

**Seroprävalenz von *Leptospira*-spp.-Infektionen
bei Rindern
aus Zentral- und Nordmadagaskar**

von Theresa Maria Zitzl, geb. Schafbauer

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

**Seroprävalenz von *Leptospira*-spp.-Infektionen
bei Rindern
aus Zentral- und Nordmadagaskar**

von Theresa Maria Zitzl, geb. Schafbauer
aus Regensburg

München 2020

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

Tag der Promotion: 08. Februar 2020

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	2
1	<i>Leptospira</i> spp.....	2
1.1	Taxonomie und Nomenklatur.....	2
1.2	Morphologie und mikrobiologische Eigenschaften	3
2	Infektion und Pathogenese	7
3	Immunologie	8
4	Leptospirose beim Menschen.....	10
5	Leptospirose beim Rind	11
5.1	Epidemiologie	11
5.2	Klinisches Erscheinungsbild beim Rind	12
5.3	Therapie.....	13
5.4	Prophylaxe.....	13
6	Diagnostik	14
6.1	Direkter Erregernachweis.....	14
6.1.1	Mikroskopischer Nachweis	15
6.1.2	Kultureller Nachweis.....	15
6.1.3	Polymerase-Kettenreaktion.....	18
6.2	Indirekter Erregernachweis	19
6.2.1	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	19
6.2.2	Mikroagglutinationstest.....	19
7	Epidemiologie der Leptospirose.....	23
7.1	Leptospirose in Europa.....	25
7.2	Leptospirose auf Madagaskar.....	25
III.	PUBLIKATION	28
IV.	DISKUSSION	38
1	Vergleich der untersuchten Regionen	39
2	Untersuchte Serovare im MAT und die durch deren Infektion hervorgerufenen Prävalenzen.....	40

3	Kreuzreaktionen und Interpretation der Titer.....	42
4	Ausblick	44
V.	ZUSAMMENFASSUNG.....	46
VI.	SUMMARY	47
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	48
VIII.	ANHANG.....	60
IX.	DANKSAGUNG.....	62

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BMJV	Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz
°C	Grad Celsius
CI	Confidence Interval
DNA	deoxyribonucleic acid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMJH	Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris
ERU	Equine Rezidivierende Uveitis
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KI	Konfidenzintervall
<i>L.</i>	<i>Leptospira</i>
Len	leptospiral endostatin-like protein
Lig	leptospiral immunoglobulin-like protein
Lip	Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharide
MAT	Mikroagglutinationstest
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OIE	Office International des Epizooties
OMP	outer membrane protein
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
RKI	Robert-Koch-Institut
spp.	species pluralis
TÄHAV	Tierärztliche Hausapothekenverordnung
TNF	Tumornekrosefaktor
TLR	Toll-like Rezeptor
WHO	World Health Organization
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Leptospiren.....	4
Abbildung 2: Zellwandaufbau von Leptospiren	6
Abbildung 3: Funktion von Toll-like Rezeptoren (TLRs)	9
Abbildung 4: Aspekte der erfolgreichen Leptospirose-Kontrolle beim Rind.....	14
Abbildung 5: EMJH-Medium in Kultivierungsröhrchen.....	16
Abbildung 6: Wachstum von Leptospiren in halbfestem Medium	17
Abbildung 7: 96-Well-Mikrotiterplatte für den MAT	20
Abbildung 8: Positiver MAT	21
Abbildung 9: Negativer MAT.....	21
Abbildung 10: Mikrotiterplatte im inversen Dunkelfeldmikroskop	22

TABELLENVERZEICHNIS ANHANG

Tabelle A 1: Seroprävalenzen (%) der einzelnen Serovare in den jeweiligen geografischen Regionen mit Angabe des p-Werts.....	60
Tabelle A 2: Anzahl der positiven Proben (n) und relative Prävalenz (%) der einzelnen Serovare für jede MAT-Titerstufe.....	61

I. EINLEITUNG

Leptospirose ist eine bakterielle Zoonose von weltweiter Bedeutung, vor allem in tropischen Gebieten. Die Übertragung von Leptospiren erfolgt entweder über den direkten Kontakt mit infizierten Tieren oder indirekt über kontaminiertes Wasser. Als wichtigste Infektionsquelle für den Menschen gilt die Wanderratte (*Rattus norvegicus*), aber auch andere Wildtiere sowie Haustiere können als Wirte dienen und Leptospiren ausscheiden (HAAKE & LEVETT, 2015). Klassischerweise findet die Infektion über den Urin von infizierten Tieren statt, aber eine Übertragung vom Rind auf den Menschen ist auch über abortierte Feten oder Vaginalausfluss nach Abort oder Kalbung möglich (ELLIS, 2015). Jährlich erkranken weltweit etwa eine Million Menschen an der Leptospirose, wobei fast 60.000 Fälle tödlich enden. Der Großteil der Infektionen und Todesfälle wird in den Tropen verzeichnet, wozu auch Madagaskar zählt (COSTA et al., 2015). Beim Rind verläuft die akute Leptospirose häufig klinisch inapparent, bei chronischen Infektionen hingegen kommt es häufig zu Störungen in der Reproduktion mit teils schwerwiegenden wirtschaftlichen Folgeschäden. Akute, schwerwiegende Erkrankungen treten beim Rind selten auf und betreffen in der Regel Jungtiere (ELLIS, 2015). Über die Leptospirose bei Rindern auf Madagaskar gibt es nur wenige Daten und die vorhandenen sind bereits sehr alt (KOLOCHINE-ERBER & BRYGOO, 1956; KOLOCHINE-ERBER et al., 1956; SILVERIE et al., 1968).

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, mehr Informationen über den aktuellen Infektionsstatus von Rindern aus Zentral- und Nordmadagaskar mit *Leptospira* spp. zu gewinnen. Dazu wurden 194 Serumproben mittels Mikroagglutinationstest (MAT) auf Antikörper gegen zwölf Leptospiren-Serovare untersucht. Die Seroprävalenz lag bei annähernd 60% mit Titern zwischen 1:100 und 1:1600. Bei diesem Ergebnis wird deutlich, dass die Exposition von madagassischen Rindern gegenüber Leptospiren sehr hoch ist, was in der Folge ein Infektionsrisiko für jene Menschen auf Madagaskar bedeutet, die mit Rindern arbeiten und zusammenleben.

II. LITERATURÜBERSICHT

1 *Leptospira* spp.

1.1 Taxonomie und Nomenklatur

Nachdem Adolph Weil im Jahr 1886 erstmals das Krankheitsbild der Leptospirose beschrieben hatte (WEIL, 1886), gelang Stimson einige Jahre später der erste Nachweis von Leptospiren mittels Levaditi-Färbung aus dem Nierengewebe eines Patienten, der an den Folgen der Leptospirose verstorben war (STIMSON, 1907). Da die Form der Bakterien an ein Fragezeichen erinnerte, wurde von nun an der Name *Spirochaeta interrogans* verwendet (STIMSON, 1907). Um den Erreger der Leptospirose von anderen, zur damaligen Zeit bekannten, Spirochäten wie *Treponema pallidum*, *Spirochaeta* und *Spironema* (später *Borrelia*) *recurrentis* unterscheiden zu können, führte Noguchi im Jahr 1918 den Gattungsnamen *Leptospira* ein, der bis heute besteht (NOGUCHI, 1918).

Die taxonomische Klassifizierung von *Leptospira* spp. sieht wie folgt aus:

Stamm Spirochaetes

Klasse Spirochaetia

Ordnung Leptospirales

Familie Leptospiraceae

Gattung *Leptospira*

(NCBI, 2019)

Klassischerweise wurde die Gattung *Leptospira* in die beiden Spezies *Leptospira interrogans* sensu lato und *Leptospira biflexa* sensu lato unterteilt, wobei die erste alle pathogenen und die zweite alle nicht-pathogenen, saprophytären Stämme umfasste. Die Einteilung beruhte auf phänotypischen Merkmalen und Wachstumseigenschaften der Erreger (SCHULLER et al., 2015). So wachsen saprophytäre Leptospiren beispielsweise in Anwesenheit des Purinanalogs 8-Azaguanin und bei niedrigen Temperaturen von teils unter 13 °C, wohingegen das Wachstum von pathogenen Stämmen unter diesen Bedingungen gehemmt ist (JOHNSON & ROGERS, 1964; JOHNSON & HARRIS, 1967). Pathogene Stämme gehören mit einer Generationszeit von etwa 20 Stunden zu den langsam

wachsenden Bakterien, im Gegensatz zu saprophytären Stämmen, die sich mit einer Generationszeit von circa fünf Stunden sehr schnell vermehren (CERQUEIRA & PICARDEAU, 2009). Da das Kohlenhydratmotiv der Lipopolysaccharide (LPS) von Leptospiren variabel ist und die Oberflächenstruktur somit antigenetisch stark verändert werden kann, war mittels Agglutinationsreaktion die weitere Einteilung in Serovare möglich. Serovare mit gemeinsamen Antigenen werden zusammengefasst in Serogruppen. Aktuell sind etwa 300 pathogene Serovare bekannt, die 24 verschiedenen Serogruppen zugeteilt werden (CERQUEIRA & PICARDEAU, 2009; HARTSKEERL et al., 2011). Neben dieser phänotypischen Klassifizierung gibt es eine neuere genotypische Einteilung der Leptospiren basierend auf Desoxyribonukleinsäure (DNS)-Hybridisierungsstudien. Mittlerweile sind für die Gattung *Leptospira* 20 Genospezies identifiziert, wovon neun als pathogen, sechs als saprophytär und fünf als intermediär eingestuft werden (SCHULLER et al., 2015). Serologische und genotypische Klassifizierung korrelieren allerdings nicht vollständig miteinander, da Serovare der gleichen Serogruppe zu verschiedenen Genospezies gehören können. Die korrekte Schreibweise von Leptospiren beginnt mit dem Genus und Speziesnamen in Kursivbuchstaben, anschließend folgt die Serovarbezeichnung, nicht kursiv und mit einem großen Anfangsbuchstaben geschrieben. Ein Beispiel wäre *Leptospira interrogans* Serovar Icterohaemorrhagiae (SCHULLER et al., 2015).

1.2 Morphologie und mikrobiologische Eigenschaften

Leptospiren sind lange, dünne, aktiv bewegliche und spiralig geformte Bakterien mit einer Länge von sechs bis 20 μm sowie einem durchschnittlichen Durchmesser von 0,1 μm (CAMERON, 2015) (Abbildung 1).

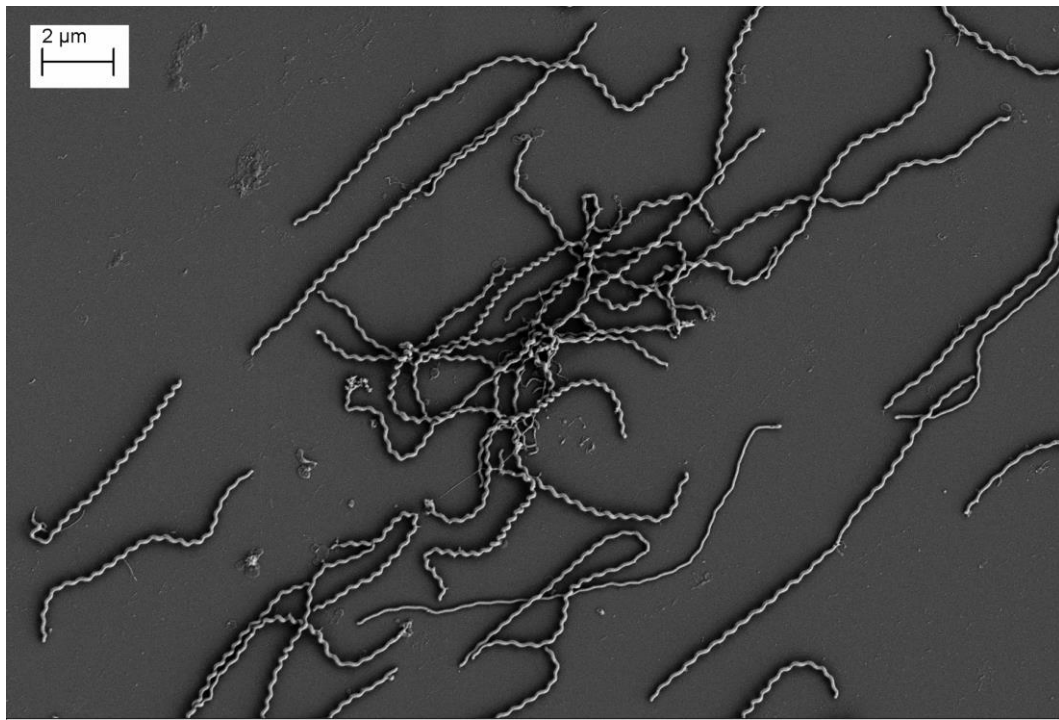


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Leptospiren

Pathogene Leptospiren, die frisch aus einem Säugetierwirt isoliert wurden, sind in der Regel kürzer und stärker gedreht als Stämme aus dem Labor oder saprophytäre Stämme (ELLIS et al., 1983). Im Labor können Leptospiren unter limitierten Wachstumsbedingungen häufig sehr lang werden; außerdem nimmt ihre Bewegungsaktivität dann oftmals ab. Je älter die Kulturen werden, umso häufiger bilden Leptospiren eine kugelartige Form aus (CAMERON, 2015). Der Zellwandaufbau von Leptospiren ähnelt jenem Gram-negativer Bakterien (Abbildung 2). Zwischen der äußeren und inneren Membran befindet sich der periplasmatische Raum mit einer Peptidoglykanschicht. Innerhalb des Periplasmas sind die Endoflagellen verankert; jeweils eine Flagelle an jedem Polende der Leptospiren. Diese longitudinal orientierten Flagellen winden sich um die Zellen und sind verantwortlich für die typische kornenzieherartige Fortbewegungsform (GREENE et al., 2012; CAMERON, 2015). Dadurch können sich Leptospiren nicht nur in Flüssigkeiten schwimmend fortbewegen, sondern auch über feste Oberflächen kriechen (TAHARA et al., 2018). Da Leptospiren sowohl außerhalb als auch innerhalb des Wirtes überleben müssen, werden einige Ansprüche an die äußere Membran der Zellwand gestellt. Einerseits muss die Membran porös genug sein, um die Nahrungsaufnahme zu ermöglichen, andererseits soll sie robust genug sein, um die Zellen gegen schädliche Substanzen zu schützen. In der äußeren

Membran von Leptospiren befinden sich Lipopolysaccharide (LPS), outer membrane proteins (OMPs) sowie Transmembranproteine. Hauptbestandteil sind LPS, die den Großteil der Zelloberfläche bedecken. Sie setzen sich zusammen aus dem Lipid A, das für die Membranverankerung sorgt, einer Kernregion, dem sogenannten Core und dem O-Polysaccharid, das für die Antigenvariabilität der verschiedenen Serovare verantwortlich ist. Da wirtsgebundenen Spirochäten wie *Borrelia burgdorferi* oder *Treponema pallidum* diese LPS fehlen, wird vermutet, dass die Expression von intakten LPS essentiell ist, um Leptospiren das Überleben auch außerhalb des Säugetierwirtes zu ermöglichen. OMPs treten meist in Form von Lipoproteinen auf und sind für den Stoffwechsel sowie die Pathogenität der Serovare verantwortlich. Das Lipoprotein LipL32 macht etwa 75% aller exprimierten Proteine aus und ist ausschließlich in pathogenen Leptospiren zu finden. Zwei weitere wichtige und häufig vorkommende OMPs sind Loa22 und LipL41, die als Virulenzfaktoren fungieren (HAAKE & ZÜCKERT, 2015). Auch die Proteine LigA, LigB und LigC gehören zur Gruppe der OMPs, wobei die Abkürzung für Leptospiral Immunoglobuline (Ig)-like proteins steht. Dabei handelt es sich um Adhesine, die eine wichtige Rolle in der Anheftung an die Wirtszelle und der anschließenden Invasion des Wirtes spielen (MATSUNAGA et al., 2003). Transmembranproteine sind essentiell für Bakterien mit einer äußeren Membran, da sie Poren oder Kanäle ausbilden, die die Aufnahme von Nahrung ermöglichen und gleichzeitig Toxine und Abfallprodukte ausschleusen können. Im Gegensatz zu typischen Gram-negativen Bakterien findet man bei Leptospiren die Transmembranproteine in einer deutlich geringeren Zahl (HAAKE & ZÜCKERT, 2015). Eines der ersten Porine, das bei Leptospiren beschrieben wurde, ist OmpL1 (KROPINSKI et al., 1987).

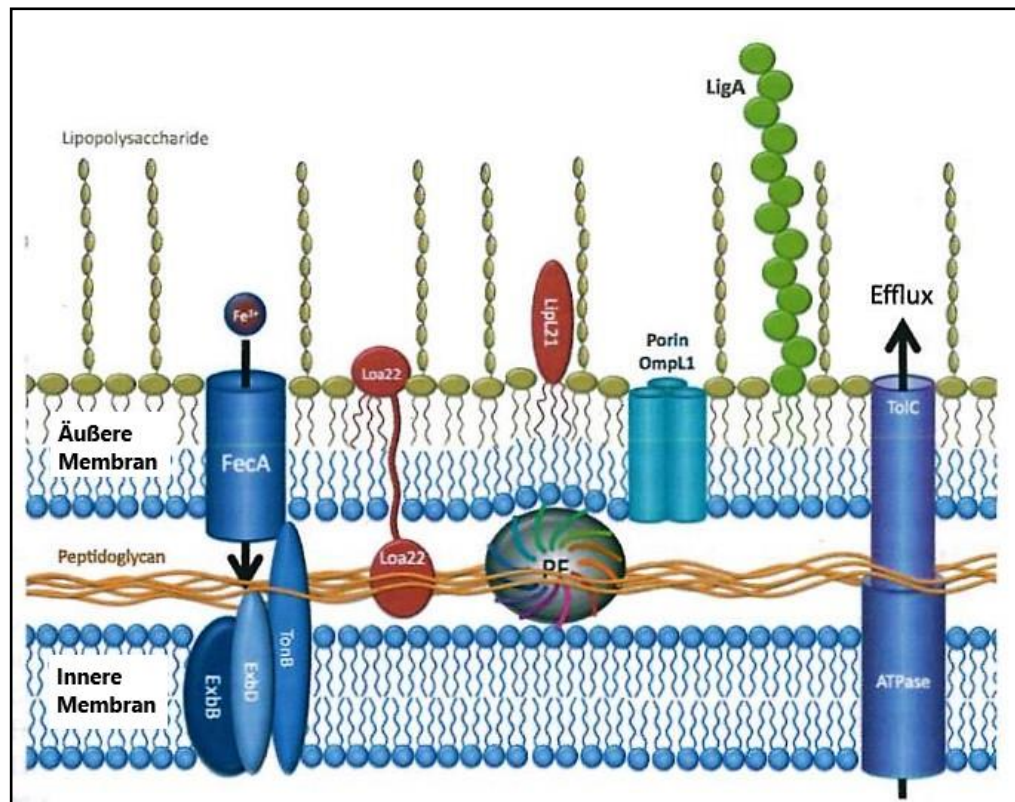


Abbildung 2: Zellwandaufbau von Leptospiren

Modifiziert nach Haake & Zückert (HAAKE & ZÜCKERT, 2015)

PF Periplasmatische Flagelle im Querschnitt

Leptospiren können bei einem pH-Wert von bis zu 7,6 überleben und sind nicht resistent gegenüber Austrocknung oder hypertonen Lösungen. Sie sind obligate Aerobier mit einer idealen Wachstumstemperatur zwischen 28 und 30 °C. Bestmögliches Wachstum bietet ein Medium, das mit Vitamin B₁ und B₁₂, langkettigen Fettsäuren und Ammoniumsalzen angereichert ist (LEVETT, 2001; MOHAMMED et al., 2011). Meist wird für das Anzüchten von Leptospiren das Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) Medium verwendet, das neben Albumin auf Polysorbat 80 und weiteren Wachstumsfaktoren basiert. Das Wachstum von Leptospirenkulturen ist sehr langsam und kann mehrere Wochen bis Monate dauern (ZUERNER, 2005).

