

Nachweis von *Leptospira* spp. in Ferkeln  
SMEDI - (stillbirth, mummification, embryonic death, infertility)  
assoziierter Würfe

von Annika Magdalena Seifert



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

Nachweis von *Leptospira* spp. in Ferkeln  
SMEDI - (stillbirth, mummification, embryonic death, infertility)  
assoziierter Würfe

von Annika Magdalena Seifert  
aus München

München, 2023



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

Lehrstuhl für Krankheiten des Schweines

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Priv.-Doz. Dr. Matthias Eddicks



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

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

**Berichterstatter:** Priv.-Doz. Dr. Matthias Eddicks

**Korreferent:** Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.  
Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

Tag der Promotion: 11.02.2023



Meiner Familie



## Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>1.</b>	<b><i>Leptospira</i> spp. ....</b>	<b>3</b>
1.1.	Morphologie .....	3
1.2.	Taxonomie .....	3
<b>2.</b>	<b>Epidemiologie .....</b>	<b>6</b>
2.1.	Vorkommen .....	6
2.2.	Wirtsspektrum .....	8
2.3.	Leptospirenübertragung beim Schwein .....	8
2.4.	Pathogenese .....	10
<b>3.</b>	<b>Klinik der Leptospirose beim Schwein .....</b>	<b>11</b>
3.1.	Akute Leptospirose .....	11
3.2.	Chronische Leptospirose .....	11
3.3.	Leptospiren im Rahmen von SMEDI.....	12
<b>4.</b>	<b>Diagnostik .....</b>	<b>15</b>
4.1.	Indirekte Nachweismethoden .....	16
4.1.1.	Mikroagglutinationstest (MAT) .....	16
4.1.2.	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA) .....	19
4.2.	Direkte Nachweismethoden.....	20
4.2.1.	Molekularbiologische Diagnostik .....	20
4.2.1.1.	Geeignetes Untersuchungsmaterial für die PCR .....	22
4.2.1.2.	Limitationen der PCR.....	23
4.2.2.	Isolierung .....	23
4.2.3.	Immunochemische Färbetechniken und Histopathologie .....	24
<b>5.</b>	<b>Bekämpfung.....</b>	<b>24</b>
5.1.	Vakzination .....	24
5.2.	Unterbrechung der Infektionskette.....	26
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>27</b>
<b>1.</b>	<b>Ziel dieser Arbeit.....</b>	<b>27</b>
<b>2.</b>	<b>Untersuchungsmaterial.....</b>	<b>28</b>

Inhaltsverzeichnis	XII
2.1.	Bestandsebene .....29
2.2.	Serumproben der Sauen.....30
2.3.	Studienpopulation auf Ferkelebene.....30
2.4.	Auswahl der zu untersuchenden Ferkel .....32
<b>3.</b>	<b>Probenentnahme .....35</b>
3.1.	Probenentnahme für die molekularbiologische Untersuchung der Ferkel.....35
3.2.	Serologische Untersuchung der Ferkel .....36
3.2.1.	Auswahlkriterium für die serologische Untersuchung .....36
3.2.2.	Herzblut-Probenentnahme bei Ferkeln .....36
<b>4.</b>	<b>Labordiagnostik .....37</b>
4.1.	Molekularbiologische Diagnostik .....37
4.1.1.	Screening mittels LipL32-multiplex-PCR .....38
4.1.2.	Differenzierung mittels Multiplex-qPCR auf Basis des 16S RNA-Gens.....38
4.2.	Serologische Diagnostik .....39
<b>5.</b>	<b>Fragebogen.....40</b>
<b>6.</b>	<b>Statistische Auswertung.....41</b>
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE .....43</b>
<b>1.</b>	<b>Deskriptive Auswertung der Studienpopulation.....43</b>
1.1.	Auswertung der Studienpopulation auf Bestandsebene.....43
1.1.1.	Beschreibung der Bestände nach Größe und Lokalisation.....43
1.1.2.	Beschreibung der Impfschemata der Bestände.....43
1.1.3.	Beschreibung der Reproduktionsschemata der Bestände.....43
1.2.	Auswertung der Studienpopulation auf Wurf- / Sauenebene .....44
1.2.1.	Beschreibung der Paritäten der Sauen.....44
1.2.2.	Beschreibung der Anzahl der Ferkel pro Wurf.....44
1.3.	Auswertung der Studienpopulation auf Ferkelebene .....45
1.3.1.	Beschreibung der randomisiert ausgewählten Studienpopulation nach Phänotyp .....45
1.3.2.	Gemessene Scheitel-Steiß-Längen (mm) und Gewichte (g) .....45
<b>2.</b>	<b>Molekularbiologische Ergebnisse .....47</b>

2.1.	Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung auf pathogene Leptospiren mittels LipL32-Screening.....	47
2.1.1.	Auswertung des LipL32-Screenings der Poolproben nach phänotypischem Erscheinungsbild der Ferkel.....	47
2.1.2.	Ergebnisse des LipL32-Screenings auf pathogene <i>Leptospira</i> spp. im Gewebevergleich .....	49
2.2.	Untersuchung mittels genotypspezifischer qPCR auf die Subclade P1 und P2 auf Basis der 16S RNA .....	52
2.2.1.	Auswertung der genotypspezifischen qPCR der Poolproben nach phänotypischem Erscheinungsbild der Ferkel.....	52
2.2.2.	Ergebnisse der genotypspezifischen qPCR auf die Subclade P1 im Gewebevergleich .....	53
2.3.	Weitere statistische Auswertungen .....	56
<b>3.</b>	<b>Serologische Ergebnisse.....</b>	<b>57</b>
3.1.	Diagnostisches Screening auf <i>Leptospira</i> spp. bei Sauen .....	57
3.1.1.	Nachweishäufigkeiten von Leptospirenantikörpern in mittels MAT untersuchten Serumproben der Muttersauen .....	57
3.1.2.	Nachweishäufigkeiten einzelner Serovaren mittels MAT in Abhängigkeit von dem Impfstatus der Sau und dem Leptospiren-PCR-Ergebnis der Ferkel .....	58
3.2.	Serologische Untersuchung von Herzblut von Ferkeln mit einem errechneten Alter von mindestens 70 Tagen (SSL $\geq$ 160 mm) mittels MAT .....	62
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>63</b>
<b>1.</b>	<b>Auswahl der Studientiere und Studiendesign .....</b>	<b>63</b>
<b>2.</b>	<b>Molekularbiologische Ergebnisse .....</b>	<b>63</b>
2.1.	Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung mittels LipL32-Screening auf pathogene Leptospiren in Poolproben von Ferkeln aus SMEDI-assoziierten Wurfen .....	63
2.1.1.	Auswertung des LipL32-Screenings der Poolproben nach phänotypischem Erscheinungsbild der Ferkel.....	65
2.1.2.	Ergebnisse des LipL32-Screenings auf pathogene <i>Leptospira</i> spp. im Gewebevergleich .....	66

2.2.	Untersuchung mittels genotypspezifischer qPCR auf die Subclade P1 und P2 auf Basis der 16S RNA .....	68
2.2.1.	Auswertung der genotypspezifischen qPCR der Poolproben nach phänotypischem Erscheinungsbild der Ferkel .....	70
2.2.2.	Ergebnisse der genotypspezifischen qPCR auf die Subclade P1 im Gewebevergleich .....	71
2.3.	Assoziation des PCR-Ergebnisses der Ferkel mit den MAT-Ergebnissen der Sauen .....	72
<b>3.</b>	<b>Serologische Ergebnisse.....</b>	<b>74</b>
3.1.	Diagnostisches Screening auf <i>Leptospira</i> spp. bei Sauen .....	74
3.1.1.	Nachweishäufigkeiten von Leptospirenantikörpern in mittels MAT untersuchten Serumproben der Muttersauen .....	74
3.1.2.	Nachweishäufigkeiten von Antikörpern gegen die einzelnen Serovaren in Abhängigkeit von dem Impfstatus der Sau und dem Leptospiren-PCR-Ergebnis der Ferkel.....	78
3.2.	Serologische Untersuchung von Herzblut von Ferkeln mit einem errechneten Alter von mindestens 70 Tagen (SSL $\geq$ 160 mm) mittels MAT .....	80
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>83</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>85</b>
<b>VIII.</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>87</b>
<b>IX.</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>91</b>
<b>X.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>93</b>
<b>XI.</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>113</b>
<b>XII.</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>119</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>µm</b>	Mikrometer
<b>AAI</b>	<i>Average acid identity</i>
<b>ANI</b>	<i>Average nucleotide identity</i>
<b>AS</b>	Altsau
<b>AUS</b>	Australis
<b>AUT</b>	Autumnalis
<b>BMEL</b>	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
<b>CAN</b>	Canicola
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<b>EMJH</b>	Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris
<b>et al.</b>	et alia (und andere)
<b>etc.</b>	et cetera
<b>ICT</b>	Icterohaemorrhagiae
<b>JS</b>	Jungsau
<b><i>L.</i></b>	<i>Leptospira</i>
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>MAT</b>	Mikroagglutinationstest
<b>Max.</b>	Maximum
<b>Min.</b>	Minimum
<b>Mw.</b>	Mittelwert
<b>OIE</b>	<i>Office International des Epizooties</i> (Weltorganisation für Tiergesundheit)
<b>OMP</b>	<i>Outer membrane protein</i>
<b>OR</b>	<i>Odds Ratio</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase-Chain-Reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)

<b>PCV 2</b>	Porzines Circovirus Typ 2
<b>POCP</b>	<i>Percentage of conserved proteins</i>
<b>POM</b>	Pomona
<b>PPV</b>	Porzines Parvovirus
<b>qPCR</b>	<i>quantitative polymerase chain reaction</i> (quantitative Polymerasekettenreaktion)
<b>SD</b>	<i>Standard Deviation</i> (Standardabweichung)
<b>Sek.</b>	Sekunden
<b>SMEDI</b>	<i>Stillbirth mummification embryonic death infertility</i>
<b>Spp.</b>	Subspezies
<b>SSL</b>	Scheitel-Steiß-Länge
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i> (Weltgesundheitsorganisation)

## I. EINLEITUNG

Die Leptospirose ist eine der weltweit am weitest verbreiteten Zoonosen (ADLER & DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Für die meisten *Leptospira* Serovaren dienen Nagetiere als Reservoirwirte (LEVETT, 2001), prinzipiell gelten aber fast alle Säugetiere als empfänglich für Leptospiren (ELLIS, 2015; JOBBINS & ALEXANDER, 2015). Bei Schweinen und Schafen ist die Leptospirose entsprechend der Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten in Deutschland meldepflichtig (BMEL, 2020).

*Leptospira* spp. zählen zu den bakteriellen Erregern, die beim Schwein zu Fruchtbarkeitsstörungen führen können, die durch embryonale oder fetale Infektion mit anschließendem Fruchttod einhergehen und somit zum Vorkommen von SMEDI (stillbirth mummification embryonic death infertility) beitragen können (LEMAN et al., 1974; RAGUVARAN et al., 2017; POZZI et al., 2020; OIE, 2021). Die allermeisten Infektionen mit Leptospiren beim Schwein verlaufen jedoch subklinisch (ARENT & ELLIS, 2019).

Der Mikroagglutinationstest (MAT) gilt bei der Leptospirendiagnostik als Goldstandard (OIE, 2000). Da der MAT allerdings in der Literatur als schwierig und zeitaufwändig beschrieben wird (MUSSO & LA SCOLA, 2013), kommt der „*Polymerase Chain Reaction*“ (PCR) im Rahmen der molekularbiologischen Diagnostik eine wichtige Rolle zu (FERREIRA et al., 2014; STRUTZBERG-MINDER et al., 2018).

Die genauen Leptospirenprävalenzen in Europa sind zwar unklar, MAT-Daten aus diagnostischen Laboreinsendungen lassen jedoch Rückschlüsse auf das Vorkommen von Leptospiren bei Schweinen zu (STRUTZBERG-MINDER et al., 2018). So lagen die Seroprävalenzen in den vergangenen Jahren zwischen 19,74 % in Italien (BERTELLONI et al., 2019), 20,2 % in Deutschland (STRUTZBERG-MINDER et al., 2018) und 22,7 % in Frankreich (NAUDET et al., 2022).

Leptospiren werden in der Literatur zwar regelmäßig als Differentialdiagnose im Zusammenhang mit SMEDI genannt, jedoch sind konkrete Beschreibungen von Leptospireninfektionen in Fällen von SMEDI

sehr selten. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen sollte das Vorkommen von Leptospiren in Fällen von SMEDI untersucht werden und in diesem Zusammenhang verschiedene diagnostische Möglichkeiten evaluiert werden. Dazu werden verschiedene Gewebeproben von Ferkeln SMEDI-assoziiertes Würfe, die zu diagnostischen Zwecken an die Klinik für Schweine eingeschickt wurden, mittels qPCR auf Leptospiren-DNA untersucht. Um die Auswahl des Probenmaterials zur Leptospirendiagnostik in Fällen von SMEDI zu optimieren, wird die Nachweishäufigkeit in den Geweben verglichen. Des Weiteren wird Herzblut von Ferkeln, deren Scheitel-Steiß-Länge auf ein Mindestalter von 70 Tagen und somit auf eine beginnende Immunkompetenz schließen lässt auf Antikörper gegen Leptospiren untersucht, um zu evaluieren, ob dieser in der Literatur beschriebene Ansatz einen Mehrwert im Rahmen der Leptospirendiagnostik bietet. Die so gewonnenen Ergebnisse werden in Zusammenhang mit der von der OIE als Goldstandard definierten Leptospirendiagnostik mittels Antikörperbestimmung bei von Fruchtbarkeitsstörungen betroffenen Sauen gebracht.

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. *Leptospira* spp.

#### 1.1. Morphologie

Bei Leptospiren handelt es sich um spiralförmige, circa 6 - 20 µm lange und circa 0,1 µm breite Bakterien (LEVETT, 2001; ADLER & DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Sie weisen eine charakteristische Struktur auf, die der eines Kleiderbügels ähnelt (LEVETT, 2001; ADLER & DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

Aufgrund von zwei im Periplasma gelegenen Flagellen sind Leptospiren beweglich (CHARON & GOLDSTEIN, 2002). Die Flagellenhülle und der Flagellenkern bestehen aus FlaA- und FlaB-Proteinen (PICARDEAU et al., 2001). Je nach Viskosität ihrer Umgebung können sie sich mit Geschwindigkeiten von circa 7 - 10 µm / Sekunde in Standardmedien fortbewegen (TAKABE et al., 2013).

