Allerberger F, Schmoll F, Seeber K, Wagner J, Valentin T, Zollner-Schwetz I, Flick H, Krause R (2014):** Autochthonous leptospirosis in South-East Austria, 2004–2012. *PLoS one* 9: e85974.
- Jansen A, Schoneberg I, Frank C, Alpers K, Schneider T, Stark K (2005):** Leptospirosis in Germany, 1962–2003. *Emerg Infect Dis* 11: 1048–1054.
- Karaseva EV, Chemukha YG, Piskunova LA (1973):** Results of studying the time of survival of pathogenic *Leptospira* under natural conditions. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 17: 339–345.
- Klaasen HL, Molkenboer MJ, Vrijenhoek MP, Kaashoek MJ (2003):** Duration of immunity in dogs vaccinated against leptospirosis with a bivalent inactivated vaccine. *Vet Microbiol* 95: 121–132.
- Langston CE, Heuter KJ (2003):** Leptospirosis. A re-emerging zoonotic disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 33: 791–807.
- Levett PN (2001):** Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 14: 296–326.
- Levett PN (2003):** Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. *Clin Infect Dis* 36: 447–452.
- Martin LE, Wiggans KT, Wennogle SA, Curtis K, Chandrashekar R, Lappin MR (2014):** Vaccine-associated *Leptospira* antibodies in client-owned dogs. *J Vet Intern Med* 28: 789–792.
- Major A, Schweighauser A, Francey T (2014):** Increasing incidence of canine leptospirosis in Switzerland. *International journal of environmental research and public health* 11: 7242–7260.
- Mayer-Scholl A, Hammerl JA, Schmidt S, Ulrich RG, Pfeffer M, Woll D, Scholz HC, Thomas A, Nockler K (2014):** *Leptospira* spp. in rodents and shrews in Germany. *Int J Environ Res Public Health* 11: 7562–7574.
- Midence JN, Leutenegger CM, Chandler AM, Goldstein RE (2012):** Effects of recent *Leptospira* vaccination on whole blood real-time PCR testing in healthy client-owned dogs. *J Vet Intern Med* 26: 149–152.
- Muller H, Winkler P (1994):** Ergebnisse serologischer Untersuchungen auf *Leptospira*-Antikörper bei Füchsen. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 107: 90–93.
- Rojas P, Monahan AM, Schuller S, Miller IS, Markey BK, Nally JE (2010):** Detection and quantification of leptospires in urine of dogs: a maintenance host for the zoonotic disease leptospirosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 29: 1305–1309.
- Schönberg A, Lutz W, Kämpe U (1999):** Untersuchung von Serumproben vom Schwarzwild (*Sus scrofa* L. 1758) auf Leptospirose. *Z Jagdwiss* 45: 262–265.
- Schuller S, Francey T, Hartmann K, Hugonnard M, Kohn B, Nally JE, Sykes J (2015):** European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. *J Small Anim Pract* 56: 159–179.
- Stoddard RA, Gee JE, Wilkins PP, McCaustland K, Hoffmaster AR (2009):** Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the *lipL32* gene. *Diagn Microbiol Infect Dis* 64: 247–255.
- Trueba G, Zapata S, Madrid K, Cullen P, Haake D (2004):** Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. *Int Microbiol* 7: 35–40.
- Turner LH (1969):** Leptospirosis. *Br Med J* 1: 231–235.
- Twigg GI, Cuerden CM, Hughes DM, and Medhurst P (1969):** The leptospirosis reservoir in British wild mammals. *Vet Rec* 84: 424–426.
- Van de Maele I, Claus A, Haesebrouck F, Daminet S (2008):** Leptospirosis in dogs: a review with emphasis on clinical aspects. *Vet Rec* 163: 409–413.
- Weekes CC, Everard CO, Levett PN (1997):** Seroepidemiology of canine leptospirosis on the island of Barbados. *Vet Microbiol* 57: 215–222.
- Yang CW, Wu MS, Pan MJ, Hsieh WJ, Vandewalle A, Huang CC (2002):** The *Leptospira* outer membrane protein lipL32 induces tubulointerstitial nephritis-mediated gene expression in mouse proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol* 13: 2037–2045.

Address for correspondence:

Julia-Rebecca Llewellyn
 Medizinische Kleintierklinik
 der Ludwig-Maximilians-Universität München
 Veterinärstraße 13
 80539 München
 julia.rllewellyn@googlemail.com

IV. DISKUSSION

Leptospirose ist eine als Zoonose eingestufte, weltweit verbreitete Krankheit, für die der Hund eine mögliche Ansteckungsquelle für den Menschen darstellt (SCHMIDT *et al.*, 1989; LEVETT, 2001). Hundekontakt wird als Risikofaktor für das Auftreten humaner Leptospirose gesehen (HOENIGL *et al.*, 2014; JURKE *et al.*, 2015). In der Schweiz nahm die Anzahl an Leptospirose erkrankter Hunde von 2002 bis 2013 zu (MAJOR *et al.*, 2014). Derzeit ist noch unbekannt, wie viele Hunde in Deutschland subklinisch infiziert sind und damit ein nicht einzuschätzendes Risiko für eine potenzielle Ansteckung darstellen (JANSEN *et al.*, 2005). Es gab bisher in Deutschland keine Untersuchung zur AK-Prävalenz oder Ausscheidung von Leptospiren über den Urin bei gesunden Hunden. Jedoch existieren zwei Studien außerhalb Deutschlands, bei denen die Prävalenz einer Leptospirurie bei unselektierten Hunden untersucht wurde. In Irland lag die Prävalenz bei 7,1 % und in den USA bei 8,2 % (HARKIN *et al.*, 2003; ROJAS *et al.*, 2010).

Die vorliegende Arbeit umfasste drei Ziele. Zunächst wurde die Prävalenz einer Leptospirurie bei gesunden Hunden aus Oberbayern mittels PCR ermittelt. Darüber hinaus wurden die Genospezies der ausgeschiedenen Leptospiren mittels einer MLST bestimmt. Schließlich wurde das Vorkommen von AK gegen Leptospiren bei gesunden Hunden mit Hilfe eines MAT untersucht. Dazu wurden Urin- und Serumproben von 200 gesunden Hunden aus Oberbayern, die im Rahmen der Gesundheitsvorsorge in der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München und der Tierklinik Ismaning vorgestellt wurden, randomisiert untersucht.

Von 200 gesunden Hunden schieden drei Leptospiren über den Urin aus. Dies entspricht einer Prävalenz von 1,5 %. Damit war die Prävalenz in der vorliegenden Studie niedriger als die der Studie in Irland (7,1 %) (ROJAS *et al.*, 2010) und in den USA (8,2 %) (HARKIN *et al.*, 2003). Als ein Grund für die niedrigere Prävalenz in der vorliegenden Studie ist die Tatsache anzusehen, dass nur klinisch gesunde Hunde in die Studie eingeschlossen wurden. In Irland und in den USA hingegen wurde auch der Urin kranker Hunde untersucht. Da darunter auch Patienten mit Leber- und Nierenversagen sein konnten, war die

Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer Leptospireninfektion bei diesen Tieren höher. Außerdem ist es aufgrund unterschiedlicher klimatischer Bedingungen möglich, dass die Prävalenz in diesen beiden Ländern höher ist als in Deutschland. In Irland kam es in den Jahren 2008 und 2009 zu starken Regenfällen und Überschwemmungen (KIELY *et al.*, 2010). Die durchschnittliche Jahresniederschlagsmenge lag 2008 bei 1270 mm und 2009 bei 2175 mm (KIELY *et al.*, 2010). Zahlreiche Untersuchungen konnten einen Zusammenhang zwischen der Niederschlagsmenge und dem Auftreten von Leptospirosefällen nachweisen (ADIN und COWGILL, 2000; WARD, 2002; LEE *et al.*, 2014). Im Studienzeitraum der vorliegenden Studie, betrug die durchschnittliche Jahresniederschlagsmenge in München 959 mm im Jahr 2010 und 827 mm im Jahr 2011 (LUGAUER, 2011). Der durchschnittliche Jahresniederschlag in München lag somit deutlich unterhalb der Werte aus Irland. Die Studiehunde von HARKIN und Mitarbeitern (2003) stammten aus dem Patientengut der Kansas State University (HARKIN *et al.*, 2003). Je nach Region in Kansas kommt es im Sommer zu sehr viel Niederschlag (bis 1200 mm) und im Winter ist es sehr mild (Klima. Kansas, 2016). Neben hohen Niederschlagsmengen führen auch milde Winter ohne Frost zu einem gehäuften Auftreten von Leptospirose (LEE *et al.*, 2014). Im Jahr 2010 gab es 84,5 Frosttage in München (LUGAUER, 2011). Die klimatischen Bedingungen für das Überleben von Leptospiren in der Umwelt in Oberbayern waren somit schlechter als in Irland und den USA und eine Ansteckung damit weniger wahrscheinlich. Weitere Gründe für die niedrigere Prävalenz könnten sein, dass die Dauer und Intensität der Leptospirose mit dem infizierenden Serovar und von Hund zu Hund variiert und darüber hinaus intermittierend sein kann (VAN DE MAELE *et al.*, 2008). Harn ist ein für die Leptospirendiagnostik geeignetes Probenmaterial, da die Ausscheidung von Leptospiren über den Urin noch vor einer im Blut nachweisbaren AK-Bildung erfolgt. Einige Studien bewiesen, dass auch AK-negative Hunde Leptospiren über ihren Urin ausscheiden können (TURNER, 1969; FEIGIN *et al.*, 1973; CLEGG und HEATH, 1975; LEVETT, 2003). Die Leptospirose beginnt in der zweiten Woche nach Infektion und kann vier bis sechs Wochen, in seltenen Fällen auch Monate andauern (JOHNSON, 1950; BAL *et al.*, 1994). Bei einer einzelnen Probennahme besteht daher die Möglichkeit, dass zum Zeitpunkt der Entnahme keine Leptospirose besteht. Falsch-negative qPCR-Ergebnisse sind aus diesen Gründen denkbar. Die Prävalenz der

vorliegenden Studie von 1,5 % unterschätzt daher unter Umständen die tatsächliche Prävalenz in Deutschland.

In der vorliegenden Studie wurde zum Nachweis der Leptospiren-DNA ein qPCR-Protokoll gewählt, das spezifisch für das *lipL32*-Gen pathogener Leptospiren ist. Dieses Gen codiert das häufigste Zelloberflächenprotein von pathogenen *Leptospira* spp. (HAAKE *et al.*, 2000). Das Zelloberflächenprotein L32 gilt auch als Virulenzfaktor, da es nicht in apathogenen Spezies gefunden werden kann (HAAKE *et al.*, 2000; CULLEN *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2002; CULLEN *et al.*, 2005). Das in der vorliegenden Studie gewählte qPCR-Protokoll ist sehr sensitiv um Leptospiren im Urin nachzuweisen (STODDARD *et al.*, 2009). ROJAS und Mitarbeiter (2010) verwendeten ebenfalls ein für das *lipL32*-Gen spezifisches qPCR-Protokoll. Allerdings verwendeten die Autoren andere Primer, als die der vorliegenden Studie (ROJAS *et al.*, 2010). HARKIN und Mitarbeiter (2003) bedienten sich einer konventionellen PCR, die auf der 23S-rRNA basierte (HARKIN *et al.*, 2003). Die Verwendung unterschiedlicher Zielsequenzen kann zu einer unterschiedlichen Sensitivität und Spezifität der PCR führen. Der in der vorliegenden Studie eingesetzte Assay war in der Lage $1,0 \times 10^2$ Leptospiren/ml Urin nachzuweisen.