2 Infektion und Pathogenese

Eine Infektion mit Leptospiren ist über den direkten Kontakt mit infiziertem Urin, Blut oder tierischem Gewebe möglich. Auch plazentäre Infektionen mit der Folge von Aborten sowie Deckinfektionen sind beschrieben. Viel häufiger jedoch kommt es zur indirekten Infektion über Wasser, das mit Leptospiren kontaminiert ist. Hautläsionen sowie die Schleimhäute von Auge, Nase, Mund oder Genitaltrakt bieten den Bakterien eine ideale Eintrittspforte in den Wirt (PICARDEAU, 2013; ELLIS, 2015). Hier wird unterschieden zwischen sogenannten Reservoir- und Fehlwirten. Bei Reservoirwirten führt die Infektion mit adaptierten Serovaren zu einer asymptomatischen chronischen Erkrankung mit Kolonisierung der Leptospiren in den Nierentubuli, was die Ausscheidung über den Urin in die Umwelt zur Folge hat (PICARDEAU, 2013). Serovare in diesem Zusammenhang mit weltweiter Bedeutung sind beispielsweise Icterohaemorrhagiae bei der Wanderratte (*Rattus norvegicus*), Hardjo bei Rind und Schaf und Canicola beim Hund. Bei Fehlwirten hingegen führt die Infektion mit Leptospiren zu einer akut klinischen Erkrankung mit oftmals schwerwiegendem Verlauf; die renale Ausscheidung ist in diesen Fällen üblicherweise nur von kurzer Dauer (ELLIS, 2015). Wurden Leptospiren über den Urin in die Umwelt ausgeschieden, dann vermehren sie sich nicht mehr weiter. Allerdings können sie in stehendem oder langsam fließendem, vorzugsweise warmem Wasser über mehrere Monate hinweg überleben. Ein neutraler oder leicht alkalischer pH-Wert im Boden sowie Temperaturen zwischen 0 °C und 25 °C erleichtern den Bakterien das Überdauern im Boden. Frost und Austrocknung hingegen führen zum Absterben der Leptospiren (GREENE et al., 2012).

Haben Leptospiren einmal die Hautbarriere überwunden, dann kommt es zur hämatogenen Streuung der Bakterien. Die Erreger breiten sich so über die Blutbahn aus und persistieren dort in der ersten Phase der Erkrankung, der Leptospirämie, die circa eine Woche ab Beginn der Infektion andauert. In dieser Zeit können Leptospiren aus der Blutbahn, einer Vielzahl von Geweben (Niere, Leber, Milz, zentrales Nervensystem (ZNS), Auge und Genitaltrakt) und der Cerebrospinalflüssigkeit isoliert werden (GREENE et al., 2012; ELLIS, 2015). Mit der Bildung von spezifischen Antikörpern durch den Wirt endet die bakteriämische Phase nach etwas zehn bis 14 Tagen. Die Leptospiren werden größtenteils aus der Blutbahn und den meisten Organen eliminiert und sind nun vor allem in den

proximalen Nierentubuli lokalisiert, wo sie sich vermehren und anschließend über den Urin ausgeschieden werden. Man spricht von der zweiten Krankheitsphase, der Leptospiurie. Ohne antibiotische Therapie können Leptospiren auf diesem Weg über Monate bis Jahre hinweg persistieren und ausgeschieden werden. Neben den Nieren können sich die Bakterien auch im Uterus oder, bei einigen Spezies (z. B. Pferd), im Auge festsetzen und dort persistieren, was zu Aborten beziehungsweise Uveitis mit nachfolgender Blindheit führen kann (ELLIS, 2015).

3 Immunologie

An der Oberfläche von Säugetierzellen, insbesondere an Leukozyten, gibt es eine Vielzahl an Rezeptoren, die bestimmte Strukturen pathogener Mikroorganismen (z. B. LPS, Lipoproteine, Peptidoglykan oder Flagellenproteine) erkennen und anschließend für eine Aktivierung des Immunsystems sorgen (IWASAKI & MEDZHITOV, 2010). Toll-like Rezeptoren (TLRs) sind die bisher am gründlichsten untersuchten Rezeptoren und in den meisten Fällen auch der erste Teil des Immunsystems, der auf eine Infektion reagiert. Bei TLRs handelt es sich um Transmembranproteine, die pathogene Organismen an der äußeren Zellmembran erkennen und über das Zytoplasma ein Signal an den infizierten Wirt weitergeben, entsprechend mit einer Entzündungsreaktion und Aktivierung des erworbenen Immunsystems zu antworten (ZUERNER, 2015) (Abbildung 3).

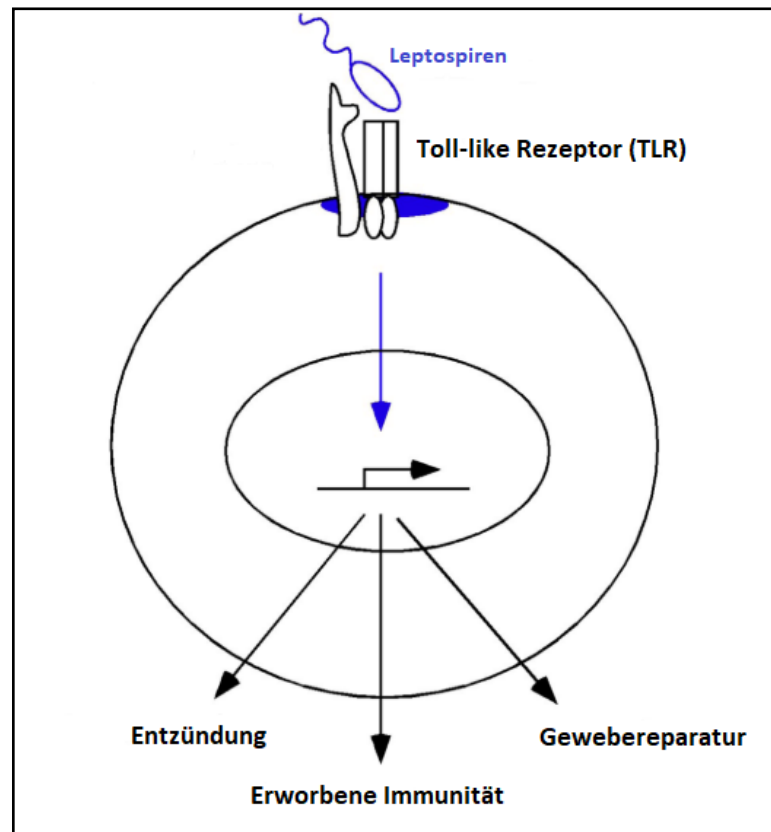


Abbildung 3: Funktion von Toll-like Rezeptoren (TLRs)

Modifiziert nach Iwasaki & Medzhitov (IWASAKI & MEDZHITOV, 2010)

Die LPS Gram-negativer Bakterien werden klassischerweise vor allem vom TLR4 erkannt. Bei Leptospiren hingegen wurde die Aktivität des TLR4 bisher nur bei der Infektion im Mausversuch nachgewiesen. Leptospiren-Infektionen beim Menschen werden vorrangig von TLR1 und TLR2 detektiert (WERTS et al., 2001). Für andere Säugetierspezies gibt es bisher noch keine Erkenntnisse, welche TLRs bei der Erkennung der LPS von Leptospiren von Bedeutung sind. Auch Makrophagen bilden vor allem im frühen Infektionsstadium einen wichtigen Teil der angeborenen Immunität. Durch die LPS der Leptospiren sowie Hämolysine werden sie zur Produktion von immunmodulierenden proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 β , IL-6, IFN und TNF- α) angeregt, was eine Entzündungsreaktion und teilweise Elimination der Leptospiren zur Folge hat (WANG et al., 2012). Polymorphkernige Leukozyten (eosinophile und neutrophile Granulozyten) sind ebenfalls Bestandteil der angeborenen Immunantwort, doch ihre Rolle in der Abwehr von Leptospiren-Infektionen ist noch nicht ausreichend untersucht und daher unklar (ZUERNER, 2015).

Essentiell in der Bekämpfung einer Leptospirose-Infektion ist die Ausbildung von Antikörpern. Diese werden in der frühen Phase der Infektion gegen die LPS der Leptospiren gebildet und können nach etwa zehn bis 14 Tagen ab Infektionsbeginn mittels Mikroagglutinationstest (MAT) im Serum des infizierten Wirtes nachgewiesen werden. Der höchste Antikörperspiegel wird nach etwa drei bis sechs Wochen erreicht und kann im MAT bei einem Titer zwischen 1.000 und 100.000 liegen (ELLIS, 2015). Da die LPS der Leptospiren Serovar-spezifisch sind, bieten die gebildeten Antikörper allerdings nur minimal kreuzreaktiven Schutz gegenüber anderen Serovaren (ZUERNER, 2015). Zuletzt spielt auch die zellvermittelte, erworbene Immunität eine Rolle in der Bekämpfung von Leptospiren. B- und T-Lymphozyten sind verantwortlich für die Bildung von Interferon- γ (IFN- γ). Die IFN- γ -Produktion in der Leber sowie die nachfolgende Elimination der Leptospiren erfolgt vor allem durch B-Lymphozyten, während dies in der Niere von den T-Lymphozyten übernommen wird (CHASSIN et al., 2009).

Pathogene Leptospiren besitzen außerdem die Möglichkeit, sich einzelner Inaktivierungsmechanismen des Immunsystems des Wirtes gezielt zu entziehen. Eine Vielzahl an Proteinen, beispielsweise LenA, LenB, LigA oder LigB, können an die Bestandteile des Komplementsystems binden und somit die Aktivierung des Komplements und nachfolgende Zellschäden verhindern (ZUERNER, 2015). Das Komplementsystem ist Bestandteil der angeborenen Immunantwort.

4 Leptospirose beim Menschen

Leptospirose ist eine der häufigsten Zoonosen weltweit, die vor allem in Entwicklungsländern mit tropischem Klima ein Gesundheitsproblem darstellt. Aufgrund zunehmender Einwohnerzahlen in ländlich gelegenen Armenvierteln sowie sich häufender extremer Wetterbedingungen nimmt die Leptospirose gerade in diesen Ländern zu, wird allerdings als wichtige tropische Erkrankung noch viel zu sehr vernachlässigt (PICARDEAU, 2015). Weltweit gibt es jährlich mehr als eine Million Krankheitsfälle, wobei 73% davon in der tropischen Zone zwischen nördlichem und südlichem Wendekreis auftreten. Erwachsene haben grundsätzlich ein höheres Risiko, an Leptospirose zu erkranken als Kinder. Ebenso sind Männer prädisponierter für die Erkrankung als Frauen, wobei die höchste Morbidität in der Altersklasse der 20 bis 29-jährigen Männer zu finden ist. Jedes Jahr sterben etwa

60.000 Menschen an den Folgen einer Infektion mit *Leptospira* spp., mit der höchsten Mortalitätsrate bei Männern zwischen 50 und 59 Jahren (COSTA et al., 2015). In tropischen Regionen ist das Risiko, an Leptospirose zu erkranken, oftmals berufsbedingt, beispielsweise bei der Arbeit auf Reis- oder Zuckerrohrfeldern. Doch auch die Regensaison und Naturkatastrophen wie Überschwemmungen oder Wirbelstürme haben Leptospirose-Ausbrüche zur Folge. In Industrieländern wie Europa oder Nordamerika steht das Erkrankungsrisiko oft in Zusammenhang mit bestimmten Berufsgruppen, wie Landwirten, Tierärzten, Schlachthauspersonal, Laborpersonal oder Kanalarbeitern. Eine weitere Risikogruppe sind Personen, die mit Wasser in Kontakt kommen, das mit dem Urin infizierter Tiere kontaminiert ist, wie zum Beispiel Angler oder Wassersportler (PICARDEAU, 2013; MWACHUI et al., 2015). Typischerweise zeigt sich die Leptospirose beim Menschen als unspezifische, akut fieberhafte Erkrankung mit Muskel- und Kopfschmerzen und wird deshalb häufig mit Influenza oder (in tropischen Regionen) mit Dengue-Fieber verwechselt. Wird nicht rechtzeitig adäquat behandelt, dann kann im schlimmsten Falle ein letales Multiorganversagen die Folge sein. Die Therapie erfolgt symptomatisch in Kombination mit einer Antibiose (HAAKE & LEVETT, 2015).

5 Leptospirose beim Rind

5.1 Epidemiologie

Leptospirose tritt weltweit bei Rindern auf, allerdings vorrangig in Regionen mit Weidehaltung. Das Rind ist der bevorzugte Reservoirwirt für das Serovar Hardjo. Am weitesten verbreitet ist *L. borgpetersenii* Serovar Hardjo Typ Bovis (Hardjobovis), doch in einigen Regionen findet man auch *L. interrogans* Serovar Hardjo Typ Prajitno (Hardjoprajitno). Beide Serovare können den Genitaltrakt von Kühen oder Bullen besiedeln und dort persistieren, was zur Folge hat, dass Leptospiren auch beim Deckakt übertragen werden können. Hauptfaktoren für eine Infektion mit dem Serovar Hardjo sind: Weidegang zusammen mit anderen Tierarten wie beispielsweise Schafen, Zugang zu kontaminierten Wasserquellen sowie der natürliche Deckakt (ELLIS, 2015). Außerdem sollten Hunde und Katzen von Rinderherden ferngehalten werden, da sie, ebenso wie Nager, eine Infektion durch die Übertragung von Leptospiren verursachen können (FÁVERO et al., 2017;

OJEDA et al., 2018). Ein weiteres Serovar, das im Rind persistieren kann, ist das Serovar Kennewicki (*L. interrogans*, Serogruppe Pomona). Dieses tritt üblicherweise in Nord- und Südamerika, Australien und Neuseeland auf. Serovare der Serogruppen Icterohaemorrhagiae, Canicola, Hebdomadis, Sejroe, Pyrogenes, Autumnalis, Australis, Javanica, Tarassovi und Grippotyphosa können zu Fehlinfektionen beim Rind führen (ELLIS, 2015).

5.2 Klinisches Erscheinungsbild beim Rind

Die klinischen Zeichen der Leptospirose beim Rind stehen üblicherweise in Zusammenhang mit Fertilitätsstörungen und haben vor allem wirtschaftliche Bedeutung. Infektionen mit dem Serovar Hardjo verlaufen meist subklinisch; Ausnahme sind laktierende Kühe, bei denen es zu einer Agalaktie kommen kann. Auffallend sind bei diesem „akuten Milchverlust-Syndrom“ der plötzliche Abfall in der Milchproduktion sowie das weiche, schlaffe Euter. Die Milch der Tiere bekommt einen gelben, kolostrumähnlichen Charakter mit Flocken und die somatische Zellzahl steigt an. Bei manchen Kühen kann außerdem Fieber beobachtet werden. In der Regel bringen die Tiere nach zehn bis 14 Tage wieder ihre annähernd volle Milchleistung, ob mit oder ohne vorhergegangener Behandlung. Eine Ausnahme sind Kühe in der späten Trächtigkeitsphase, die sich dann häufig trockenstellen. Die Anzahl der betroffenen Tiere liegt zwischen einem und 50%, je nach Herdenimmunität und Herdenmanagement (ELLIS, 2015). Eine chronische Infektion mit Leptospiren äußert sich beim Rind klassischerweise in Aborten oder Totgeburten. Kälber werden häufig zu früh geboren, sind lebensschwach oder haben ein reduziertes Geburtsgewicht, was auf eine Infektion der Plazenta zurückgeführt werden kann (SMYTH et al., 1999). Auch das unvollständige Ablösen der Nachgeburt oder Nachgeburtshaltung können Folge einer chronischen Leptospirose sein (ELLIS et al., 1985a). Noch bis zu acht Tage nach Abort oder Kalbung konnten Leptospiren im Vaginalsekret von infizierten Rindern nachgewiesen werden (ELLIS et al., 1985b). Ein schwerwiegendes Krankheitsbild nach einer Infektion mit Leptospiren ist beim Rind eher unüblich. Dennoch kann es, hauptsächlich bei Kälbern oder Jungtieren, zu einer fieberhaften Erkrankung mit hämolytischer Anämie, Hämoglobinurie, Ikterus sowie vereinzelt Meningitis kommen; auch Todesfälle sind möglich. Assoziiert sind solche Fälle vor allem mit Stämmen der Serogruppen Icterohaemorrhagiae oder Grippotyphosa. Bei laktierenden Kühen führen Fehlinfektionen (Infektionen mit anderen Serovaren als

Hardjo) oftmals zu kleineren Mengen blutverfärbter Milch (ELLIS, 2015).

5.3 Therapie

Bei der Behandlung der akuten Leptospirose des Rindes steht die antibiotische Therapie im Vordergrund. Ideal geeignet ist ein Kombinationspräparat aus Penicillin und Streptomycin, da dies neben der Beendigung der Leptospirämie auch zu einer Elimination der Erreger aus den Nieren führt (ALT et al., 2001). Weitere Wirkstoffe, die alternativ verwendet werden können, sind Amoxicillin (SMITH et al., 1997), Tetracyclin, Tulathromycin oder Cephalosporine der dritten Generation wie beispielsweise Ceftiofur (ALT et al., 2001; CORTESE et al., 2007). Die Wartezeiten sind sehr ähnlich und liegen für Milch zwischen drei und sechs Tagen, für Fleisch zwischen 21 und 22 Tagen. Lediglich Tulathromycin darf nicht bei laktierenden Kühen angewendet werden (CLINIPHARM, 2019). Cephalosporine der dritten Generation haben kürzere Wartezeiten (Milch null Tage, Fleisch drei Tage) (CLINIPHARM, 2019), doch laut §12c der aktuellen tierärztlichen Hausapothekenverordnung (TÄHAV) besteht vor Anwendung dieses Wirkstoffes eine Antibiotampflicht (BMJV, 2018). Alternativ kann bei akut erkrankten Rindern auf ein Antibiotikum verzichtet und das betroffene Tiere dafür unmittelbar geimpft werden. Allerdings muss der Tierhalter darauf hingewiesen werden, dass dies nicht vor einem möglichen Abort schützt, wenn bereits eine plazentäre Infektion stattgefunden hat (ELLIS, 2015). Auch bei Rindern mit chronischer Leptospirose ist die antibiotische Therapie indiziert. Bei Milchkühen im letzten Trächtigkeitsdrittel, die bereits trocken gestellt wurden oder kurz davor sind, wird die Verwendung von Streptomycin empfohlen. Außerdem sollten zusätzlich, soweit möglich und wenn ein Impfstoff zugelassen ist, alle gefährdeten Tiere geimpft werden (ELLIS, 2015).

5.4 Prophylaxe

Durch erfolgreiche Prophylaxemaßnahmen kann eine Infektion mit Leptospiren reduziert oder gar verhindert werden und somit auch das zoonotische Risiko für den Tierhalter gesenkt werden. Ein wichtiger Aspekt ist das richtige Management von Rinderbetrieben. So sollte die gemeinsame Haltung von unterschiedlichen Tierarten, wie beispielsweise Rindern und Schafen, vermieden werden und bei Weidehaltung sollten adäquate Tränkevorrichtungen vorhanden sein. Um eine Übertragung von Leptospiren durch infizierte Bullen zu vermeiden, ist die

künstliche Besamung zu bevorzugen. Rinder, die neu zugekauft werden, sollten idealerweise aus einem Leptospirose-freien Betrieb stammen. Durch Rodentizide und nagersicheren Stallbau kann der Kontakt zu diesen, ebenfalls als Reservoirwirte für Leptospiren fungierenden Tieren vermieden werden (ELLIS, 2015). Sofern Impfstoffe gegen Leptospiren-Infektionen zugelassen sind, können diese das Infektionsrisiko senken und bieten einen guten Schutz der Rinder von mindestens einem Jahr (BOLIN et al., 1991) (Abbildung 4).

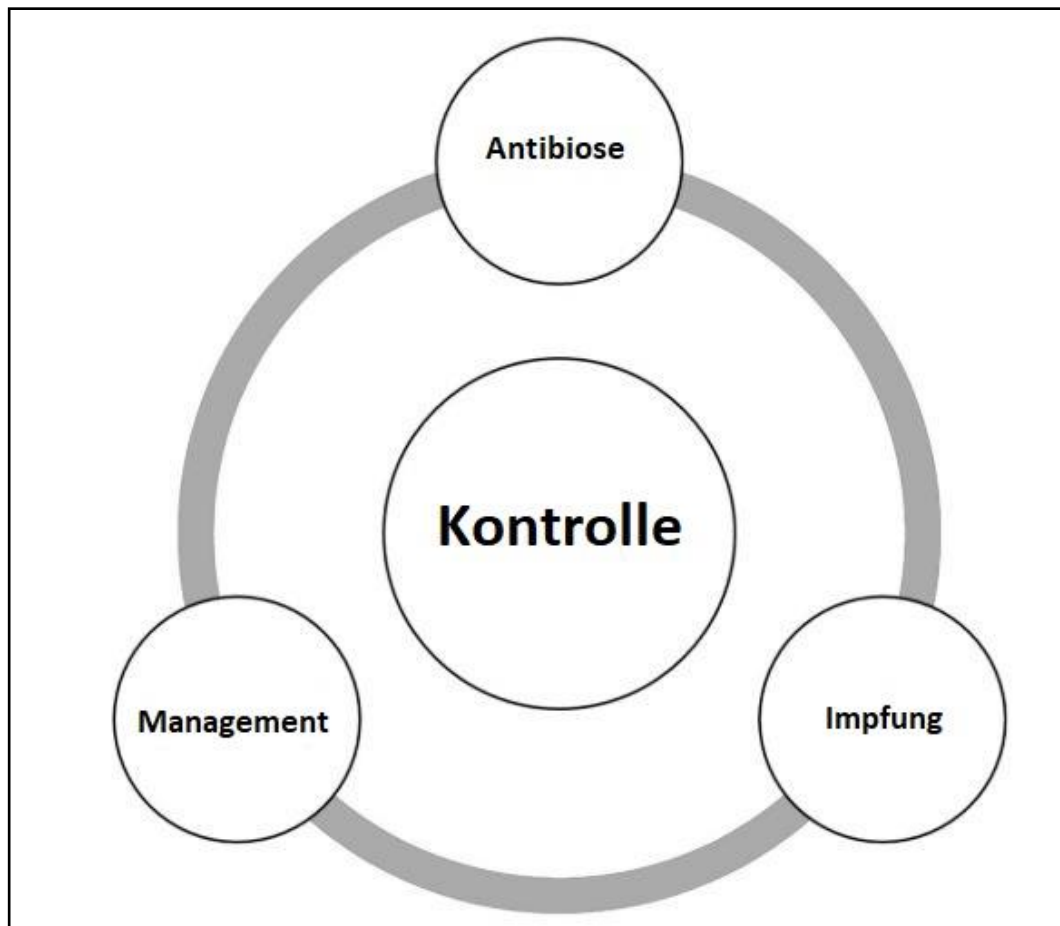


Abbildung 4: Aspekte der erfolgreichen Leptospirose-Kontrolle beim Rind

Modifiziert nach Martins & Lilenbaum (MARTINS & LILENBAUM, 2017)

6 Diagnostik

6.1 Direkter Erregernachweis

Klassischerweise werden Leptospiren mittels Kultur nachgewiesen, doch durch den Fortschritt molekulargenetischer Methoden wird diese weitestgehend durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ersetzt.