Die Ultrastruktur der Leptospiren ähnelt der von gramnegativen Bakterien (CAMERON, 2015). Sie besitzen eine Doppelmembranstruktur, bei der die Zytoplasmamembran eng mit der Peptidoglykanzellwand verbunden ist. Diese beide werden von einer äußeren Membran umgeben (CULLEN et al., 2004). In der äußeren Membran formen Lipopolysaccharide (LPS) das Hauptantigen der Leptospiren. Dieses Hauptantigen ist dem LPS gramnegativer Bakterien sowohl strukturell als auch immunologisch ähnlich (CULLEN et al., 2005). Es besitzt eine relativ geringe Toxizität: Verglichen mit dem LPS gramnegativer Bakterien, ist es für Zellen und Tiere bis zu zehn Mal weniger tödlich (ZUERNER et al., 2000).

#### 1.2. Taxonomie

Die Taxonomie von *Leptospira* spp. ist komplex (GUERNIER et al., 2018). Leptospiren gehören zur Ordnung der Spirochäten, Familie der Leptospiraceae und zum Genus *Leptospira* (LEVETT, 2015).

Heutzutage finden zwei verschiedene Klassifizierungssysteme Anwendung (AHMED et al., 2012):

Die erste Art der Klassifizierung basiert auf den serologischen Eigenschaften. Dabei wird zwischen apathogenen, saprophytischen (*Leptospira biflexa sensu lato*) und pathogenen (*Leptospira interrogans sensu lato*) Leptospirenspezies unterschieden (JOHNSON & FAINE, 1984). Mittels sogenannter Kreuzagglutination-Absorptionstests werden die Leptospirenstämme aus klinischen, diagnostischen und epidemiologischen Gründen in über 300 Serovaren unterteilt (LEVETT, 2015). Diejenigen Serovaren, die antigenetisch verwandt sind, werden in sogenannten Serogruppen zusammengefasst (LEVETT, 2001; AHMED et al., 2012).

Diese Serovar-Klassifizierung basiert auf der Expression von oberflächenexponierten Epitopen in einem Mosaik von LPS-Antigenen (ZHANG et al., 2015). Dabei hängt die Klassifizierung sowohl von der Zusammensetzung als auch von der Orientierung der Zucker ab (ADLER & DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

Die beim Schwein vorkommenden Leptospiren und ihre antigenetische Verwandtschaft sind der Tabelle 1 zu entnehmen.

**Tabelle 1: Bei Schweinen vorkommende Leptospiren-Serovare und die von ihnen gebildeten Serogruppen, für die das Schwein a) als Reservoirwirt gilt und b) Serovaren und Serogruppen, mit denen sich das Schwein zwar infizieren kann, wobei das Schwein aber eher als Fehlwirt agiert (BOLIN, 1994; LEVETT, 2001; ELLIS, 2006; STRUTZBERG-MINDER & KREIENBROCK, 2011; ELLIS, 2015; STRUTZBERG-MINDER et al., 2018)**

Serogruppe	Serovar
a)	
Australis	Australis
	Bratislava
	Muenchen
Pomona	Pomona
b)	
Tarassovi	Tarassovi
Canicola	Canicola
Gryppytyphosa	Grippytyphosa
Icterohaemorrhagiae	Copenhageni
	Icterohaemorrhagiae
Sejroe	Sejroe
	Hardjo

Die zweite Art der Klassifizierung basiert auf den genetischen Eigenschaften (AHMED et al., 2012). Dabei werden Leptospiren in verschiedene Genospezies unterteilt. Nach aktuellem Kenntnisstand unterscheidet man mindestens 65 pathogene, intermediäre und apathogene Genospezies (THIBEAUX et al., 2018a; THIBEAUX et al., 2018b; VINCENT et al., 2019). Die intermediären Spezies sind den pathogenen Spezies nahe verwandt, weisen allerdings nur eine moderate Pathogenität bei Tier und Mensch auf (PEROLAT et al., 1998).

Basierend auf der AAI (amino acid identity), der ANI (average nucleotide identity), dem POCP (percentage of conserved proteins) und der Analyse des *ppk*-Gens, welches die Polyphosphatkinase kodiert, schlagen VINCENT et al. (2019) eine neue Art der genotypischen Klassifizierung vor. Dabei wird zwischen den zwei Hauptgruppierungen Saprophyten (S) und Pathogenen (P) (sogenannten „clades“) sowie vier Subclades (P1, P2, S1 und S2) unterschieden. Die pathogenen Arten beinhalten alle Arten, die bei Mensch und Tier zu Infektionen führen können. Die Saprophyten beinhalten all diejenigen Arten, die in der Umwelt zu finden und nicht infektiös sind, inklusive denjenigen, deren Virulenzstatus noch nicht geklärt ist. Die Subclade P1 fasst die zuvor als pathogen eingestuft Leptospiren zusammen, P2 die ehemals intermediären Leptospiren, S1 beinhaltet die Leptospiren, die bis dahin als saprophytär eingeordnet wurden. Die Subclade S2 wurde neu hinzugefügt. Diese Einteilung der verschiedenen Leptospirenarten in die vier Subclades nach VINCENT et al. (2019) wird auch von der IVD Gesellschaft für Innovative Veterinärmedizin mbH verwendet.

Trotz der Tatsache, dass die beiden Einteilungsmöglichkeiten nicht deckungsgleich sind und zum Beispiel Serovaren derselben Serogruppe unterschiedlichen Genospezies zugeordnet werden können, werden beide Arten der Klassifizierung heutzutage noch benutzt (AHMED et al., 2012). Sowohl in der human- als auch in der veterinärmedizinischen Diagnostik findet vor allem die serologische Einteilung Verwendung, da der Mikroagglutinations-Test als Goldstandard für den Nachweis von Leptospiren gilt (OIE, 2021).

## 2. Epidemiologie

Die Epidemiologie der Leptospirose beim Schwein ist kompliziert, da sich Schweine potentiell mit jeder pathogenen Serovar infizieren können (ARENT & ELLIS, 2019). Aufgrund der Tatsache, dass die verschiedenen Leptospirenserovaren sowohl eine regionale als auch eine wirtsspezifische Präferenz zeigen, sind in einem bestimmten Gebiet nur wenige Serovaren endemisch (ARENT & ELLIS, 2019). Somit ist die Epidemiologie der Infektionen durch Leptospiren abhängig vom Vorkommen der jeweiligen Wirtsspezies in der Region und wird zusätzlich von klimatischen Faktoren bedingt (HABUS et al., 2017).

Während das Schwein derzeit als Reservoirwirt für die Serovaren der Serogruppen Pomona und Australis gilt, gelten Infektionen mit den Serogruppen Icterohaemorrhagiae, Tarassovi und Grippotyphosa beim Schwein eher als zufällig (LEVETT, 2001; ELLIS, 2006; STRUTZBERG-MINDER & KREIENBROCK, 2011). Die Hauptwirte für diese Serovaren sind häufig Nagetiere wie Brandmäuse und Wanderratten, aber auch andere infizierte Kontakttiere können als Überträger fungieren (ARENT & ELLIS, 2019).

Eine entscheidende Rolle in der Epidemiologie spielt die Fähigkeit vieler Serovaren, für eine längere Zeit die Nieren zu besiedeln und somit eine Ausscheidung über den Harn hervorzurufen oder venerisch übertragen werden zu können (STRUTZBERG-MINDER & KREIENBROCK, 2011). So ist zum Beispiel die Ausscheidung der Serovar Bratislava im Gegensatz zur Serovar Pomona bei einer persistierenden Infektion zwar gering, und die Übertragung dieser Serovar in der Mast nicht effizient; dafür besitzt die Serovar Bratislava aber zusätzlich die Fähigkeit, im oberen Genitaltrakt von Sauen und Ebern zu persistieren und kann demnach auch venerisch übertragen werden (ELLIS & THIERMANN, 1986).

### 2.1. Vorkommen

Die Leptospirose gilt als eine der weltweit am weitest verbreiteten Zoonose (ADLER & DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Sie führt zu Reproduktionsstörungen in Schweineherden auf allen Kontinenten (ARENT & ELLIS, 2019). Circa 60.000 humane Todesfälle pro Jahr lassen

sich auf Leptospireninfektionen zurückführen (COSTA et al., 2015). Die Leptospirose bei Schweinen und Schafen ist entsprechend der Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten in der Fassung der Bekanntmachung vom 11. Februar 2011 (BGBl. I S. 252), die zuletzt durch Artikel 1 der Verordnung vom 8. Juli 2020 (BGBl. I S. 1604) geändert wurde, meldepflichtig (BMEL, 2020).

Die genauen Leptospirenprävalenzen in Europa sind zwar unklar, Auswertungen von Mikroagglutinationstest-(MAT) Daten aus diagnostischen Laboreinsendungen lassen jedoch Rückschlüsse auf das Vorkommen von Leptospiren bei Schweinen zu (STRUTZBERG-MINDER et al., 2018). So lagen in den vergangenen Jahren die Seroprävalenzen zwischen 19,74 % in Italien (BERTELLONI et al., 2019), 20,2 % in Deutschland (STRUTZBERG-MINDER et al., 2018) und 26,5 % in Frankreich (ANDRÉ-FONTAINE, 2016).

In den vergangenen Jahren wurden nur wenige Studien über das Vorkommen von Leptospirenserovaren beim Hausschwein publiziert (STRUTZBERG-MINDER et al., 2018). Zwischen 2011 und 2016 konnte in Deutschland mit 57,2 % die Serovar Bratislava innerhalb der auf Leptospiren positiv getesteten Proben am häufigsten nachgewiesen werden (STRUTZBERG-MINDER et al., 2018). Ebenso wurde in den Jahren 2011 bis 2017 in Frankreich diese Serovar mit 48,5 % am häufigsten diagnostiziert (NAUDET et al., 2022). In Polen wurde ungefähr zeitgleich die Serovar Pomona mit einer Prävalenz von 0,39 bis 1,13 % und in Brasilien im Jahr 2013 die Serovar Icterohaemorrhagiae mit einer Prävalenz von 41,8 % nachgewiesen (VALENÇA et al., 2013).

Allerdings limitieren die Einschlusskriterien (zum Beispiel Einschluss oder Ausschluss von Tieren mit klinischen Veränderungen), sowie die Auswahl der im MAT verwendeten Serogruppen die Vergleichbarkeit dieser Daten (STRUTZBERG-MINDER et al., 2018).

Wie in der Humanmedizin ist in den kommenden Jahren auch in der Veterinärmedizin mit steigenden Leptospireninfektionen zu rechnen: Während in Deutschland im Jahr 2011 noch eine Seroprävalenz von 16,3 % der untersuchten Hausschweinpopulation festgestellt wurde,

waren es in 2016 bereits 30,9 % (STRUTZBERG-MINDER et al., 2018).

Insbesondere in tropischen Gegenden mit hohen Temperaturen, großen Niederschlagsmengen und regelmäßigen Überflutungen rechnet die Forschung mit gehäuften Leptospireninfektionen (KO et al., 2009; LAU et al., 2010). Nicht zuletzt führt auch die globale Erderwärmung infolge des Klimawandels zu steigenden Zahlen auch in Europa (PIJNACKER et al., 2016).

## 2.2. Wirtsspektrum

Fast alle Säugetiere (auch Meeressäuger und Beuteltiere, Fledermäuse, Vögel, Amphibien und Reptilien) sind empfänglich für Leptospiren (ADLER & DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010; ELLIS, 2015; JOBBINS & ALEXANDER, 2015; MGOODE et al., 2015). Für die Mehrzahl der Säugetiere wird die durchschnittliche Prävalenz von Leptospireninfektionen global auf etwa 15 % geschätzt (ANDERSEN-RANBERG et al., 2016).

Allerdings haben sich die verschiedenen Leptospirenserovaren im Laufe ihrer Evolution an bestimmte Tierarten adaptiert. Diese werden als Hauptwirte bezeichnet. Die Hauptwirte sind in der Regel hochempfindlich gegenüber den adaptierten Serovaren. Nach der Infektion, die in der Regel ohne klinische Veränderungen verläuft, bleiben die Hauptwirte häufig lebenslang infiziert (LEVETT, 2001). Während bei den Hauptwirten die Infektion meist direkt von Tier zu Tier verläuft, infizieren sich die sogenannten Nebenwirte indirekt. Die Nebenwirte sind zwar weniger empfindlich gegenüber den nicht-adaptierten Serovaren, bei einer Infektion kommt es allerdings häufig zu schweren bis tödlichen Verläufen. Prinzipiell kann jedes Tier zeitgleich als Hauptwirt für eine oder mehrere Serovaren und als Nebenwirt für andere Serovaren fungieren (LEVETT, 2001). Vor allem Nager und Kleinsäuger fungieren als Reservoirwirte für *Leptospira* spp. (MÜNKER, 1963; LEVETT, 2001).

## 2.3. Leptospirenübertragung beim Schwein

Das Bakterium wird über die Schleimhäute von Augen, Rüsselscheibe oder Maul aufgenommen (ADLER & DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Dabei ist die häufigste Art der Übertragung noch nicht identifiziert worden. Auch die Infektion von Ferkeln über den vaginalen und plazentaren Weg

(PEDERSEN et al., 2015) und über die Aufnahme von Milch einer experimentell infizierten Sau konnte nachgewiesen werden (ARENT & ELLIS, 2019).

Eine empfängliche Schweineherde kann sich über die drei folgenden Wege mit Leptospiren infizieren: Ein infiziertes Tier („*carrier*“) wird in die Herde eingegliedert, die Herde wird einer kontaminierten Umgebung ausgesetzt oder ein anderes infiziertes Tier dient als Vektor bei der Übertragung (ARENT & ELLIS, 2019). Als „*carrier*“, oder auch Trägartiere konnten sowohl infizierte Eber (KEMENES & SÜVEGES, 1976), als auch neu eingegliederte Jungsauen (EDWARDS & DAINES, 1979) identifiziert werden. Je nach geografischer Lage können auch freilebende Tierarten eine Rolle bei der Infektion spielen. Während in Deutschland die meisten Schweine konventionell gehalten werden und somit kaum Kontakt zu freilebenden Tieren haben, konnte in Nordamerika das Stinktier als Überträger für Leptospireninfektionen identifiziert werden (MITCHELL et al., 1966). Vor allem Mäusen (*Mus musculus* und andere Mausspezies) und Ratten (*Rattus norvegicus* und *Rattus rattus*) kommt eine besondere Bedeutung als Reservoirwirte für die von ihnen übertragenen Serovaren zu (BALBONI et al., 2022). Sie zeigen in der Regel keine klinischen Veränderungen, da die Leptospiren jedoch in ihren Nieren persistieren, scheiden sie die Bakterien über ihren Urin aus (GOARANT, 2016). Dadurch kommt es zur Kontamination von Abwasser, Wasser oder Böden (BHARTI et al., 2003). Bei indirekter Übertragung ist Feuchtigkeit als kritischer Faktor anzusehen, da die Organismen bei Trockenheit nicht widerstandsfähig sind (SUMI et al., 2017). Wird infizierter Harn allerdings auf feuchtem Boden oder Wasser mit einem pH im alkalischen Bereich abgesetzt, können die Leptospiren für eine längere Zeit überdauern (LEVETT, 2001; STRUTZBERG-MINDER & KREIENBROCK, 2011; NAU et al., 2019).