FINK und Mitarbeiter (2015) evaluierten in ihrer Studie das von STODDARD und Mitarbeitern (2009) entwickelte qPCR-Protokoll zum Nachweis von Leptospiren in Hundeurin. Die Nachweisgrenze lag dort bei $1,2 \times 10^2$ Leptospiren/ml, was in etwa einer mit dem des in der vorliegenden Studie verwendeten Assays vergleichbaren Nachweisgrenze entspricht (FINK *et al.*, 2015). Eine höhere Sensitivität ist mit dem in der vorliegenden Studie verwendeten Assay somit nicht möglich. Bei einer Ausscheidung von Leptospiren unterhalb der Nachweisgrenze, kann es zu falsch-negativen qPCR-Ergebnissen gekommen sein. Die Spezifität des Assays wurde in der originären Studie und in der Studie von FINK und Mitarbeitern (2015) bestimmt und betrug 100 % für pathogene *Leptospira* spp. (STODDARD *et al.*, 2009; FINK *et al.*, 2015). In der vorliegenden Studie wurden alle Negativkontrollen mittels PCR negativ getestet, daher sind falsch-positive Ergebnisse unwahrscheinlich.

In der vorliegenden Studie war es möglich, die Genospezies der ausgeschiedenen Leptospiren mittels MLST zu ermitteln. Für die MLST wurde das 6-Lokus-Schema von AHMED und Mitarbeitern (2006) verwendet, welches eine

Einteilung in Genospezies, nicht aber in Sequenztypen, ermöglicht (AHMED *et al.*, 2015). Bei zwei Hunden wurden Leptospiren der Genospezies *L. interrogans* und bei einem Hund der Genospezies *L. borgpetersenii* nachgewiesen. Durch den Nachweis der Genospezies konnten die positiven Ergebnisse der qPCR bestätigt werden.

Es gibt Unterschiede zwischen den Ergebnissen der qPCR und des MAT. Bei klinischen Fällen beruht die Diagnose meistens auf MAT-Ergebnissen, da der Test von vielen spezialisierten Laboratorien angeboten wird und aktuell als Goldstandard gilt (WHO, 2003). Allerdings hat der MAT viele Limitationen, da die Interpretation subjektiv ist und die Anwendung ein hohes Maß an Erfahrung bedarf (SYKES *et al.*, 2011). Außerdem gibt es keine klare Definition eines negativen Ergebnisses (SYKES *et al.*, 2011). In der Regel wird ein Cut-off Titer von $< 1:100$ verwendet, um positive von negativen Tieren zu unterscheiden (OIE, 2014). Ein einmalig nachgewiesener AK-Titer bestätigt noch keine klinische Diagnose, da der MAT nicht zwischen denjenigen AK differenzieren kann, die durch eine Impfung und denen, die nach natürlichem Kontakt entstanden sind (BOLIN, 1996). Bei Hunden mit Verdacht auf Leptospirose, spricht ein mindestens vierfacher Titeranstieg innerhalb von ein bis zwei Wochen für eine akute Infektion oder eine kürzlich durchgeführte Impfung (MILLER *et al.*, 2011; FRAUNE *et al.*, 2013). Geimpfte Hunde können sehr hohe Titer sowohl ($> 1:6.400$) gegen Impf- als auch gegen nicht-Impfserogruppen entwickeln (MIDENCE *et al.*, 2012; MARTIN *et al.*, 2014). Einmalig hohe MAT-Titer sind daher nicht beweisend für eine Infektion. Der MAT ist auch nicht in der Lage die infizierende Serogruppe vorherzusagen. In einer Studie bestand eine lediglich 50%ige Korrelation zwischen der auf MAT-Basis vermuteten und der auf bakteriologischer Kultur basierenden identifizierten Serogruppe (LEVETT, 2003).

In der vorliegenden Studie zeigten 47,0 % der Hunde im MAT einen AK-Titer $\geq 1:100$ gegen mindestens eine der im MAT getesteten Serogruppen. AK-Titer gegen mindestens eine nicht-Impfserogruppe konnten bei 17,0 % bei einem Cut-off Titer $\geq 1:100$ und bei 3,5 % der Hunde bei einem Cut-off Titer $\geq 1:400$ nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu lag die Prävalenz der qPCR-positiven Hunde mit 1,5 % deutlich darunter. Der Grund für diese Diskrepanz liegt vermutlich darin, dass es sich bei der PCR um einen direkten und beim MAT um einen indirekten Erregernachweis handelt. AK, welche im MAT nachgewiesen

werden, verbleiben lang im Körper und sind so auch noch Jahre nach einer Infektion nachweisbar. Demgegenüber weist die PCR das momentane Vorhandensein des Erregers nach. Außerdem kann es sein, dass die mittels PCR ermittelte Prävalenz fälschlicherweise zu niedrig angenommen wurde. So kann es z. B. durch eine intermittierende Ausscheidung zu falsch-niedrigen Prävalenzen gekommen sein. AK durch vorangegangene Impfungen können die MAT-Ergebnisse verfälschen (BARR *et al.*, 2005).

Studien bei gesunden Hunden aus den USA zeigten eine AK-Prävalenz von 17,1 % gegen mindestens eine Serogruppe (inklusive Impferogruppen) bei einem Cut-off Titer $\geq 1:100$ (DAVIS *et al.*, 2008) und 24,9 % bei einem Cut-off Titer $\geq 1:200$ (STOKES *et al.*, 2007). Vergleicht man die AK-Prävalenzen aus der vorliegenden Studie mit den Ergebnissen der Studie aus den USA, zeigt sich eine höhere AK-Prävalenz in Deutschland. Eine mögliche Erklärung ist eine höhere Impfrate in Deutschland und damit eine größere Anzahl impfassoziierter AK-Titer und Kreuzreaktionen. In einer Studie aus den USA waren nur 20,0 % der Hunde gegen Leptospirose geimpft (SANDHU und SINGH, 2014). In einer vergleichbaren Studie aus Deutschland hingegen waren 60,0 % der Hunde gegen Leptospirose geimpft (GEISEN *et al.*, 2007). In der vorliegenden Studie war der Impfstatus der Studienpopulation bei 145 (72,5 %) der 200 Hunde bekannt; 144 (99,3 %) der 145 Hunde waren gegen Leptospirose geimpft. Hunde in Deutschland, wie auch die Hunde der vorliegenden Studie, wurden bis zum Jahr 2011 mit Impfstoffen geimpft, die lediglich die Serovare Canicola und Icterohaemorrhagiae enthielten. Im Jahr 2011 wurde zusätzlich ein Impfstoff mit den Serovaren Canicola, Icterohaemorrhagiae und Grippytyphosa auf den Markt gebracht. Im Jahr 2014 folgte die Einführung eines quadrivalenten Impfstoffes, der außerdem noch das Serovar Australis enthält (KLAASEN *et al.*, 2014). Es gibt zahlreiche Untersuchungen über die Effektivität der Leptospiroseimpfstoffe beim Hund. Alle Leptospiroseimpfstoffe schützen vor klinischen Symptomen, es kann aber trotz Impfung zu einer Leptospirurie kommen (ANDRE-FONTAINE *et al.*, 2003; KLAASEN *et al.*, 2003; MINKE *et al.*, 2009; KLAASEN *et al.*, 2013). Um auch vor einer Niereninfektion zu schützen, ist eine höhere Antigendosis nötig (MINKE *et al.*, 2009). In einer Studie wurden 16 Hunde mit einem bivalenten Impfstoff (Canicola und Icterohaemorrhagiae) geimpft und danach mit Serovar Canicola gechallenged. Bei drei der 16 Hunde kam es zu einer

Leptospirose (ANDRE-FONTAINE *et al.*, 2003). Ein Grund für die Leptospirose der PCR-positiven Hunde in der vorliegenden Studie könnte also sein, dass die damals verwendeten Impfstoffe nicht ausreichend vor einer Leptospirose schützten. Eine andere Möglichkeit ist, dass eine Infektion mit nicht-Impfserovaren vorlag. Eine Kreuzprotektion besteht nur gegenüber antigenetisch ähnlichen Serovaren (ELLIS, 2010). Eine neuere Studie mit einem quadrivalenten Impfstoff konnte einen Schutz vor einer Niereninfektion und Ausscheidung von Leptospiren zeigen (KLAASEN *et al.*, 2013). In dieser Studie wurden 64 Hunde in acht Gruppen unterteilt. Die Hälfte der Hunde (16) der Gruppe 1 – 4 wurde mit einem quadrivalenten Impfstoff (Canicola, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa und Australis) geimpft und die andere Hälfte der Hunde diente als Kontrolle. Jede Gruppe wurde mit einem unterschiedlichen Impfserovar gechallenged. Die Hunde der Gruppe 5 – 8 erhielten zusätzlich zu dem quadrivalenten Impfstoff noch Serum mit AK. Keiner der geimpften Hunde zeigte nach der Challenge eine Leptospirose oder Nephritis (KLAASEN *et al.*, 2013). Aufgrund der geringen Kreuzprotektivität von Leptospirenimpfstoffen sollten Impfstoffe eingesetzt werden, die die in der Region relevanten Serogruppen enthalten. Außerdem sollten nur Impfstoffe verwendet werden, die auch vor einer Leptospirose schützen.

Es existieren zwei Studien aus Deutschland, die die AK-Prävalenz von *Leptospira* spp. bei Hunden mit Verdacht auf Leptospirose untersuchten. In diesen Studien hatte fast die Hälfte (44,1 % und 48,0 %) der Hunde einen AK-Titer $\geq 1:100$ gegen mindestens eine Serogruppe (inklusive Canicola und Icterohaemorrhagiae) (GERLACH und STEPHAN, 2007; GEISEN *et al.*, 2008). Interessant ist, dass die in der vorliegenden Studie ermittelte AK-Prävalenz bei gesunden Hunden (47,0 %) somit etwa gleich hoch ist wie bei Hunden mit Verdacht auf Leptospirose. Dies ist durch die hohe Impfquote in Deutschland und damit verbundene AK-Bildung zu erklären.