6.1.1 Mikroskopischer Nachweis

Der Nachweis von Leptospiren ist sowohl im Lichtmikroskop als auch im Dunkelfeldmikroskop möglich. Für die Darstellung im Lichtmikroskop ist eine entsprechende Bearbeitung der Gewebeproben oder Ausstriche nötig, wie beispielsweise eine Giemsa-Färbung oder Silberimprägnation (GREENE et al., 2012). Mittels Dunkelfeldmikroskopie können Blut- und Urinproben sowie *Liquor cerebrospinalis* auf das Vorhandensein von Leptospiren untersucht werden, wobei die mikroskopische Untersuchung von Blut nur während der ersten Tage der akuten Erkrankung, der Phase der Leptospirämie, sinnvoll ist (LEVETT, 2001). Um in der mikroskopischen Durchsicht mindestens ein Bakterium pro Gesichtsfeld detektieren zu können, sind mindestens 1×10^4 Leptospiren/ml Probenmaterial notwendig (TURNER, 1970). Durch vorheriges Zentrifugieren ist eine Steigerung der Leptospirenkonzentration im Probenmaterial möglich. Zell- oder auch Staubbestandteile sowie Fibrinfäden können im mikroskopischen Bild zu einer Verwechslung mit Leptospiren führen und ein falsch-positives Ergebnis zur Folge haben (GREENE et al., 2012). Aufgrund der geringen Sensitivität und Spezifität sollte das Ergebnis der Mikroskopie niemals alleinig zu einer Diagnosestellung führen, sondern immer durch kulturelle, serologische oder molekulargenetische Methoden bestätigt werden (GREENE et al., 2012).

6.1.2 Kultureller Nachweis

Einen eindeutigen Beweis für eine Infektion mit *Leptospira* spp. liefert die positive Kultur aus dem Probenmaterial. Hierfür werden Blut-, Urin- oder Gewebeproben entnommen und in ein spezielles Medium eingebracht (SCHULLER et al., 2015). In den ersten sieben bis zehn Tagen der Erkrankung ist Blut das ideale Probenmaterial, im Anschluss daran Urin. Da Leptospiren intermittierend ausgeschieden werden, ist eine wiederholte Beprobung empfehlenswert, um falsch-negative Ergebnisse zu vermeiden (GREENE et al., 2012). Die Kultivierung von *Leptospira* spp. ist in flüssigen oder halbfesten Medien möglich. Dabei ist der Zusatz von langkettigen Fettsäuren, Ammoniumsalzen sowie Vitamin B₁ und B₁₂ essentiell, um ein optimales Wachstum der Bakterien zu gewährleisten (MOHAMMED et al., 2011). Am häufigsten wird das EMJH-Medium verwendet, ein von ELLINGHAUSEN and MCCULLOUGH (1965) entwickeltes und anschließend von JOHNSON and HARRIS (1967) modifiziertes Flüssigmedium (Abbildung 5).

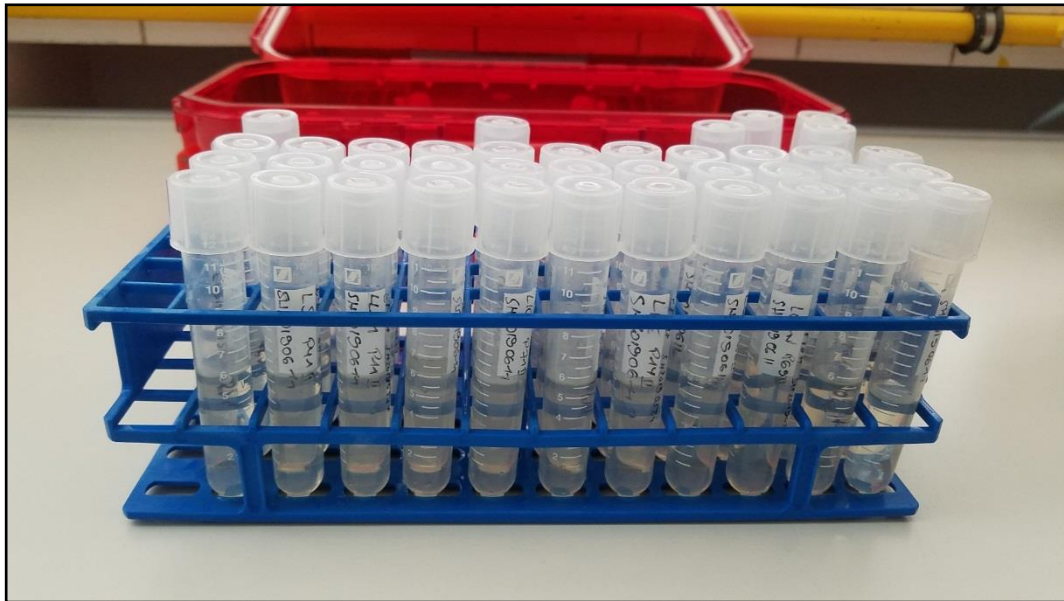


Abbildung 5: EMJH-Medium in Kultivierungsröhrchen

Die ideale Wachstumstemperatur von *Leptospira* spp. liegt zwischen 28 und 30 °C, wobei pathogene Leptospiren auch noch bei 37 °C und saprophytäre Leptospiren bei niedrigen Temperaturen von 11-13 °C wachsen können. *Leptospira* spp. wächst unter aeroben Bedingungen bei einem idealen pH-Wert von 7,2-7,6 (CAMERON, 2015). In halbfestem Medium erreicht das Leptospirenwachstum seine maximale Dichte in einer Zone unterhalb der Oberfläche des Mediums, wobei sich diese mit zunehmender Inkubationszeit zu trüben beginnt. Diese Zone wird auch als „Dinger’s Disk“ oder „Dinger’s Ring“ bezeichnet (LAWRENCE, 1951) (Abbildung 6).

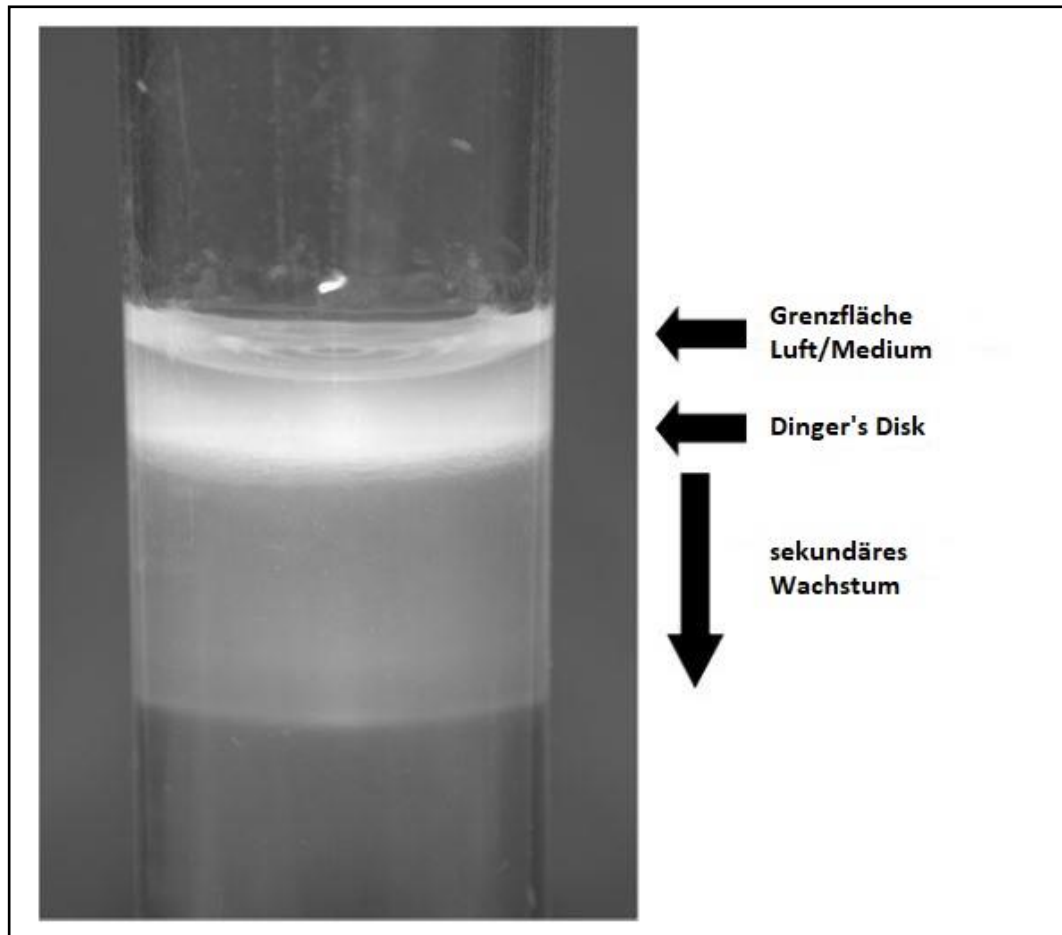


Abbildung 6: Wachstum von Leptospiren in halbfestem Medium

Modifiziert nach Zuerner (ZUERNER, 2005)

Leptospiren wachsen sehr langsam, weshalb die Bebrütung der Kulturen, begleitet von wöchentlichen Begutachtungen mit dem Dunkelfeldmikroskop, Monate dauern kann. Bevor eine Probe als negativ beurteilt wird, muss die Kultur über mindestens 13 Wochen einbehalten und kontrolliert werden, erst danach darf sie verworfen werden (MOHAMMED et al., 2011). Aufgrund des langwierigen Wachstums wird die Kultivierung deshalb auch nicht in der Routinediagnostik eingesetzt. Für die langfristige Aufrechterhaltung von *Leptospira* spp. Kulturen ist eine wiederholte Subkultivierung notwendig. Die Langzeitlagerung pathogener Leptospiren ist in halbfestem Medium bei Raumtemperatur möglich, allerdings reduziert sich unter diesen Umständen häufig ihre Lebensfähigkeit und meist geht die Virulenz dabei verloren. Ideal ist die Lagerung in flüssigem Stickstoff (ZUERNER, 2005). Auch bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ist eine Lagerung möglich, wobei die Leptospiren direkt aus der Kultur in EMJH-Medium eingefroren werden können.

6.1.3 Polymerase-Kettenreaktion

In den vergangenen Jahren wurde vermehrt die PCR in der Leptospiren-Diagnostik eingesetzt. Zeitlich ist sie dem klassisch kulturellen Nachweis eindeutig überlegen; so ist mittels modernster real-time PCR bereits wenige Stunden nach Probenentnahme ein Ergebnis möglich. Vor allem in der ersten Woche der Infektion, in der noch nicht genug Antikörper für den serologischen Nachweis gebildet sind, ermöglicht die PCR bereits den Nachweis von Leptospiren-DNA. Im Anschluss an die Leptospirämie können die Bakterien dann mittels PCR im Urin nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze in Blut- und Urinproben liegt bei etwa zehn bis 100 Leptospiren/ml (SMYTHE et al., 2002b; STODDARD et al., 2009; BOURHY et al., 2011). Eine Vielzahl an PCR-Protokollen wurde entwickelt, wobei die gängigsten auf der Detektion von 16S- oder 23S-Genabschnitten beruhen. Diese werden entweder als konventionelle PCR mit anschließender Darstellung mittels Agarosegel durchgeführt oder als real-time PCR mithilfe von TaqMan-Sonden oder SYBR-Green-Farbstoff (MÉRIEN et al., 1992; WOO et al., 1997; SMYTHE et al., 2002b). Eine weitere Möglichkeit ist der Nachweis des LipL32-Gens, das für ein Oberflächenprotein kodiert und spezifisch für alle Stämme pathogener Leptospiren ist (STODDARD et al., 2009). Die Ergebnisse der PCR sind allerdings vorsichtig zu interpretieren. Ist eine Probe PCR-positiv, so bedeutet dies, dass Leptospiren-DNA vorhanden ist. Bei einer positiven Blutprobe mit eindeutigen klinischen Zeichen kann mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit von einer akuten Leptospirose ausgegangen werden. Ist eine Urinprobe positiv, so deutet dies auf einen renalen Ausscheider hin, der entweder akut infiziert ist oder chronisch Leptospiren ausscheidet. Mit einem negativen PCR-Ergebnis hingegen kann eine Leptospiren-Infektion nicht ausgeschlossen werden. Wurde beispielsweise die Blutprobe zu spät entnommen, dann wird sich keine DNA mehr darin finden, da die Leptospiren sich bereits in den Nieren angesiedelt haben. Im Urin werden Leptospiren anschließend intermittierend ausgeschieden, was ebenfalls einen negativen PCR-Befund zur Folge haben kann (SCHULLER et al., 2015). Mittels PCR ist derzeit noch keine Identifizierung des auslösenden Serovars möglich, dazu sind im Anschluss Genotypisierungen notwendig, was aktuell lediglich in der Forschung eine Rolle spielt, in der Routinediagnostik aber noch nicht verbreitet ist.

6.2 Indirekter Erregernachweis

Der Nachweis von Antikörpern gegen Leptospiren wird vermehrt mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) durchgeführt, der häufig als Schnelltest zur Verfügung steht. Goldstandard in der serologischen Leptospiren-Diagnostik ist allerdings nach wie vor der Mikroagglutinationstest (MAT).

6.2.1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Vor allem in der akuten Infektionsphase wird mittlerweile vermehrt der ELISA, häufig als Schnelltest in der Praxis, zur Leptospiren-Diagnostik eingesetzt. Die verwendeten Antigene werden entweder direkt aus der Kultur von *L. biflexa* oder pathogenen Stämmen gewonnen (HAAKE & LEVETT, 2015). Alternativ gibt es ELISA-Systeme, die outer membrane proteins (OMPs) oder rekombinante OMPs als Antigene verwenden. Für die Diagnostik der Leptospirose beim Rind gibt es ELISA-Testsysteme, die den Nachweis von Antikörpern gegen das Serovar Hardjo in der Milch von Einzeltieren oder in der Tankmilch erlauben (ELLIS, 2015). Detektiert werden mittels ELISA IgM- und IgG-Antikörper. IgM-Antikörper können bereits in der ersten Woche der Erkrankung nachgewiesen werden und sind deshalb vor allem in der Akutdiagnostik der Leptospirose von Bedeutung (HAAKE & LEVETT, 2015). Wenn die erste Probe frühzeitig entnommen wurde, dann ist der ELISA teilweise sensitiver als der MAT (CUMBERLAND et al., 1999). Bei einem ELISA-Schnelltest für die Leptospirose-Diagnostik beim Hund hingegen fällt auf, dass die Ergebnisse von ELISA und MAT lediglich bei sehr hohen MAT-Titern übereinstimmen. Je niedriger dieser Titer wird, umso häufiger ist nur der MAT positiv und der ELISA negativ (CURTIS et al., 2015). Ein positiver ELISA gibt außerdem keinen Hinweis auf die infizierende Serogruppe und wird auch nicht zur alleinigen Diagnose der Leptospirose empfohlen. Im positiven Fall sollte das Ergebnis mit einer Referenzmethode wie MAT oder PCR bestätigt werden (PICARDEAU, 2013).

6.2.2 Mikroagglutinationstest

Die Referenzmethode in der serologischen Leptospiren-Diagnostik ist der MAT. Dabei handelt es sich um einen zeitintensiven Test, der das notwendige Fachwissen voraussetzt und nur in einem Labor der Sicherheitsstufe BSL2 durchgeführt werden darf, da Kulturen von vitalen Leptospiren als Antigen verwendet werden. Das Serum von Patienten mit Leptospirose-Verdacht wird mit Leptospiren aus der

Kultur (= Antigen) beispielsweise in einer 96-Well-Mikrotiterplatte (Abbildung 7) für zwei Stunden bei 30 °C im Brutschrank inkubiert.

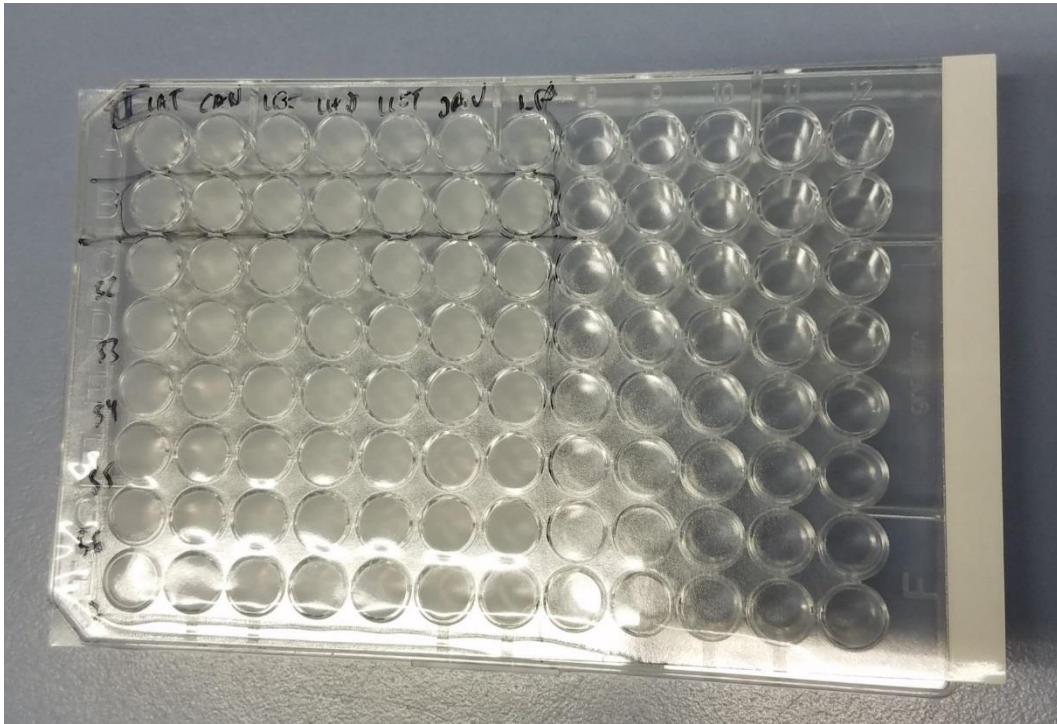


Abbildung 7: 96-Well-Mikrotiterplatte für den MAT

Dabei werden je nach Labor acht oder mehr repräsentative Serovare verwendet, die alle in einem ersten Durchlauf bei einer niedrigen Serumverdünnung von beispielsweise 1:50 im Screeningverfahren zur Antikörperfindung eingesetzt werden. Sind im Serum spezifische Antikörper gegen Leptospiren vorhanden, dann bilden diese zusammen mit dem Antigenen Agglutinate, die im mikroskopischen Bild beurteilt werden können (Abbildung 8). Wenn keine spezifischen Antikörper vorhanden sind, dann ist im mikroskopischen Bild eine reine Leptospirenkultur erkennbar (Abbildung 9) (GORIS & HARTSKEERL, 2014).