Werden Abwasser über ein gemeinsames Drainagesystem abgeführt, so kann es zu Infektionen zwischen Gruppen von Mastschweinen über mit Harn kontaminiertes Abwasser kommen (BUDDLE & HODGES, 1977).

Zusätzlich konnten statistische Auswertungen zeigen, dass es eine saisonale Häufung von Leptospireninfektionen aufgrund von günstigen

Wettereinflüssen gibt: Temperaturen von neun bis 19 °C und Niederschlagsmengen von über 100 mm / m<sup>2</sup> begünstigen das Vorkommen von Leptospiren (HABUS et al., 2017).

#### 2.4. Pathogenese

Leptospiren gelangen über kleine Schnitte oder Abrasionen, über Schleimhäute oder nasse Haut in den Körper (ADLER & DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Die anschließende bakteriämische Phase dauert meist circa sieben Tage an (ELLIS, 1994). Sobald eine kritische Anzahl an Leptospiren im Blut und in den Geweben vorhanden sind, kommt es zur Symptomatik aufgrund von Läsionen, die durch Toxinwirkung und toxische Zellkomponenten der Leptospiren entstehen (ADLER & DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Die Primärläsion bildet das geschädigte Endothelium der kleinen Blutgefäße, wodurch es zu lokalen Ischämien in Organen kommt und renale Tubulusnekrosen, Zellschäden in Leber und Lunge, Meningitis und Plazentitis, später auch Granulozytose und Splenomegalie entstehen können (ADLER & DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). In stärkeren Fällen können Blutungen, Ikterus und Thrombozytopenie auftreten (PALANIAPPAN et al., 2007). Sobald das Schwein Antikörper gebildet hat, werden Leptospiren durch Oponophagozytose aus dem Blutkreislauf und den Geweben entfernt (ADLER & DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Gewebeschäden können durch Reparaturprozesse sowohl reversibler Art sein (zum Beispiel in Leber und Niere). Es können beim Schwein aber auch nicht reversible Schäden zum Beispiel durch Myokarditis und Vernarbungen in Form von „white spots“ in den Nieren entstehen (ADLER & DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

Das Hauptoberflächenprotein von Leptospiren bildet das LipL32, welches eine Bindungsaffinität zu Laminin (HOKE et al., 2008), Kollagen und Fibrinectin des Wirtes zeigt (HAUK et al., 2008). Dieses LipL32 ist einzigartig für pathogene *Leptospira* spp. und stets hoch konserviert vorkommend (ADLER & DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

### **3. Klinik der Leptospirose beim Schwein**

Die allermeisten Infektionen mit Leptospiren beim Schwein verlaufen subklinisch, allerdings sind klinische Infektionen bei zwei Gruppen von Schweinen am wahrscheinlichsten: bei jungen Ferkeln und bei tragenden Sauen (ELLIS, 2006). Es wird zwischen akuten und chronischen Infektionen unterschieden, bei letzteren stehen Reproduktionsstörungen im Vordergrund (ARENT & ELLIS, 2019).

#### **3.1. Akute Leptospirose**

Die Phase der akuten Leptospirose fällt in der Regel mit der Phase der Bakteriämie zusammen (ARENT & ELLIS, 2019). Nach experimenteller Infektion zeigen viele infizierte Schweine während dieser Phase Anorexie, Pyrexie und Apathie (HANSON et al., 1986). Bei natürlichen Infektionen sind die Symptome meist von milder Natur, weshalb vor allem in endemischen Infektionen in Herden, in denen nur ein oder zwei Tiere betroffen sind, diese Phase häufig unerkannt bleibt (ARENT & ELLIS, 2019).

Es konnten allerdings auch Ikterus und Hämoglobinurie bei natürlichen Ausbrüchen nachgewiesen werden (NIEDMANN et al., 1964). Dies konnte vor allem bei Ferkeln, die im Alter von weniger als drei Monaten durch die Serovar Icterohaemorrhagiae infiziert wurden, nachgewiesen werden. Die meisten der erkrankten Tiere erholten sich spontan innerhalb einer Woche (FIELD & SELLERS, 1951).

#### **3.2. Chronische Leptospirose**

Die chronische Leptospirose ist durch vermehrtes Umrauschen, Spätaborte, Totgeburten, die Geburt schwacher Ferkel (ELLIS, 2015) mit reduzierter Lebensfähigkeit, fetale Mumifikation (NETO et al., 1997), kleinere Wurfgrößen (FRANTZ et al., 1989) und Infertilität der infizierten Sau gekennzeichnet (DE AZEVEDO et al., 2008), was zu erheblichen wirtschaftlichen Verlusten führen kann (ELLIS, 2015).

Nach der Phase der Bakteriämie können Leptospiren in den proximalen Tubuli der Niere persistieren, wo sie sich auch multiplizieren und über den Urin ausgeschieden werden können (CALDERÓN et al., 2014). Die Dauer

und Intensität der Bakteriurie variiert abhängig von der infizierenden Serovar von Schwein zu Schwein (STRUTZBERG-MINDER & KREIENBROCK, 2011). Ebenso ist eine Infektion des Uterus möglich, was bei trächtigen Sauen zu Aborten (FENNESTAD & BORG-PETERSEN, 1966), Totgeburten (MORTER et al., 1960), Mumifikation (DAL SANTO et al., 2020) und Fruchtbarkeitsstörungen (POZZI & ALBORALI, 2012) führen kann. Aborte oder Totgeburten folgen meist ein bis vier Wochen nach der Infektion mit Leptospiren (HANSON et al., 1986). Zu diesem Zeitpunkt haben die meisten Sauen bereits serokonvertiert (ARENT & ELLIS, 2019).

Da der Einfluss von Leptospirose auf die nationalen Abortraten beim Schwein sowohl von der jeweiligen Prävalenz der infizierenden Serovaren als auch von der Epidemiologie sowie Managementfaktoren abhängig ist, gibt es keine international vergleichbaren Daten. Allerdings ist davon auszugehen, dass auch in Ländern, in denen eine Impfung gegen diesen Erreger weit verbreitet ist, Leptospiren eine erhebliche Rolle bei Fruchtbarkeitsstörungen beim Schwein spielen (ARENT & ELLIS, 2019). Außerdem führen Unterschiede in der Pathogenität der einzelnen Stämme zu unterschiedlichen Prävalenzen bei klinischen Aborten in infizierten Herden (NAGY, 1993). Endemische Infektionen mit der Serovar Tarrasovi führten in Polen zu einer drei prozentigen Abortrate (WANDURSKI, 1982). Im Vereinten Königreich (ELLIS et al., 1986) und den Vereinigten Staaten (BOLIN & CASSELLS, 1990) wurde eine hohe Prävalenz der Serogruppe Australis in abortieren Schweinefeten nachgewiesen. In Ontario konnte die Serovar Bratislava in 16 % der untersuchten Schweineherden mit Abortgeschehen nachgewiesen werden (REHMTULLA et al., 1992).

### **3.3. Leptospiren im Rahmen von SMEDI**

Sowohl die Geburt abgestorbener Ferkel zum physiologischen Termin als auch das vorzeitige Ausstoßen der Feten zählen zu den auffallendsten und häufigsten Folgen einer Reihe von Störungen der intrauterinen Entwicklung, die zwar ähnliche Erscheinungsbilder zeigen, denen allerdings diverse unterschiedliche Ursachen zugrunde liegen können (PLONAIT, 2004a; SYDLER et al., 2011). Das Akronym „SMEDI“-Syndrom fasst einige dieser klinischen Erscheinungen zusammen, kann durch viele Infektionserreger verursacht werden und geht stets mit ähnlicher

Symptomatik einher (HEINRITZI et al., 2006b). SMEDI steht für „stillbirth“ (Totgeburt), „*mummification*“ (Mumifikation), „*embryonic death*“ (embryonaler Tod) und „*infertility*“ (Unfruchtbarkeit) „*syndrome*“ (Syndrom) (STRECK & TRUYEN, 2020). Auch wenn das porcine Parvovirus als Haupterreger für SMEDI gilt (STRECK & TRUYEN, 2020), so zählen Leptospiren zu den bakteriellen Erregern, die beim Schwein zu Fruchtbarkeitsstörungen führen können, die durch embryonale oder fetale Infektion mit anschließendem Fruchttod einhergehen und damit zum Vorkommen von SMEDI beitragen können (LEMAN et al., 1974; RAGUVARAN et al., 2017; POZZI et al., 2020; OIE, 2021).

Es gelten folgende Definitionen:

Ein totgeborenes Ferkel wird als vollentwickelte, tote Frucht definiert (DA SILVA et al., 2016). Diese Tiere verfügen über ein makroskopisch physiologisches Erscheinungsbild, ihre Lungen schwimmen allerdings nicht in Wasser (die Lungenschwimmprobe verläuft negativ) (CHRISTIANSON, 1992).

Die Mumifikation ist definiert als eine Dehydratation des im Uterus verbleibenden Fetus, die unter anderem zu eingesunkenen Augen führen kann (PLONAIT, 2004a). Sie verläuft weitestgehend steril, da es nicht zur bakteriellen Infektion und somit nicht zu Zersetzungs Vorgängen kommt (GIVENS & MARLEY, 2008).

Der embryonale Tod findet per definitionem vor dem 35. Tag post conceptionem statt; bis zu diesem Zeitpunkt hat noch keine Mineralisation des fetalen Skeletts stattgefunden und die Frucht kann somit resorbiert werden (CHRISTIANSON, 1992). Unregelmäßiges Umrauschen, Pseudogravidität oder verkleinerte Wurfgrößen können beobachtet werden (HEINRITZI et al., 2006a).

Der fetale Tod hingegen findet per definitionem zwischen dem 35. und 110. Graviditätstag statt, sodass die Ferkel Skelettanlagen aufweisen können (WRATHALL et al., 1974). Es kann zu verlängerten Graviditäten, sowie der termingerechten Geburt von klinisch gesunden, lebensschwachen oder mumifizierten Ferkeln kommen (HEINRITZI et al., 2006a). Autolytische Ferkel zeigen in Folge von hämolytischen Prozessen

braun rot verfärbte Gewebe, sowie serosanguinöse Flüssigkeitsansammlungen in den Körperhöhlen (FENNESTAD & BORG-PETERSEN, 1966). Diese autolytischen Prozesse basieren auf einer vorherigen bakteriellen Infektion des Fetus (GIVENS & MARLEY, 2008).

Maternale Bakteriämien - ebenso wie maternale Virämien - können in der Infektion eines oder mehrerer Feten und auch in der Infektion der Plazenta resultieren (ARENT & ELLIS, 2019). In der Folge kann es zu einer horizontalen Infektion kommen, ergo der Infektionsweitergabe von Fetus zu Fetus (NIELSEN et al., 1991). Dies kann zu orgelpfeifenartig abgestuften Größen der Ferkel innerhalb eines Wurfes führen, je nachdem, zu welchem Zeitpunkt der Fruchttod stattgefunden hat (STRECK & TRUYEN, 2020).

Abhängig davon, wann der Embryo oder Fetus mit Leptospiren infiziert wird, kann dies vielfältige Folgen haben: sowohl der embryonale Tod und anschließende Resorption als auch der fetale Tod und anschließende Mumifikation, Aborte von frischen oder autolytischen Feten, totgeborene oder lebensschwachgeborene Ferkel, sowie eine insgesamt erhöhte neonatale Mortalität (CHRISTIANSON, 1992). Findet die Infektion zu einem frühen Zeitpunkt in der Gestation statt, kann es zu embryonalem Fruchttod und der Resorption von einigen, aber nicht allen Feten kommen, was zu verkleinerten Wurfgrößen führen kann (ARENT & ELLIS, 2019).

Nach dem 35. Graviditätstag beginnt die fetale Knochenmineralisation, weshalb eine fetale Infektion zu diesem Zeitpunkt eine Mumifikation des Ferkels zur Folge haben kann (WRATHALL et al., 1974). Zunächst kommt es zu Kongestionen, Ödemen und Hämorrhagien mit Akkumulationen von serosanguinösen Flüssigkeiten in den Körperhöhlen. Nach dem Tod folgt Dehydratation und Entfärbung der Haut, weshalb der Fetus dunkler erscheint (ZIMMERMAN, 1972).

Ebenso kann die Plazenta dehydriert und braun-grau verfärbt, sowie das extrafetale Flüssigkeitsvolumen verringert sein (LENGHAUS et al., 1978; CHOI et al., 1987).

Da die Feten ab dem 65. bis 70. Trächtigkeitstag eine Immunkompetenz ausbilden können (MADSON et al., 2009; GERBER et al., 2012), kann es

infolge einer Infektion ab diesem Zeitpunkt in der Gravidität zur Ausbildung von Antikörpern gegen Leptospiren und demnach zur Geburt lebensfähiger, seropositiver Tiere kommen (NIELSEN et al., 1991). Klinisch manifestiert sich dieses sequentielle Infektionsszenario in der Geburt von multipel größenvariierenden Feten und physiologisch erscheinenden Lebendgeborenen (ARENT & ELLIS, 2019).

#### **4. Diagnostik**

Ebenso wie die Diagnose von Reproduktionsstörungen beim Schwein generell schwierig ist (SILVA et al., 2015), stellt auch die Leptospirendiagnostik für praktizierende Tierärzte / Tierärztinnen eine Herausforderung dar (ADLER & DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010; MUSSO & LA SCOLA, 2013). Folgende drei Gründe können unter anderem eine Diagnose verlangen: (1) die Bestätigung der klinischen Erkrankung, (2) die Untersuchung der Herdeninfektion / des Herdenimmunitätsstatus zur Kontrolle oder Eradikation auf Herden- oder Landesbasis und (3) die Bestimmung des Status eines Einzeltieres vor Einbringung in eine geschlossene Herde oder vor dem Verkauf (ARENT & ELLIS, 2019).