Die MAT-Ergebnisse der PCR-positiven Hunde fallen in der vorliegenden Studie sehr unterschiedlich aus. Der erste Hund (Irish Setter, Hund Nr. 1) hatte niedrige Titer gegen die Serogruppen Bratislava (1:100), Australis (1:100), und Icterohaemorrhagiae (1:100). Der Hund war elf Monate vor der Probenentnahme mit einer bivalenten Vakzine (Canicola und Icterohaemorrhagiae) geimpft worden. Nur der Icterohaemorrhagiae-Titer konnte als Impftiter interpretiert

werden. Die niedrigen Titer gegen die anderen beiden Serogruppen waren vermutlich unspezifische Reaktionen aus früheren Infektionen. Durch die MLST konnte bewiesen werden, dass der Hund Leptospiren der Genospezies *L. borgpetersenii* ausgeschieden hat. Die Serogruppen jedoch, gegen die der Hund AK aufwies, gehören alle zu der Genospezies *L. interrogans*. Es wurde nur eine Serogruppe (Sejroe) der Genospezies *L. borgpetersenii* im MAT getestet. Gründe für einen fehlenden Titer gegen eine Serogruppe der Genospezies *L. borgpetersenii* können eine sehr frühe Infektion, oder eine Infektion mit einem Serovar einer anderen Serogruppe sein.

Der zweite Hund (Jack Russell Terrier, Hund Nr. 2) hatte einen hohen Titer gegen Icterohaemorrhagiae (1:1.600) sowie niedrige Titer gegen Grippotyphosa (1:200), Sejroe (1:200) und Canicola (1:400). Er war 14 Monate vor der Probenentnahme mit einer bivalenten Vakzine (Canicola und Icterohaemorrhagiae) geimpft worden. Normalerweise kommt es innerhalb von zwölf bis 16 Wochen nach einer Impfung zu einem deutlichen Titeranstieg; danach sinken die Titer auf einen Wert von 1:200 oder weniger ab (ANDRE-FONTAINE *et al.*, 2003; KLAASEN *et al.*, 2003). Der hohe Icterohaemorrhagiae-Titer spricht daher eher für eine Infektion mit dieser Serogruppe als für einen Impftiter. Die Titer gegen die anderen Serogruppen sind vermutlich Kreuzreaktionen oder unspezifische Reaktionen. Die ausgeschiedenen Leptospiren gehörten zu der Genospezies *L. interrogans*, zu der auch die Serogruppe Icterohaemorrhagiae gehört. Es ist jedoch auch möglich, dass der Hund mit einer anderen Serogruppe der Genospezies *L. interrogans* infiziert war und der Icterohaemorrhagiae-Titer eine paradoxe Reaktion darstellt.

Bei dem dritten Hund (Ratonero Bodeguero, Hund Nr. 3) konnten trotz des positiven PCR-Befunds keine AK-Titer nachgewiesen werden. Nach Angaben des Impfpasses war er zwei Monate vor der Probenentnahme mit einer bivalenten Vakzine (Canicola und Icterohaemorrhagiae) geimpft worden. Eine mögliche Ursache für fehlende impfasoziierte AK bei diesem Hund kann eine fehlerhafte Anwendung der Impfung, wie Fehlinjektion oder falsche Lagerung, sein. Es ist auch möglich, dass der Hund als „non-responder“ nicht auf die Impfung reagierte. Der Hund hatte offensichtlich nicht nur keine Impf-AK, er hatte auch noch keine AK trotz Infektion. Gründe hierfür könnten sein, dass sich der Hund in einer sehr frühen Phase einer Leptospireninfektion befand und daher noch keine AK gegen den Erreger gebildet hatte. Weiterhin denkbar wäre eine Infektion mit einer

Serogruppe, die nicht im MAT getestet wurde. Für generell fehlende Leptospiren-AK ist außerdem auch eine Immunsuppression ursächlich möglich. Dadurch ist der Körper nicht in der Lage AK zu bilden. Wie aus dem MLST ersichtlich, schied der Hund Leptospiren der Genospezies *L. interrogans* aus, aber im MAT wurden nicht alle Serogruppen dieser Genospezies getestet. Dies wäre auf Grund der großen Anzahl an vorkommenden Serogruppen auch nicht praktikabel. Es ist daher möglich, dass der Hund AK gegen nicht im MAT getestete Serogruppen hatte.

Neben den drei PCR-positiven Hunden war ein weiterer Hund auffällig. Dieser Hund (Mischling) hatte einen Grippotyphosa-Titer von $\geq 1:6.400$ und war damit hoch verdächtig für eine akute Leptospireninfektion. Er hatte jedoch eine negative Urin-qPCR. Es ist möglich, dass die Anzahl der ausgeschiedenen Leptospiren unterhalb des Detektionsminimums von 1×10^2 Leptospiren/ml lag. Eine weitere Erklärung könnte die intermittierende Ausscheidung von Leptospiren über den Urin sein. Dies könnte erklären warum der Hund keine nachweisbare Leptospiren-DNA zum Zeitpunkt der Probenentnahme hatte.

Zu den Limitationen der vorliegenden Studie gehören, dass nur eine Urinprobe von jedem Hund genommen wurde, obwohl es bekannt ist, dass die Ausscheidung von Leptospiren intermittierend erfolgen kann (VAN DE MAELE *et al.*, 2008). Der Grund dafür, dass lediglich eine einzige Probenentnahme erfolgte, war der, dass es sich um gesunde Hunde handelte. Diese wurden lediglich einmal im Rahmen einer Gesundheitsvorsorge oder z. B. einer Kastration untersucht. Auf Grund des Studiendesigns war es nicht möglich, bei den positiven Tieren eine zweite Probe zu entnehmen, da zunächst alle 200 Urinproben gesammelt wurden und erst im Anschluss die qPCR durchgeführt wurde. Die Zeit zwischen der Probenentnahme und der qPCR betrug bis zu 18 Monate. Die Besitzer wurden über die Symptome einer Leptospirose aufgeklärt und gebeten, sich bei Auftreten von Krankheitsanzeichen zu melden. Dies war bei keinem der mittels PCR-positiv getesteten Studiehunde der Fall.

Ein Leptospirennachweis mittels PCR ist bezüglich der Unterscheidung, ob noch infektiöse oder nicht mehr infektiöse Leptospiren ausgeschieden werden, nicht aussagekräftig. Dafür wäre das Ansetzen einer Kultur nötig. Die PCR hat eine höhere Sensitivität und ist weniger zeitaufwändig als die Kultur. Da als Nachweisverfahren eine qPCR gewählt wurde, die spezifisch für pathogene

Leptospiren ist, ist davon auszugehen, dass die Hunde mit für den Menschen pathogenen Leptospiren infiziert waren. Ob sie zum Zeitpunkt der Probenentnahme noch infektiös waren, oder ob es sich nur um Leptospiren-DNA/tote Leptospiren handelte, war für die aktuelle Fragestellung unwichtig. Ziel dieser Studie war es, die Prävalenz der Ausscheidung von Leptospiren über den Urin zu ermitteln. Nachfolgend sollten nun weitere Studien mit dem Ziel folgen, die klinische Relevanz der ermittelten Daten zu überprüfen.

Hunde die Leptospiren ausscheiden stellen ein potenzielles Infektionsrisiko für ihre Besitzer und andere Menschen dar. Eine Ansteckung mit Leptospiren erfolgt meist über Hautwunden oder Schleimhäute (LEVETT, 2001). Bei Studien aus Zentraleuropa und Barbados wurde Gartenarbeit, Aufenthalt im Wald oder Wasser, Kontakt zu Nagetieren und Kontakt zu Hunden (7,0 % und 18,0 %) als Risikofaktor für humane Leptospirose angegeben (DOUGLIN *et al.*, 1997; JANSEN *et al.*, 2005; HOENIGL *et al.*, 2014). Bei einem Leptospiroseausbruch unter Erdbeerpflückern in Deutschland wurde der Kontakt von Hautwunden mit Wühlmausurin über kontaminierte Erde verantwortlich gemacht (DESAI *et al.*, 2009). Da viele Hunde unter anderem in Gärten urinieren, ist ein ähnlicher Ansteckungsweg bei der Gartenarbeit möglich. Besitzer von nicht stubenreinen Hunden, die in Wohnräume urinieren, kommen beim Aufwischen des Urins ebenfalls mit Hundeurin in Kontakt. In einer Studie aus der Schweiz erkrankten Hundewelpen (< ein Jahr) signifikant häufiger an Leptospirose als ältere Hunde (MAJOR *et al.*, 2014). Die Anzahl an nicht stubenreinen Tieren ist unter Welpen größer; daher stellen sie ein höheres Risiko für ihre Besitzer dar. Die Ursache für das vermehrte Auftreten von Leptospireninfektionen bei Welpen ist bisher nicht geklärt. Vermutet werden eine immunologische Lücke und eine erhöhte Exposition zu begünstigenden Umweltfaktoren während der Sozialisierungsphase der Welpen (MAJOR *et al.*, 2014).

Es gibt bisher keine allgemeingültige Empfehlung, wie mit klinisch gesunden Hunden, die Leptospiren über ihren Urin ausscheiden, umgegangen werden soll. Dies liegt daran, dass diese Tiere bisher meist unerkant blieben, da der Nachweis von Leptospiren im Urin bisher nicht zu einer routinemäßigen Gesundheitsvorsorge gehört. Penicilline und anschließend Doxycyclin werden traditionell zur Therapie der Leptospirose bei Menschen und Hunden eingesetzt (WATT *et al.*, 1988b; SUPUTTAMONGKOL *et al.*, 2010). Hunde ohne

gastrointestinale Symptome erhalten zweimal täglich Doxycyclin (5 mg/kg KGW oral) über zwei Wochen (GOLDSTEIN, 2010; SYKES *et al.*, 2011). Bei Erbrechen oder Anorexie wird eine intravenöse Gabe von Ampicillin (viermal täglich 20 mg/kg KGW) oder Amoxicillin (dreimal täglich 20 mg/kg KGW) bis zum Abklingen der Symptome empfohlen. Bei Besserung der gastrointestinalen Symptome sollte eine zweiwöchige Doxycyclin-Gabe (zweimal täglich 5 mg/kg KGW) angeschlossen werden (GOLDSTEIN, 2010; SYKES *et al.*, 2011, Schuller *et al.*, 2015). Nach diesen Empfehlungen sollten auch klinisch gesunde Hunde, bei denen durch eine Routineuntersuchung eine Leptospirurie festgestellt wurde, Doxycyclin (zweimal täglich 5 mg/kg KGW) über zwei Wochen erhalten, um eine weitere Ausscheidung zu verhindern. Im Anschluss an die Therapie ist eine PCR-Kontrolle des Urins zu empfehlen. Außerdem ist eine ausführliche Besitzeraufklärung über mögliche Ansteckungswege sinnvoll, um eine Ansteckung der Besitzer zu vermeiden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass 1,5 % der gesunden Hunde aus Oberbayern Leptospiren über ihren Urin ausschieden. Die AK-Prävalenz von nicht-Impfserogruppen betrug 17,0 % für Titer $\geq 1:100$ und 3,5 % für Titer $\geq 1:400$. Somit existiert eine potenzielle Gefahr für Besitzer und andere Tiere, sich an subklinisch infizierten Hunden zu infizieren. Zudem ist eine regelmäßige Impfung gegen Leptospirose mit Impfstoffen, in denen die für die jeweilige Region relevanten Serogruppen enthalten sind, wichtig. Dadurch werden Hunde vor einer klinisch manifesten Infektion geschützt und eine Leptospirurie verhindert. Eine routinemäßige Untersuchung auf eine Leptospirurie sollte im Rahmen der Gesundheitsvorsorge zur Zoonose-Prophylaxe in Erwägung gezogen werden. Außerdem sollten generell beim Umgang mit Hundeurin geeignete Schutzmaßnahmen, wie das Tragen von Handschuhen für das Aufwischen von Hundeurin, ergriffen werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Leptospirose ist eine Zoonose mit weltweit steigender Prävalenz bei Hunden und Menschen. Die genaue Prävalenz von Infektionen bei Hunden mit *Leptospira* spp. in Deutschland ist unbekannt. Es wird vermutet, dass die Bedeutung von *Leptospira*-spp.-Ausscheidern unterschätzt wird, da viele Infektionen subklinisch verlaufen.