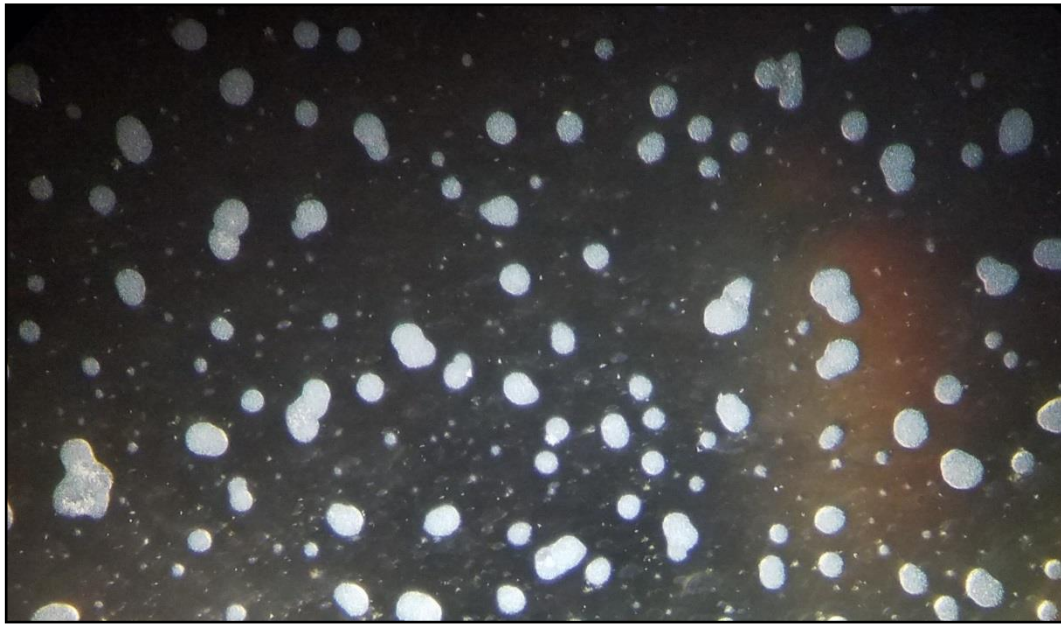


Abbildung 8: Positiver MAT

Deutliche Agglutinate im mikroskopischen Bild des Dunkelfeldmikroskops, Vergrößerung 100x

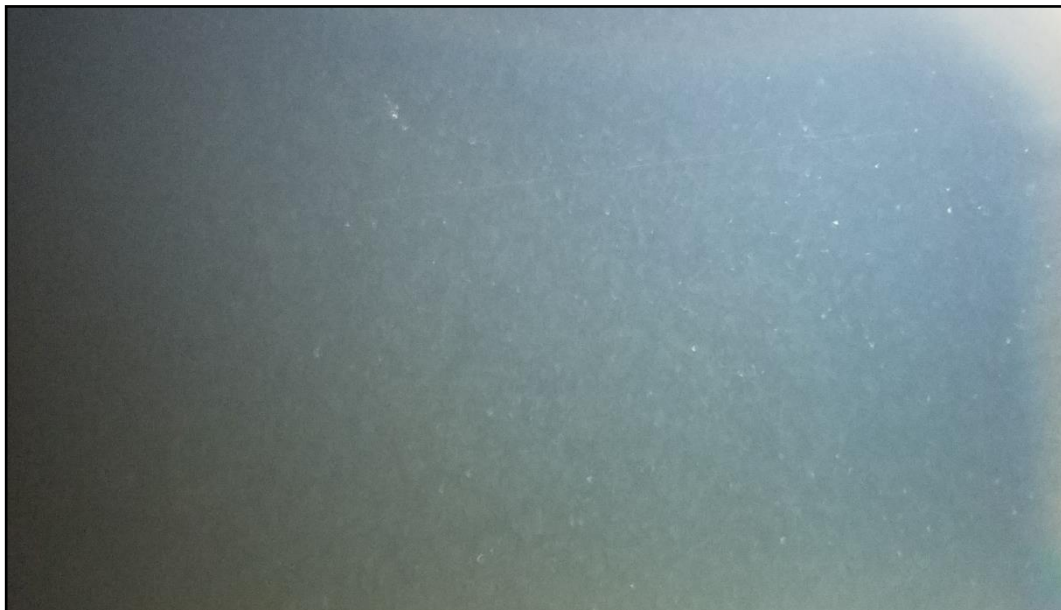


Abbildung 9: Negativer MAT

Keine Agglutinate im mikroskopischen Bild des Dunkelfeldmikroskops, reine Leptospirenkultur, Vergrößerung 100x

Die Begutachtung im Dunkelfeldmikroskop ist durch direktes oder indirektes Ablesen möglich. Bei der indirekten Methode wird ein kleiner Tropfen aus der Reaktionsmischung der Mikrotiterplatte auf einen Objektträger pipettiert und im Dunkelfeldmikroskop bei 100 bis 200facher Vergrößerung beurteilt. Wesentlich

schneller und vor allem sicherer für das Laborpersonal ist die direkte Methode, bei der die Mikrotiterplatte direkt im inversen Dunkelfeldmikroskop bei 100facher Vergrößerung begutachtet wird (Abbildung 10).

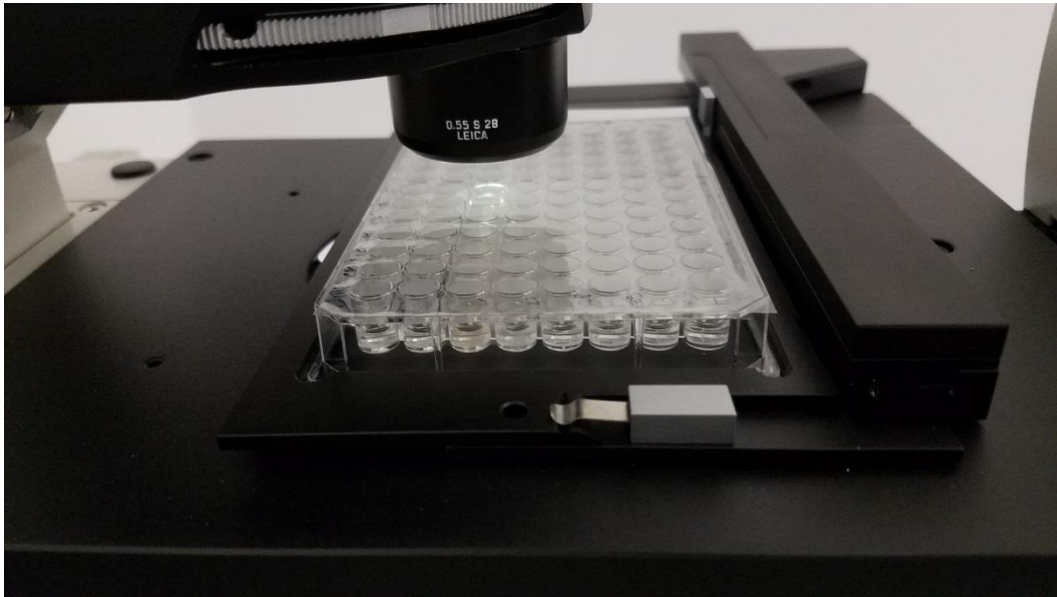


Abbildung 10: Mikrotiterplatte im inversen Dunkelfeldmikroskop

Alle positiv reagierenden Serovare werden anschließend in einem zweiten Schritt in einer Serumverdünnungsreihe weiter untersucht. Das Ergebnis des MAT wird als Titer angegeben. Dieser ist definiert als die höchste Verdünnungsstufe, bei der 50% oder mehr Leptospiren agglutiniert sind beziehungsweise sich weniger als 50% der Leptospiren noch frei bewegen (GORIS & HARTSKEERL, 2014).

Ab dem achten bis zehnten Tag nach Infektionsbeginn können spezifische Antikörper im MAT nachgewiesen werden. Wird eine Blutprobe bereits in einem sehr frühen Krankheitsstadium entnommen, dann sollte bei anhaltendem Leptospirose-Verdacht nach etwa ein bis zwei Wochen eine weitere Probe entnommen werden, um diese auf Serokonversion (im Falle eines negativen MAT-Ergebnisses bei der ersten Probe) oder hinsichtlich eines Titeranstiegs zu überprüfen. Wenn in der zweiten Probe nach erfolgreicher Serokonversion spezifische Antikörper vorhanden sind oder der Titer zwischen der ersten und zweiten Probe um mindestens das Vierfache (zwei Verdünnungsstufen) angestiegen ist, dann ist dies ein sehr starker Hinweis auf eine akute Infektion mit Leptospiren. Ein negatives Ergebnis im MAT, auch bei zweimaliger Probenentnahme, schließt die Möglichkeit einer Leptospiren-Infektion allerdings

nicht aus, da der Patient trotzdem mit einem Serovar infiziert sein kann, welches im Untersuchungsspektrum nicht berücksichtigt wurde. Außerdem kann die frühzeitige Gabe von Antibiotika die Bildung von Antikörpern gegen Leptospiren hemmen (PICARDEAU, 2013; GORIS & HARTSKEERL, 2014). Die Interpretation des MAT-Ergebnisses bei nur einer Serumprobe ist meist nicht eindeutig und deshalb auch nicht immer aussagekräftig. Laut OIE (2014) wird bereits ein Titer von 1:100 als positives Ergebnis angesehen, doch gerade ein solch niedriger Titer kann auch infolge einer vorhergegangenen Infektion oder nach einer Impfung bestehen. Bei sehr hohen Titern kann in der Regel von einer akuten Infektion mit Leptospiren ausgegangen werden, wobei hier die Meinungen deutlich auseinandergehen, welche Antikörperspiegel als „hohe Titer“ zu bewerten sind – ob 1:400 oder höher. Aufgrund gemeinsamer Antigene der Leptospiren kann es außerdem zu Kreuzreaktionen innerhalb einer Serogruppe oder auch zwischen einzelnen Serogruppen kommen. Während der akuten Phase der Infektion sind vor allem IgM-Antikörper in großer Menge vorhanden, denen später die spezifischeren IgG-Antikörper folgen. Insbesondere die dekalvalenten IgM-Antikörper können aufgrund ihrer ausgeprägten Avidität zu einem gewissen Grad zur Kreuzreaktivität beitragen. Nachdem eine Infektion mit Leptospiren überstanden ist, sinken die spezifischen Antikörpertiter unterschiedlich schnell wieder ab. Vor allem nach einer akuten Infektion können manche Titer noch über lange Zeit hinweg sehr hoch bleiben und erst nach Monaten oder sogar Jahren wieder auf einen niedrigen Titer absinken. Deshalb ist auch nicht immer der höchste detektierte Titer in einer Serumprobe das infizierende Serovar (GORIS & HARTSKEERL, 2014).

7 Epidemiologie der Leptospirose

Die Leptospirose ist eine Zoonose, die weltweit auftritt und nicht nur beim Menschen, sondern auch bei zahlreichen Haus-, Nutz- und Wildtieren zur Erkrankung führen kann. Während der Mensch für sämtliche Leptospiren-Serovare als Fehlwirt gilt, sind eine Vielzahl von Serovaren an bestimmte Tierarten adaptiert und lösen bei diesen keine schwerwiegende Krankheit aus, werden jedoch über lange Zeit mit dem Urin ausgeschieden. Als wichtigstes natürliches Reservoir für Leptospiren gelten Nager, vor allem Ratten und Mäuse, die somit ein wichtiges Infektionsrisiko für andere Tiere und den Menschen darstellen.

Beim Hund waren lange Zeit die beiden Serovare Canicola und Icterohaemorrhagiae Auslöser der Leptospirose, doch mit der Einführung entsprechender Impfstoffe hat sich das epidemiologische Bild verändert und neue Serovare wie beispielsweise Grippotyphosa oder Australis traten als Krankheitsursache auf (ELLIS, 2010; GREENE et al., 2012). Nachdem auch gegen diese neuen Serovare Impfstoffe entwickelt wurden, ist allgemein ein Rückgang an Leptospirose-Fällen bei Hunden zu verzeichnen.

Von Katzen dachte man lange Zeit, dass sie nicht für Leptospiren empfänglich sind. Mittlerweile konnte dies widerlegt werden, doch Berichte über klinisch manifeste Erkrankungen bei diesen Tieren kommen nur sehr sporadisch vor (SCHULLER et al., 2015; WEIS et al., 2017).

Die Leptospirose beim Pferd wird vor allem durch die Serovare Kennewicki und Grippotyphosa verursacht, wobei sich der Großteil der Tiere häufig nur subklinisch mit der Infektion auseinandersetzt. Neben dem Auftreten von Aborten und dem somit potentiellen Verlust wertvoller Fohlen wird außerdem ein Zusammenhang von Leptospiren-Infektionen mit der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU) diskutiert (ELLIS, 2015).

Bei Nutztieren wie Schweinen, Rindern, Schafen und Ziegen stehen Störungen in der Reproduktion mit Aborten und der Geburt lebensschwacher Jungtiere sowie nachfolgende wirtschaftliche Schäden im Vordergrund (ELLIS, 2015). Die Leptospirose bei Schwein und Schaf ist in Deutschland nach Anlage (zu §1) der Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten meldepflichtig (BMJV, 2015), ebenso wie die humane Leptospirose nach §7 des Infektionsschutzgesetzes (BMJV, 2019).

Neben den genannten Haus- und Nutztieren sind auch eine Vielzahl von Wildtieren empfänglich für Leptospiren. Neben Infektionen von Nagern und anderen kleinen Säugetieren wie Igel und Mardern ist mittlerweile bekannt, dass die Leptospirose auch bei Wildschweinen, Hirschen und Waschbären auftritt (JANSEN et al., 2007; KOIZUMI et al., 2009a; KOIZUMI et al., 2009b). In Südamerika wurden hohe Seroprävalenzen von *Leptospira*-spp.-Infektionen bei Lamas und Alpakas nachgewiesen (LLORENTE et al., 2002; ROSADIO et al., 2012); ein Umstand der nicht zu vernachlässigen ist, da diesen Tieren in unseren Breitengraden immer mehr Bedeutung in der Hobbytierhaltung zukommt.

7.1 Leptospirose in Europa

Auch wenn die Leptospirose vor allem in Ländern mit tropischem Klima auftritt, so gibt es doch in den Industrieländern regelmäßig Meldungen über Leptospirose-Fälle. In Deutschland werden dem Robert-Koch-Institut (RKI) jährlich zwischen 40 und 160 Fälle humaner Leptospirose gemeldet, wobei mehr als drei Viertel der Infektionen ihren Ursprung in Deutschland hatten (RKI, 2015). Die restlichen Patienten waren auf Reisen im Ausland, haben sich dort infiziert und sind anschließend in Deutschland an den Folgen der Infektion erkrankt. Durch den direkten Kontakt mit potentiell infizierten Tieren sind bestimmte Berufsgruppen wie beispielsweise Tierärzte, Landwirte oder Metzger für eine Erkrankung prädisponiert. Daher stammt auch die Bezeichnung „Schweinehüterkrankheit“, die durch eine Infektion mit dem Serovar Pomona ausgelöst wird, für das unter anderem das Schwein als Reservoirwirt gilt (SCHMID & GIOVANELLA, 1947). Eine Übertragung von Leptospiren über infizierte Haustiere wie Hunde oder auch Hausratten auf den Menschen ist möglich, tritt allerdings selten auf. Häufiger kommt es dagegen über den Kontakt mit kontaminiertem Wasser oder Erdreich zu Leptospirose-Ausbrüchen. Im Jahr 2007 infizierten sich beispielsweise 13 Erdbeerpflücker bei der Erntearbeit in Deutschland mit dem Serovar Grippyphosa („Erdbeerpflückerkrankheit“). Durch den vorhergehenden, unüblich warmen Winter konnten sich die auf den Feldern gefundenen Wühlmäuse extrem vermehren, was das Risiko für eine Infektion steigerte. Die meisten der Arbeiter wiesen außerdem Riss- oder Schürfwunden an den Händen auf, die den Leptospiren das Eindringen in den Körper ermöglichten (DESAI et al., 2009). Eine Vielzahl der gemeldeten Leptospirose-Fälle tritt außerdem in der Freizeit bei der Ausübung von Wassersportarten auf (JANSEN et al., 2005). Vor allem nach heftigen Regenfällen werden Leptospiren vermehrt von den Ufern in Gewässer eingeschwemmt; eine Konstellation, die sowohl in Deutschland als auch in Österreich bei Triathlon-Teilnehmern zur Leptospirose führte (BROCKMANN et al., 2010; RADL et al., 2011).

7.2 Leptospirose auf Madagaskar

In tropischen Ländern wie beispielsweise Madagaskar spielt die Leptospiren-Übertragung von Nutztieren auf den Menschen noch eine deutlich größere Rolle als in den Industrieländern. Dies liegt unter anderem an den oftmals schlechteren herrschenden Hygienestandards sowie einem höheren Infektionsrisiko der Tiere, da

diese häufig aus gemeinsamen Wasserquellen trinken, in denen Leptospiren aufgrund des vorherrschenden Klimas ideal überleben können. Studien über Leptospirose auf Madagaskar sind allerdings sehr rar, weshalb lange Zeit nicht klar war, ob auf der Insel überhaupt Leptospiren vorhanden sind oder nicht. Der erste Fall von Leptospirose beim Menschen auf Madagaskar wurde 1956 beschrieben, gefolgt von weiteren Fällen in den Jahren 1968, 1978 und 2001 (KOLOCHINE-ERBER & BRYGOO, 1956; SILVERIE et al., 1968; LHUILLIER, 1978; RALAIARIJAONA et al., 2001). All diese Fälle wurden mittels MAT bestätigt, wobei Reaktionen gegen die folgenden Serogruppen auftraten: Australis, Canicola, Grippotyphosa, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae und Tarassovi. Für sämtliche Serogruppen fungiert das Rind als Fehlwirt (ELLIS, 2015). In den Jahren 2015 und 2018 gelangen die ersten Nachweise von Leptospiren-DNA mittels PCR in zwei Fällen von humaner Leptospirose (PAGÈS et al., 2015; GUILLEBAUD et al., 2018). HAGEN et al. (2018) hingegen konnten bei 1.009 untersuchten humanen Fieberpatienten keine Leptospiren-DNA im Blut nachweisen. Allerdings wurden in dieser Studie keine Urinproben untersucht, was Patienten in einem späteren Infektionsstadium unentdeckt lässt und auch der MAT zum Nachweis spezifischer Antikörper gegen Leptospiren fehlte. Bei den Untersuchungen von RATSITORAHINA et al. (2015) wurde schließlich eine Seroprävalenz von 2,9% bei gesunden und fieberhaften Humanpatienten (n = 678) nachgewiesen, wobei Rinder einen signifikanten Risikofaktor darstellten. Aufgrund dieser Risikofaktoranalyse kann eine Übertragung von Leptospiren vom Rind auf den Menschen angenommen werden. Auch zur Leptospirose bei madagassischen Rindern gibt es nur wenige Informationen. Wie bereits beim Menschen wurden 1956 auch beim Rind Fälle von Leptospiren-Infektionen beschrieben und mittels MAT bestätigt. Dabei handelte es sich sowohl um gesunde als auch um kranke Tiere, die aus Ost- und Zentralmadagaskar stammten (KOLOCHINE-ERBER & BRYGOO, 1956; KOLOCHINE-ERBER et al., 1956). Zwölf Jahre später wurde bei gesunden Rindern aus Südmadagaskar eine hohe Seroprävalenz von 36% für Leptospiren-Infektionen detektiert (SILVERIE et al., 1968). Über Leptospirose-Fälle bei Rindern aus dem Norden der Insel gibt es aktuell keine Daten. RALAIARIJAONA et al. (2001) versuchten mittels PCR Leptospiren-DNA in Rindernieren nachzuweisen, jedoch ohne Erfolg. Allerdings war die Zahl der untersuchten Tiere sehr gering und es wurde kein MAT durchgeführt, weshalb unklar bleibt, ob die geprüften Rinder überhaupt Kontakt zu Leptospiren gehabt

hatten. Auch auf Madagaskar spielen Nager (Rodentia) und Spitzmäuse sowie die auf Madagaskar heimischen Tenreks eine wichtige Rolle als Reservoirwirte für Leptospiren. Bei den Tenreks handelt es sich um eine Säugetierfamilie, die ausschließlich auf Madagaskar vorkommt und die Größe von Spitzmäusen oder Igel erreicht. Die meisten dieser Tiere sind nachtaktiv und ernähren sich von wirbellosen Tieren. In Nierengewebe der genannten Tiergruppen konnte Leptospiren-DNA der Spezies *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. kirschneri* und *L. mayottensis* nachgewiesen werden (DIETRICH et al., 2014; DIETRICH et al., 2018; MOSELEY et al., 2018; RAHELINIRINA et al., 2019). Die Prävalenz lag zwischen 13% und 33,9%, bei Wanderratten (*Rattus norvegicus*) sogar bei 44,9%; alle genannten Werte beziehen sich dabei auf den DNA-Nachweis (RAHELINIRINA et al., 2010; DIETRICH et al., 2014; RAHELINIRINA et al., 2019). Bereits vor über zehn Jahren diskutierten SMYTHE et al. (2002a) die potentielle Rolle von Fledermäusen im Infektionszyklus der Leptospirose. Bei madagassischen (vorrangig endemischen) Fledermäusen, wurde ebenfalls Leptospiren-DNA der zuvor genannten Spezies nachgewiesen, wobei die meisten Proben *L. borgpetersenii* und *L. kirschneri* zugeordnet werden konnten (GOMARD et al., 2016; DIETRICH et al., 2018). LAGADEC et al. (2012) untersuchten neun verschiedene Fledermausspezies auf Madagaskar und fanden eine Prävalenz von 34,6%.