So wie die milden, oft inapparenten klinischen Zeichen der akuten Leptospirose die klinische Diagnose erschweren, ist die geringe Spezifität der makroskopischen Läsionen bei der pathologischen Diagnose limitierend (ARENT & ELLIS, 2019). Auch die chronische Leptospirose ist aufgrund der Fähigkeit des Erregers, in den Nieren und im Genitaltrakt zu persistieren, schwierig zu diagnostizieren. Die infizierten, subklinischen Trägartiere können jahre- oder lebenslang unerkannte Ausscheider bleiben (ELLIS, 2015).

Da die klinischen und pathologischen Befunde oftmals nicht ausreichen, stützt sich die Diagnose meist auf labordiagnostische Ergebnisse (STRUTZBERG-MINDER et al., 2018). Diese lassen sich in die indirekten serologischen Nachweismethoden, bei denen Antikörpertiter im Blut gemessen werden und direkte Nachweismethoden, bei denen der Organismus selbst detektiert wird, unterteilen. Bakterielle Erreger, die fetales Gewebe infizieren und sich dort replizieren können, werden auch in fetalem Gewebe nachgewiesen, sofern genug Probenmaterial

untersucht und der richtige Test zum Nachweis von lebenden Pathogenen oder Resten von deren DNA ausgewählt wird (ALTHOUSE et al., 2019).

Meistens werden die Feten aus praktischen Gründen entweder gekühlt oder gefroren eingeschickt. Dies ermöglicht dem Diagnostiker, die richtigen Proben zu entnehmen und die angemessenen Tests unter hygienischen Umständen durchführen zu können (ALTHOUSE et al., 2019). Intakte Feten gelten als steril, da ihre inneren Organe mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht mit Umweltkeimen kontaminiert sind, weshalb der Nachweis von Erregern aus diesen Materialien als signifikant gilt (ALTHOUSE et al., 2019).

Bei der Diagnostik von Leptospiren wird zwischen direkten und indirekten Nachweismethoden unterschieden (MARQUEZ et al., 2017), die im Folgenden erläutert werden.

#### **4.1. Indirekte Nachweismethoden**

Bei den indirekten Nachweismethoden gilt es zu beachten, dass die Tiere erst in der zweiten Woche nach der Infektion Antikörper bilden, sodass diese Nachweismethoden erst ab diesem Zeitpunkt für die Diagnose genutzt werden können (MUSSO & LA SCOLA, 2013).

##### **4.1.1. Mikroagglutinationstest (MAT)**

Der Mikroagglutinationstest (MAT) basiert auf lebenden Leptospirenserovaren (JAYASUNDARA et al., 2021). Eine Verdünnungsreihe des Serums des zu untersuchenden Tieres wird mit diesen lebenden Leptospirenserovaren in Mikrotiterplatten gemixt und bei 30°C für zwei Stunden inkubiert (GORIS & HARTSKEERL, 2014). Mittels Dunkelfeldmikroskopie wird anschließend untersucht, ob es zur Agglutination kommt und falls ja bis zu welcher Verdünnungsstufe (GORIS & HARTSKEERL, 2014). Diejenige Endverdünnung des Serums, bei der 50 % der zugegebenen Leptospiren agglutiniert sind, zum Beispiel 1/100, 1/400 usw. oder der Kehrwert der Endverdünnung, zum Beispiel 100 oder 400, gilt als Testergebnis (GORIS & HARTSKEERL, 2014).

Der MAT gilt als die serologische Referenzmethode laut der „*World Organization for Animal Health*“ (OIE) und der „*World Health*

*Organization*“ (WHO) (WHO, 2003; OIE, 2021). Diese Tatsache beruht auf der nach wie vor unübertroffenen diagnostischen Spezifität. Antikörper gegen andere Bakterien kreuzreagieren selten mit Leptospiren (GORIS & HARTSKEERL, 2014). Der MAT wird gegenwärtig auch zur Ermittlung von Seroprävalenzen eingesetzt (OIE, 2021).

Die minimalen Anforderungen an den MAT bestehen darin, dass die ausgewählten Antigene für die in der jeweiligen Region vorkommenden Stämme von bekannten Serogruppen repräsentativ sein sollten. Zusätzlich sollten diejenigen Antigene verwendet werden, die bekanntermaßen in der zu testenden Wirtsspezies vorkommen (ELLIS, 2006; OIE, 2021). Spätestens seit der Veröffentlichung des *„Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals“* im Jahr 2000 gilt ein Titer von mindestens 100 als allgemein anerkannt signifikant für eine Leptospireninfektion (OIE, 2000).

In nicht-endemischen Gebieten kann ein Titer von 50 oder mehr in Zusammenhang mit passender Klinik auf eine Leptospirose hinweisen. Meist steigt der Titer in einer zweiten Probe fünf bis sieben Tage später um das Vierfache oder höher (ELLIS, 2006). Ein einzelner Titer von 400 oder höher ermöglicht nur eine Verdachtsdiagnose (BOLIN, 1994). Es lässt sich dann nicht zuverlässig sagen, dass der Kontakt mit Leptospiren tatsächlich der Grund für die akute Erkrankung gewesen sein muss (BOLIN, 1994).

In endemischen Gebieten gilt ein Titeranstieg um das Vierfache oder mehr fünf bis zehn Tage nach Beginn der klinischen Veränderung ebenso als diagnostisch wie ein anfänglicher Titer von mehr als 400 (OIE, 2021).

BOLIN (1994) empfiehlt außerdem präkolostrales Ferkelserum für die Diagnostik einzusenden, da dieses im Falle einer transplazentaren Infektion nach dem circa 70. Trächtigkeitstag bereits Leptospirenantikörper enthalten kann (MADSON et al., 2009; GERBER et al., 2012). Die resultierenden Antikörpertiter sind zwar meistens niedrig (kleiner als 100), dafür aber normalerweise spezifisch für die infizierende Serovar und damit von hoher epidemiologischer Relevanz (BOLIN, 1994). Der Nachweis von Antikörpern in fetalem Blut gilt als diagnostisch (OIE,

2021).

Ein bis zwei Tage nach der Infektion folgt eine Phase der Bakteriämie, die circa eine Woche andauert (ADLER & DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Während dieser Zeit können die Leptospiren aus den meisten Organen und aus der Cerebrospinalflüssigkeit isoliert werden (ELLIS, 2006). Die bakteriämische Phase endet mit dem Vorhandensein von zirkulierenden Antikörpern, die nach ungefähr fünf bis zehn Tagen nachweisbar sind (HANSON et al., 1986; AGAMPODI et al., 2012; PICARDEAU, 2013). Etwa drei Wochen nach der Infektion erreichen die Antikörpertiter ihre Höhepunkte, die für circa drei Wochen anhalten und anschließend graduell wieder sinken. Bei einigen Tieren können niedrige Titer über mehrere Jahre hinweg bestehen (ANDRÉ-FONTAINE, 2016).

Schweinefeten können ab einem Alter von circa 70 Tagen eine Immunkompetenz ausbilden (MADSON et al., 2009; GERBER et al., 2012). Daher können bei systemischen Infektionen nach diesem Trächtigkeitszeitraum, wie sie zum Beispiel durch die Serovar Pomona hervorgerufen werden (STRUTZBERG-MINDER & KREIENBROCK, 2011), bei einigen Totgeborenen Antikörper nachweisbar sein. Dabei kommt es zur fetalen Infektion während der kurzen Phase der maternalen Leptospirämie (ARENT & ELLIS, 2019). Andere Serovaren wie die Serovar Bratislava führen allerdings nur zu geringen Antikörpertitern bei den Feten. Deshalb kann eine verminderte Immunkompetenz des Uterus als mögliche Ursache für eine transplazentare Infektion durch Leptospiren, die im Genitaltrakt lokalisiert sind, vermutet werden (SOTO et al., 2006).

Da die Antikörpertiter bei chronisch infizierten Tieren auch unter die Nachweisgrenze fallen können, weist der MAT bei der Diagnose von chronischen Infektionen erhebliche Leistungseinbußen auf. Dies gilt bei einzelnen Tieren sowohl für die Diagnose chronischer Infektionen bei Aborten als auch für die Identifizierung von renalen oder genitalen Trägartieren und bei der Diagnose von endemischen Herdeninfektionen (ELLIS & THIERMANN, 1986; STRUTZBERG-MINDER & KREIENBROCK, 2011).

Einen weiteren Nachteil stellen die möglichen Kreuzreaktionen dar

(CHAPPEL et al., 2004; MILLER et al., 2011). In diesen Fällen beinhalten die MAT-Ergebnisse Titer, die gegen zwei oder mehr Serovaren gerichtet sind. Somit ist eine definitive Identifizierung der infizierenden Serovar mittels MAT nicht möglich (NAUDET et al., 2022). Daher empfehlen NAUDET et al. (2022) gewichtete Mittelwerte aus den MAT-Ergebnissen von möglichst vielen Beobachtungsstudien zu nutzen. Gewichtete Mittelwerte erlauben eine Zuweisung von höherer Gewichtung bestimmter Ergebnisse, die verlässlicher oder wichtiger zu sein scheinen als andere bei der Ausrechnung der Durchschnittsergebnisse (SOKAL, 1995). Da die Reaktionen mit der ursächlich infizierenden Serovar allerdings meist höher sind als die der kreuzreagierenden Serovaren, können Rückschlüsse auf die möglicherweise infizierende Serovar aus den Ergebnissen der Serologie gezogen werden (STRUTZBERG-MINDER et al., 2018).

Des Weiteren ist eine Unterscheidung zwischen Antikörpern, die aufgrund einer Infektion gebildet wurden von denjenigen, die aufgrund einer Impfung gebildet wurden, mittels MAT nicht möglich (STRUTZBERG-MINDER & KREIENBROCK, 2011). Daher sollte der Impfstatus bei der Bewertung der MAT-Ergebnisse unbedingt Beachtung finden (STRUTZBERG-MINDER et al., 2018).

Da der MAT weiterhin weder die Identifikation von klinisch gesunden Trägertieren noch der infizierenden Serovar ermöglicht, werden weitere Diagnostikmöglichkeiten benötigt (MUSSO & LA SCOLA, 2013).

Außerdem sollte bei der Interpretation der MAT-Ergebnisse beachtet werden, dass diese subjektiv und somit von der durchführenden Person abhängig sind: Das Agglutinationsausmaß der Leptospiren wird visuell in der jeweiligen Verdünnungsstufe des Serums beurteilt (STRUTZBERG-MINDER et al., 2018).

#### **4.1.2. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

„Enzyme-linked immunosorbent assays“ (ELISA) bieten eine weitere Möglichkeit für den Nachweis von Antikörpern gegen Leptospiren (NAUDET et al., 2022). Dabei wird mittels Sichtbarmachen von Antigen-Antikörper-Bindungsreaktionen nachgewiesen, ob Antikörper gegen ein bestimmtes Antigen in der Probe vorhanden sind (AYDIN, 2015).

Allerdings gilt deren diagnostische Genauigkeit derzeit noch als nicht gänzlich geklärt (NULOFA et al., 2015). Die Art des verwendeten Antigens bestimmt die Spezifität des ELISA, wobei aktuell Tests, die auf rekombinierte OMPs (outer membrane proteins) basieren, gegenüber jenen präferiert werden, die auf ganzen Zellen basieren (OIE, 2021). Da die OMP-basierten ELISA allerdings mit allen Antikörpern reagieren, die gegen pathogene Leptospiren gerichtet sind, haben ihre Ergebnisse keinerlei epidemiologische Aussagekraft. Im Gegensatz dazu lassen Lipopolysaccharidantigen-basierte ELISA epidemiologische Rückschlüsse zu (PADILHA et al., 2019). Während IgM-ELISA als nützlich bei der Diagnose akuter Infektionen gelten, können IgG-ELISA voll empfängliche Tiere identifizieren, die sich für Challenge-Versuche eignen könnten (OIE, 2021).

#### **4.2. Direkte Nachweismethoden**

Der Nachweis von Leptospiren in verschiedenen inneren Organen (wie Leber, Lunge, Gehirn oder Niere) (BOLIN, 1994) sowie Körperflüssigkeiten (wie Blut, Milch, Zerebrospinal-, Brust- oder Bauchhöhlenflüssigkeit) (JACOBS et al., 2015) gilt als diagnostisch für eine akute klinische Infektion beziehungsweise beim Nachweis in einem Fetus für eine chronische Infektion des Muttertiers und eine akute Infektion des Fetus. Im Falle einer chronischen Infektion gilt der Leptospirennachweis in Niere, Urin oder Genitaltrakt von Tieren ohne klinische Erkrankung als diagnostisch (OIE, 2021).

##### **4.2.1. Molekularbiologische Diagnostik**

Aufgrund der oben genannten Nachteile des MAT kommt der „*Polymerase Chain Reaction*“ (PCR) im Rahmen der molekularbiologischen Diagnostik eine wichtige Rolle zu (STRUTZBERG-MINDER et al., 2018). Zudem decken sich die serologischen Ergebnisse mitunter nicht mit dem Vorkommen von DNA pathogener Leptospiren in Nieren und Urin und erfordern daher den Nachweis des infizierenden Agens, um subklinische Trägartiere identifizieren zu können (FERREIRA et al., 2014).

Die PCR ermöglicht das Kopieren und Vervielfältigen von DNA (POWLEDGE, 2004). Dabei wird ein spezifischer DNA-Abschnitt durch

sich ständig wiederholende Abfolgen von Arbeitsschritten amplifiziert, wobei sich die Anzahl der identischen DNA-Fragmente nach jedem abgeschlossenen Zyklus verdoppelt (VALASEK & REPA, 2005). Aufgrund der sehr hohen Sensitivität und Spezifität können selbst geringste Mengen an DNA mittels PCR in einer Probe nachgewiesen werden (VALASEK & REPA, 2005).

Konventionelle PCR-Assays gelten heutzutage als unzureichend evaluiert und verfügen daher nur über einen fraglichen diagnostischen Wert (MERIEN et al., 1992; BROWN et al., 1995). Daher wurden sie durch die schnellere quantitative „real-time“ PCR (qPCR) ersetzt, welche den Nachweis und die Quantifizierung des amplifizierten Produkts zeitgleich ermöglicht, wobei wie bei herkömmlichen PCRs sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität als sehr hoch gelten und das Kontaminationsrisiko als gering bewertet wird (ESPY et al., 2006; PICARDEAU, 2013). Die Quantifizierung erfolgt mithilfe von Fluoreszenz-Messungen, die während eines PCR-Zyklus in Echtzeit erfasst werden. Dabei gilt die Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR-Green zwar als sensitiv, aber nicht so spezifisch wie die Methode, die auf dem Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) mit TaqMan-Sonden basiert (MUSSO & LA SCOLA, 2013).