In der vorliegenden prospektiven Arbeit wurden Urinproben von 200 gesunden Hunden aus Oberbayern randomisiert gesammelt und auf das Vorhandensein von Leptospiren untersucht. Ziel der Studie war es, die Prävalenz der Ausscheidung von Leptospiren über den Urin von gesunden Hunden und die Genospezies dieser Erreger zu ermitteln. Dafür wurde eine hochsensitive Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR), spezifisch für das *lipL32* Gen pathogener Leptospiren, durchgeführt. Positive Proben wurden mittels Multilocus-Sequenztypisierung auf die ausgeschiedenen Genospezies hin untersucht. Zusätzlich wurde die Antikörperprävalenz mittels Mikroagglutinationstest bestimmt.

Drei der 200 untersuchten Urinproben waren qPCR-positiv. Die Prävalenz der Leptospirenausscheidung lag damit bei 1,5 %. Alle qPCR-positiven Hunde waren mit einem „alten“ bivalenten Impfstoff gegen Leptospirose geimpft. Ein Hund schied Leptospiren der Genospezies *L. borgpetersenii*, und zwei Hunde der Genospezies *L. interrogans* aus.

Antikörper-Titer $\geq 1:100$ gegen mindestens eine Serogruppe, inklusive der Impfserogruppen, wurden bei 47,0 % der Hunde nachgewiesen. Einen Antikörper-Titer gegen nicht-Impfserogruppen $\geq 1:100$ hatten 17,0 %, einen Antikörper-Titer $\geq 1:400$ hatten 3,5 % der Hunde.

Gesunde, infizierte Hunde können Leptospiren über den Urin ausscheiden und somit ein Risiko für Tierbesitzer und andere Tiere darstellen. Eine flächendeckende Impfung gegen die relevanten Serogruppen ist daher bei Hunden in Deutschland empfehlenswert. Außerdem sollten geeignete Hygienemaßnahmen beim Umgang mit Hundeurin ergriffen werden und eine ausführliche Besitzeraufklärung über das zoonotische Potential der Leptospirose erfolgen.

VI. SUMMARY

Leptospirosis is a zoonotic disease with an increasing prevalence among humans and dogs worldwide. The prevalence of *Leptospira* spp.-infected dogs in Germany is unknown. It is suggested that the role of *Leptospira* spp.-shedding dogs is underestimated, because subclinical infections are common.

In this prospective study, urine samples of 200 healthy dogs from Upper Bavaria were randomly collected and evaluated for the presence of leptospires. The aim of this study was to evaluate the prevalence of urinary shedding of leptospires in healthy dogs, and to identify the genomospecies of those leptospires. Therefore, a quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) specific for the *lipL32* gene of pathogenic *Leptospira* spp. was performed. Positive samples were further characterized *via* multilocus sequence typing to identify the genomospecies. As a second aim, prevalence of antibodies against leptospires was determined *via* microscopic agglutination testing.

Three of the 200 urine samples were found to be qPCR-positive, resulting in a urinary shedding prevalence of 1.5 %. All three dogs had been vaccinated with “old” vaccines containing only two serogroups. One dog shed leptospires of the genomospecies *L. borgpetersenii*, and two of the genomospecies *L. interrogans*.

Antibody titers $\geq 1:100$ against at least one serogroup, including vaccinal serogroups, were presented in 47.0 % of all dogs. Seventeen percent of the dogs had antibody titers $\geq 1:100$, and 3.5 % showed titers $\geq 1:400$ to non-vaccinal serogroups.

Healthy, infected dogs can shed leptospires with their urine, and represent a risk for their owners and other animals. Therefore, vaccination containing serogroups relevant for the respective region is advisable for dogs in Germany. In addition, general hygiene measures should be performed while handling dog urine, and dog owners should be informed about the zoonotic potential of leptospirosis.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Abdoel TH, Houwers DJ, van Dongen AM, Adesiyun AA, Jimenez-Coelloe M, Cardoso L, Suepaul SM, Ortega-Pacheco A, Smits HL. Rapid test for the serodiagnosis of acute canine leptospirosis. *Vet Microbiol* 2011; 150: 211-3.

Adin CA, Cowgill LD. Treatment and outcome of dogs with leptospirosis: 36 cases (1990-1998). *J Am Vet Med Assoc* 2000; 216: 371-5.

Adler B, Faine S. Host immunological mechanisms in the resistance of mice to leptospiral infections. *Infect Immun* 1977; 17: 67-72.

Adler B, Faine S, Christopher WL, Chappel RJ. Development of an improved selective medium for isolation of leptospires from clinical material. *Vet Microbiol* 1986; 12: 377-81.

Adler H, Vonstein S, Deplazes P, Stieger C, Frei R. Prevalence of *Leptospira* spp. in various species of small mammals caught in an inner-city area in Switzerland. *Epidemiol Infect* 2002; 128: 107-9.

Agunloye CA, Nash AS. Investigation of possible leptospiral infection in cats in Scotland. *J Small Anim Pract* 1996; 37: 126-9.

Ahmed A, Engelberts MF, Boer KR, Ahmed N, Hartskeerl RA. Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic *Leptospira* species in clinical materials. *PLoS One* 2009; 4: e7093.

Ahmed A, Thaipadungpanit J, Boonsilp S, Wuthiekanun V, Nalam K, Spratt BG, Aanensen DM, Smythe LD, Ahmed N, Feil EJ, Hartskeerl RA, Peacock SJ. Comparison of two multilocus sequence based genotyping schemes for *Leptospira* species. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5: e1374.

Ahmed A, Ferreira AS, Hartskeerl RA. Multilocus sequence typing (MLST): markers for the traceability of pathogenic *Leptospira* strains. *Methods Mol Biol*

2015; 1247: 349-59.

Ahmed N, Devi SM, Valverde Mde L, Vijayachari P, Machang'u RS, Ellis WA, Hartskeerl RA. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2006; 5: 28.

Akane A, Matsubara K, Nakamura H, Takahashi S, Kimura K. Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. *J Forensic Sci* 1994; 39: 362-72.

Al-Soud WA, Radstrom P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 485-93.

Alston JM, Broom JC. *Leptospirosis in man and animals*, 1st ed. Edinburgh and London: E. & S. Livingstone; 1958.

Alton GD, Berke O, Reid-Smith R, Ojkić D, Prescott JF. Increase in seroprevalence of canine leptospirosis and its risk factors, Ontario 1998-2006. *Can J Vet Res* 2009; 73: 167-75.

Andre-Fontaine G, Branger C, Gray AW, Klaasen HL. Comparison of the efficacy of three commercial bacterins in preventing canine leptospirosis. *Vet Rec* 2003; 153: 165-9.

Babudieri B. Animal reservoirs of leptospires. *Ann N Y Acad Sci* 1958; 70: 393-413.

Bajani MD, Ashford DA, Bragg SL, Woods CW, Aye T, Spiegel RA, Plikaytis BD, Perkins BA, Phelan M, Levett PN, Weyant RS. Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 803-9.

Bal AE, Gravekamp C, Hartskeerl RA, De Meza-Brewster J, Korver H, Terpstra WJ. Detection of leptospires in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1894-8.

Bandara M, Ananda M, Wickramage K, Berger E, Agampodi S. Globalization of leptospirosis through travel and migration. *Global Health* 2014; 10: 61.

Barkin RM, Glosser JW. Leptospirosis - an epidemic in children. *Am J Epidemiol* 1973; 98: 184-91.

Barr SC, McDonough PL, Scipioni-Ball RL, Starr JK. Serologic responses of dogs given a commercial vaccine against *Leptospira interrogans* serovar Pomona and *Leptospira kirschneri* serovar Grippotyphosa. *Am J Vet Res* 2005; 66: 1780-4.

Batza HJ, Weiss R. Occurrence of *Leptospira* antibodies in cat serum samples. *Kleintierprax* 1987; 32: 171-2.

Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 757-71.

Blackmore DK, Bell L, Schollum L. Leptospirosis in meat inspectors: preliminary results of a serological survey. *N Z Med J* 1979; 90: 415-8.

Bolin CA, Koellner P. Human-to-human transmission of *Leptospira interrogans* by milk. *J Infect Dis* 1988; 158: 246-7.

Bolin CA, Zuerner RL, Trueba G. Comparison of three techniques to detect *Leptospira interrogans* serovar Hardjo type hardjo-bovis in bovine urine. *Am J Vet Res* 1989; 50: 1001-3.

Bolin CA. Diagnosis of leptospirosis: a reemerging disease of companion animals.

Semin Vet Med Surg (Small Anim) 1996; 11: 166-71.

Bolin CA, Alt DP. Use of a monovalent leptospiral vaccine to prevent renal colonization and urinary shedding in cattle exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. Am J Vet Res 2001; 62: 995-1000.

Boonsilp S, Thaipadungpanit J, Amornchai P, Wuthiekanun V, Bailey MS, Holden MT, Zhang C, Jiang X, Koizumi N, Taylor K, Galloway R, Hoffmaster AR, Craig S, Smythe LD, Hartskeerl RA, Day NP, Chantratita N, Feil EJ, Aanensen DM, Spratt BG, Peacock SJ. A single multilocus sequence typing (MLST) scheme for seven pathogenic *Leptospira* species. PLoS Negl Trop Dis 2013; 7: e1954.

Borg-Petersen C, Fagroeus A. The influence of the antigen density and other factors on the serum titer in the agglutination-lysis-test for leptospirosis. Acta Pathol Microbiol Scand 1949; 26: 555-67.

Brenner DJ, Kaufmann AF, Sulzer KR, Steigerwalt AG, Rogers FC, Weyant RS. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. Int J Syst Bacteriol 1999; 49: 839-58.

Brown PD, Gravekamp C, Carrington DG, van de Kemp H, Hartskeerl RA, Edwards CN, Everard CO, Terpstra WJ, Levett PN. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. J Med Microbiol 1995; 43: 110-4.

Bundesinstitut für Risikobewertung. Leptospirose - eine seltene, aber immer häufiger auftretende Erkrankung. Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin; 2014. abrufbar über <http://www.bfr.bund.de/cm/343/leptospirose-eine-seltene-aber-immer-haeufiger-auftretende-erkrankung.pdf>.

Campagnolo ER, Warwick MC, Marx HL, Jr., Cowart RP, Donnell HD, Jr., Bajani MD, Bragg SL, Esteban JE, Alt DP, Tappero JW, Bolin CA, Ashford DA.

Analysis of the 1998 outbreak of leptospirosis in Missouri in humans exposed to infected swine. *J Am Vet Med Assoc* 2000; 216: 676-82.