III. PUBLIKATION




International Journal of
*Environmental Research
and Public Health*



Article

Seroprevalence of *Leptospira* spp. Infection in Cattle from Central and Northern Madagascar

Theresa Schafbauer ¹, Anou Dreyfus ^{2,3}, Benedikt Hogan ⁴, Raphael Rakotozandrindrainy ⁵, Sven Poppert ^{2,3} and Reinhard K. Straubinger ^{1,*} 

¹ Bacteriology and Mycology, Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, Department of Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, LMU Munich, Veterinärstr. 13, 80539 Munich, Germany; t.schafbauer@lmu.de

² Swiss Tropical and Public Health Institute, 4051 Basel, Switzerland; anou.dreyfus@swisstph.ch (A.D.); sven.poppert@swisstph.ch (S.P.)

³ Faculty of Medicine, University Basel, 4056 Basel, Switzerland

⁴ Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, 20359 Hamburg, Germany; hogan@bnitm.de

⁵ Department of Microbiology and Parasitology, University of Antananarivo, BP 566, Antananarivo 101, Madagascar; rakrapha13@gmail.com

* Correspondence: r.straubinger@lmu.de

Received: 13 May 2019; Accepted: 5 June 2019; Published: 6 June 2019



Abstract: Leptospirosis is a zoonotic disease of global importance, especially in tropical countries. The current *Leptospira* spp. seroprevalence in cattle from central and northern Madagascar is unknown. Thus, the aim of this study was to determine the seroprevalence resulting from infections with pathogenic *Leptospira* spp. in zebu cattle from these areas. Serum samples from 194 animals were tested by microscopic agglutination test (MAT) using a panel of 12 serovars as antigens. Samples with a titer of $\geq 1:100$ were considered positive. The overall seroprevalence was 59.3% (95% CI; 52.0–66.2%) with titers ranging from 1:100 to 1:1600. Among the seropositive animals, the most frequent antibody reactions were against serovar *L. Tarassovi* (serogroup *L. Tarassovi*) with 40.2% (33.3–47.5%), followed by *L. Hardjo* (*L. Sejroe*) with 13.9% (9.5–19.8%), *L. Grippotyphosa* (*L. Grippotyphosa*) with 9.8% (6.2–15.1%), *L. Pomona* (*L. Pomona*) with 7.7% (4.5–12.7%) and *L. Autumnalis* (*L. Autumnalis*) with 5.2% (2.6–9.5%). Less than 5% of the samples reacted positively against the remaining serovars. These results indicate a very high exposure of Malagasy cattle to *Leptospira* spp. which, consequently, poses a definite risk for people working with cattle acquiring this zoonotic infection.

Keywords: leptospirosis; Madagascar; cattle; seroprevalence; microscopic agglutination test

1. Introduction

Leptospirosis is an important—but neglected—bacterial zoonosis that occurs worldwide, especially in tropical regions. Transmission of *Leptospira* spp. is possible either through direct contact with infected carrier animals or indirectly through contaminated water sources. The most important source of human infection is the brown rat (*Rattus norvegicus*), but many other wild and domestic animals can be reservoir hosts and shed leptospire [1]. Usually the infection source is urine from infected animals, but transmission from cattle to humans is also possible through aborted fetuses or vaginal discharges after abortion or calving [2].

Leptospire are spirochaetes belonging to the genus *Leptospira*, which is divided into 20 genetically different genospecies. In addition, there are presently 24 serogroups with nearly 300 serovars described for pathogenic leptospire [3,4].

Annual cases of human leptospirosis are estimated at 1 million, with 58,900 deaths worldwide, and the majority of cases occur in the tropical regions. Seventy-three percent of cases and deaths are

found within the tropical climatic zone between the northern and southern tropics, which includes Madagascar. This makes the disease one of the leading zoonotic causes of morbidity and mortality in the human population [5].

In Madagascar, studies about leptospirosis are rare and, for a while, it was not obvious if *Leptospira* spp. were present on the island or not. There are a few studies pertaining to leptospiral infection in humans that have been carried out so far. The earliest evidence of human leptospirosis was reported in 1956 [6], followed by additional described cases in 1968, 1978, and 2001 [7–9]. All cases were confirmed using a microscopic agglutination test (MAT), which is the gold standard in serological diagnosis. The results of the MAT showed antibody reactions against the following serogroups: *L. Australis*, *L. Canicola*, *L. Grippityphosa*, *L. Hebdomadis*, *L. Icterohaemorrhagiae* and *L. Tarassovi*. Cattle are incidental hosts for all of these serogroups [2]. In 2015, leptospire organisms were detected and confirmed in a human case using molecular methods, specifically the polymerase chain reaction (PCR), for the first time [10]. A cross-sectional study on human leptospirosis in Madagascar from 2015 found a seroprevalence of 2.9% ($n = 678$) in healthy and febrile humans; cattle were a significant risk factor for seropositivity (odds ratio [OR] = 3.4, p -value = 0.02) [11]. Based on this risk-factor analysis, a cattle to human transmission pathway can be hypothesized.

Infection by *Leptospira* spp. can cause severe disease in cattle, such as pyrexia, hemolytic anemia, jaundice, meningitis, or even death, but these cases are uncommon and very rare. The infection with serovar *L. Hardjo*, for which cattle are known to be a maintenance host, is often subclinical. Importantly, however, the economic losses for farmers resulting from reproductive disorders or abortion are not negligible, and affected cattle can pose a possible threat to the health of their owners. Moreover, infection in dairy cows may sometimes show as an acute milk drop syndrome [2].

Data about leptospirosis in Malagasy cattle is very scarce. The only reports on MAT-confirmed leptospirosis in sick and healthy animals from eastern and central Madagascar were published in 1956 [6,12]. In the southern part of the island, a high seroprevalence in healthy cattle of more than 36% was found using MAT in 1968 [7]. Information about leptospirosis in cattle from northern Madagascar is not available. The most recent study tried to detect DNA from *Leptospira* spp. in bovine kidney samples with PCR, but without positive results [9]. However, it should be noted that the number of tested animals was very small and no MAT was performed. Thus, it was not clear whether the tested animals had any contact with leptospire.

The present study aimed to obtain more information about the current infection status of cattle from central and northern Madagascar with *Leptospira* spp. and, in the case of high seropositivity, reveal a possible public health risk.

2. Materials and Methods

2.1. Animals and Sample Collection

Serum samples from 201 zebu cattle were collected in three different slaughterhouses in the municipality of Bemasoandro (district of Antananarivo-Atsimondrano) in Madagascar in October 2012. All blood samples were left to clot at ambient temperature before the serum was collected and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Samples of these animals were investigated prior to the present work in the scope of a study on different zoonotic diseases [13–15].

Afterwards, the samples were delivered on dry ice to the Institute of Infectious Diseases and Zoonoses, LMU Munich, Germany for serological analysis and were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until testing.

2.2. Serological Analysis

To detect antibodies against pathogenic *Leptospira* spp., all serum samples were tested with the MAT, in accordance with the methodology of Goris and Hartskeerl [16]. Cultures with living organisms of 12 *Leptospira* spp. reference strains were used in this study (Table 1).

Table 1. Panel of *Leptospira* spp. strains used as antigens in the microscopic agglutination test (MAT).

Genospecies	Serogroup	Serovar	Strain
<i>L. interrogans</i>	Australis	Australis	Ballico
	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
	Bataviae	Bataviae	Swart
	Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	Ictero I
	Pomona	Pomona	Pomona
	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitno
	Ballum	Ballum	Mus 127
	Javanica	Javanica	Veldrat Batavia 46
	Tarassovi	Tarassovi	Perepelitsin
<i>L. kirschmeri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V

Serovars were chosen based on previously published data from Madagascar [6,7,12]. All reference strains were originally supplied by the Federal Institute of Risk Assessment (Berlin, Germany) except strain Veldrat Batavia 46, which came from the Academic Medical Center (Amsterdam, The Netherlands). Negative (phosphate-buffered saline, PBS) and positive (rabbit antisera) controls were included in the test protocol. Rabbit antisera were also supplied by the Academic Medical Center (Amsterdam, The Netherlands). Leptospiral strains used in the MAT were cultured in liquid Ellinghausen–McCullough–Johnson–Harris (EMJH) medium (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA), incubated at 29 °C, and used after 7 to 11 days of culture. For standardization, leptospire were counted with a Petroff–Hausser counting chamber (Hausser Scientific, Horsham, PA, USA) and adjusted to approximately 2×10^8 organisms per mL.

To protect the laboratory personnel from infection, all serum samples were heat-inactivated for 30 min in a water bath at 56 °C [16].

All samples were initially screened at a dilution of 1:50 with an inverse dark-field microscope (Leica DMi8, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) using 100× total magnifying power. Sera with a positive reaction in this screening were titrated in a serial twofold dilution from 1:50 to 1:6400 to determine the end-point titer. The antibody titer is defined as the highest dilution containing $\geq 50\%$ of agglutinated leptospire. Samples with a titer of $\geq 1:100$ were considered positive. If no agglutination was detectable, the sample was considered negative.

2.3. Statistical Analysis

Data was organized and analyzed with Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) and OriginPro 9.1 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). The overall seroprevalence, prevalence for each serovar, 95% confidence intervals (CI), and geometric mean titer for each serovar were calculated [17]. Differences in the *Leptospira* spp. seroprevalence and seroprevalences of each serovar according to geographic sampling regions were analyzed by a chi-square test. A *p*-value less than 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. Description of Study Population and Tested Samples

A total of 201 serum samples were collected from cattle in three slaughterhouses located close to Antananarivo, the capital of Madagascar. The cattle originated from five different regions in central and northern Madagascar: Bongolava ($n = 79$; 39.3%), Haute Matsiatra ($n = 63$; 31.3%), Menabe ($n = 27$; 13.4%), Sofia ($n = 22$; 10.9%) and Vakinankaratra ($n = 10$; 5.0%) (Figure 1).

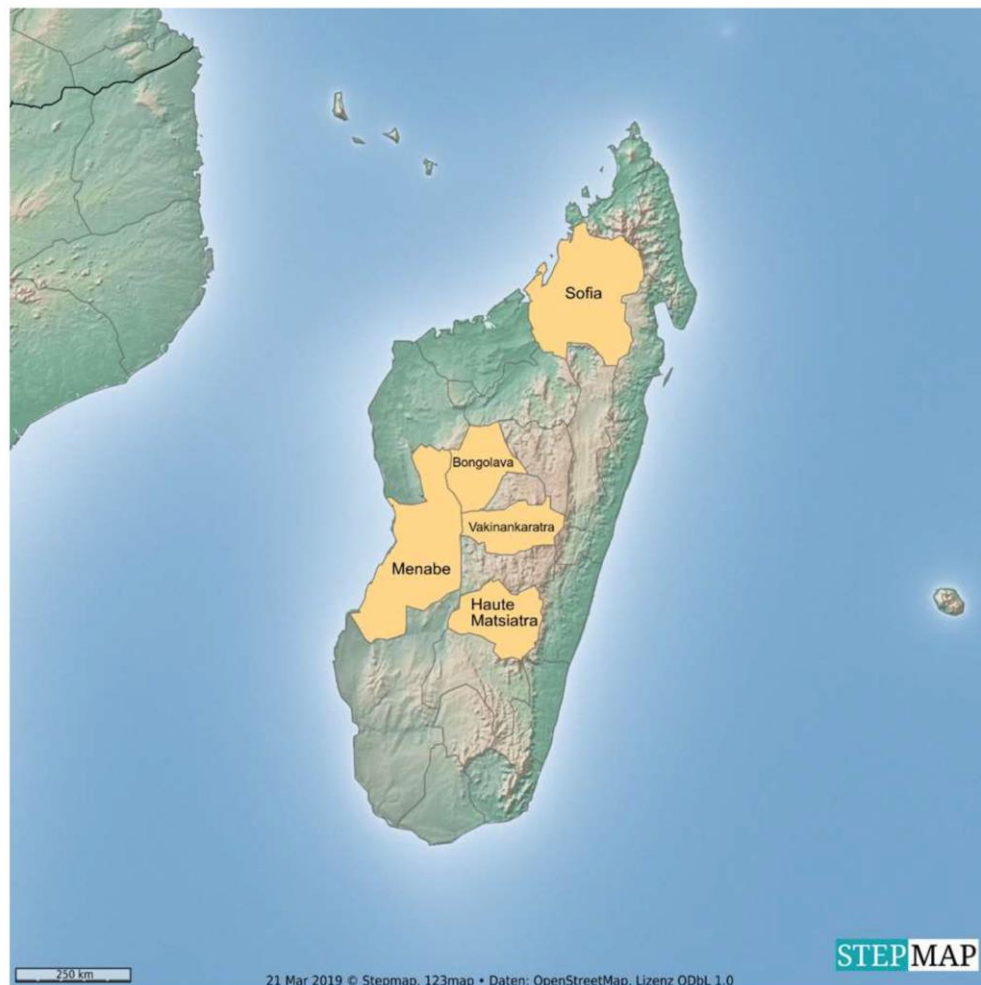


Figure 1. Origin of Malagasy zebu sera.

All cattle were pure *Bos indicus* breed and exclusively male with an age between 4 and 20 years. Two animals were classified as sick during routine veterinary examination; all other cattle were considered healthy.

From these 201 collected samples, seven samples could not be evaluated due to insufficient serum quality or small amounts of serum. Finally, 194 samples were tested serologically using MAT.

3.2. Serological Results

Of the 194 tested sera, a total of 115 samples had a positive titer of 1:100 or higher against one or more serovars, which results in an overall seroprevalence of 59.3% (95% CI; 52.0–66.2%). The most reactive serovar was *L. Tarassovi* (serogroup *L. Tarassovi*) with 40.2% (33.3–47.5%), followed by *L. Hardjo* (*L. Sejroe*) with 13.9% (9.5–19.8%), *L. Grippytyphosa* (*L. Grippytyphosa*) with 9.8% (6.2–15.1%), *L. Pomona* (*L. Pomona*) with 7.7% (4.5–12.7%) and *L. Autumnalis* (*L. Autumnalis*) with 5.2% (2.6–9.5%). Serovars *L. Pyrogenes* (serogroup *L. Pyrogenes*), *L. Bataviae* (*L. Bataviae*), *L. Australis* (*L. Australis*), *L. Javanica* (*L. Javanica*) and *L. Ballum* (*L. Ballum*) showed a seroprevalence of less than 5% each (Table 2). No sample showed a positive reaction against serovar *L. Canicola* (*L. Canicola*) or *L. Icterohaemorrhagiae* (*L. Icterohaemorrhagiae*).

The *Leptospira* spp. seroprevalence among the five sampling areas showed no statistically significant difference (p -value = 0.71). Moreover, there were no statistically significant differences between the seroprevalences of each serovar among the five different sampling regions (Table S1).

Table 2. Number of seropositive samples and seroprevalence of *Leptospira* spp. serovars using MAT (titer \geq 1:100); in total 194 bovine serum samples from central and northern Madagascar were included in the study.

Serovar	Seropositive Samples n	Seroprevalence %	CI 95%
<i>L. Tarassovi</i>	78	40.2	33.3–47.5
<i>L. Hardjo</i>	27	13.9	9.5–19.8
<i>L. Grippotyphosa</i>	19	9.8	6.2–15.1
<i>L. Pomona</i>	15	7.7	4.5–12.7
<i>L. Autumnalis</i>	10	5.2	2.6–9.5
<i>L. Pyrogenes</i>	9	4.6	2.3–8.9
<i>L. Bataviae</i>	6	3.1	1.3–6.9
<i>L. Australis</i>	2	1	0.2–4.1
<i>L. Javanica</i>	2	1	0.2–4.1
<i>L. Ballum</i>	1	0.5	0.0–3.3
<i>L. Canicola</i>	0	0	-
<i>L. Icterohaemorrhagiae</i>	0	0	-

Reactions with two or more serovars were detected in 42/115 samples (36.5%). Most reactions against more than one serovar in a single serum sample were observed for *L. Tarassovi* with *L. Hardjo* (Table 3).

Table 3. Number and percentage of positive samples reacting with two, three or more serovars.

Positive Serovars n	Samples with Multiple Reactions n (%)	Serovars with Frequent Reactions (n)
2	32 (27.8)	
3	8 (7.0)	T ¹ + HJ ² (9)
4	2 (1.7)	

¹ *L. Tarassovi*, ² *L. Hardjo*.

MAT titers ranged from 1:100 to 1:1600, with one sample having a positive titer of 1:1600 against serovar *L. Grippotyphosa* (Figure 2, Table S2). The geometric mean titer ranged from 1:100 (*L. Ballum*) to 1:247 (*L. Grippotyphosa*) (Figure 3).

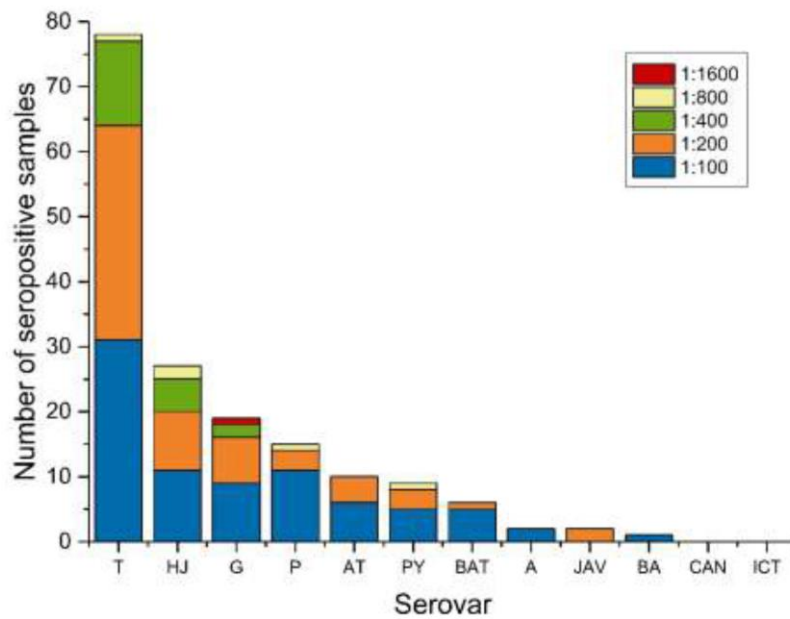


Figure 2. Number of seropositive samples with titers from 1:100 to 1:1600 for each serovar. Seroprevalences of some serovars may be overestimated due to cross-reactivity. Serovars included in the test: *L. Tarassovi* (T), *L. Hardjo* (HJ), *L. Grippityphosa* (G), *L. Pomona* (P), *L. Autumnalis* (AT), *L. Pyrogenes* (PY), *L. Bataviae* (BAT), *L. Australis* (A), *L. Javanica* (JAV), *L. Ballum* (BA), *L. Canicola* (CAN) and *L. Icterohaemorrhagiae* (ICT).

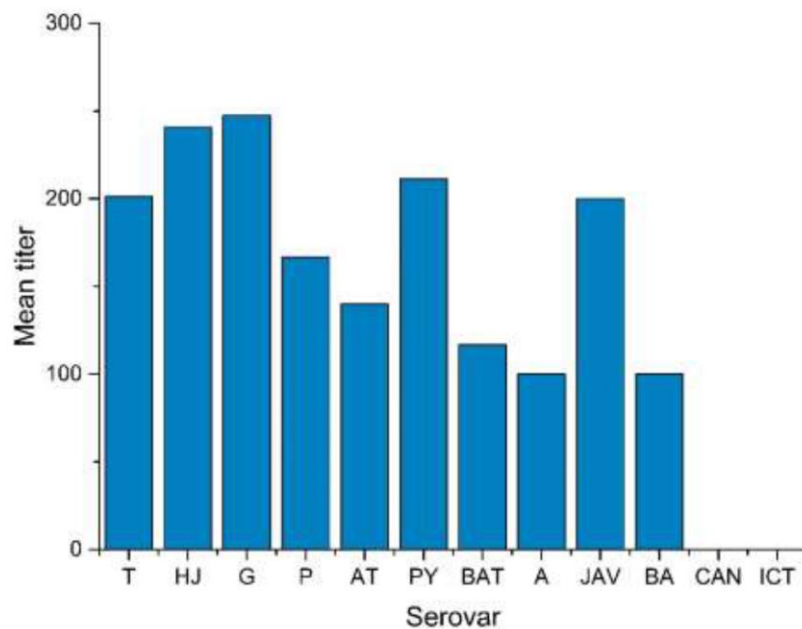


Figure 3. Mean titer of each serovar. Serovars included in the test: *L. Tarassovi* (T), *L. Hardjo* (HJ), *L. Grippityphosa* (G), *L. Pomona* (P), *L. Autumnalis* (AT), *L. Pyrogenes* (PY), *L. Bataviae* (BAT), *L. Australis* (A), *L. Javanica* (JAV), *L. Ballum* (BA), *L. Canicola* (CAN) and *L. Icterohaemorrhagiae* (ICT).