Die meisten PCRs für den Nachweis von Leptospiren detektieren entweder Gene, die in allen Bakterien zu finden sind (wie zum Beispiel 16S RNA-Gene), oder ausschließlich in pathogenen Leptospiren (wie *lipL21*, *LipL32*, *lipL41*, *ligA* und *ligB*) (THAIPADUNPANIT et al., 2011). Diese können allerdings nicht die infizierende Serovar detektieren (OIE, 2021). Mittlerweile sind allerdings auch multiplex „real time“ PCRs entwickelt worden, die die Expression mehrerer Gene gleichzeitig (*LipL32* und  $\beta$ -*actin*) nachweisen können (FERREIRA et al., 2014). Somit ermöglichen sie sowohl das Detektieren von als auch das Differenzieren zwischen verschiedenen Leptospirenservaren und damit Rückschlüsse auf den möglicherweise ursächlich infizierenden Serovarentyp (FERREIRA et al., 2014). Allerdings beschränkt sich diese Tatsache auf die pathogenen Leptospiren, die der Subclade 1 angehören (PÉREZ et al., 2020). Um neben den pathogenen Leptospiren der Subclade P1 auch diejenigen der Subclade 2 detektieren zu können, wurden multiplex real-time PCRs

entwickelt, die drei spezifische Regionen auf dem 16S RNA-Gen detektieren (PÉREZ et al., 2020).

#### **4.2.1.1. Geeignetes Untersuchungsmaterial für die PCR**

Wie Studien zeigen konnten, können Bakteriämien der Muttersau zur Infektion eines oder mehrerer Feten führen, wobei es zur Übertragung von Fetus zu Fetus kommen kann (NIELSEN et al., 1991). Dementsprechend müssen nicht alle Feten des Wurfs zum Zeitpunkt des Aborts infiziert sein und die Wahrscheinlichkeit, den Erreger zu diagnostizieren, steigt mit der Anzahl der untersuchten Feten. BENSON et al. (2002) empfehlen vier bis sechs Feten pro Wurf von mindestens drei Würfen zu untersuchen. Geht man davon aus, dass 50 % der Ferkel infiziert sind und ein Wurf im Schnitt aus 12 Ferkeln besteht, dann befindet sich mit einer Wahrscheinlichkeit von 90 bis 95 % ein infizierter Fetus unter den untersuchten Tieren (BENSON et al., 2002).

Der genaue Mechanismus, mit welchem Leptospiren die Plazentaschranke überwinden, ist bislang unbekannt (PICARDEAU, 2017). Sobald die Plazentaschranke überwunden ist, können Leptospiren via horizontaler Übertragung von Frucht zu Frucht und folgender Septikämie in allen fetalen Geweben nachweisbar sein (ELLIS, 2006).

Zum Nachweis von Leptospiren mittels PCR eignen sich Vollblut (VILLUMSEN et al., 2012), Serum (SMYTHE et al., 2002), Urin (MIOTTO et al., 2018), Niere, Leber und Plazenta (FORNAZARI et al., 2012).

LOURDAULT et al. (2009) konnten die höchsten Nachweisraten ( $5 \times 10^4$  Leptospiren  $\text{ml}^{-1}$ ) fünf Tage post infectionem in Leber- und Nierengewebe nachweisen. Während der akuten Phase ist die PCR vom Blut des infizierten Tieres hoch sensitiv (NILOOFA et al., 2015) und ermöglicht einen zeitnahen Nachweis der pathogenen Leptospirenstämme (PICARDEAU et al., 2014).

Des Weiteren empfehlen ALTHOUSE et al. (2019) fetalen Mageninhalt zur Abklärung möglicher bakterieller Abortursachen zu untersuchen, da dieser meist nur minimal kontaminiert ist. Dafür wird die Magenwand mithilfe einer Spritze penetriert und anschließend der Mageninhalt mittels

Aspiration gewonnen (UNTERWEGER et al., 2018; ALTHOUSE et al., 2019).

#### **4.2.1.2. Limitationen der PCR**

Vor allem in klinischen Proben kann eine Kontamination durch zum Beispiel Fäzes oder auch autolytische Prozesse zur Hemmung der Amplifikation und somit zu falsch negativen Ergebnissen führen (OIE, 2021). Deshalb sind Qualitätskontrollen, besondere Vorsicht bei der Durchführung von PCRs (MITCHELL et al., 2014) und die Verwendung geeigneten Materials (UNTERWEGER et al., 2018) von essentieller Bedeutung bei der molekularbiologischen Diagnostik von Leptospireninfektionen. Auch nach Behandlung kann es zu falsch negativen Testergebnissen kommen (NAUDET et al., 2022).

#### **4.2.2. Isolierung**

Die Anzucht aus klinischem Material bietet eine weitere Möglichkeit Leptospiren nachzuweisen (NARKKUL et al., 2020). Als obligat aerobe Bakterien ist die Zufuhr von Luft, sowie ein pH von 7,4 und eine Temperatur von 30 °C für optimales Wachstum notwendig (JOHNSON & FAINE, 1984). Auf den Agarplatten zeigen Leptospiren Kulturwachstum unterhalb der Oberfläche, bei einer durchschnittlichen Generationszeit von zwölf Stunden (JOHNSON & FAINE, 1984).

Die Isolierung von Leptospiren erweist sich als extrem schwierig und sehr zeitaufwendig und wird selbst heutzutage nur von spezialisierten Laboren erfolgreich durchgeführt (ELLIS & THIERMANN, 1986; BOLIN & CASSELLS, 1990; SCHÖNBERG et al., 1992; BOQVIST et al., 2003; STRUTZBERG-MINDER & KREIENBROCK, 2011).

Derzeit findet vor allem das auf dem Ölsäure-Albumin Medium basierte EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris) Medium bei der Anzucht von Leptospiren Anwendung (ELLINGHAUSEN & MCCULLOUGH, 1965; STRUTZBERG-MINDER & KREIENBROCK, 2011). Je nach Leptospirenstamm kann der Zusatz von 5-Fluorouracil, Gentamicin, Nalidixinsäure oder Rifampicin zum Verhindern von Kontaminantenwachstum oder bei klinischen Proben zusätzlich Pyruvat oder Kaninchenserum zur Erstisolierung nötig sein (ADLER & DE LA PENA

MOCTEZUMA, 2010).

Da Leptospiren bei der Erstisolierung häufig sehr langsam wachsen, sollten Kulturen mindestens 16 Wochen, besser bis zu 26 Wochen andauern, ehe sie verworfen werden können (OIE, 2021). Daher ist die Kultur meist für eine schnelle Diagnose ungeeignet (NAUDET et al., 2022).

#### **4.2.3. Immunochemische Färbetechniken und Histopathologie**

Leptospiren lassen sich sowohl mit Immunfluoreszenz als auch mit Immunhistochemie nachweisen (WILD et al., 2002). SAGLAM et al. (2022) fanden bei diesen beiden Methoden dieselben Nachweisraten. Allerdings ist die Effizienz dieser Nachweismethoden abhängig von der Anzahl der Organismen in der Probe, weshalb ihre Sensitivität geringer ist als die der Kultur und sie sich deshalb weniger für die Diagnostik chronischer Infektionen eignen, bei denen die Erreger meist nur in geringer Anzahl oder stark lokalisiert zu finden sind (OIE, 2021). Außerdem ermöglichen die immunochemischen Tests keine Identifizierung der infizierenden Serovar, weshalb die Ergebnisse dafür mit serologischen Methoden ergänzt werden müssten. Sie können dennoch von großem Nutzen sein, da sie den Nachweis von Leptospirenantigenresten zum Beispiel nach bereits erfolgter antibiotischer Therapie ermöglichen, während andere Methoden nur intakte Antigene nachweisen können (OIE, 2021).

Histopathologie mit Silberfärbung ist eine Nachweismethode, die auch bei formalin-fixiertem Gewebe vom Schwein angewendet wird, um Leptospiren nachzuweisen (BOLIN, 1994). Allerdings gilt auch für diese Methode, dass der Nachweis der infizierenden Serovar nicht möglich ist (BOLIN, 1994).

## **5. Bekämpfung**

Aufgrund der Tatsache, dass zahlreiche Säugetierarten als Reservoirwirte für die Leptospirose beim Schwein dienen können, ist die Bekämpfung und Kontrolle dieser Erkrankung komplex (NAUDET et al., 2022).

### **5.1. Vakzination**

Die Vakzination stellt eine vielversprechende Möglichkeit zur Reduktion

von gesundheitlichen und ökonomischen Folgen von Leptospireninfektionen beim Schwein dar (NAUDET et al., 2022).

Meist bestehen Leptospirenimpfungen für den tiermedizinischen Gebrauch aus Suspensionen von einer oder mehreren Serovaren von *Leptospira* spp., die so inaktiviert wurden, dass eine immunogenetische Aktivität bewahrt wird (OIE, 2021). Allerdings verleihen diese auf inaktivierten Bakterien basierenden Impfstoffe weder langanhaltende noch kreuz-protective Immunitäten (PICARDEAU, 2017). Die Leptospiren werden dafür in passenden Kulturmedien gezüchtet, welche oft auf Serum oder Serumproteinen basieren; sollte dies der Fall sein, so sollte das Serum bzw. dessen Proteine entfernt und nicht mehr im finalen Impfstoff enthalten sein (OIE, 2021).

In Deutschland ist seit dem 31. August 2016 ein Leptospirenimpfstoff für Schweine (Porcilis® Ery+Parvo+Lepto, Zulassungsnummer PEI.V.11798.01.1) der Intervet Deutschland GmbH zur intramuskulären Anwendung zugelassen (PAUL-EHRLICH-INSTITUT, 2016). Dieses Vakzin enthält inaktivierte Leptospirenstämme aus sechs verschiedenen Serogruppen, die in Tabelle 2 aufgeführt sind.

**Tabelle 2: Übersicht über die sechs im Porcilis® Ery+Parvo+Lepto enthaltenen inaktivierten Leptospirenstämme, Quelle: <https://www.msd-tiergesundheits.de/produkte/porcilis-eryparvolepto/>**

<b>Leptospirenstamm</b>	
1	<i>Leptospira interrogans</i> Serogruppe Canicola Serovar Portland-Vere (Stamm Ca-12-000)
2	<i>Leptospira interrogans</i> Serogruppe Icterohaemorrhagiae Serovar Copenhageni (Stamm Ic-02-001)
3	<i>Leptospira interrogans</i> Serogruppe Australis Serovar Bratislava (Stamm As-05-073)
4	<i>Leptospira kirschneri</i> Serogruppe Grippotyphosa Serovar Dadas (Stamm Gr-01-005)
5	<i>Leptospira interrogans</i> Serogruppe Pomona Serovar Pomona (Stamm Po-01-000)
6	<i>Leptospira santarosai</i> Serogruppe Tarassovi Serovar Gatuni (Stamm S1148/02)

## **5.2. Unterbrechung der Infektionskette**

Um die Quantität der in die Umwelt ausgeschiedenen Leptospiren und somit die Anzahl der potentiellen Neuansteckungen zu reduzieren, ist es wichtig, Faktoren, die das Überleben und Vervielfältigen des Erregers bestärken, zu identifizieren und nach Möglichkeit zu eliminieren (SOTO et al., 2022). Neben der Vakzination als einer möglichen Bekämpfungsstrategie, ist demnach die Unterbrechung von Infektionsketten, sowohl durch direkte, als auch durch indirekte Übertragung, von großer Relevanz (THEODORIDIS, 2004). Somit stellt die Bekämpfung der Überträgertiere, beispielsweise durch eine strikte Schädnerbekämpfung, ebenso wie eine Trennung, Therapie oder Ausmerzungen von infizierten Tieren, vor allem von ausscheidenden Tieren eines Bestandes, einen wichtigen Teil der Infektionsprophylaxe dar (THEODORIDIS, 2004). Ebenfalls ist eine Trennung der Tiergruppen (KEMENES & SÜVEGES, 1976) und gewissenhafte Kontrolle der Jungtieraufzucht zu empfehlen und ein für Leptospiren vorteilhaftes feuchtwarmes Mikroklima (beispielsweise auf Weiden, in Tränken oder Wasserstellen) zu vermeiden (PLONAIT, 2004b).

### III. MATERIAL UND METHODEN

Die vorliegende Studie wurde durch die Ethikkommission der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München unter dem Aktenzeichen 290-10-11-2021 genehmigt.

#### 1. Ziel dieser Arbeit

*Leptospira* spp. werden regelmäßig in Zusammenhang mit SMEDI (*stillbirth mummification embryonic death infertility*) gebracht. Genaue Beschreibungen zu diesem Thema sind jedoch in der Literatur sehr selten. Die vorliegende Arbeit soll Ansatzpunkte liefern, um die Diagnostik hinsichtlich einer Leptospireninfektion bei Vorliegen von SMEDI zu optimieren.

Folgende Arbeitshypothesen werden im Rahmen dieser Arbeit überprüft:

Mageninhalt von abortierten Tieren wird regelmäßig zu diagnostischen Zwecken hinsichtlich bakterieller Infektionen empfohlen. Mekonium, als der erste Kot des Ferkels, der sich während der Trächtigkeit im Darm ansammelt kann theoretisch ebenfalls Bakterienmaterial beinhalten. Im Fall von Leptospireninfektionen werden jedoch konkret Leber und Niere (Zielorgane) zur Diagnostik empfohlen. Daher wird folgende Hypothese überprüft:

- 1.) Mageninhalt bzw. Mekoniummaterial sind hinsichtlich der Nachweisrate von Leptospiren-DNA mittels PCR im Vergleich zum Nachweis aus Leber oder Niere überlegen oder zumindest gleichwertig.

Präkolostrale Blutproben können ebenfalls auf Leptospirenantikörper untersucht werden. Positive Befunde gelten als beweisend für eine Leptospireninfektion. Da im Fall von SMEDI wenige bis keine lebendgeborenen Ferkel erwartet werden und der Aufwand präkolostrale Blutproben zu gewinnen sehr hoch ist, wird folgende Arbeitshypothese überprüft:

- 2.) Herzblut von Ferkeln, deren Scheitel-Steiß-Längen ein Alter von mindestens 70 Tagen erwarten lassen, ist ebenso geeignet, um eine Leptospireninfektion eines Wurfes im Fall von SMEDI zu identifizieren wie der Nachweis von DNA aus Gewebeproben.