Carbrey EA. The relative importance of variable factors in the agglutination-lysis test. *Proc Annu U S Livest Sanit Assoc* 1960; 64: 130-42.

Cerqueira GM, Picardeau M. A century of *Leptospira* strain typing. *Infect Genet Evol* 2009; 9: 760-8.

Cerqueira GM, McBride AJ, Queiroz A, Pinto LS, Silva EF, Hartskeerl RA, Reis MG, Ko AI, Dellagostin OA. Monitoring *Leptospira* strain collections: the need for quality control. *Am J Trop Med Hyg* 2010; 82: 83-7.

Cerri D, Ebani VV, Fratini F, Pinzauti P, Andreani E. Epidemiology of leptospirosis: observations on serological data obtained by a "diagnostic laboratory for leptospirosis" from 1995 to 2001. *New Microbiol* 2003; 26: 383-9.

Chan OY, Paul DR, Sng EH. Leptospirosis among abattoir workers - a serological survey. *Singapore Med J* 1987; 28: 293-6.

Chappel RJ, Goris M, Palmer MF, Hartskeerl RA. Impact of proficiency testing on results of the microscopic agglutination test for diagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5484-8.

Clegg FG, Heath PJ. Subclinical *L. Icterohaemorrhagiae* infection in dogs associated with a case of human leptospirosis. *Vet Rec* 1975; 96: 385.

Colagross-Schouten AM, Mazet JA, Gulland FM, Miller MA, Hietala S. Diagnosis and seroprevalence of leptospirosis in California sea lions from coastal California. *J Wildl Dis* 2002; 38: 7-17.

Cole JR, Jr., Sulzer CR, Pursell AR. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. *Appl Microbiol* 1973; 25: 976-80.

Colegrove KM, Lowenstine LJ, Gulland FM. Leptospirosis in northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*) stranded along the California coast. *J Wildl Dis* 2005; 41: 426-30.

Cullen PA, Cordwell SJ, Bulach DM, Haake DA, Adler B. Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. *Infect Immun* 2002; 70: 2311-8.

Cullen PA, Xu X, Matsunaga J, Sanchez Y, Ko AI, Haake DA, Adler B. Surfaceome of *Leptospira* spp. *Infect Immun* 2005; 73: 4853-63.

Cumberland P, Everard CO, Levett PN. Assessment of the efficacy of an IgM-elisa and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61: 731-4.

Curling A. Equine recurrent uveitis: classification, etiology, and pathogenesis. *Compend Contin Educ Vet* 2011; 33: E2.

Damborg P, Broens EM, Chomel BB, Guenther S, Pasmans F, Wagenaar JA, Weese JS, Wieler LH, Windahl U, Vanrompay D, Guardabassi L. Bacterial zoonoses transmitted by household pets: state-of-the-art and future perspectives for targeted research and policy actions. *J Comp Pathol* 2015; doi:10.1016/j.jcpa.2015.03.004

Davis MA, Evermann JF, Petersen CR, VancerSchalie J, Besser TE, Huckabee J, Daniels JB, Hancock DD, Leslie M, Baer R. Serological survey for antibodies to *Leptospira* in dogs and raccoons in Washington State. *Zoonoses Public Health* 2008; 55: 436-42.

Dedie K, Bockemühl J, Kühn H, Volkmer KJ, Weinke T. Leptospirosen. In: *Bakterielle Zoonosen bei Tier und Mensch*, 1st ed. Stuttgart: Enke; 1993. p. 105-33.

Desai S, van Treeck U, Lierz M, Espelage W, Zota L, Sarbu A, Czerwinski M, Sadowska-Todys M, Avdicova M, Reetz J, Luge E, Guerra B, Nockler 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: 691-7.

Dey S, Mohan CM, Kumar TM, Ramadass P, Nainar AM, Nachimuthu K. Recombinant LipL32 antigen-based single serum dilution ELISA for detection of canine leptospirosis. *Vet Microbiol* 2004; 103: 99-106.

Dey S, Mohan CM, Ramadass P, Nachimuthu K. Recombinant antigen-based dipstick ELISA for the diagnosis of leptospirosis in dogs. *Vet Rec* 2007; 160: 186-8.

Dickeson D, Love DN. A serological survey of dogs, cats and horses in south-eastern Australia for leptospiral antibodies. *Aust Vet J* 1993; 70: 389-90.

Diesch SL, McCulloch WF, Braun JL, Ellinghausen HC, Jr. Leptospire isolated from frog kidneys. *Nature* 1966; 209: 939-40.

Douglin CP, Jordan C, Rock R, Hurley A, Levett PN. Risk factors for severe leptospirosis in the parish of St. Andrew, Barbados. *Emerg Infect Dis* 1997; 3: 78-80.

Doungchawee G, Kositanont U, Niwetpathomwat A, Inwisai T, Sagarasaeranee P, Haake DA. Early diagnosis of leptospirosis by immunoglobulin M immunoblot testing. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15: 492-8.

Dupouey J, Faucher B, Edouard S, Richet H, Kodjo A, Drancourt M, Davoust B. Human leptospirosis: an emerging risk in Europe? *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2014; 37: 77-83.

Dura EU. Vergleichende Untersuchungen von Enzyme Linked Immunosorbent

Assay (ELISA), Mikroagglutinationsreaktion und Immunfluoreszenztest zum Nachweis von Antikörper gegen Leptospiren (Dissertation). München: Ludwig-Maximilians Universität; 1993.

Ehsanollah S, Gholam RA. Detection of leptospiral antibodies by microscopic agglutination test in north-east of Iran. *Asian Pac J Trop Biomed* 2011; 1: 227-9.

Ellinghausen HC, Jr., McCullough WG. Nutrition of *Leptospira Pomona* and growth of 13 other serotypes: Fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. *Am J Vet Res* 1965; 26: 45-51.

Ellis WA, Michna SW. Bovine leptospirosis: demonstration of leptospire of the Hebdomadis serogroup in aborted fetuses and a premature calf. *Vet Rec* 1976; 99: 430-2.

Ellis WA, O'Brien JJ, Neill SD, Ferguson HW, Hanna J. Bovine leptospirosis: microbiological and serological findings in aborted fetuses. *Vet Rec* 1982; 110: 147-50.

Ellis WA. The diagnosis of leptospirosis in farm animals. In: *The Present State of Leptospirosis Diagnosis and Control*. 1st ed. Ellis WA, Little TWA, eds. Dordrecht, Netherlands: Martinus Nijhoff; 1986: p. 13-31.

Ellis WA. Control of canine leptospirosis in Europe: time for a change? *Vet Rec* 2010; 167: 602-5.

Enright MC, Spratt BG. Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol* 1999; 7: 482-7.

Esteves LM, Bulhoes SM, Branco CC, Mota FM, Paiva C, Cabral R, Vieira ML, Mota-Vieira L. Human leptospirosis: seroreactivity and genetic susceptibility in the population of Sao Miguel Island (Azores, Portugal). *PLoS One* 2014; 9: e108534.

Everard JD, Everard CO. Leptospirosis in the Caribbean. *Rev Med Microbiol* 1993; 4: 114-22.

Faine S. Guidelines for the control of leptospirosis. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 1982; 1-171.

Feigin RD, Lobes LA, Jr., Anderson D, Pickering L. Human leptospirosis from immunized dogs. *Ann Intern Med* 1973; 79: 777-85.

Fiedler A. Zur Weilschen Krankheit. *Dtsch Arch Klin Med* 1888; 42: 261.

Fink JM, Moore GE, Landau R, Vemulapalli R. Evaluation of three 5' exonuclease-based real-time polymerase chain reaction assays for detection of pathogenic *Leptospira* species in canine urine. *J Vet Diagn Invest* 2015; 27: 159-66.

Fraser DW, Glosser JW, Francis DP, Phillips CJ, Feeley JC, Sulzer CR. Leptospirosis caused by serotype Fort-Bragg. A suburban outbreak. *Ann Intern Med* 1973; 79: 786-9.

Fraune CK, Schweighauser A, Francey T. Evaluation of the diagnostic value of serologic microagglutination testing and a polymerase chain reaction assay for diagnosis of acute leptospirosis in dogs in a referral center. *J Am Vet Med Assoc* 2013; 242: 1373-80.

Gan SD, Patel KR. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Invest Dermatol* 2013; 133: e12.

Garibyan L, Avashia N. Polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol* 2013; 133: e6.

Gaudie CM, Featherstone CA, Phillips WS, McNaught R, Rhodes PM, Errington J, Fearnley C, Fenner JS, Pritchard GC. Human *Leptospira interrogans* serogroup

Icterohaemorrhagiae infection (Weil's disease) acquired from pet rats. *Vet Rec* 2008; 163: 599-601.

Geisen V, Stengel C, Brem S, Muller 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: 324-8.

Geisen V, Stengel C, Hartmann K. Epidemiologische Situation der Leptospirose beim Hund in Süddeutschland. *Tierärztl Prax* 2008; 36: 329-36.

Gerlach T, Stephan I. Epidemiologische Situation der kaninen Leptospirose in Norddeutschland in den Jahren 2003-2006 - Eine retrospektive Studie. *Tierärztl Prax* 2007; 35: 421-9.

Gerritsen MJ, Olyhoek T, Smits MA, Bokhout BA. Sample preparation method for polymerase chain reaction-based semiquantitative detection of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo subtype Hardjobovis in bovine urine. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2805-8.

Gerritsen MJ, Koopmans MJ, Peterse D, Olyhoek T. Sheep as maintenance host for *Leptospira interrogans* serovar Hardjo subtype Hardjobovis. *Am J Vet Res* 1994; 55: 1232-7.

Goarant C, Bourhy P, D'Ortenzio E, Dartevelle S, Mauron C, Soupe-Gilbert ME, Bruyere-Ostells L, Gourinat AC, Picardeau M, Nato F, Chanteau S. Sensitivity and specificity of a new vertical flow rapid diagnostic test for the serodiagnosis of human leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; 7: e2289.

Goldstein RE, Lin RC, Langston CE, Scrivani PV, Erb HN, Barr SC. Influence of infecting serogroup on clinical features of leptospirosis in dogs. *J Vet Intern Med* 2006; 20: 489-94.

Goldstein RE. Canine leptospirosis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2010;

40: 1091-101.

Gonsalez CR, Casseb J, Monteiro FG, Paula-Neto JB, Fernandez RB, Silva MV, Camargo ED, Mairinque JM, Tavares LC. Use of doxycycline for leptospirosis after high-risk exposure in Sao Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1998; 40: 59-61.

Gravekamp C, Van de Kemp H, Franzen M, Carrington D, Schoone GJ, Van Eys GJ, Everard CO, Hartskeerl RA, Terpstra WJ. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. *J Gen Microbiol* 1993; 139: 1691-700.

Greene CE, Sykes JE, Brown CA, Hartmann K. Leptospirosis. In: *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 3rd ed. Greene CE, editor. St Louis: Saunders Elsevier; 2006. p. 402-17.

Greene CE, Sykes JE, Moore GE, Goldstein RE, Schultz RD. Leptospirosis. In: *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 4th ed. Greene CE, editor. St Louis: Saunders Elsevier; 2012. p. 431-47.