4. Discussion

The aim of this study was to evaluate the seroprevalence of *Leptospira* spp. in cattle from central and northern Madagascar, indicating past exposure to leptospires. For all the data presented here, it has to be considered that we only tested male cattle and the situation may be different for female cattle. The obtained seroprevalence of 59.3% shows high exposure of cattle to *Leptospira* spp. and a possible public health risk for people working with cattle. According to the data presented here, leptospirosis appears to be a major infectious disease in Malagasy cattle, which is in agreement with data from Reunion Island (also part of the Western Indian Ocean islands) [18]. In a similar study from 1968 that focused on leptospirosis in cattle from southern Madagascar, the seroprevalence was 36.1% ($n = 72$) [7]. Factors associated with such a high seroprevalence in cattle may be due to contact with other animals, such as domesticated or wild pigs, sheep, rodents or other small mammals, which also carry leptospiral infections and transmit the organisms via urine. Another important source of infection could be the common usage of water sources. The transmission of leptospires via venereal spread is also a factor that should not be underestimated.

Among the five geographic sampling regions, there was no significant statistical difference in seroprevalence. The main reason for this is probably the sample size, which was not large enough to detect small differences. Another factor could be the very similar climatic conditions in these regions. Usually high humidity and rainfall are associated with cases of leptospirosis, because under these conditions most leptospires have a very high survival rate in the environment. Central and northern Madagascar is known for its sub-humid to humid climate, in contrast to the (semi-)arid southern part of the island [19]. The tropical climate on islands in the Western Indian Ocean consists of two main seasons: A hot and rainy season, the austral summer, and a dry season, the austral winter [18]. As our sampling was conducted during the austral summer, the exposure to leptospires may have been slightly higher than during the dry winter period.

The most reactive serovar in 40.2% of the tested samples was *L. Tarassovi* (genospecies *L. borgpetersenii*), which corresponds with data from cattle in southern Madagascar [7]. *L. Tarassovi* is well-known for infections in beef cattle from New Zealand and Australia, with herd seroprevalences of 74.0% and 13.9%, respectively [20,21]. A recent study in Thailand detected a herd-seroprevalence of 92.9% for *L. Tarassovi* [22]. Although, in these studies, a MAT cut-off titer of 1:48 or 1:50 was used, both of which are lower than the one we used in our study. Additionally, pigs and wild boars are known to be maintenance hosts for serovar *L. Tarassovi*. In Madagascar, most pigs are located in the central and northern part of the island; though, data about the population of wild boars are missing [19]. As contact with wild boars or pigs may occur during grazing, their role in the pig–cattle transmission cycle seems to be quite important. Note that, due to cross-reactivity in the MAT, it is possible that another serovar indicated the antibody reaction for *L. Tarassovi*, and therefore its seroprevalence could be overestimated.

Serovar *L. Hardjo* (genospecies *L. interrogans*) is usually associated with cattle, as they are known to be a maintenance host. The observed seroprevalence of 13.9% shows that *L. Hardjo* is present in Malagasy cattle. Currently, information about the genospecies *L. interrogans* and *L. borgpetersenii* on Madagascar is missing. Thus, as these genospecies are likely to cross-react in the MAT, it may be possible that the detected antibodies are against *L. borgpetersenii* serovar *Hardjo*, but not *L. interrogans* serovar *Hardjo*. Transmission of serovar *L. Hardjo* is possible through placental infection or direct contact with urine or fetal membranes from infected cattle [2]. The animals in our study were exclusively male, so they were probably already infected as a fetus or during birth. Transmission from other infected cattle may also be possible. In maintenance hosts, infection is often subclinical or the clinical signs are very mild. Chronic leptospirosis, on the other hand, can lead to abortion, stillbirth or infertility in female cattle [2]. The economic impact of the infection in cattle from Madagascar is still unknown.

The obtained seroprevalence of 9.8% for the rodent-associated serovar *L. Grippotyphosa* (genospecies *L. kirschneri*) shows that this classical transmission pathway, perpetuated by small mammals, also plays a role in Malagasy cattle. Madagascar, with its diversity of ecosystems and

mammal populations, provides a very wide range of potential hosts for *Leptospira* spp. [18]. Additionally, endemic small mammals (e.g., rodents, tenrecs and shrews) and bats may have a role in the transmission cycle that includes cattle, as they harbor leptospires from the same genospecies like the ones found in our study [23,24].

Exposure to two or more serovars, or exposure to one serovar with cross-agglutinations, was found in 36.5% of the tested samples. Cross-reactions may occur, since several common antigens are found among leptospires. During the acute phase of an infection, IgM antibodies may be present at elevated levels, followed later by the production of more specific IgG antibodies. IgM may also contribute to a certain degree of antibody cross-reaction. After an infection has been overcome, antibody titers can decline at very different rates. Especially following a case of acute infection, some titers may remain high for a long time and may take months or even years to decline to lower levels. Thus, if a sample shows cross-reactions, the highest titer does not necessarily indicate the infecting serovar. However, as shown previously, it does indicate that the animal was at least, at one time, infected by a strain belonging to this serogroup [25]. Infecting serovars can only be identified with isolates from infected tissues or fluids, which is rather difficult, or with PCR, which can be run directly from urine or tissues. The research community is divided regarding the interpretation of MAT results. Some argue that data obtained with MAT only provide a general impression about the presence of serogroups within a population or within the environment [26]. However, if the epidemiology of leptospirosis is well known, and the MAT validated in the context of a country, MAT results can be serovar-specific [27]. Given the unknown epidemiology in Madagascar, MAT interpretation regarding serovars should be made with caution.

Antibody titers in our study ranged from 1:100 to 1:1600. According to the OIE (Office International des Epizooties, World Organization for Animal Health) a titer of $\geq 1:100$ is considered positive [28]. Yet, clinically relevant titers in cases of acute leptospirosis are usually much higher [26]. In our study, all animals were considered healthy during routine veterinary examination with two exceptions, from which one showed an antibody titer against serovar *L. Tarassovi* of 1:200. As the titer of this case is reasonably low, acute leptospirosis is not expected.

Most of the antibody levels we detected were low ($\leq 1:400$). They probably resulted from earlier infections with antibodies remaining in the sera or very early infections without clinical signs. High titers of 1:800 or 1:1600 were found for serovars *L. Grippytyphosa*, *L. Hardjo*, *L. Pomona*, *L. Pyrogenes* and *L. Tarassovi*. The affected animals could have had acute leptospirosis without obvious clinical signs, or the titers may have resulted from older infections with slowly decreasing (but remaining) antibody levels. Another reason could be a reinfection, wherein antibodies from an older infection were still present, and thus the titer was boosted because of the production of new antibodies. High antibody titers are also possible during the early weeks after vaccines have been applied. As this latter scenario is not practiced in Madagascar, vaccination can be excluded as a possible reason for the antibody positivity.

With 194 samples, the sample size was large enough to precisely estimate an apparent prevalence of 15%, with a precision of 0.05 and confidence of 95%. Hence, our sample size was too small to get a precise estimate for the existing prevalence, which was reflected in the wider confidence intervals. A limitation of the study is the small and varying number of samples from each geographic region. Further, as the samples were collected in slaughterhouses, the origin of the animals was unknown and equal distribution of the areas was not possible. Therefore, we did not calculate the seroprevalence for each sampling region, but for the central and northern part of Madagascar in total.

From our study, we can show that cattle from central and northern Madagascar have been exposed to *Leptospira* spp., but the number of cattle suffering from leptospirosis with clinical signs is still unknown. Moreover, the importance of leptospirosis in humans in Madagascar is not clear, as there are only a few reports; for example, a recent study in fever patients ($n = 1009$) did not detect leptospiral DNA with real-time PCR [15]. In particular, areas with rice cultivation, where cattle and rodents occur, infection in humans can be suspected.

To evaluate the public health relevance, the detection of leptospiral DNA in bovine kidney or urine samples and the status of cattle as shedders of pathogenic leptospires is highly recommended as the next steps in future research. Additionally, insight on the seroprevalence in female cattle and the economic impact of *Leptospira* spp. infection on Malagasy cattle may also assist in assessing the importance of future leptospirosis control in Madagascar. Finally, further studies on leptospirosis in humans are highly recommended to evaluate the current infection status of this widespread zoonotic disease.

5. Conclusions

A seroprevalence of 59.3% is strong evidence for exposure of cattle from central and northern Madagascar to pathogenic leptospires. Hence, transmission of *Leptospira* spp. from livestock to humans is possible and should be considered as a risk factor relevant for public health aspects. Based on these findings, we recommend further studies focusing on detection of leptospire organisms in Malagasy cattle, rodents and humans to reveal and characterize the shedding status of affected animals and herds, and to determine the relevance for humans. Beyond the detection of leptospires, it is also advised to search for possible causes of Leptospirosis on Madagascar. Moreover, humans on Madagascar should be informed adequately about this zoonotic disease and how they can prevent themselves from being infected. For example, by avoiding contact with rodents or the urine of cattle, or the use of protective gloves during work with cattle.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/1660-4601/16/11/2014/s1>, Table S1: Seroprevalence of each serovar according to geographic sampling region. Table S2: Number of individuals and relative prevalence per *Leptospira* spp. serovar.

Author Contributions: Conceptualization, T.S., S.P. and R.K.S.; methodology, T.S. and R.K.S.; validation, T.S.; formal analysis, T.S. and A.D.; investigation, T.S.; resources, B.H., R.R., S.P. and R.K.S.; writing—original draft preparation, T.S.; writing—review and editing, A.D., S.P. and R.K.S.; visualization, T.S.; supervision, R.K.S.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: Special thanks to Stephanie Hiereth for her assistance in bacterial culture, medium preparation and MAT evaluation. We also thank Ivonne Stamm from IDEXX Laboratories, Ludwigsburg, Germany for her technical advice concerning the MAT.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Haake, D.A.; Levett, P.N. Leptospirosis in humans. In *Leptospira and Leptospirosis. Current Topics in Microbiology and Immunology*, 1st ed.; Adler, B., Ed.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2015; Volume 387, pp. 65–97.
2. Ellis, W.A. Animal leptospirosis. In *Leptospira and Leptospirosis. Current Topics in Microbiology and Immunology*, 1st ed.; Adler, B., Ed.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2015; Volume 387, pp. 99–137.
3. Cerqueira, G.M.; Picardeau, M. A century of *Leptospira* strain typing. *Infect. Genet. Evol.* **2009**, *9*, 760–768. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Hartskeerl, R.A.; Collares-Pereira, M.; Ellis, W.A. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: Dynamics of infection in the changing world. *Clin. Microbiol. Infect.* **2011**, *17*, 494–501. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Costa, F.; Hagan, J.E.; Calcagno, J.; Kane, M.; Torgerson, P.; Martinez-Silveira, M.S.; Stein, C.; Abela-Ridder, B.; Ko, A.I. Global morbidity and mortality of leptospirosis: A systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2015**, *9*, e0003898. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Kolochine-Erber, B.; Brygoo, E.R. Research on leptospirosis in Madagascar. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Fil.* **1956**, *49*, 686–698.
7. Silverie, R.; Monnier, M.; Lataste-Dorolle, C. Recent survey of leptospirosis on Madagascar. Contribution to the study of human, bovine and porcine leptospirosis in the southern region. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Fil.* **1968**, *61*, 346–359.
8. Lhuillier, M. Leptospiroses in Madagascar. (Bacteriological and serological study). *Arch. Inst. Pasteur Madag.* **1978**, *46*, 429–439.

9. Ralaiviraona, R.L.; Bellenger, E.; Chanteau, S.; Roger, F.; Pérolat, P.; Rasolofo Razanamparany, V. Detection of leptospirosis reservoirs in Madagascar using the polymerase chain reaction technique. *Arch. Inst. Pasteur Madag.* **2001**, *67*, 34–36.
10. Pagès, F.; Kuli, B.; Moiton, M.P.; Goarant, C.; Jaffar-Bandjee, M.C. Leptospirosis after a stay in Madagascar. *J. Travel Med.* **2015**, *22*, 136–139. [[CrossRef](#)]
11. Ratsitorahina, M.; Rahelinirina, S.; Michault, A.; Rajerison, M.; Rajatonirina, S.; Richard, V. Has Madagascar lost its exceptional leptospirosis free-like status? *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0122683. [[CrossRef](#)]
12. Kolochine-Erber, B.; Buck, G.; Quesnel, J. Bovine leptospirosis should be suspected in Madagascar. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Fil.* **1956**, *49*, 681–686.
13. Keller, C.; Kruger, A.; Schwarz, N.G.; Rakotozandrindrainy, R.; Rakotondrainiarivelo, J.P.; Razafindrabe, T.; Derschum, H.; Silaghi, C.; Pothmann, D.; Veit, A.; et al. High detection rate of *Rickettsia africae* in *Amblyomma variegatum* but low prevalence of anti-rickettsial antibodies in healthy pregnant women in Madagascar. *Ticks Tick Borne Dis.* **2016**, *7*, 60–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Boone, I.; Henning, K.; Hilbert, A.; Neubauer, H.; von Kalkreuth, V.; Dekker, D.M.; Schwarz, N.G.; Pak, G.D.; Krüger, A.; Hagen, R.M.; et al. Are brucellosis, Q fever and melioidosis potential causes of febrile illness in Madagascar? *Acta Trop.* **2017**, *172*, 255–262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Hagen, R.M.; Frickmann, H.; Ehlers, J.; Krüger, A.; Margos, G.; Hizo-Teufel, C.; Fingerle, V.; Rakotozandrindrainy, R.; Kalkreuth, V.V.; Im, J.; et al. Presence of *Borrelia* spp. DNA in ticks, but absence of *Borrelia* spp. and of *Leptospira* spp. DNA in blood of fever patients in Madagascar. *Acta Trop.* **2018**, *177*, 127–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Goris, M.G.; Hartskeerl, R.A. Leptospirosis serodiagnosis by the microscopic agglutination test. *Curr. Protoc. Microbiol.* **2014**, *32*, 12E.5.1–12E.5.18. [[CrossRef](#)]
17. Fleiss, J.L.; Levin, B.; Paik, M.C. *Statistical Methods for Rates and Proportions*, 3rd ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2003.
18. Desvars, A.; Michault, A.; Bourhy, P. Leptospirosis in the western Indian Ocean islands: What is known so far? *Vet. Res.* **2013**, *44*, 80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. FAO. *Livestock Sector Brief Madagascar*; FAO: Rome, Italy, 2005.
20. Mannewald, A. Prevalence of Atypical *Leptospira* Serovars in New Zealand's Pastoral Livestock. Ph.D. Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, 2016.
21. Heuer, C. Human health and leptospirosis. In Proceedings of the Society of Sheep & Beef Cattle Veterinarians of the NZVA, Annual Seminar, Auckland, New Zealand, 25–27 May 2006.
22. Yatbantoong, N.; Chaivarat, R. Factors Associated with Leptospirosis in Domestic Cattle in Salakphra Wildlife Sanctuary, Thailand. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2019**, *16*, 1042. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Dietrich, M.; Gomard, Y.; Lagadec, E.; Ramasindrazana, B.; Le Minter, G.; Guernier, V.; Benlali, A.; Rocamora, G.; Markotter, W.; Goodman, S.M.; et al. Biogeography of *Leptospira* in wild animal communities inhabiting the insular ecosystem of the western Indian Ocean islands and neighboring Africa. *Emerg. Microbes Infect.* **2018**, *7*, 57. [[CrossRef](#)]
24. Rahelinirina, S.; Bourhy, P.; Andriamiramanana, F.; Garin, B.; Rajerison, M. High Prevalence of *Leptospira* spp. in Rodents in an Urban Setting in Madagascar. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2019**, *100*, 1079–1081. [[CrossRef](#)]
25. Blanco, R.M.; dos Santos, L.F.; Galloway, R.L.; Romero, E.C. Is the microagglutination test (MAT) good for predicting the infecting serogroup for leptospirosis in Brazil? *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2016**, *44*, 34–36. [[CrossRef](#)]
26. Levett, P.N. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2001**, *14*, 296–326. [[CrossRef](#)]
27. Dreyfus, A.; Wilson, P.; Benschop, J.; Collins-Emerson, J.; Verdugo, C.; Heuer, C. Seroprevalence and herd-level risk factors for seroprevalence of *Leptospira* spp. in sheep, beef cattle and deer in New Zealand. *N. Z. Vet. J.* **2018**, *66*, 302–311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. OIE. Chapter 2.1.12. Leptospirosis. In *OIE Terrestrial Manual*; OIE: Paris, France, 2014; pp. 1–15.



IV. DISKUSSION

Leptospirose ist eine durch Bakterien verursachte Zoonose, die weltweit bei Tier und Mensch auftritt und vor allem in Gegenden mit tropischem Klima von großer Bedeutung ist. Beim Rind stehen vorrangig Störungen in der Reproduktion und Fruchtbarkeit sowie eventuelle wirtschaftliche Folgeschäden im Vordergrund (ELLIS, 2015). Die Datenlage ist je nach Region unterschiedlich. Madagaskar beispielsweise zählt zu jenen Ländern, aus denen nur wenig hinsichtlich dieser zoonotischen Erkrankung bekannt ist. Ziel dieser Arbeit war es daher, den Infektionsstatus von Rindern aus dem Zentrum und Norden Madagaskars zu bestimmen, da solche Daten bisher fehlten. Epidemiologische Studien zur Leptospirose werden in der Regel mittels MAT durchgeführt, da dieser Test Aufschluss darüber gibt, ob untersuchte Individuen bereits Kontakt zum Erreger hatten und wenn ja, in welchem Ausmaß und mit welchen Serogruppen. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden die Serumproben von Zeburindern ($n = 194$) aus Zentral- und Nordmadagaskar mittels MAT auf spezifische Antikörper gegen *Leptospira* spp. hin untersucht. Dabei wurden alle Proben in einem ersten Schritt bei einer Anfangsverdünnung des Serums von 1:50 voruntersucht. Jene Proben, die hier positiv reagierten, wurden anschließend titriert und ab einem Titer von 1:100 als positiv beurteilt (WHO, 2003; OIE, 2014). In einer anfänglichen Voruntersuchung wurden die Proben zudem bei einer Verdünnung von 1:25 überprüft. Jedoch führte dieser Ansatz bei sehr vielen Proben zu unspezifischen positiven Reaktionen. Als die Anfangsverdünnung auf 1:50 erhöht wurde, konnten eindeutig positive Agglutinate ausgewertet werden, weshalb in der Folge alle weiteren Serumproben erst ab einer Verdünnung von 1:50 untersucht wurden.

Mit einer Seroprävalenz von 59,3% wird eine klare Exposition von madagassischen Rindern aus den untersuchten Regionen gegenüber Leptospiren erkennbar. In der Folge kann dies ein Infektionsrisiko für jene Menschen darstellen, die mit Rindern arbeiten oder auf dichtem Raum zusammenleben. SILVERIE et al. (1968) fanden bei Rindern aus Südmadagaskar ebenfalls eine hohe Seroprävalenz von 36,1% ($n = 72$). Leptospirose scheint somit auf Madagaskar eine weitverbreitete Infektionskrankheit beim Rind zu sein, deren Bedeutung nicht unterschätzt werden sollte. Dies stimmt überein mit Daten aus La Réunion, das ebenfalls zur Gruppe der westlichen Inseln des Indischen Ozeans gehört. Dort ist bereits seit 1980 bekannt,

dass die Leptospirose eine der wichtigsten Infektionskrankheiten beim Rind ist (MOUTOU, 1980), wobei die Serogruppe Sejroe am häufigsten bei Milch- und Fleischrindern zirkuliert (DESVARS et al., 2013b). Hauptursache für Aborte bei Milchrindern auf La Réunion sind die Serogruppen Sejroe und Hebdomadis (GARES, 2003).

1 Vergleich der untersuchten Regionen

Sämtliche Proben der vorliegenden Arbeit wurden an drei verschiedenen Schlachthöfen im Bezirk Antananarivo-Atsimondrano entnommen. Die geschlachteten und beprobten Rinder stammten ursprünglich aus fünf verschiedenen Regionen aus Zentral- und Nordmadagaskar. Hinsichtlich der Seroprävalenz für *Leptospira*-spp.-Infektionen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gebieten festgestellt werden. Auch die Seroprävalenzen der einzelnen Serovare in den fünf untersuchten Regionen unterschieden sich statistisch nicht signifikant. Die Hauptursache dafür ist vermutlich die nicht angemessen hohe Probenanzahl, die in der Folge nicht ausreicht, um eindeutige Unterschiede darzustellen. Ein weiterer Grund könnten die klimatischen Bedingungen sein, die in allen fünf untersuchten Regionen sehr ähnlich sind. Vor allem bei Regen und damit einhergehender hoher Luftfeuchtigkeit werden häufig Fälle von Leptospirose verzeichnet, da die meisten Leptospiren gerade unter diesen klimatischen Bedingungen sehr lange in der Umwelt überleben können (GREENE et al., 2012). Madagaskar wird grob in zwei klimatische Zonen eingeteilt, wobei der Norden und das Zentrum eher humid sind, der Süden hingegen arid ist (FAO, 2005). Somit lagen alle fünf Beprobungsgebiete in der gleichen, feuchten Klimazone. Auf Madagaskar und den weiteren westlichen Inseln des indischen Ozeans gibt es klassischerweise zwei Hauptjahreszeiten: den südlichen Sommer („austral summer“) und den südlichen Winter („austral winter“). Während der Sommer sehr heiß und verregnet ist, ist der Winter geprägt von einer Trockenperiode (DESVARS et al., 2013a). Die Proben der vorliegenden Arbeit wurden während des Südsommers entnommen, also während der regenreichen Periode, weshalb die Exposition der Rinder gegenüber *Leptospira* spp. eventuell ein wenig höher war, als dies während der Trockenzeit der Fall wäre.