Der Nachweis von Antikörpern gegen Leptospiren im Serum von Muttertieren gilt derzeit als Goldstandard zum Nachweis einer Leptospireninfektion der Sau und der Diagnose von assoziierten Reproduktionsstörungen. Es wird folgende Arbeitshypothese überprüft:

- 3.) Die Untersuchung von Herzblut von SMEDI-Ferkeln deren Scheitel-Steiß-Länge ein Alter von mindestens 70 Tagen erwarten lässt, in Kombination mit der Untersuchung von Mageninhalt, Niere, Leber und Mekonium auf Leptospiren-DNA ist vergleichbar mit dem Einsatz des MATs mit Serum der Muttersau.

## 2. Untersuchungsmaterial

In die vorliegende Studie wurden aus insgesamt 358 frisch totgeborenen, autolytisch totgeboren oder mumifizierten Ferkeln von 40 Würfen aus 18 verschiedenen Beständen, die zur diagnostischen Abklärung hinsichtlich infektiöser Ursachen des vorliegenden SMEDI-Syndroms eingesandt wurden, 158 Ferkel mittels *stratified random sampling* ausgewählt. Die Einsender wurden gebeten, möglichst alle toten Ferkel eines SMEDI-Wurfs zu versenden. Die Würfe wurden im Zeitraum von September 2021 bis April 2022 gesammelt.

Von den Ferkeln wurden Organproben und andere Materialien auf das Vorkommen von *Leptospira* spp. mittels PCR untersucht. Des Weiteren wurde Herzblut gewonnen. Dieses wurde mittels MAT auf das Vorkommen von Antikörpern gegen Leptospiren untersucht.

Zusätzlich lag das Serum der Muttersauen zur serologischen Untersuchung auf Antikörper gegen *Leptospira* spp. vor (diagnostische Empfehlung der OIE). Die Untersuchungen auf SMEDI-Erreger inklusive Leptospirenantikörper und -antigene wurden an ein akkreditiertes Labor weitergeleitet. Weitere differentialdiagnostische Untersuchungen wurden an der LMU und ebenfalls in Fremdlaboren durchgeführt.

### 2.1. Bestandsebene

Es handelte sich bei allen 40 Würfeln um SMEDI-assoziierte Würfe, in denen ein gewisser Anteil an kleineren und größeren sowie frisch totgeborenen, autolytisch totgeborenen und mumifizierten Ferkeln vorkommt. Aus diesen Schichtungen („strata“) wurden vier Ferkel pro Wurf mittels stratified random sampling ausgewählt und in die Studie eingeschlossen. Ziel der Stratifizierung war es, aus jedem Wurf Ferkel der folgenden Gruppen in die Stichprobe einzuschließen: totgeborene (weiter unterteilt in frisch und autolytisch) und mumifizierte Ferkel.

Ein Überblick über die Studienpopulation auf Bestands- und Ferkelebene inklusive eingeschickter und untersuchter Ferkel, sowie dem Anteil untersuchter Ferkel pro Bestand ist in Tabelle 3 dargestellt.

**Tabelle 3: Studienpopulation auf Bestands- (n = 18), Wurf- (n = 40) und Einzeltierebene, inklusive eingeschickter (n<sub>gesamt</sub> = 358) und untersuchter Ferkel (n<sub>untersucht</sub> = 158) und Anteil untersuchter Ferkel pro Bestand (%)**

Bestand (Nr.)	Würfe (n = 40)	Ferkel		
		gesamt (n = 358)	untersucht (n = 158)	Anteil untersuchter Ferkel / Bestand (%)
1	2	9	8	88,89
2	3	18	12	66,67
3	2	28	8	28,57
4	3	16	12	75,00
5	1	4	4	100,00
6	4	61	16	26,23
7	1	3	3	100,00
8	2	18	8	44,44
9	1	5	4	80,00
10	5	71	20	28,17
11	3	40	12	30,00
12	2	13	8	61,54
13	1	4	4	100,00
14	1	12	4	33,33
15	1	5	4	80,00
16	4	30	16	53,33
17	2	8	7	87,50
18	2	13	8	61,54
	40	358	158	

Ein Bestand wurde als positiv gewertet, wenn im Probenmaterial von mindestens einem eingeschickten Ferkel Leptospiren-DNA nachweisbar war.

## **2.2. Serumproben der Sauen**

Die Serumproben wurden im Labor der Klinik für Schweine der Ludwig-Maximilians-Universität München bei 20 °C und 1300 g für zehn Minuten zentrifugiert (Rotanta 460R Zentrifuge, Andreas Hettich® GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland). Im Anschluss wurde das überstehende Serum in Reaktionsgefäße mit einem Fassungsvermögen von je 1,5 ml (Eppendorf® Safe-Lock Tubes, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) pipettiert.

Daraufhin wurde jedem Serum eine individuelle Nummer zugeordnet, die sich aus zwei Zahlen zusammensetzte, wobei die erste Zahl für den Bestand stand (1 bis 18) und die zweite Zahl für den Wurf im Bestand (1 bis maximal 5). Im Anschluss wurden die Proben bis zur weiteren Verarbeitung bei minus 20 °C tiefgefroren.

## **2.3. Studienpopulation auf Ferkelzebene**

Die eingeschickten Ferkel wurden wurfweise im Institut der Tierpathologie der LMU München aufgetaut.

Im Anschluss erfolgte die Ermittlung des Gewichtes (g) mittels einer Neigungswaage (Typ Bizerba ASE C109 Nr. 93 251 August Sauter KG, Ebingen/ Württ) und die Erhebung der SSL (mm) mittels eines Maßbandes. Anschließend wurden die Tiere nach aufsteigender SSL auf dem Sektionstisch angeordnet. Daraufhin bekam jedes Ferkel eine Nummer, die sich aus drei Zahlen zusammensetzte: die erste Zahl stand für den Bestand, die zweite für den Wurf und die dritte für das Ferkel, aufsteigend mit steigender SSL. Diese dreiteilige Nummer wurde gemeinsam mit dem individuellen Gewicht und der SSL auf einem Zettel notiert und dieser wurde neben das dazugehörige Ferkel gelegt. Jeder Wurf wurde im Anschluss fotodokumentiert, siehe Abbildung 1.



**Abbildung 1: Ferkel des Wurfs Nummer 2.2. mit der jeweiligen dreiteiligen Nummer der einzelnen Ferkel inklusive Gewicht (g) und SSL (cm), sowie Übersichtszettel mit den zusätzlichen Daten aus dem Fragebogen (Foto: Klinik für Schweine der LMU München)**

Auf dem phänotypischen Erscheinungsbild des Ferkels basierend, wurde für jeden Wurf notiert, welches und wie viele Ferkel totgeboren (vor der Lungenschwimmprobe) oder mumifiziert waren. Die totgeborenen Ferkel wurden makroskopisch weiter eingeteilt in frisch totgeborene und

autolytisch totgeborene Ferkel. Die Klassifizierung „mumifiziert“ erhielten diejenigen Tiere, die die im Literaturteil beschriebene braune Verfärbung der Haut durch Entfärbungsprozesse und aufgrund der Dehydratation eingefallene Augen aufwiesen. Als autolytisch totgeboren wurden diejenigen Ferkel klassifiziert, die aufgrund von bakterieller Zersetzung und Hämolyse eine Verfärbung der Haut, aber keine Dehydratation aufwiesen. Die totgeborenen Ferkel, die makroskopisch weder Mumifikation noch Autolyse aufwiesen, wurden als frisch totgeboren klassifiziert.

Bevor die Tiere, die in die Studie eingeschlossen wurden, beprobt wurden, wurde makroskopisch das Geschlecht bestimmt.

#### **2.4. Auswahl der zu untersuchenden Ferkel**

Da BENSON et al. (2002) empfehlen vier bis sechs Feten pro Wurf von mindestens drei Würfen zu untersuchen, wurden vier Ferkel pro Wurf untersucht. Davon ausgehend, dass 50 % der Ferkel infiziert sind und ein Wurf im Schnitt aus 12 Ferkeln besteht, befindet sich mit einer Wahrscheinlichkeit von 90 bis 95 % ein infizierter Fetus unter den untersuchten Tieren (BENSON et al., 2002). Um in der Studienpopulation vergleichbare Anteile der mumifizierten, frisch und autolytischen totgeborenen und lebensschwachgeborenen Ferkel zu beproben, wurden die Studientiere mittels *stratified random sampling* ausgewählt. Abhängig von der Anzahl der eingeschickten Ferkel (n) wurde der Wurf in gewissen Abständen beprobt, siehe Tabelle 4.

**Tabelle 4: Übersicht über die Anzahl der zu beprobenden Ferkel in Abhängigkeit von der Wurfgröße (Anzahl Ferkel pro Wurf)**

n (Anzahl der Ferkel gesamt)	Beprobung jedes "x-ten" Ferkels	Hinweis
20	5	
19	5	
18	5	
17	4	
16	4	
15	4	
14	4	
13	3	
12	3	
11	3	
10	3	
9	2	
8	2	
7	2	
6	2	
5	1	
4	1	jedes Ferkel
3	1	jedes Ferkel
2	1	jedes Ferkel
1	1	jedes Ferkel

Um die Anteile der oben definierten Gruppen (mumifizierte, autolytisch totgeborene und frisch totgeborene Ferkel) innerhalb der 158 Studentiere entsprechend ihrer Anteile an den insgesamt 358 eingeschickten Tieren zu beproben, wurde der Startpunkt, bei dem die Auswahl der vier zu beprobenden Ferkel begann, pro Wurf um ein Ferkel nach hinten verschoben, siehe Tabelle 5.

**Tabelle 5: Übersicht über die Auswahl des Ferkels, bei der das Zählen für die Probenentnahme begann**

<b>Nummer Wurf</b>	<b>Startpunkt Ferkel</b>	<b>Studienwurf</b>
1	1	1.1.
2	2	1.2.
3	3	2.1.
4	4	2.2.
5	1	2.3.
6	2	3.1.
7	3	3.2.
8	4	4.1.
9	1	4.2.
10	2	4.3.
11	3	7.1.
12	4	5.1.
13	1	6.1.
14	2	6.2.
15	3	6.3.
16	4	6.4.
17	1	8.1.
18	2	8.2.
19	3	9.1.
20	4	10.1.
21	1	10.2.
22	2	10.3.
23	3	10.4.
24	4	10.5.
25	1	11.1.
26	2	11.2.
27	3	11.3.
28	4	12.1.
29	1	12.2.
30	2	13.1.
31	3	14.1.
32	4	15.1.
33	1	16.1.
34	2	16.2.
35	3	16.3.
36	4	16.4.
37	1	17.1.
38	2	17.2.
39	3	18.1.
40	4	18.2.

### **3. Probenentnahme**

#### **3.1. Probenentnahme für die molekularbiologische Untersuchung der Ferkel**

Die Probenentnahme fand im Institut der Tierpathologie der LMU München statt. Vor der eigentlichen Probenentnahme wurde zunächst die Brusthöhle eröffnet und ein Stück der Lunge entnommen, um via Lungenschwimmprobe zu testen, ob diese schon einmal ventiliert wurde. Dazu wurde ein Stück der Lunge in ein mit Wasser gefülltes Behältnis gegeben. Hat das Ferkel bereits geatmet, so wurde die Lunge belüftet und schwimmt auf der Wasseroberfläche. Tiere, deren Lungenschwimmprobe positiv ausfielen, wurden retrospektiv als lebensschwachgeboren klassifiziert.

Die Entnahme der Proben erfolgte anschließend in immer gleichbleibender Reihenfolge: Im Anschluss an die Eröffnung des Abdomens wurde der Mageninhalt nach Penetration der Magenwand durch Aspiration mit einer Spritze gewonnen. Anschließend wurde Leber- und Nierengewebe und zuletzt Mekoniummaterial aus dem Enddarm entnommen.

Das Sektionsbesteck wurde zwischen den einzelnen Organproben zur Sterilisation zunächst in 96-prozentigen Alkohol getaucht und anschließend über einem Bunsenbrenner abgeflammt.

Während der gesamten Probenentnahme wurden Einmalhandschuhe getragen, die nach jedem Ferkel gewechselt wurden, um Kontaminationen zu vermeiden.

Die Proben wurden einzeln in Reaktionsgefäße mit einem Fassungsvermögen von 1,5 ml (Eppendorf® Safe-Lock Tubes, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) gefüllt und mit der dreistelligen Ferkelnummer, sowie dem Kürzel „Ma“ für Mageninhalt, „Le“ für Leber, „Ni“ für Niere und „Me“ für Mekonium beschriftet, sodass jeder Probe genau ein Ferkel zuzuordnen war.

Aus den Einzelproben wurde im Anschluss für jedes Ferkel eine Poolprobe

hergestellt. Dafür wurde jeweils Mageninhalts-, Leber-, Nieren- und Mekoniummaterial eines Ferkels in ein Reaktionsgefäß mit einem Fassungsvermögen von 1,5 ml (Eppendorf® Safe-Lock Tubes, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) gefüllt und mit der dreistelligen Ferkelnummer sowie „Pool“ beschriftet. Das dafür benutzte Besteck wurde bei jedem Zwischenschritt erneut abgeflammt, um Kontamination zu vermeiden.

Die beschrifteten 632 Einzel- und die 158 Poolproben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei minus 20 °C tiefgefroren.

### **3.2. Serologische Untersuchung der Ferkel**

#### **3.2.1. Auswahlkriterium für die serologische Untersuchung**

Mithilfe folgender Formel nach KIRKWOOD et al. (2012) kann das Alter eines Ferkels anhand seiner SSL geschätzt werden:

$$\text{Alter (entsprechend der Trächtigkeitstage)} = \text{SSL (in cm)} \times 3 + 21$$

Tiere, die ein errechnetes Alter von über 70 Tagen, ergo eine SSL über 160 mm hatten und nicht mumifiziert waren, wurden in die serologische Untersuchung eingeschlossen, um Antikörper zu detektieren.

#### **3.2.2. Herzblut-Probenentnahme bei Ferkeln**

Die oben genannten Kriterien ( $\text{SSL} \geq 160$  mm und nicht mumifiziert) trafen für 110 Ferkel zu. Bei diesen Tieren ging man anhand ihres mittels der SSL errechneten Alters davon aus, dass sie alt genug waren, um Antikörper zu bilden. Allerdings konnte nur bei 104 dieser Tiere Herzblut mittels Aspiration aus den Herzohren und -kammern mit einer Spritze entnommen werden.

Das gewonnene Herzblut wurde ebenfalls in Reaktionsgefäße mit einem Fassungsvermögen von 1,5 ml (Eppendorf® Safe-Lock Tubes, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) gefüllt und bis zur weiteren Verarbeitung bei minus 20 °C tiefgefroren.