Guerra MA. Leptospirosis. *J Am Vet Med Assoc* 2009; 234: 472-8.

Guidugli F, Castro AA, Atallah AN. Antibiotics for preventing leptospirosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2000: CD001305.

Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, Matsunaga J, Levett PN, Bolin CA. The leptospiral major outer membrane protein *lipL32* is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun* 2000; 68: 2276-85.

Harkin KR, Roshto YM, Sullivan JT, Purvis TJ, Chengappa MM. Comparison of polymerase chain reaction assay, bacteriologic culture, and serologic testing in assessment of prevalence of urinary shedding of leptospires in dogs. *J Am Vet*

Med Assoc 2003; 222: 1230-3.

Hartman EG, van Houten M, Frik JF, van der Donk JA. Humoral immune response of dogs after vaccination against leptospirosis measured by an IgM- and IgG-specific ELISA. *Vet Immunol Immunopathol* 1984; 7: 245-54.

Hartman EG, van den Ingh TS, Rothuizen J. Clinical, pathological and serological features of spontaneous canine leptospirosis. An evaluation of the IgM- and IgG-specific ELISA. *Vet Immunol Immunopathol* 1986; 13: 261-71.

Haunz EA, Cardy JD. Canicola fever report of nine cases in one family, with abstract of the world literature. *AMA Arch Intern Med* 1952; 89: 978-93.

Henry RA, Johnson RC, Bohlool BB, Schmidt EL. Detection of *Leptospira* in soil and water by immunofluorescence staining. *Appl Microbiol* 1971; 21: 953-6.

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 1992; 10: 413-7.

Hoag WG, Gochenour WS, Jr., Yager RH. Use of baby chicks for isolation of leptospires. *Proc Soc Exp Biol Med* 1953; 83: 712-3.

Hodges RT, Ekdahl MO. Use of a fluorescent antibody technique for the serological differentiation of leptospiral serotypes in cultures and in bovine urine. *N Z Vet J* 1973; 21: 109-15.

Hoenigl M, Wallner C, Allerberger F, Schmoll F, Seeber K, Wagner J, Valentin T, Zollner-Schwetz I, Flick H, Krause R. Autochthonous leptospirosis in South-East Austria, 2004-2012. *PLoS One* 2014; 9: e85974.

Hofer. *Der Typhus der Hunde. Repertorium der Thierheilkunde* 1852; 13: 201-11.

Horsch F, Klockmann J, Janetzky B, Drechsler H, Lobnitz P. Untersuchungen von

Wildtieren auf Leptospirose. *Monatsh Veterinarmed* 1970; 25: 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: 377-402.

Jansen A, Schoneberg I, Frank C, Alpers K, Schneider T, Stark K. Leptospirosis in Germany, 1962-2003. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1048-54.

Jansen A, Luge E, Guerra B, Wittschen P, Gruber AD, Loddenkemper C, Schneider T, Lierz M, Ehlert D, Appel B, Stark K, Nockler K. Leptospirosis in urban wild boars, Berlin, Germany. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 739-42.

Johnson DW. The Australian leptospires. *Med J Aust* 1950; 2: 724-31.

Johnson RC, Rogers P. 5-Fluorouracil as a selective agent for growth of *Leptospirae*. *J Bacteriol* 1964; 87: 422-6.

Johnson RC, Harris VG. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires. I. Growth at low temperatures. *J Bacteriol* 1967; 94: 27-31.

Jung BY, Song YK, Choi JS, Lee KW, Ha TY, Yoon SS, Kweon CH, Park CK. Seroprevalence of leptospirosis in animals in Korea. *Vet Rec* 2008; 163: 28-9.

Jurke A, Bannert N, Brehm K, Fingerle V, Kempf VA, Kompf D, Lunemann M, Mayer-Scholl A, Niedrig M, Nockler K, Scholz H, Splettstoesser W, Tappe D, Fischer SF. 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* 2015; 305: 652-62.

Kadlec V, Ippen R, Schröder HD, Kozojed V, Jira J. Antibodies to *Leptospirae* in

zoo animals in German Democratic Republic. *Folia Parasitol* 1983; 30: 9-13.

Khan G, Kangro HO, Coates PJ, Heath RB. Inhibitory effects of urine on the polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA. *J Clin Pathol* 1991; 44: 360-5.

Kiely G, Leahy P, Ludlow F, Stefanini B, Reilly E, Monk M, Harris J. Extreme weather, climate and natural disasters in Ireland. Department of the Environment, Heritage and Local Government. Environmental Protection Agency Ireland, Wexford, Ireland; 2010 abrufbar über https://www.epa.ie/pubs/reports/research/climate/CCRP_5_Kiely_ExtremeWeather_syn_web.pdf.

Kim CH, Khan M, Morin DE, Hurley WL, Tripathy DN, Kehrl M, Jr., Oluoch AO, Kakoma I. Optimization of the PCR for detection of *Staphylococcus aureus* nuc gene in bovine milk. *J Dairy Sci* 2001; 84: 74-83.

Kingscote BF. Leptospirosis: an occupational hazard to veterinarians. *Can Vet J* 1986; 27: 78-81.

Klaasen HL, Molkenboer MJ, Vrijenhoek MP, Kaashoek MJ. Duration of immunity in dogs vaccinated against leptospirosis with a bivalent inactivated vaccine. *Vet Microbiol* 2003; 95: 121-32.

Klaasen HL, van der Veen M, Molkenboer MJ, Sutton D. A novel tetravalent *Leptospira* bacterin protects against infection and shedding following challenge in dogs. *Vet Rec* 2013; 172: 181.

Klaasen HL, van der Veen M, Sutton D, Molkenboer MJ. A new tetravalent canine leptospirosis vaccine provides at least 12 months immunity against infection. *Vet Immunol Immunopathol* 2014; 158: 26-9.

Klima. Kansas, 2016; 08.03.2016: <http://de.climate-data.org/region/933/>.

Kohn B, Steinicke K, Arndt G, Gruber AD, Guerra B, Jansen A, Kaser-Hotz B, Klopffleisch R, Lotz F, Luge E, Nockler K. Pulmonary abnormalities in dogs with leptospirosis. *J Vet Intern Med* 2010; 24: 1277-82.

Koutis C. *Special Epidemiology*. 1st ed. Athens, Greece; 2007.

Langston CE, Heuter KJ. Leptospirosis. A re-emerging zoonotic disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2003; 33: 791-807.

Lantz PG, Matsson M, Wadstrom T, Radstrom P. Removal of PCR inhibitors from human faecal samples through the use of an aqueous two-phase system for sample preparation prior to PCR. *J Microbiol Meth* 1997; 28: 159-67.

Larson AD, Treick RW, Edwards CL, Cox CD. Growth studies and plate counting of leptospire. *J Bacteriol* 1959; 77: 361-6.

Lee HS, Levine M, Guptill-Yoran C, Johnson AJ, von Kamecke P, Moore GE. Regional and temporal variations of *Leptospira* seropositivity in dogs in the United States, 2000-2010. *J Vet Intern Med* 2014; 28: 779-88.

Leutenegger CM. The real-time TaqMan PCR and applications in Veterinary Medicine. *Veterinary Science Tomorrow* 2001; January: 1-15.

Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 296-326.

Levett PN, Branch SL. Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay methods for detection of immunoglobulin M antibodies in acute leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 66: 745-8.

Levett PN. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 447-52.

Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG, Mayer LW.

Detection of pathogenic leptospire by real-time quantitative PCR. *J Med Microbiol* 2005; 54: 45-9.

Levett PN. Systematics of *Leptospiraceae*. In: *Leptospira* and Leptospirosis. Adler B, editor. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2015. p. 11-20.

Lim VK. Leptospirosis: a re-emerging infection. *Malays J Pathol* 2011; 33: 1-5.

Lugauer M. Das Münchner Wetter 2010 stoppt den Trend der zu warmen Jahre. Statistisches Amt München, München: 2011; 1. Quartalsheft.

Luciani O. Réceptivité et sensibilité du chat aux leptospire (Dissertation). Nantes, Frankreich: Université de Nantes; 2004.

Maciel EA, de Carvalho AL, Nascimento SF, de Matos RB, Gouveia EL, Reis MG, Ko AI. Household transmission of *Leptospira* infection in urban slum communities. *PLoS Negl Trop Dis* 2008; 2: e154.

Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 3140-5.

Major A, Schweighauser A, Francey T. Increasing incidence of canine leptospirosis in Switzerland. *Int J Environ Res Public Health* 2014; 11: 7242-60.

Martin L, Pettit A. Sero-diagnostic de la spirochaetose icterohaemorrhagique. *Bull Mem Soc Med Hop Paris* 1918; 42: 672-5.

Martin LE, Wiggans KT, Wennogle SA, Curtis K, Chandrashekar R, Lappin MR. Vaccine-associated *Leptospira* antibodies in client-owned dogs. *J Vet Intern Med* 2014; 28: 789-92.

Martinez Sanchez R, Obregon Fuentes AM, Perez Sierra A, Baly Gil A, Diaz Gonzalez M, Baro Suarez M, Menendez Capote R, Ruiz Perez A, Sierra Gonzalez G, Lopez Chavez AU. Reactogenicidad e inmunogenicidad de la primera vacuna cubana contra la leptospirosis humana. *Rev Cubana Med Trop* 1998; 50: 159-66.

Masri SA, Nguyen PT, Gale SP, Howard CJ, Jung SC. A polymerase chain reaction assay for the detection of *Leptospira* spp. in bovine semen. *Can J Vet Res* 1997; 61: 15-20.

Matthias MA, Ricaldi JN, Cespedes M, Diaz MM, Galloway RL, Saito M, Steigerwalt AG, Patra KP, Ore CV, Gotuzzo E, Gilman RH, Levett PN, Vinetz JM. Human leptospirosis caused by a new, antigenically unique *Leptospira* associated with a *Rattus* species reservoir in the Peruvian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis* 2008; 2: e213.

Mayer-Scholl A, Luge E, Draeger A, Nockler K, Kohn B. Distribution of *Leptospira* serogroups in dogs from Berlin, Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2013; 13: 200-2.

McCrum FR, Jr., Stockard JL, Robinson CR, Turner LH, Levis DG, Maisey CW, Kelleher MF, Gleiser CA, Smadel JE. Leptospirosis in Malaya. I. Sporadic cases among military and civilian personnel. *Am J Trop Med Hyg* 1957; 6: 238-56.

McLean M, Ruscoe Q, Kline T, King C, Nesdale A. A cluster of three cases of leptospirosis in dairy farm workers in New Zealand. *N Z Med J* 2014; 127: 13-20.

Merien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2219-24.

Meslin FX. Global aspects of emerging and potential zoonoses: a WHO perspective. *Emerg Infect Dis* 1997; 3: 223-8.

Midence JN, Leutenegger CM, Chandler AM, Goldstein RE. Effects of recent *Leptospira* vaccination on whole blood real-time PCR testing in healthy client-owned dogs. *J Vet Intern Med* 2012; 26: 149-52.

Miller MD, Annis KM, Lappin MR, Gill M, Lunn KF. Sensitivity and specificity of the microscopic agglutination test for the diagnosis of leptospirosis in dogs. *J Vet Intern Med* 2008; 22: 787 (abstract).