2 Untersuchte Serovare im MAT und die durch deren Infektion hervorgerufenen Prävalenzen

Die Auswahl der Serovare, die im vorliegenden MAT verwendet wurden, basierte auf zuvor publizierten Daten aus Madagaskar. KOLOCHINE-ERBER et al. (1956) untersuchten erkrankte und gesunde Rinder von der Ostküste und aus Zentralmadagaskar. Am häufigsten fanden sie Titer gegen die Serovare Pomona, Icterohaemorrhagiae, Grippytyphosa, Mitis Johnson (= Tarassovi), Bovis (= Hardjo), Bataviae, Canicola und Australis. Im gleichen Jahr fanden Untersuchungen am Schlachthof in Antananarivo statt; hier waren die auffallendsten Titer jene gegen die Serovare Ballum, Australis, Mitis Johnson (= Tarassovi) und Sentoti (KOLOCHINE-ERBER & BRYGOO, 1956). Die dritte und vorerst letzte Studie zu spezifischen Antikörpern gegen Leptospiren führten SILVERIE et al. (1968) bei gesunden Rindern aus der Region Tulear (Südmadagaskar) durch. Hier war der MAT vor allem bei den Serovaren Tarassovi und Bataviae positiv, gefolgt von Icterohaemorrhagiae, Javanica, Ballum, Pyrogenes, Cynopteri, Autumnalis und Grippytyphosa.

Das Serovar, das in der vorliegenden Arbeit mit 40,2% der Serumproben und somit am häufigsten reagierte, war Tarassovi (Genospezies *L. borgpetersenii*). Auch bei SILVERIE et al. (1968), die Rinder aus dem Süden Madagaskars auf Antikörper gegen Leptospiren untersuchten, war Serovar Tarassovi mit einer Seroprävalenz von 46,2% das am meisten reagierende Serovar. Studien aus anderen Ländern zeigen ähnliche Zahlen wie beispielsweise Mexiko mit 53,3% (MAT cut-off Titer 1:100; SEGURA-CORREA et al., 2003). In Neuseeland und Australien ist Serovar Tarassovi bekannt für seine Infektionen bei Fleischrindern und tritt mit Herden-Seroprävalenzen von 74,0% beziehungsweise 13,9% auf (HEUER, 2006; MANNEWALD, 2016). Bei einer aktuellen Studie aus Thailand lag die Herden-Seroprävalenz für das Serovar Tarassovi sogar bei 92,9% (YATBANTOONG & CHAIYARAT, 2019). Allerdings wurde in den zuvor genannten Studien ein cut-off Titer von 1:48 beziehungsweise 1:50 verwendet, was niedriger ist als jener in der vorliegenden Arbeit. Die wichtigsten Reservoirwirte für Serovar Tarassovi sind Schweine und Wildschweine (BOLIN, 2000). Auf Madagaskar wird der Großteil der Schweine im Zentrum und dem nördlichen Teil der Insel gehalten (FAO, 2005), also genau jenen Gebieten, in denen die Proben für die vorliegende Arbeit entnommen wurden. Über die Verteilung der Wildschweinpopulationen auf

Madagaskar gibt es aktuell keine Daten. Da Rinder beim Weiden durchaus Kontakt mit Schweinen und deren wildlebenden Artgenossen haben, ist eine Übertragung der Leptospiren vom Schwein auf das Rind möglich und scheint in Anbetracht der hohen Seroprävalenz für Serovar Tarassovi eine wichtige Rolle zu spielen.

Mit einer Seroprävalenz von 13,9% folgte Serovar Hardjo (Genospezies *L. interrogans*), für das neben dem Schaf auch das Rind einer der Reservoirwirte ist (BOLIN, 2000; ELLIS, 2015). Über die beiden Genospezies *L. interrogans* und *L. borgpetersenii* gibt es aktuell noch keine Daten aus Madagaskar. Da diese zwei Genospezies im MAT oft kreuzreagieren, könnten die detektierten Antikörper möglicherweise auch gegen *L. borgpetersenii* Serovar Hardjo und nicht *L. interrogans* Serovar Hardjo gebildet worden sein. Die Übertragung von Serovar Hardjo ist neben dem klassischen Weg mittels Urin auch über den direkten Kontakt mit Eihäuten oder Nachgeburt möglich. Der Fetus selbst kann außerdem über die Plazenta mit Leptospiren infiziert werden (ELLIS, 2015). Bei Reservoirwirten verläuft die akute Infektion mit *Leptospira* spp. meist subklinisch oder die klinischen Veränderungen sind nur mild ausgeprägt. Die chronische Leptospirose hingegen führt beim weiblichen Rind häufig zu Störungen in der Reproduktion, wie beispielsweise Aborten, Totgeburten oder Unfruchtbarkeit (ELLIS, 2015). In der vorliegenden Studie konnte zwar gezeigt werden, dass madagassische Rinder spezifische Antikörper gegen das Serovar Hardjo aufweisen, doch die tatsächlichen Auswirkungen dieser Infektionen sowie deren potentieller wirtschaftlicher Einfluss sind nach wie vor unbekannt. Der Großteil der Übertragung von Serovar Hardjo findet sicherlich innerhalb der Rinderherden statt, doch auch eine Übertragung von domestizierten oder wildlebenden Schafen auf das Rind sind nicht vollends auszuschließen.

Serovar Grippotyphosa (Genospezies *L. kirschneri*) folgte mit einer Prävalenz von 9,8%. Leptospiren dieses Serovars werden klassischerweise von Nagern, vor allem Mäusen, ausgeschieden (GREENE et al., 2012). Madagaskar bietet mit seiner Vielfalt an Ökosystemen den unterschiedlichsten Säugetieren Lebensraum, die wiederum als potentielle Wirte für Leptospiren in Frage kommen (DESVARS et al., 2013a). DIETRICH et al. (2014) konnten zeigen, dass die auf Madagaskar heimische Säugetierfamilie der Tenreks mit Leptospiren der Genospezies *L. kirschneri* infiziert ist. Auch bei Fledermäusen auf Madagaskar konnten bereits Infektionen mit *L. kirschneri* nachgewiesen werden (GOMARD et al., 2016).

Neben der genannten Genospezies wurden zusätzlich Infektionen mit *L. borgpetersenii* und *L. interrogans* bei Nagern, Tenreks und Fledermäusen gefunden (LAGADEC et al., 2012; GOMARD et al., 2016; DIETRICH et al., 2018; MOSELEY et al., 2018). Alle aufgeführten Genospezies wurden auch in den Serumproben der Rinder aus der vorliegenden Studie gefunden, weshalb anzunehmen ist, dass die genannten Tiere im Leptospiren-Infektionszyklus von madagassischen Rindern ebenfalls von Bedeutung sind.

Für das Serovar Pomona (Genospezies *L. interrogans*), das eine Seroprävalenz von 7,7% aufwies, sind Rinder, Schafe und Schweine als Reservoirwirte bekannt (BOLIN, 2000). Wie bereits oben erwähnt, wird der Großteil der Infektionen mit Leptospiren innerhalb der Rinderherden stattfinden und ein kleinerer Teil kann durchaus durch eine Übertragung von Schafen oder Schweinen möglich sein.

Leptospiren des Serovars Autumnalis (Genospezies *L. interrogans*), die in der vorliegenden Arbeit mit einer Seroprävalenz von 5,2% verzeichnet wurden, vermehren sich vor allem in Mäusen und werden von diesen ausgeschieden. Hier spielt erneut der klassische Übertragungsweg von kleinen Säugetieren auf das Rind eine Rolle.

Von den restlichen sieben untersuchten Serovaren reagierten weniger als 5% der Serumproben im MAT positiv. Daraus lässt sich folgern, dass Leptospiren auf Madagaskar vor allem über die zuvor genannten Säugetiere auf das Rind übertragen werden können.

3 Kreuzreaktionen und Interpretation der Titer

Insgesamt 36,5% der untersuchten Rinderseren reagierten im MAT mit zwei (27,8%), drei (7,0%) oder vier (1,7%) Serovaren. Kreuzreaktionen treten im MAT häufig zwischen Serovaren der gleichen Serogruppe auf, wobei die Titer dann häufig bei allen Serovaren gleich hoch sind. Doch auch Serovare unterschiedlicher Serogruppen können kreuzreagieren, vor allem bei Proben, die in der akuten Krankheitsphase entnommen wurden. Während der akuten Phase der Leptospirose werden vor allem IgM-Antikörper gebildet, denen anschließend die spezifischeren IgG-Antikörper folgen. Da im MAT sowohl IgM- als auch IgG-Antikörper nachgewiesen werden, kann dies zu einem gewissen Grad zu Kreuzagglutinationen

führen. Eine weitere Ursache für das Auftreten von Kreuzreaktionen sind die zahlreichen Antigene, die auf mehreren Leptospiren zu finden und nicht Serovar-spezifisch sind (LEVETT, 2001). Nachdem eine Leptospiren-Infektion einmal überstanden ist, sinken die Titer mit sehr unterschiedlicher Geschwindigkeit wieder ab. Vor allem nach einer akuten Infektion können die Titer noch lange sehr hoch bleiben und brauchen oft Monate oder in manchen Fällen sogar Jahre, bis sie wieder auf ein niedriges Niveau absinken. Wenn bei einer untersuchten Probe Kreuzreaktionen auftreten, dann muss deshalb auch nicht immer das Serovar mit dem höchsten Titer das infizierende Serovar sein. Allerdings konnte gezeigt werden, dass das betroffene Tier mindestens einmal mit einem Stamm infiziert war, der zu dieser Serogruppe gehört (BLANCO et al., 2016). Eine eindeutige Identifizierung des infizierenden Serovars ist über die Isolierung von Leptospiren aus infiziertem Gewebe oder infizierten Körperflüssigkeiten (Blut oder Urin) möglich, wobei dies sehr aufwendig ist, oft Monate dauert und nicht immer erfolgreich ist. Deutlich einfacher ist der Nachweis mittels PCR, die direkt aus infiziertem Gewebe oder infizierten Körperflüssigkeiten durchgeführt werden kann. Diese Methoden kamen in der vorliegenden Studie aber nicht zum Einsatz.

Die MAT-Titer in der vorliegenden Arbeit lagen zwischen 1:100 und 1:1600. Laut OIE (2014) werden alle Titer ab 1:100 als positiv beurteilt. Aus der Praxis weiß man allerdings, dass klinisch relevante Titer im Fall einer akuten Leptospirose deutlich höher sind. Alle Rinder in der vorliegenden Arbeit wurden am Schlachthof während der routinemäßigen tierärztlichen Untersuchung als „gesund“ beurteilt. Mit zwei Ausnahmen, wobei bei einem dieser Tiere im MAT ein Antikörpertiter gegen Serovar Tarassovi von 1:200 festgestellt werden konnte. Da dieser Titer allerdings eher niedrig ist, kann von einer nicht-akuten Leptospiren-Infektion ausgegangen werden.

Der Großteil der untersuchten Proben wies einen niedrigen Titer ($\leq 1:400$) auf. Solche niedrigen Titer sind häufig das Ergebnis einer vorangegangenen und überstandenen Leptospiren-Infektion, aus der noch verbleibende Antikörper im Serum nachgewiesen werden können. Eine weitere Möglichkeit ist eine akute Leptospirose in einem sehr frühen Krankheitsstadium, in dem noch keine klinischen Veränderungen sichtbar werden und die Rinder deshalb als „gesunde“ Tiere zur Schlachtung gehen. Die höchsten Titer lagen bei 1:800 und 1:1600 und waren gegen die Serovare Grippotyphosa, Hardjo, Pomona, Pyrogenes und Tarassovi gerichtet.

Da auch diese betroffenen Tiere am Schlachthof als „gesund“ beurteilt wurden, ist erneut eine akute Leptospirose ohne auffallende klinische Zeichen denkbar. Auch ältere, bereits überstandene Infektionen mit Antikörpertitern, die nur sehr langsam abnehmen, sind denkbar. Bei einer Reinfektion sind oftmals noch Antikörper aus einer vorhergehenden Infektion vorhanden und durch die Bildung von neuen Antikörpern kann es zu einem Anstieg des Antikörperspiegels und somit des Titers kommen. Außerdem treten in den ersten Wochen nach Verabreichung eines Impfstoffes klassischerweise sehr hohe Titer auf. Da dies bei Rindern auf Madagaskar allerdings nicht praktiziert wird, scheidet die Impfung als Ursache für die detektierten hohen Antikörpertiter aus.

4 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Rinder aus Zentral- und Nordmadagaskar deutlich Leptospiren verschiedener Serovare ausgesetzt sind. Weiterhin unbekannt ist allerdings die Zahl der Rinder, die tatsächlich nach einer Infektion mit Leptospiren erkranken und klinische Veränderungen zeigen. Auch die Situation der humanen Leptospirose auf Madagaskar ist noch nicht ausreichend erforscht. In einer kürzlich durchgeführten Studie bei Fieberpatienten ($n = 682$) wurde lediglich bei einem der Patienten Leptospiren-DNA mittels PCR nachgewiesen (GUILLEBAUD et al., 2018). Eine weitere Studie aus dem gleichen Jahr untersuchte 1.009 Blutproben von Patienten mit Fieber unbekannter Genese und konnte bei keinem der Patienten DNA von Leptospiren im Blut nachweisen (HAGEN et al., 2018). Dem gegenüber steht das Ergebnis der Untersuchungen von RATSITORAHINA et al. (2015), die bei 678 untersuchten humanen Blutproben aus Moramanga eine Seroprävalenz von 2,9% fanden. Gerade in Gegenden, in denen Reis angebaut wird und in denen Rinder und Nager vorkommen, können Fälle humaner Leptospirose vermutet werden.

Künftige Studien sollten sich mit dem Nachweis leptospiraler DNA mittels PCR aus Nieren oder Urin von madagassischen Rindern befassen, um den Status der Tiere als Leptospiren-Ausscheider beurteilen zu können. Des Weiteren sollten die wirtschaftlichen Folgen aufgrund von chronischen Infektionen mit *Leptospira* spp. evaluiert werden. Dafür bietet sich beispielsweise die Untersuchung weiblicher Rinder nach Abort oder bei Fruchtbarkeitsstörungen generell an. Da nun bereits in

mehreren Studien auf Madagaskar eine hohe Seroprävalenz von Serovar Tarassovi festgestellt wurde, empfiehlt sich ebenfalls eine Untersuchung von Haus- und Wildschweinen, um deren potentiell Infektionsrisiko für den Menschen zu evaluieren. Zuletzt sind weitere Studien zur Leptospirose beim Menschen notwendig, um zum aktuellen Infektionsstatus dieser wichtigen Zoonose ausreichend Informationen zu erhalten. Dies ermöglicht in Zukunft eine adäquate Bekämpfung der Leptospirose unter Einbezug zielgerichteter Hygiene- und Präventionsmaßnahmen auf Madagaskar.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Leptospirose handelt es sich um eine bakterielle Zoonose, die überwiegend in Ländern mit tropischem Klima zu einer Vielzahl von Krankheits- und Todesfällen bei Mensch und Tier führt. Die Seroprävalenz der *Leptospira*-spp.-Infektion bei Rindern aus Zentral- und Nordmadagaskar ist bisher nicht bekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Seroprävalenz infolge einer Infektion mit pathogenen Leptospiren bei Zebu-Rindern aus diesen Gebieten zu bestimmen. Goldstandard in der serologischen Leptospiren-Diagnostik ist der Mikroagglutinationstest (MAT), weshalb dieser auch verwendet wurde, um die 194 Serumproben auf Antikörper gegen Leptospiren zu untersuchen. Dabei dienten insgesamt 12 verschiedene Leptospiren-Serovare als Antigene. Alle Proben mit einem Titer von $\geq 1:100$ wurden als positiv eingestuft. Die Gesamtseroprävalenz betrug 59,3% (95% KI; 52,0-66,2%), wobei die Titer zwischen 1:100 und 1:1600 lagen. Von jenen Rindern, deren Seren im MAT positiv reagierten, fanden die meisten Antikörperreaktionen mit einer Seroprävalenz von 40,2% (33,3-47,5%) gegen das Serovar Tarassovi (Serogruppe Tarassovi) statt, gefolgt von Hardjo (Sejroe) mit 13,9% (9,5-19,8%), Grippotyphosa (Grippotyphosa) mit 9,8% (6,2-15,1%), Pomona (Pomona) mit 7,7% (4,5-12,7%) und Autumnalis (Autumnalis) mit 5,2% (2,6-9,5%). Gegen die verbleibenden sieben Serovare reagierten weniger als 5% aller untersuchten Proben positiv. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen somit eine sehr hohe Exposition von madagassischen Rindern gegenüber *Leptospira* spp. auf, was vor allem ein Infektionsrisiko für jene Menschen auf Madagaskar bedeutet, die mit Rindern arbeiten und zusammenleben. Basierend auf diesen Erkenntnissen sollten weitere Studien durchgeführt werden, um den Infektions- und Ausscheidungsstatus von Rindern und Nagern auf Madagaskar zu bestimmen und potentielle Risiken für die menschliche Bevölkerung aufzudecken. Außerdem müssen die Menschen vor Ort adäquat über diese zoonotische Erkrankung informiert werden und aufgeklärt werden, wie sie Infektionen verhindern können, beispielsweise durch die Vermeidung von Kontakt mit Nagern oder dem Urin von Rindern sowie der Verwendung von Schutzhandschuhen bei der Arbeit mit Rindern.

VI. SUMMARY

Leptospirosis is a bacterial zoonosis of global importance that causes disease and death in humans and animals, especially in countries with tropical climate. The current seroprevalence of *Leptospira* spp. infection in cattle from central and northern Madagascar is unknown. Therefore, the aim of the present study was to determine the seroprevalence resulting from an infection with pathogenic *Leptospira* spp. in zebu cattle from these two areas. The microscopic agglutination test (MAT), which was used to detect antibodies against leptospires in all 194 serum samples, is the gold standard in serological diagnosis. Twelve *Leptospira* spp. serovars were used as antigens in the MAT. Samples with a titer of $\geq 1:100$ were considered positive. The overall seroprevalence was 59.3% (95% CI; 52.0–66.2%) with titers ranging from 1:100 to 1:1600. Among all seropositive animals, the most frequent antibody reactions were against serovar Tarassovi (serogroup Tarassovi) with 40.2% (33.3–47.5%), followed by Hardjo (Sejroe) with 13.9% (9.5–19.8%), Grippotyphosa (Grippotyphosa) with 9.8% (6.2–15.1%), Pomona (Pomona) with 7.7% (4.5–12.7%) and Autumnalis (Autumnalis) with 5.2% (2.6–9.5%). Less than 5% of all samples reacted positively against the remaining seven serovars. These results indicate a very high exposure of Malagasy cattle to pathogenic *Leptospira* spp., which documents the potential infection risk for people who work and live together with cattle. Based on these findings, further studies focusing on the detection of leptospires in Malagasy cattle and rodents are necessary, to reveal the shedding status of affected animals and herds, and to determine the relevance for humans. Moreover, humans on Madagascar should be informed adequately about this important zoonotic disease and how they can protect themselves from being infected, for example by avoiding contact with rodents or the urine of cattle, or the use of protective gloves during their work with cattle.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Alt DP, Zuerner RL, Bolin CA. Evaluation of antibiotics for treatment of cattle infected with *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo. J Am Vet Med Assoc 2001; 219: 636-9.

Blanco RM, dos Santos LF, Galloway RL, Romero EC. Is the microagglutination test (MAT) good for predicting the infecting serogroup for leptospirosis in Brazil? Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2016; 44: 34-6.

BMJV. Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten. 2015:
http://www.gesetze-im-internet.de/TKrmeldpflv_1983/index.html. 19.06.2019.

BMJV. Verordnung über tierärztliche Hausapotheken (TÄHAV). 2018:
https://www.gesetze-im-internet.de/t_hav/. 30.04.2019.

BMJV. Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz - IfSG). 2019: <https://www.gesetze-im-internet.de/ifsg/>. 19.06.2019.

Bolin C. Leptospirosis. In: Emerging Diseases of Animals. Brown C, Bolin C, eds. Washington DC: ASM Press 2000: 185-200.

Bolin CA, Cassells JA, Zuerner RL, Trueba G. Effect of vaccination with a monovalent *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-bovis vaccine on type hardjo-bovis infection of cattle. Am J Vet Res 1991; 52: 1639-43.

Bourhy P, Bremont S, Zinini F, Giry C, Picardeau M. Comparison of real-time PCR assays for detection of pathogenic *Leptospira* spp. in blood and identification of variations in target sequences. J Clin Microbiol 2011; 49: 2154-60.