## 4. Labordiagnostik

Die Labordiagnostik fand in dem akkreditierten Labor der IVD GmbH Albert-Einstein-Str. 5, 30926 Seelze-Letter statt. Die IVD wurde am 01.07.2018 von der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) zum Konsiliarlabor für *Leptospira* spp. ernannt.

### 4.1. Molekularbiologische Diagnostik

Die molekularbiologische Untersuchung erfolgte ebenfalls im Labor der IVD GmbH Albert-Einstein-Str. 5, 30926 Seelze-Letter.

Die Poolproben, bestehend aus Nieren-, Leber-, Mageninhalt- und Mekoniummaterial (erster Kot des Ferkels, der sich während der Trächtigkeit im Darm ansammelt) jeweils eines Ferkels, wurden mittels einer laborinternen Kombination aus einer LipL32-multiplex-PCR nach FERREIRA et al. (2014) und einer Multiplex-PCR auf Basis des 16S RNA-Gens nach PÉREZ et al. (2020) auf das Vorkommen von Leptospiren-DNA untersucht.

Die LipL32-multiplex-PCR dient dabei im Rahmen eines Screenings dem Nachweis des für pathogene Leptospiren charakteristischen LipL32-Gens, wobei ein Set an speziesspezifischen Sonden und entsprechende flankierende Primer genutzt werden.

Die Multiplex Real-Time PCR nach PÉREZ et al. (2020) ermöglicht auf Basis des 16S RNA-Gens die Differenzierung zwischen den pathogenen Subclades P1 und P2.

Anschließend wurden die positiv getesteten Poolproben aufgelöst und einzeln ebenfalls auf das Vorkommen von LipL32 untersucht und die Differenzierung zwischen der Subclade P1 und P2 durchgeführt.

Dabei wurde entsprechend den Angaben des ausführenden Labors ein ct-Wert kleiner als 37 als positiv, ein ct-Wert von 37 bis 40 als schwach positiv gewertet. Der ct-Wert gibt den Zyklus der PCR-Reaktion an, in dem ein spezifisches Amplifikat entsteht. Je niedriger der ct-Wert, umso höher ist die Last an Erregern in der Ausgangsprobe. Im Folgenden werden die beiden PCR-Assays beschrieben, die von der IVD kombiniert wurden.

#### **4.1.1. Screening mittels LipL32-multiplex-PCR**

Die Leptospiren-DNA wird unter Anleitung des QIAamp DNA-Extraktionskits entsprechend den Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilde, Deutschland) isoliert.

Der Reaktionsmix, mit dem die PCR durchgeführt wird, hat ein Volumen von 20 µl, bestehend aus SsoFast Sonden-Supermix, 400 nM von jedem Primer, 150 nM der TaqMan Sonden, DNase-freies Wasser (GIBCO) und 5 µl der Probenlösung. Negativkontrollen ohne Probenlösung werden untersucht, um Kontamination auszuschließen.

Dieser Sonden-Primer-Probenmix wird im Anschluss erhitzt (zwei Minuten bei 95 °C), worauf 45 Zyklen mit jeweils 5 Sekunden bei 95 °C (Denaturierung) und 35 Sekunden bei 60 °C (Elongation / Annealing) folgen. Die Datenanalyse erfolgt den Angaben des Herstellers folgend.

#### **4.1.2. Differenzierung mittels Multiplex-qPCR auf Basis des 16S RNA-Gens**

Die Leptospiren-DNA wird mit einem automatischen Extraktionsprotokoll von KingFischer Flex (Thermofischer scientific) mit dem MagMax CORE Nucleic Acid Purification Kit (Thermofischer scientific) isoliert. Die einzelnen Schritte erfolgen nach Anweisung des Herstellers. Zunächst werden 25 µg der Probe in 1 ml 1X PBS mit dem Bead Bud Microtube Homogenizer (Benchmark Model D1030) bei 3800 Umdrehungen pro Minute homogenisiert.

100 µl dieses Gewebehomogenates werden im folgenden Schritt mit Perlen und Proteinase K für zwei Minuten auf eine Rüttelplatte mit 100 bis 150 Umdrehungen pro Minute gegeben. Lyse- und Waschpuffer werden nach Herstellerangaben hinzugefügt. Anschließend wird die DNA nach den Angaben des MagMax Pathogen High Volume DW 96 Protokolls extrahiert.

Nach Zugabe des Primer-Sonden-Mixes werden die Proben auf 95 °C (für 30 Sekunden) erhitzt, worauf 40 Zyklen bestehend aus abwechselnden Temperaturwechseln von 95 °C für fünf Sekunden (Denaturierung) und anschließenden 20 Sekunden bei 60 °C mit gleichzeitiger Auswertung der

Fluoreszenzdaten (Elongation / Annealing) folgen.

#### 4.2. Serologische Diagnostik

Blutproben der Muttersauen, die in dieser Studie untersucht wurden, wurden von den bestandsbetreuenden Tierärzten im Rahmen der diagnostischen Aufarbeitung der SMEDI-Fälle entnommen und ebenso wie die Herzblutproben der Ferkel an die IVD GmbH weitergeleitet. Dort wurden sie mittels MAT gemäß der Standards des Manuals der OIE aus 2000 (OIE, 2000) auf das Vorkommen von Antikörpern gegen Leptospiren untersucht.

Da das Serum von 4 Sauen hämolytisch verändert war, konnten insgesamt 36 Serumproben mittels MAT untersucht werden. Ein Titer von  $\geq 100$  wurde als positiv gewertet. Gemäß der „*World Organisation for Animal Health*“ (OIE, 2000) gelten Titer von 1:100 in der Endverdünnung als signifikant für eine Infektion mit Leptospiren.

Die Seren wurden auf das Vorkommen von Antikörpern gegen die elf Serogruppen / Serovaren untersucht, die in Tabelle 6 aufgeführt sind. Alle elf Serovaren sind der Subclade P1 zuzuordnen (VINCENT et al., 2019).

**Tabelle 6: Übersicht über die elf im MAT verwendeten Serogruppen / Serovaren**

Serogruppe	Serovar
Australis	Australis Bratislava
Autumnalis	Autumnalis
Canicola	Canicola
Grippotyphosa	Grippotyphosa
Icterohaemorrhagiae	Copenhageni Icterohaemorrhagiae
Pomona	Pomona
Sejroe	Hardjo Sejroe
Tarassovi	Tarassovi

Die verwendeten Verdünnungsreihen begannen bei einer Verdünnung von 1:100 und wurden bis zu einer Verdünnungsstufe von 1:3200 durchgeführt. Dafür wurden lebende Antigene dieser elf Serovaren mit

dem gleichen Volumen der Serumproben der Ferkel / Sauen gemischt und die Agglutination in den verschiedenen oben genannten Verdünnungsstufen beurteilt, so wie es im Kapitel 3.1.12 des OIE Manuals beschrieben ist. Als Testergebnis wurde diejenige Endverdünnung des Serums (1 / 100, 1 / 400, etc.) angegeben, bei der 50 % der zugegebenen Leptospiren aufgrund von Antigen-Antikörper-Bindungsreaktionen agglutiniert sind beziehungsweise 50 % der Zellen im Vergleich zur halbverdünnten Kontrollkultur frei bleiben (OIE, 2000). Als Titer gilt der Kehrwert der Endverdünnung (100, 400 etc.) (OIE, 2000).

## 5. Fragebogen

Den Betriebsleitern\*innen der in die Studie inkludierten Bestände wurde ein Fragebogen (siehe Anhang) zur freiwilligen Teilnahme zugeschickt, mit der Bitte, bestands- und wurfspezifische Daten anzugeben.

Neben allgemeinen Angaben (Name und Anschrift des Bestandes und des Tierarztes zur Befundübermittlung und Zuordnung der Ergebnisse) wurden Daten zum Bestand (Management von Auslauf, Stroheinstreu, Jungsauquarantäne, Schadnagerbekämpfung und die Reproduktionsparameter Durchgänge pro Sau pro Jahr, Remontierungs-, Umrausch- und Abortrate), Management und Vakzination erhoben. Außerdem wurden Angaben zum Wurf (Parität der Sau, Geburts- / Abortdatum, Anzahl lebendgeborener, totgeborener und mumifizierter Ferkel) und zur SMEDI-Historie sowie zu bereits erfolgten Behandlungen abgefragt.

Die Trächtigkeitsdauer wurde errechnet, indem gezählt wurde, wie viele Tage zwischen dem Inseminationsdatum und dem Geburtsdatum lagen.

## 6. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte durch die Programme IBM SPSS Statistics® (Version 26.0. IBM® SPSS Inc., Chicago, IL, USA) und Microsoft Excel® (2016, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA).

Das Signifikanzniveau der Untersuchung lag bei 5 % ( $p = 0,05$ ). Das Konfidenzintervall wurde auf 95 % festgelegt.

Assoziationen von nominalen / dichotomen Variablen mit dem PCR-Ergebnis der Ferkel bzw. dem MAT-Ergebnis der Sauen wurden mit dem Chi<sup>2</sup>-Test nach Pearson ermittelt. Waren mehrere unabhängige Variablen mit einer abhängigen Variable assoziiert, wurde im Anschluss eine binär-logistische Regression durchgeführt.

Metrisch skalierte Daten wurden zunächst mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung getestet (siehe Tabelle 22 und Tabelle 23 im Anhang). Aufgrund der nicht gegebenen Normalverteilung wurden im Anschluss nicht-parametrische Tests durchgeführt.



## **IV. ERGEBNISSE**

### **1. Deskriptive Auswertung der Studienpopulation**

#### **1.1. Auswertung der Studienpopulation auf Bestandsebene**

##### **1.1.1. Beschreibung der Bestände nach Größe und Lokalisation**

Im Mittel lag die Anzahl produzierender Sauen bei 761 pro Bestand (Minimum: 83, Maximum: 2800, Standardabweichung: 722,79).

9 (50 %) der 18 Bestände stammten aus Bayern, 4 (22,2 %) aus Niedersachsen, 3 (16,7 %) aus Nordrhein-Westfalen und jeweils ein Bestand (5,6 %) stammte aus Thüringen und Baden-Württemberg.

##### **1.1.2. Beschreibung der Impfschemata der Bestände**

Auf insgesamt zwei der 18 Bestände (11,11 %) wurde eine Bestandsimpfung gegen Leptospiren durchgeführt. Von den 158 in die Studie eingeschlossenen Ferkeln stammten 15,19 % (24 / 158) aus Beständen, in denen gegen Leptospiren geimpft wurde. Eine Übersicht über die durchgeführten Bestandsimpfungen inklusive der Impfungen gegen PPV und PCV2 ist in Tabelle 21 im Anhang zu finden.

##### **1.1.3. Beschreibung der Reproduktionsschemata der Bestände**

Die Bestände wurden anhand der Angaben aus den Fragebögen in solche mit niedrigeren und höheren Remontierungsraten / Jahr ( $\leq 40$ ;  $> 40$ ) und mit weniger und mehr Abferkelungen / Sau / Jahr ( $\geq 2,3$ ;  $< 2,3$ ) als der Durchschnitt in Deutschland nach dem deutschen statistischen Bundesamt eingeteilt (BUNDESAMT, 2022). Während 66,7 % (12 / 40) der Bestände eine Remontierungsrate von maximal 40 % pro Jahr angaben, hatten 33,3 % (6 / 40) eine Remontierungsrate über 40 %. In Bezug auf die Abferkelungen hatten 66,7 % (12 / 40) der Bestände weniger als 2,3 Abferkelungen / Sau / Jahr, während 33,3 % (6 / 40) der Bestände mindestens 2,3 Abferkelungen / Sau / Jahr verzeichnen konnten.

## 1.2. Auswertung der Studienpopulation auf Wurf- / Sauenebene

### 1.2.1. Beschreibung der Paritäten der Sauen

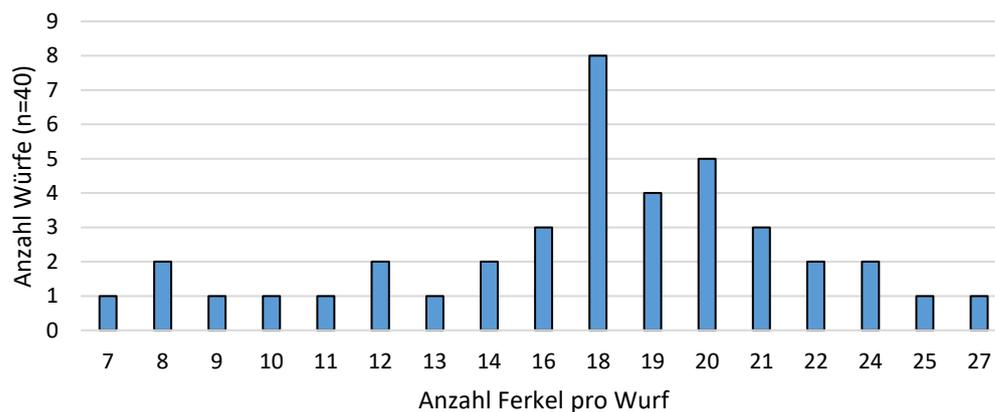
Einen Überblick über die mithilfe des Fragebogens ermittelten Paritäten der 40 Sauen sowie die Sauen und beprobten Ferkel (n / %) in Abhängigkeit von der Parität der Sau gibt Tabelle 7.

**Tabelle 7: Sauen und beprobte Ferkel (n / %) in Abhängigkeit von der Parität der Sau**

Parität der Sau	n ( %)	
	Sauen	beprobte Ferkel
1	5 (12,5)	20 (12,66)
2	6 (15,0)	24 (15,19)
3	7 (17,5)	28 (17,72)
4	9 (22,5)	35 (22,15)
5	6 (15,0)	23 (14,56)
6	1 (2,5)	4 (2,53)
8	5 (12,5)	20 (12,66)
9	1 (2,5)	4 (2,53)
gesamt	40 (100)	158 (100)

### 1.2.2. Beschreibung der Anzahl der Ferkel pro Wurf

Die Anzahl der Ferkel pro Wurf ist in Abbildung 2 dargestellt.



**Abbildung 2: Anzahl der Ferkel pro Wurf nach Anzahl der Würfe (n = 40)**

### 1.3. Auswertung der Studienpopulation auf Ferkelebene

#### 1.3.1. Beschreibung der randomisiert ausgewählten Studienpopulation nach Phänotyp

Einen Überblick über die Anteile der phänotypischen Erscheinungsbilder der Ferkel in der Gesamtpopulation (n = 358) im Vergleich zur mittels *stratified random sampling* ausgewählten Studienpopulation (n = 158) gibt Tabelle 8.