Miller MD, Annis KM, Lappin MR, Lunn KF. Variability in results of the microscopic agglutination test in dogs with clinical leptospirosis and dogs vaccinated against leptospirosis. *J Vet Intern Med* 2011; 25: 426-32.

Milner AR, Wilks CR, Morgan IR, Rosen NE. *Leptospira* serogroup Hebdomadis infection as an Australian zoonosis. *Aust Vet J* 1980; 56: 70-3.

Minke JM, Bey R, Tronel JP, Latour S, Colombet G, Yvarel J, Cariou C, Guiot AL, Cozette V, Guigal PM. Onset and duration of protective immunity against clinical disease and renal carriage in dogs provided by a bi-valent inactivated leptospirosis vaccine. *Vet Microbiol* 2009; 137: 137-45.

Monteiro L, Bonnemaïson D, Vekris A, Petry KG, Bonnet J, Vidal R, Cabrita J, Megraud F. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 995-8.

Muller H, Winkler P. Ergebnisse serologischer Untersuchungen auf *Leptospira*-Antikörper bei Füchsen. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 1994; 107: 90-3.

Mumford CJ. Leptospirosis and water sports. *Br J Hosp Med* 1989; 41: 519.

Murray RE, Fielding JW. Notes on the silver impregnation of *Leptospira Icterohaemorrhagiae*. *Med J Aust* 1936; 1: 610-1.

Musso D, La Scola B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: a challenge. *J*

Microbiol Immunol Infect 2013; 46: 245-52.

Mylonakis ME, Bourtzi-Hatzopoulou E, Koutinas AF, Petridou E, Saridomichelakis MN, Leontides L, Siochu A. Leptospiral seroepidemiology in a feline hospital population in Greece. Vet Rec 2005; 156: 615-6.

NASPHV. Compendium of veterinary standard precautions for zoonotic disease prevention in veterinary personnel. J Am Vet Med Assoc 2010; 237: 1403-22.

Niloofoa R, Fernando N, de Silva NL, Karunanayake L, Wickramasinghe H, Dikmadugoda N, Premawansa G, Wickramasinghe R, de Silva HJ, Premawansa S, Rajapakse S, Handunnetti S. Diagnosis of leptospirosis: Comparison between microscopic agglutination test, IgM-ELISA and IgM rapid immunochromatography test. PLoS One 2015; 10: e0129236.

Odontsetseg N, Sakoda Y, Kida H. Serological surveillance of canine leptospirosis in Mongolia. Vet Rec 2005; 157: 120-1.

OIE. Leptospirosis. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Paris, France; 2014: 1-15. abrufbar über <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>.

Padre LP, Watt G, Tuazon ML, Gray MR, Laughlin LW. A serologic survey of rice-field leptospirosis in Central Luzon, Philippines. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1988; 19: 197-9.

Palaniappan RU, Chang YF, Chang CF, Pan MJ, Yang CW, Harpending P, McDonough SP, Dubovi E, Divers T, Qu J, Roe B. Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. Mol Cell Probes 2005; 19: 111-7.

Palaniappan RU, Ramanujam S, Chang YF. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. Curr Opin Infect Dis 2007; 20: 284-92.

Palmer MF, Waitkins SA, Wanyangu SW. A comparison of live and formalised leptospiral microscopic agglutination test. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A* 1987; 265: 151-9.

Pappas G, Papadimitriou P, Siozopoulou V, Christou L, Akritidis N. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. *Int J Infect Dis* 2008; 12: 351-7.

Patil D, Dahake R, Roy S, Mukherjee S, Chowdhary A, Deshmukh R. Prevalence of leptospirosis among dogs and rodents and their possible role in human leptospirosis from Mumbai, India. *Indian J Med Microbiol* 2014; 32: 64-7.

Paul-Ehrlich-Institut. Zugelassene Tierimpfstoffe. abgerufen am 02.03.2016 <http://www.pei.de/DE/arzneimittel/impfstoff-impfstoffe-fuer-tiere/impfstoff-impfstoffe-fuer-tiere-node.html>.

Pfukenyi DM, Chipunga SL, Dinginya L, Matenga E. A survey of pet ownership, awareness and public knowledge of pet zoonoses with particular reference to roundworms and hookworms in Harare, Zimbabwe. *Trop Anim Health Prod* 2010; 42: 247-52.

Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Med Mal Infect* 2013; 43: 1-9.

Picardeau M, Bertherat E, Jancloes M, Skouloudis AN, Durski K, Hartskeerl RA. Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: current tools and emerging technologies. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014; 78: 1-8.

Plank R, Dean D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. *Microbes Infect* 2000; 2: 1265-76.

Prescott JF, McEwen B, Taylor J, Woods JP, Abrams-Ogg A, Wilcock B. Resurgence of leptospirosis in dogs in Ontario: recent findings. *Can Vet J* 2002;

43: 955-61.

Ratnam S. Leptospirosis: An Indian perspective. *Indian J Med Microbiol* 1994; 12: 228-39.

Rentko VT, Clark N, Ross LA, Schelling SH. Canine leptospirosis. A retrospective study of 17 cases. *J Vet Intern Med* 1992; 6: 235-44.

Robert Koch-Institut. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2001. Robert Koch-Institut, Berlin: 2002; 80-2.

Robert Koch-Institut. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2002. Robert Koch-Institut, Berlin: 2003; 97-9.

Robert Koch-Institut. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2003. Robert Koch-Institut, Berlin: 2004; 107-8.

Robert Koch-Institut. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2004. Robert Koch-Institut, Berlin: 2005; 115-6.

Robert Koch-Institut. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2005. Robert Koch-Institut, Berlin: 2006; 118-20.

Robert Koch-Institut. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2006. Robert Koch-Institut, Berlin: 2007; 123-4.

Robert Koch-Institut. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2007. Robert Koch-Institut, Berlin: 2008; 124-7.

Robert Koch-Institut. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2008. Robert Koch-Institut, Berlin: 2009; 125-7.

Robert Koch-Institut. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger

Krankheiten für 2009. Robert Koch-Institut, Berlin: 2010; 132-4.

Robert Koch-Institut. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2010. Robert Koch-Institut, Berlin: 2011; 142-4.

Robert Koch-Institut. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2011. Robert Koch-Institut, Berlin: 2012; 126-8.

Robert Koch-Institut. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2012. Robert Koch-Institut, Berlin: 2013; 134-6.

Robert Koch-Institut. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2013. Robert Koch-Institut, Berlin: 2014; 137-9.

Robert Koch-Institut. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2014. Robert Koch-Institut, Berlin: 2015; 144-6.

Rodriguez-Gonzalez I, Fillonneau C, Blanchet B, Suard I, Catilina P, Andre-Fontaine G. Etude de l'efficacite du vaccin Spirolept contre la leptospirose par la protection passive de rongeurs de laboratoire. *Med Mal Infect* 2004; 34: 196-200.

Rojas P, Monahan AM, Schuller S, Miller IS, Markey BK, Nally JE. Detection and quantification of leptospires in urine of dogs: a maintenance host for the zoonotic disease leptospirosis. *Eur J Clin Microbiol* 2010; 29: 1305-9.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230: 1350-4.

Sandhu GK, Singh D. Level of awareness regarding some zoonotic diseases, among dog owners of Ithaca, New York. *J Family Med Prim Care* 2014; 3: 418-23.

Savio ML, Rossi C, Fusi P, Tagliabue S, Pacciarini ML. Detection and identification of *Leptospira interrogans* serovars by PCR coupled with restriction endonuclease analysis of amplified DNA. J Clin Microbiol 1994; 32: 935-41.

Schmid GP, Steere AC, Kornblatt AN, Kaufmann AF, Moss CW, Johnson RC, Hovind-Hougen K, Brenner DJ. Newly recognized *Leptospira* species ("*Leptospira inadai*" serovar lyme) isolated from human skin. J Clin Microbiol 1986; 24: 484-6.

Schmidt DR, Winn RE, Keefe TJ. Leptospirosis. Epidemiological features of a sporadic case. Arch Intern Med 1989; 149: 1878-80.

Schoenen D. Role of disinfection in suppressing the spread of pathogens with drinking water: possibilities and limitations. Water Res 2002; 36: 3874-88.

Schönberg A, Lutz W, Kämpe U. Untersuchung von Serumproben vom Schwarzwild (*Sus scrofa* L. 1758) auf Leptospirose. Z Jagdwiss 1999; 45: 262-5.

Schüffner W, Mochtar A. Experiments on the differential characters of *Leptospira*-strains with introductory remarks on the process of agglutination and lysis. Proceedings of the Imperial Academy of Sciences, Amsterdam 1926; 30: 25-32.

Schuller S, Francey T, Hartmann K, Hugonnard M, Kohn B, Nally JE, Sykes J. European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. J Small Anim Pract 2015; 56: 159-79.

Schwarz E. Classification, origin and distribution of commensal rats. Bull World Health Organ 1960; 23: 411-6.

Sehgal SC, Sugunan AP, Murhekar MV, Sharma S, Vijayachari P. Randomized controlled trial of doxycycline prophylaxis against leptospirosis in an endemic area. Int J Antimicrob Agents 2000; 13: 249-55.

Sharma B, Jain R. Right choice of a method for determination of cut-off values: A statistical tool for a diagnostic test. *Asian J Med Sci* 2014; 5: 30-4.

Shutler GG, Gagnon P, Verret G, Kalyn H, Korkosh S, Johnston E, Halverson J. Removal of a PCR inhibitor and resolution of DNA STR types in mixed human-canine stains from a five year old case. *J Forensic Sci* 1999; 44: 623-6.

Silva MV, Camargo ED, Batista L, Vaz AJ, Brandao AP, Nakamura PM, Negrao JM. Behaviour of specific IgM, IgG and IgA class antibodies in human leptospirosis during the acute phase of the disease and during convalescence. *J Trop Med Hyg* 1995; 98: 268-72.

Slack A, Symonds M, Dohnt M, Harris C, Brookes D, Smythe L. Evaluation of a modified Taqman assay detecting pathogenic *Leptospira* spp. against culture and *Leptospira*-specific IgM enzyme-linked immunosorbent assay in a clinical environment. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 57: 361-6.

Smythe L. Leptospirosis worldwide, 1999. *Wkly Epidemiol Rec* 1999; 74: 237-42.

Songer JG, Thiermann AB. Leptospirosis. *J Am Vet Med Assoc* 1988; 193: 1250-4.

StIKo Vet. Leitlinie zur Impfung von Kleintieren. 2013: 1-32. abrufbar über http://www.tieraerzteverband.de/bpt/berufspolitik/leitlinien/impfkommission/2013_07_Leitlinie_Kleintiere_final_gr.pdf.

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

Steneroden KK, Hill AE, Salman MD. Zoonotic disease awareness in animal shelter workers and volunteers and the effect of training. *Zoonoses Public Health*

2011; 58: 449-53.

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: 247-55.

Stokes JE, Kaneene JB, Schall WD, Kruger JM, Miller R, Kaiser L, Bolin CA. Prevalence of serum antibodies against six *Leptospira* serovars in healthy dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2007; 230: 1657-64.