Brockmann S, Piechotowski I, Bock-Hensley O, Winter C, Oehme R, Zimmermann S, Hartelt K, Luge E, Nockler K, Schneider T, Stark K, Jansen A. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants in Germany, 2006. *BMC Infect Dis* 2010; 10: 91.

Cameron CE. Leptospiral Structure, Physiology, and Metabolism. In: *Leptospira and Leptospirosis. Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol. 387. Adler B, ed. Berlin Heidelberg: Springer 2015: 21-41.

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

Chassin C, Picardeau M, Goujon JM, Bourhy P, Quellard N, Darche S, Badell E, d'Andon MF, Winter N, Lacroix-Lamandé S, Buzoni-Gatel D, Vandewalle A, Werts C. TLR4- and TLR2-mediated B cell responses control the clearance of the bacterial pathogen, *Leptospira interrogans*. *J Immunol* 2009; 183: 2669-77.

CliniPharm. 2019: <https://www.vetpharm.uzh.ch/wir/>. 30.04.2019.

Cortese VS, Behan S, Galvin JE, Penka DR, Ramsey D, Bryson WL, Lucas MJ. Evaluation of two antimicrobial therapies in the treatment of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo infection in experimentally infected cattle. *Vet Ther* 2007; 8: 201-8.

Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, Stein C, Abela-Ridder B, Ko AI. Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* 2015; 9: e0003898.

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.

Curtis KM, Foster PC, Smith PS, Monn MP, Stillman BA, Chandrashekar R, Lappin MR, Goldstein RE. Performance of a Recombinant LipL32 Based Rapid In-clinic ELISA (SNAP® Lepto) for the Detection of Antibodies Against *Leptospira* in Dogs. Intern J Appl Res Vet Med 2015; 13: 182-9.

Desai S, van Treeck U, Lierz M, Espelage W, Zota L, Sarbu A, Czerwinski M, Sadkowska-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.

Desvars A, Michault A, Bourhy P. Leptospirosis in the western Indian Ocean islands: what is known so far? Vet Res 2013a; 44: 80.

Desvars A, Naze F, Benneveau A, Cardinale E, Michault A. Endemicity of leptospirosis in domestic and wild animal species from Reunion Island (Indian Ocean). Epidemiol Infect 2013b; 141: 1154-65.

Dietrich M, Wilkinson DA, Soarimalala V, Goodman SM, Dellagi K, Tortosa P. Diversification of an emerging pathogen in a biodiversity hotspot: *Leptospira* in endemic small mammals of Madagascar. Mol Ecol 2014; 23: 2783-96.

Dietrich M, Gomard Y, Lagadec E, Ramasindrazana B, Le Minter G, Guernier V, Benlali A, Rocamora G, Markotter W, Goodman SM, Dellagi K, Tortosa P. Biogeography of *Leptospira* in wild animal communities inhabiting the insular ecosystem of the western Indian Ocean islands and neighboring Africa. Emerg Microbes Infect 2018; 7: 57.

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, Hovind-Hougen K, Moller S, Birch-Andresen A. Morphological changes upon subculturing of freshly isolated strains of *Leptospira interrogans* serovar hardjo. Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg A 1983; 255: 323-35.

Ellis WA, O'Brien JJ, Bryson DG, Mackie DP. Bovine leptospirosis: some clinical features of serovar hardjo infection. Vet Rec 1985a; 117: 101-4.

Ellis WA, O'Brien JJ, Cassells JA, Neill SD, Hanna J. Excretion of *Leptospira interrogans* serovar hardjo following calving or abortion. Res Vet Sci 1985b; 39: 296-8.

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

Ellis WA. Animal leptospirosis. In: *Leptospira* and Leptospirosis. Current Topics in Microbiology and Immunology, 1st edn. Adler B, ed. Berlin, Heidelberg, Germany: Springer 2015: 99-137.

FAO (2005) Livestock Sector Brief Madagascar. FAO, Rome, Italy.

Fávero JF, de Araújo HL, Lilenbaum W, Machado G, Tonin AA, Baldissera MD, Stefani LM, Da Silva AS. Bovine leptospirosis: Prevalence, associated risk factors for infection and their cause-effect relation. Microb Pathog 2017; 107: 149-54.

Gares HV (2003) [Study of infertility risk factors in Reunion Island dairy herds] Ecole Nationale Veterinaire Toulouse, Toulouse.

Gomard Y, Dietrich M, Wieseke N, Ramasindrazana B, Lagadec E, Goodman SM, Dellagi K, Tortosa P. Malagasy bats shelter a considerable genetic diversity of pathogenic *Leptospira* suggesting notable host-specificity patterns. FEMS Microbiol Ecol 2016; 92: fiw037.

Goris MG, Hartskeerl RA. Leptospirosis serodiagnosis by the microscopic agglutination test. *Curr Protoc Microbiol* 2014; 32: Unit 12E.5.

Greene C, Sykes J, Moore G, Goldstein R, Schultz R. Leptospirosis. In: *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 4 edn. Greene C, ed. St. Louis: Elsevier 2012: 431-47.

Guillebaud J, Bernardson B, Randriambolamanantsoa TH, Randrianasolo L, Randriamampionona JL, Marino CA, Rasolofo V, Randrianariveლოსია M, Vigan-Womas I, Stivaktas V, Venter M, Piola P, Heraud JM. Study on causes of fever in primary healthcare center uncovers pathogens of public health concern in Madagascar. *PLoS Negl Trop Dis* 2018; 12: e0006642.

Haake DA, Zückert WR. The Leptospiral Outer Membrane. In: *Leptospira and Leptospirosis. Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol. 387. Adler B, ed. Berlin Heidelberg: Springer 2015: 187-221.

Haake DA, Levett PN. Leptospirosis in humans. In: *Leptospira and Leptospirosis. Current Topics in Microbiology and Immunology*, 1st edn. Adler B, ed. Berlin, Heidelberg, Germany: Springer 2015: 65-97.

Hagen RM, Frickmann H, Ehlers J, Krüger A, Margos G, Hizo-Teufel C, Fingerle V, Rakotozandrindrainy R, Kalckreuth VV, Im J, Pak GD, Jeon HJ, Rakotondrainiarivelo JP, Heriniaina JN, Razafindrabe T, Konings F, May J, Hogan B, Ganzhorn J, Panzner U, Schwarz NG, Dekker D, Marks F, Poppert S. Presence of *Borrelia* spp. DNA in ticks, but absence of *Borrelia* spp. and of *Leptospira* spp. DNA in blood of fever patients in Madagascar. *Acta Trop* 2018; 177: 127-34.

Hartskeerl RA, Collares-Pereira M, Ellis WA. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 494-501.

Heuer C (2006) Human health and leptospirosis. The Society of Sheep & Beef Cattle Veterinarians of the NZVA, Annual Seminar, 2006. New Zealand.

Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 2010; 327: 291-5.

Jansen A, Schöneberg 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, Nöckler K. Leptospirosis in urban wild boars, Berlin, Germany. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 739-42.

Johnson RC, Rogers P. Differentiation of Pathogenic and Saprophytic Leptospire with 8-Azaguanine. *J Bacteriol* 1964; 88: 1618-23.

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

Koizumi N, Muto M, Yamada A, Watanabe H. Prevalence of *Leptospira* spp. in the kidneys of wild boars and deer in Japan. *J Vet Med Sci* 2009a; 71: 797-9.

Koizumi N, Uchida M, Makino T, Taguri T, Kuroki T, Muto M, Kato Y, Watanabe H. Isolation and characterization of *Leptospira* spp. from raccoons in Japan. *J Vet Med Sci* 2009b; 71: 425-9.

Kolochine-Erber B, Brygoo ER. [Research on leptospirosis in Madagascar]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 1956; 49: 686-98.

Kolochine-Erber B, Buck G, Quesnel J. [Bovine leptospirosis should be suspected in Madagascar]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 1956; 49: 681-6.

Kropinski AM, Parr TR, Jr., Angus BL, Hancock RE, Ghiorse WC, Greenberg EP. Isolation of the outer membrane and characterization of the major outer membrane protein from *Spirochaeta aurantia*. *J Bacteriol* 1987; 169: 172-9.

Lagadec E, Gomard Y, Guernier V, Dietrich M, Pascalis H, Temmam S, Ramasindrazana B, Goodman SM, Tortosa P, Dellagi K. Pathogenic *Leptospira* spp. in bats, Madagascar and Union of the Comoros. *Emerg Infect Dis* 2012; 18: 1696-8.

Lawrence JJ. The growth of *Leptospirae* in semi-solid media. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1951; 29: 195-9.

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

Lhuillier M. [Leptospiroses in Madagascar. (Bacteriological and serological study)]. *Arch Inst Pasteur Madagascar* 1978; 46: 429-39.

Llorente P, Leoni L, Martinez Vivot M. [Leptospirosis in south-american camelids. A study on the serological prevalence in different regions of Argentina]. *Arch Med Vet* 2002; 34: 59-68.

Mannewald A (2016) Prevalence of atypical *Leptospira* serovars in New Zealand's pastoral livestock. In: Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Department of Clinical Science. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.

Martins G, Lilenbaum W. Control of bovine leptospirosis: Aspects for consideration in a tropical environment. *Res Vet Sci* 2017; 112: 156-60.

Matsunaga J, Barocchi MA, Croda J, Young TA, Sanchez Y, Siqueira I, Bolin CA, Reis MG, Riley LW, Haake DA, Ko AI. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Mol Microbiol* 2003; 49: 929-45.

Mérien 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.

Mohammed H, Nozha C, Hakim K, Abdelaziz F. *Leptospira*: Morphology, Classification and Pathogenesis. J Bacteriol Parasitol 2011; 02.

Moseley M, Rahelinirina S, Rajerison M, Garin B, Piertney S, Telfer S. Mixed *Leptospira* Infections in a Diverse Reservoir Host Community, Madagascar, 2013-2015. Emerg Infect Dis 2018; 24: 1138-40.

Moutou F (1980) Enquête sur la faune murine dans le département de la Réunion. DDASS, Saint-Denis (La Réunion).

Mwachui MA, Crump L, Hartskeerl R, Zinsstag J, Hattendorf J. Environmental and Behavioural Determinants of Leptospirosis Transmission: A Systematic Review. PLoS Negl Trop Dis 2015; 9: e0003843.

NCBI. Taxonomy Browser. 2019:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=171>.

16.04.2019.

Noguchi H. Morphological characteristics and nomenclature of *Leptospira (Spirochaeta) icterohaemorrhagiae* (Inada and Ido). J Exp Med 1918; 27: 575-92.

OIE. Chapter 2.1.12. Leptospirosis. In: OIE Terrestrial Manual Paris, France: OIE 2014: 1-15.

Ojeda J, Salgado M, Encina C, Santamaria C, Monti G. Evidence of interspecies transmission of pathogenic *Leptospira* between livestock and a domestic cat dwelling in a dairy cattle farm. J Vet Med Sci 2018; 80: 1305-8.

Pagès F, Kuli B, Moiton MP, Goarant C, Jaffar-Bandjee MC. Leptospirosis after a stay in Madagascar. J Travel Med 2015; 22: 136-9.

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

Picardeau M. Leptospirosis: Updating the Global Picture of an Emerging Neglected Disease. *PLoS Negl Trop Dis* 2015; 9: e0004039.

Radl C, Muller M, Revilla-Fernandez S, Karner-Zuser S, de Martin A, Schauer U, Karner F, Stanek G, Balcke P, Hallas A, Frank H, Furnschliel A, Erhart F, Allerberger F. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants in Langau, Austria, 2010. *Wien Klin Wochenschr* 2011; 123: 751-5.

Rahelinirina S, Léon A, Harstskeerl RA, Sertour N, Ahmed A, Raharimanana C, Ferquel E, Garnier M, Chartier L, Duplantier JM, Rahalison L, Cornet M. First isolation and direct evidence for the existence of large small-mammal reservoirs of *Leptospira* sp. in Madagascar. *PLOS ONE* 2010; 5: e14111.

Rahelinirina S, Bourhy P, Andriamiaramanana F, Garin B, Rajerison M. High Prevalence of *Leptospira* spp. in Rodents in an Urban Setting in Madagascar. *Am J Trop Med Hyg* 2019.

Ralaiarijaona RL, Bellenger E, Chanteau S, Roger F, Pérolat P, Rasolofo Razanamparany V. [Detection of leptospirosis reservoirs in Madagascar using the polymerase chain reaction technique]. *Arch Inst Pasteur Madagascar* 2001; 67: 34-6.

Ratsitorahina M, Rahelinirina S, Michault A, Rajerison M, Rajatonirina S, Richard V. Has Madagascar lost its exceptional leptospirosis free-like status? *PLOS ONE* 2015; 10: e0122683.

RKI. Leptospirose. 2015:

https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Leptospirose.html. 19.06.2019.

Rosadio AR, Véliz AA, Castillo DH, Yaya LK, Rodríguez HA, Rivera GH, Wheeler JC. [Seroprevalence to Pathogenic *Leptospira* in Alpacas and Vicuñas From Huancavelica and Ayacucho, Peru]. *Rev Inv Vet Perú* 2012; 23: 350-6.

Schmid G, Giovanella R. Ueber die Schweinehüter-Krankheit. Schweiz Arch Tierheilkd 1947; 89: 1-13.

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.

Segura-Correa VM, Solis-Calderon JJ, Segura-Correa JC. Seroprevalence of and risk factors for leptospiral antibodies among cattle in the state of Yucatan, Mexico. Trop Anim Health Prod 2003; 35: 293-9.

Silverie R, Monnier M, Lataste-Dorolle C. [Recent survey of leptospirosis on Madagascar. Contribution to the study of human, bovine and porcine leptospirosis in the southern region]. Bull Soc Pathol Exot Filiales 1968; 61: 346-59.

Smith CR, Corney BG, McGowan MR, McClintock CS, Ward W, Ketterer PJ. Amoxicillin as an alternative to dihydrostreptomycin sulphate for treating cattle infected with *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo. Aust Vet J 1997; 75: 818-21.

Smyth JA, Fitzpatrick DA, Ellis WA. Stillbirth/perinatal weak calf syndrome: a study of calves infected with *Leptospira*. Vet Rec 1999; 145: 539-42.

Smythe LD, Field HE, Barnett LJ, Smith CS, Dohnt MF, Symonds ML, Moore MR, Rolfe PF. Leptospiral antibodies in flying foxes in Australia. J Wildl Dis 2002a; 38: 182-6.

Smythe LD, Smith IL, Smith GA, Dohnt MF, Symonds ML, Barnett LJ, McKay DB. A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. BMC Infect Dis 2002b; 2: 13.

Stimson AM. Note on an organism found in yellow-fever tissue. Public Health Rep 1907; 22: 541.

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.

Tahara H, Takabe K, Sasaki Y, Kasuga K, Kawamoto A, Koizumi N, Nakamura S. The mechanism of two-phase motility in the spirochete *Leptospira*: Swimming and crawling. *Sci Adv* 2018; 4: eaar7975.

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

Wang H, Wu Y, Ojcius DM, Yang XF, Zhang C, Ding S, Lin X, Yan J. Leptospiral hemolysins induce proinflammatory cytokines through Toll-like receptor 2-and 4-mediated JNK and NF-kappaB signaling pathways. *PLOS ONE* 2012; 7: e42266.

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

Weis S, Rettinger A, Bergmann M, Llewellyn JR, Pantchev N, Straubinger RK, Hartmann K. Detection of *Leptospira* DNA in urine and presence of specific antibodies in outdoor cats in Germany. *J Feline Med Surg* 2017; 19: 470-6.

Werts C, Tapping RI, Mathison JC, Chuang TH, Kravchenko V, Saint Girons I, Haake DA, Godowski PJ, Hayashi F, Ozinsky A, Underhill DM, Kirschning CJ, Wagner H, Aderem A, Tobias PS, Ulevitch RJ. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol* 2001; 2: 346-52.

WHO (2003) Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control. World Health Organization, Geneva.

Woo TH, Smythe LD, Symonds ML, Norris MA, Dohnt MF, Patel BK. Rapid distinction between *Leptospira interrogans* and *Leptospira biflexa* by PCR amplification of 23S ribosomal DNA. FEMS Microbiol Lett 1997; 150: 9-18.

Yatbantoong N, Chaiyarat R. Factors Associated with Leptospirosis in Domestic Cattle in Salakphra Wildlife Sanctuary, Thailand. Int J Environ Res Public Health 2019; 16.

Zuerner RL. Laboratory maintenance of pathogenic *Leptospira*. Curr Protoc Microbiol 2005; Chapter 12: Unit 12E.1.

Zuerner RL. Host Response to *Leptospira* Infection. In: *Leptospira* and Leptospirosis. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol. 387. Adler B, ed. Berlin Heidelberg: Springer 2015: 223-50.

VIII. ANHANG

Tabelle A 1: Seroprävalenzen (%) der einzelnen Serovare in den jeweiligen geografischen Regionen mit Angabe des *p*-Werts

Serovar	Bongolava (%)	Haute Matsiatra (%)	Menabe (%)	Sofia (%)	Vakinankaratra (%)	<i>p</i> -Wert
<i>L.</i> ¹ Tarassovi	32,9	48,4	36,0	38,1	50,0	0,29
<i>L.</i> Hardjo	13,2	14,5	12,0	19,1	0,0	0,93
<i>L.</i> Grippo ²	13,2	12,9	0,0	4,8	0,0	0,45
<i>L.</i> Pomona	10,5	3,2	0,0	19,1	10,0	0,10
<i>L.</i> Autumnalis	9,2	1,6	4,0	4,8	0,0	0,17
<i>L.</i> Pyrogenes	5,3	4,8	8,0	0,0	0,0	0,75
<i>L.</i> Bataviae	1,3	4,8	4,0	4,8	0,0	0,73
<i>L.</i> Australis	1,3	1,6	0,0	0,0	0,0	0,97
<i>L.</i> Javanica	2,6	0,0	0,0	0,0	0,0	-
<i>L.</i> Ballum	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0	-
<i>L.</i> Canicola	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-
<i>L.</i> Ictero ³	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-

¹ *Leptospira*, ² *Grippotyphosa*, ³ *Icterohaemorrhagiae*

Tabelle A 2: Anzahl der positiven Proben (n) und relative Prävalenz (%) der einzelnen Serovare für jede MAT-Titerstufe

MAT Titer		1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400
Alle Serovare	n	81	62	20	5	1	-	-
	%	41,8	32,0	10,3	2,6	0,5	-	-
L.¹ Tarassovi	n	31	33	13	1	-	-	-
	%	16,0	17,0	6,7	0,5	-	-	-
L. Hardjo	n	11	9	5	2	-	-	-
	%	5,7	4,6	2,6	1,0	-	-	-
L. Grippo²	n	9	7	2	-	1	-	-
	%	4,6	3,6	1,0	-	0,5	-	-
L. Pomona	n	11	3	-	1	-	-	-
	%	5,7	1,6	-	0,5	-	-	-
L. Autumnalis	n	6	4	-	-	-	-	-
	%	3,1	2,1	-	-	-	-	-
L. Pyrogenes	n	5	3	-	1	-	-	-
	%	2,6	1,6	-	0,5	-	-	-
L. Bataviae	n	5	1	-	-	-	-	-
	%	2,6	0,5	-	-	-	-	-
L. Australis	n	2	-	-	-	-	-	-
	%	1,0	-	-	-	-	-	-
L. Javanica	n	-	2	-	-	-	-	-
	%	-	1,0	-	-	-	-	-
L. Ballum	n	1	-	-	-	-	-	-
	%	0,5	-	-	-	-	-	-
L. Canicola	n	-	-	-	-	-	-	-
	%	-	-	-	-	-	-	-
L. Ictero³	n	-	-	-	-	-	-	-
	%	-	-	-	-	-	-	-

¹ *Leptospira*, ² *Grippotyphosa*, ³ *Icterohaemorrhagiae*

IX. DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Straubinger bedanken, der mir die Arbeit an seinem Lehrstuhl und somit auch dieses Dissertationsprojekt ermöglicht hat. Für die permanente Unterstützung und hervorragende fachliche Betreuung über den gesamten Arbeitszeitraum hinweg, sowie seine positive Art und Offenheit neuen Ideen gegenüber.

Ein großes Dankeschön an Sven Poppert vom Swiss TPH, der unerwarteter Weise frischen Wind in unsere Leptospiren-Forschung gebracht hat und dadurch wesentlich zum Start der vorliegenden Arbeit beigetragen hat. Auch bei Anou Dreyfus möchte ich mich herzlich bedanken – für die fachliche Expertise und kompetente Korrektur der Publikation.

Dem Team am Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie sowie der fachlich erweiterten Mittagsrunde danke ich für die schöne gemeinsame Zeit. Ganz besonders hervorheben möchte ich Frau Stephanie Hiereth, die mir mit ihrer freundlichen Art im Labor ständig unterstützend zur Seite stand.

Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich von ganzem Herzen für ihre permanente Unterstützung und ihre aufrichtige Begleitung auf meinem bisherigen Lebensweg.

Johannes, dir danke ich einfach für alles – „du bist das Beste was mir je passiert ist.“