Sunbul M, Esen S, Leblebicioglu H, Hokelek M, Pekbay A, Eroglu C. *Rattus norvegicus* acting as reservoir of *Leptospira interrogans* in the Middle Black Sea region of Turkey, as evidenced by PCR and presence of serum antibodies to *Leptospira* strain. *Scand J Infect Dis* 2001; 33: 896-8.

Suputtamongkol Y, Pongtavornpinyo W, Lubell Y, Suttinont C, Hoontrakul S, Phimda K, Losuwanaluk K, Suwancharoen D, Silpasakorn S, Chierakul W, Day N. Strategies for diagnosis and treatment of suspected leptospirosis: a cost-benefit analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4: e610.

Sykes JE, Hartmann K, Lunn KF, Moore GE, Stoddard RA, Goldstein RE. 2010 ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention. *J Vet Intern Med* 2011; 25: 1-13.

Takafuji ET, Kirkpatrick JW, Miller RN, Karwacki JJ, Kelley PW, Gray MR, McNeill KM, Timboe HL, Kane RE, Sanchez JL. An efficacy trial of doxycycline chemoprophylaxis against leptospirosis. *N Engl J Med* 1984; 310: 497-500.

Terpstra WJ, Jabboury-Postema J, Korver H. Immunoperoxidase staining of leptospires in blood and urine. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A* 1983; 254: 534-9.

Thaipadungpanit J, Wuthiekanun V, Chierakul W, Smythe LD, Petkanchanapong

W, Limpai boon R, Apiwatanaporn A, Slack AT, Suputtamongkol Y, White NJ, Feil EJ, Day NP, Peacock SJ. A dominant clone of *Leptospira interrogans* associated with an outbreak of human leptospirosis in Thailand. PLoS Negl Trop Dis 2007; 1: e56.

Thaipadungpanit J, Chierakul W, Wuthiekanun V, Limmathurotsakul D, Amornchai P, Boonslip S, Smythe LD, Limpai boon R, Hoffmaster AR, Day NP, Peacock SJ. Diagnostic accuracy of real-time PCR assays targeting 16S rRNA and *lipL32* genes for human leptospirosis in Thailand: a case-control study. PLoS One 2011; 6: e16236.

Thiermann AB. Isolation of leptospire in diagnosis of leptospirosis. Mod Vet Pract 1984; 65: 758-9.

Tripathy DN, Hanson LE. Immunoperoxidase staining of leptospire. Appl Microbiol 1974; 27: 268-9.

Turner LH. Leptospirosis. I. Trans R Soc Trop Med Hyg 1967; 61: 842-55.

Turner LH. Leptospirosis. II. Serology. Trans R Soc Trop Med Hyg 1968; 62: 880-99.

Turner LH. Leptospirosis. Br Med J 1969; 1: 231-5.

Turner LH. Leptospirosis. III. Maintenance, isolation and demonstration of leptospire. Trans R Soc Trop Med Hyg 1970; 64: 623-46.

Twigg GI, Cuerden CM, Hughes DM, Medhurst P. The leptospirosis reservoir in British wild mammals. Vet Rec 1969; 84: 424-6.

Uip DE, Amato Neto V, Duarte MS. Diagnostico precoce da leptospirose por demonstracao de antigenos atraves de exame imuno-histoquimico em musculo da panturrilha. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1992; 34: 375-81.

Van de Maele I, Claus A, Haesebrouck F, Daminet S. Leptospirosis in dogs: a review with emphasis on clinical aspects. *Vet Rec* 2008; 163: 409-13.

Van der Hoeden J. Leptospiral antibodies in cold blooded animals. *Ann Soc Belg Med Trop* 1966; 46: 171-2.

Van Eys GJ, Gravekamp C, Gerritsen MJ, Quint W, Cornelissen MT, Schegget JT, Terpstra WJ. Detection of leptospires in urine by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2258-62.

Vicente J, Leon-Vizcaino L, Gortazar C, Jose Cubero M, Gonzalez M, Martin-Atance P. Antibodies to selected viral and bacterial pathogens in European wild boars from southcentral Spain. *J Wildl Dis* 2002; 38: 649-52.

Vinetz JM, Glass GE, Flexner CE, Mueller P, Kaslow DC. Sporadic urban leptospirosis. *Ann Intern Med* 1996; 125: 794-8.

Wagenaar JA, Segers RP, Van der Zeijst BA. Rapid and specific detection of pathogenic *Leptospira* species by amplification of ribosomal sequences. *Mol Biotechnol* 1994; 2: 1-14.

Wagenaar JA, Zuerner RL, Alt D, Bolin CA. Comparison of polymerase chain reaction assays with bacteriologic culture, immunofluorescence, and nucleic acid hybridization for detection of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo in urine of cattle. *Am J Vet Res* 2000; 61: 316-20.

Ward MP. Seasonality of canine leptospirosis in the United States and Canada and its association with rainfall. *Prev Vet Med* 2002; 56: 203-13.

Ward MP, Glickman LT, Guptill LE. Prevalence of and risk factors for leptospirosis among dogs in the United States and Canada: 677 cases (1970-1998). *J Am Vet Med Assoc* 2002; 220: 53-8.

Ward MP, Guptill LF, Prah A, Wu CC. Serovar-specific prevalence and risk factors for leptospirosis among dogs: 90 cases (1997-2002). *J Am Vet Med Assoc* 2004; 224: 1958-63.

Watt G, Alquiza LM, Padre LP, Tuazon ML, Laughlin LW. The rapid diagnosis of leptospirosis: a prospective comparison of the dot enzyme-linked immunosorbent assay and the genus-specific microscopic agglutination test at different stages of illness. *J Infect Dis* 1988a; 157: 840-2.

Watt G, Padre LP, Tuazon ML, Calubaquib C, Santiago E, Ranoa CP, Laughlin LW. Placebo-controlled trial of intravenous penicillin for severe and late leptospirosis. *Lancet* 1988b; 1: 433-5.

Weil A. Ueber eine eigentümliche, mit Milztumor, Icterus und Nephritis einhergehende akute Infektionskrankheit. *Dtsch Arch Klin Med* 1886; 39: 209-32.

WHO. Human leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control. Ed World Health Organization. 2003: 1-122. abrufbar über http://www.who.int/csr/don/en/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf.

Wild CJ, Greenlee JJ, Bolin CA, Barnett JK, Haake DA, Cheville NE. An improved immunohistochemical diagnostic technique for canine leptospirosis using antileptospiral antibodies on renal tissue. *J Vet Diagn Invest* 2002; 14: 20-4.

Woo TH, Patel BK, Smythe LD, Symonds ML, Norris MA, Dohnt MF. Identification of pathogenic *Leptospira* genospecies by continuous monitoring of fluorogenic hybridization probes during rapid-cycle PCR. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 3140-6.

Woodward MJ, Redstone JS. Differentiation of *Leptospira* serovars by the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Vet Rec* 1993; 132: 325-6.

Yan Y, Chen Y, Liou W, Ding J, Chen J, Zhang J, Zhang A, Zhou W, Gao Z, Ye X, Xiao Y. An evaluation of the serological and epidemiological effects of the outer envelope vaccine to *Leptospira*. J Chin Med Assoc 2003; 66: 224-30.

Yang CW, Wu MS, Pan MJ, Hsieh WJ, Vandewalle A, Huang CC. The *Leptospira* outer membrane protein *lipL32* induces tubulointerstitial nephritis-mediated gene expression in mouse proximal tubule cells. J Am Soc Nephrol 2002; 13: 2037-45.

Zaki SR, Shieh WJ. Leptospirosis associated with outbreak of acute febrile illness and pulmonary haemorrhage, Nicaragua, 1995. The Epidemic Working Group at Ministry of Health in Nicaragua. Lancet 1996; 347: 535-6.

Zavitsanou A, Babatsikou F. Leptospirosis: Epidemiology and preventive measures. H S J 2008; 2: 75-82.

VIII. DANKSAGUNG

Sehr herzlich möchte ich mich bei *Prof. Dr. Katrin Hartmann* für die Bereitstellung des interessanten Themas, sowie für die fachliche Betreuung und Unterstützung bei der Anfertigung dieser Dissertation bedanken. Außerdem möchte ich mich sehr herzlich für die Möglichkeit bedanken, die Ergebnisse meiner Arbeit auf nationalen und internationalen Kongressen präsentieren zu können.

Prof. Dr. Reinhard Straubinger danke ich besonders für die jederzeit engagierte Betreuung, seine Anregungen und die stets konstruktive Kritik bei der Erstellung der Publikation, sowie für die Bereitstellung eines Laborarbeitsplatzes im Institut für Bakteriologie und Mykologie.

Für die engagierte wissenschaftliche Betreuung und fachlichen Anregungen im Bereich der Leptospirendiagnostik bedanke ich mich sehr herzlich bei *Dr. Inke Krupka-Dyachenko, Dr. Viktor Dyachenko* und *Dr. Anna Rettinger*.

Bei allen *Mitarbeitern* der Medizinischen Kleintierklinik möchte ich mich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft bedanken. Ich habe unheimlich viel während meiner Zeit dort lernen können.

Bei *IDEXX Laboratories* möchte ich mich zunächst sehr herzlich für die finanzielle Unterstützung bedanken. Bei *Dr. Peter Kopp, Dr. Ivonne Stamm* und ihren Mitarbeitern möchte ich mich für die Durchführung des MAT und für die Mitarbeit an der Publikation bedanken.

Meinen Korrekturlesern der Publikation *Dr. Markus Killich* und *John Llewellyn*, danke ich, dass sie sich mit dem Text befasst und Wert auf Stil und Verständnis gelegt haben.

Prof. Dr. Gerd Mietzel, Dr. Thorsten Mietzel, Hannelore Mietzel und *Dr. Markus Killich* haben sich die Mühe gemacht, diese Arbeit Korrektur zu lesen. Herzlichen Dank für die investierte Zeit und Mühe.

Meiner Freundin *Melanie* danke ich dafür, dass sie jederzeit ein offenes Ohr für meine Probleme hat, für die Hilfestellung beim Einreichen des Papers und für die moralische Unterstützung während der letzten Züge dieser Arbeit.

Meiner *Schwester* danke ich für all die Jahre, in denen sie zu mir gehalten hat. Die vielen Glücksbringer, die ich während all der Prüfungen von ihr erhalten habe und den Glauben an mich.

Meinem Ehemann *Milan* danke ich für die unglaubliche Geduld, das Chaos auf unserem Schreibtisch während der Erstellung dieser Dissertation zu ertragen, sein Zutrauen und seine Zeit, welche er mir und meinem Projekt bedingungslos gewidmet hat.

Last but not least fühle ich mich zu außerordentlichem Dank meinen *Eltern* gegenüber dafür verpflichtet, dass sie mir einen langen und aufwendigen Bildungsweg ermöglicht haben, der mich schließlich auch in die Lage versetzte, diese Dissertation anzufertigen. Sie haben mir stets bedingungsloses Vertrauen entgegengebracht und zeigten unentwegt ihre Bereitschaft, auf meine Wünsche einzugehen.