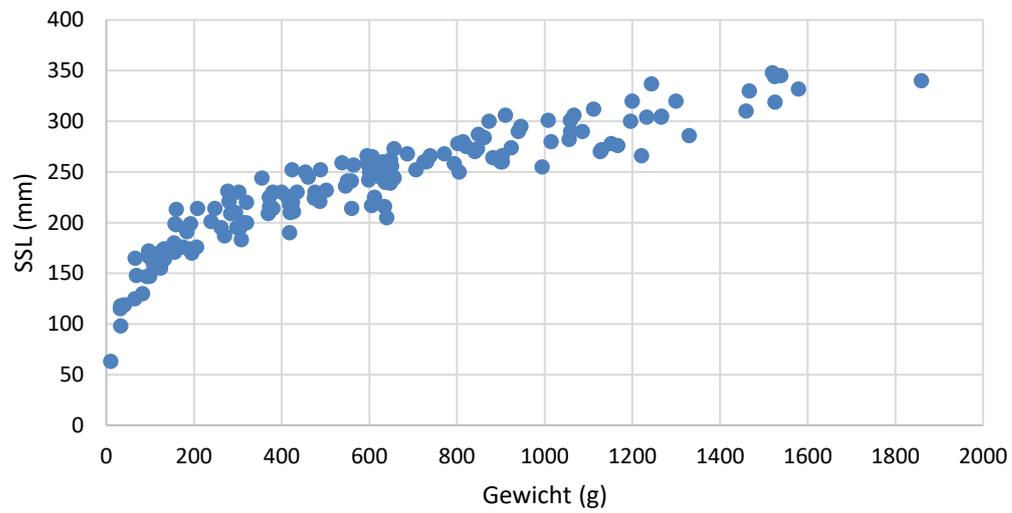
**Tabelle 8: Anteile (%) der Phänotypen innerhalb der Gesamtpopulation (n = 358) im Vergleich zur randomisiert ausgewählte Studienpopulation (n = 158)**

Phänotyp		% der Gesamt- population (n / n)	% der Studien- population (n / n)
Mumifiziert		30,45 % (109 / 358)	30,38 % (48 / 158)
Totgeboren	autolytisch	21,79 % (78 / 358)	21,52 % (34 / 158)
	frisch	44,41 % (159 / 358)	41,14 % (65 / 158)

Von den 158 Ferkeln waren 46,20 % (73 / 158) männlich, 53,20 % (84 / 158) weiblich; das Geschlecht eines Tieres (0,60 %) wurde als Free-Martins kategorisiert. Bei der Lungenschwimmprobe zeigten 93 % (147 / 158) der Ferkel ein negatives Ergebnis und 7 % (11 / 158) ein positives Ergebnis. Somit wurden diese 11 Tiere retrospektiv als lebensschwachgeboren klassifiziert.

#### 1.3.2. Gemessene Scheitel-Steiß-Längen (mm) und Gewichte (g)

Eine Übersicht über die Verteilung der Scheitel-Steiß-Längen (mm) in Abhängigkeit zum Körpergewicht (g) innerhalb der 158 beprobten Studientiere gibt Abbildung 3.



**Abbildung 3: Verteilung der Scheitel-Steiß-Längen (mm) und Gewichte (g) innerhalb der beprobten Studienpopulation (n = 158)**

## 2. Molekularbiologische Ergebnisse

### 2.1. Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung auf pathogene Leptospiren mittels LipL32-Screening

Das Screening mittels qPCR auf das für pathogene Leptospiren spezifische Gen LipL32 in Gewebepoolproben von Ferkeln aus SMEDI-assoziierten Würfen ergab, dass insgesamt 12,66 % (20 / 158) der untersuchten Ferkel aus 15 % (6 / 40) der Würfe von 11,11 % (2 / 18) der Bestände positiv für *Leptospira* spp. waren.

Aus einem positiven Bestand (Bestandsnummer 3.) stammten insgesamt zwei Würfe, von denen beide (Wurfnummern 3.1. und 3.2.) positiv waren. Aus dem anderen positiven Bestand (Bestandsnummer 10.) stammten fünf Würfe, wovon 4 / 5 (80 %) positiv waren (Wurfnummern 10.1., 10.2., 10.3., 10.5.).

Dabei handelte es sich bei 2 / 6 (33,33 %) Würfen um primipare Elterntiere und bei 4 / 6 (66,67 %) waren die Sauen multipar. Keine der Muttersauen der *Leptospira* spp. positiven Würfe war gegen Leptospiren geimpft.

#### 2.1.1. Auswertung des LipL32-Screenings der Poolproben nach phänotypischem Erscheinungsbild der Ferkel

Die Auswertung des LipL32-Screenings unter Berücksichtigung des phänotypischen Erscheinungsbildes der Ferkel ergab, dass 16,7 % (8 / 48) aller Mumien, 30,3 % (10 / 33) aller autolytischen totgeborenen, 1,5 % (1 / 66) der frischen totgeborenen und 9,1 % (1 / 11) der retrospektiv als lebensschwach klassifizierten Ferkel positiv auf pathogene *Leptospira* spp. getestet wurden.

Dabei lag die Nachweisrate von *Leptospira*-spp.-DNA mittels LipL32-Screening bei autolytisch totgeborenen Ferkeln signifikant höher als bei frisch totgeborenen Ferkeln ( $p = 0,000$ ; OR 28,261; KI: 3,427 – 233,091) und bei mumifizierten Ferkeln ebenfalls signifikant höher als bei frisch totgeborenen Ferkeln ( $p = 0,003$ ; OR 13,000; KI: 1,567 – 107,859).

Unter Berücksichtigung der PCR-positiven Proben ergab sich folgendes Bild: 40 % (8 / 20) der im LipL32-Screening positiv getesteten Ferkel waren mumifiziert, 50 % (10 / 20) der Ferkel waren autolytisch totgeboren,

5 % (1 / 20) der Ferkel waren frisch totgeboren und 5 % (1 / 20) der Ferkel waren als lebensschwachgeboren klassifiziert. Die quantitative Auswertung der PCR-Ergebnisse unter Berücksichtigung des Phänotyps ist in Tabelle 9 integriert.

**Tabelle 9: Anteile der einzelnen Phänotypen an den 20 im LipL32-Screening positiv getesteten Poolproben, sowie Mittelwerte der ct-Werte (inklusive Minimum, Maximum und Standardabweichung)**

Phänotyp		positive Proben % (n / n)	Mw. (ct) (Min. / Max. / SD)
Mumifiziert		40 % (8 / 20)	36,88 (33 / 39 / 1,808)
Totgeboren	Frisch	5 % (1 / 20)	34,00 (34 / 34 / -)
	Autolytisch	50 % (10 / 20)	35,90 (34 / 39 / 1,449)
Lebensschwachgeboren		5 % (1 / 20)	36,00 (36 / 36 / -)

In Bezug auf die gesamte Studienpopulation (n = 158) konnte mittels binär logistischer Regression gezeigt werden, dass die Chance, Leptospiren mittels PCR nachzuweisen 5,452-fach erhöht ist, wenn das untersuchte Ferkel einen autolytischen Phänotyp aufweist, siehe Tabelle 10.

**Tabelle 10: Assoziation des autolytischen Phänotyps mit dem Ergebnis des LipL32-Screenings der Ferkel aus SMEDI-assoziierten Würfen**

Unabhängige Variable	Abhängige Variable	p-Wert		Konfidenzintervall		
		Chi <sup>2</sup> -Test	Binär log. Regression	OR	Unteres	Oberes
autolytisch (ja / nein)	PCR (positiv / negativ)	< 0,001	0,001	5,452	2,074	14,332

Von den 20 im LipL32-Screening positiv getesteten Ferkeln waren 50 % (10 / 20) autolytisch, während von den 138 im LipL32-Screening negativ getesteten Ferkeln 17,39 % (24 / 138) autolytisch waren.

Aufgrund der Tatsache, dass alle ct-Werte des LipL32-Screenings auf

pathogene *Leptospira* spp. so eng beieinanderlagen (Minimum 33, Maximum 39), wurde auf eine weitere statistische quantitative Auswertung mittels nicht-parametrischer Tests verzichtet.

### 2.1.2. Ergebnisse des LipL32-Screenings auf pathogene *Leptospira* spp. im Gewebevergleich

Die Ergebnisse des LipL32-Screenings auf pathogene *Leptospira* spp. der Einzelgewebeproben im Vergleich zu den Ergebnissen der Poolproben in Bezug auf die gesamte Studienpopulation (n = 158) und die LipL32-positiv getesteten Proben (n = 20) inklusive der ct-Mittelwerte (mit Minimum, Maximum und Standardabweichung) sind in Tabelle 11 aufgeführt.

**Tabelle 11: Vergleich der LipL32-Screening-Ergebnisse der Pool-, Nieren-, Leber-, Mageninhalt- und Mekoniumproben mit jeweiligen Anteilen an der gesamten Studienpopulation (n = 158) und an den positiven Proben aus dem LipL32-Screening (n = 20) in %; sowie Mittelwerte der ct-Werte mit Minimum, Maximum und Standardabweichung**

Material	Anteil			
	LipL32- pos. Proben (n)	Gesamte Studienpopul. (n = 158)	LipL32-pos. Proben (n = 20)	Mw. (Ct) (Min.; Max.; SD)
Pool (Ni, Le, Ma, Me)	20	12,66 %	100 %	36,20 (33; 39; 1,64)
Niere	19	12,03 %	95 %	34,68 (31; 38; 1,95)
Leber	17	10,76 %	85 %	35,47 (34; 38; 1,18)
Magen- inhalt	15	9,49 %	75 %	37,2 (35; 40; 1,52)
Meko- nium	14	8,86 %	70 %	36,57 (34; 39; 1,74)

Eine Übersicht über die 20 im LipL32-Screening der Poolproben positiv getesteten Ferkel mit den positiv-getesteten Einzelgeweben im Vergleich ist in Tabelle 12 aufgeführt.

**Tabelle 12: Mittels LipL32-Screening positiv getestete Ferkel (n = 20) mit Vergleich der positiven Gewebeproben (Niere-, Leber-, Mageninhalt- und Mekoniumproben)**

Bestand (Nr.)	Wurf (Nr.)	Ferkel (Nr.)	Pool	Niere	Leber	Mageninhalt	Mekonium	PCR-pos. Gewebe (n)
3.	3.1.	3.1.2.	X	X	X	X	X	5
		3.1.17.	X	X	X	X	X	5
	3.2.	3.2.1.	X	X	X	X	X	5
		3.2.3.	X	X	-	X	-	3
10.	10.1.	10.1.3.	X	X	X	X	-	4
		10.1.4.	X	X	X	X	-	4
		10.1.7.	X	X	X	X	-	4
		10.1.10.	X	X	X	-	X	4
	10.2.	10.2.1.	X	X	X	X	X	5
		10.2.3.	X	X	X	X	-	5
		10.2.5.	X	X	X	-	X	4
		10.2.7.	X	X	X	X	X	5
	10.3.	10.3.2.	X	-	-	-	-	1
		10.3.6.	X	X	X	X	X	5
		10.3.10.	X	X	X		X	4
		10.3.14.	X	X	X	X	-	4
	10.5.	10.5.1.	X	X	X	-	X	4
		10.5.4.	X	X	X	X	X	5
10.5.9.		X	X	X	X	X	5	
10.5.14.		X	X	-	X	X	4	
			20	19	17	15	14	

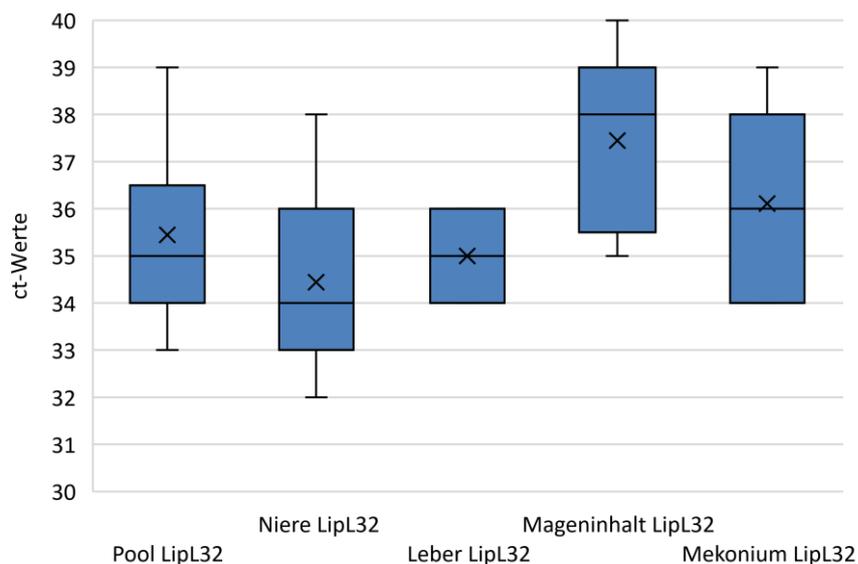
Es konnte keine Assoziation der Nachweishäufigkeit von *Leptospira* spp. mit dem getesteten Gewebe ermittelt werden ( $p = 0,184$ ).

Im Rahmen der statistischen quantitativen Auswertung des LipL32-Screenings wurden die ct-Werte der einzelnen Gewebe mittels Kruskal-Wallis-Test paarweise miteinander verglichen. Dabei konnten signifikant niedrigere ct-Werte bei den Nierenproben als bei den Mageninhaltproben ( $p = 0,001$ ) und im Gegensatz zu den ct-Werten der Mekoniumproben ( $p = 0,043$ ) gezeigt werden. Außerdem waren die ct-Werte der Leberproben signifikant niedriger als bei den Mageninhaltproben ( $p = 0,035$ ), siehe Tabelle 13.

**Tabelle 13: ct-Wertvergleich des LipL32-Screenings auf pathogene *Leptospira* spp. in Abhängigkeit des untersuchten Gewebes in SMEDI-assoziierten Ferkeln**

Gruppe	Paarweiser Vergleich der Gruppen	p-Wert Kruskal-Wallis-Test (nach Bonferroni)
(1) Niere (ct-Werte)	1 - 2	1,000
(2) Leber (ct-Werte)	1 - 3	<b>0,001</b>
(3) Mageninhalt (ct-Werte)	1 - 4	<b>0,043</b>
(4) Mekonium (ct-Werte)	2 - 3	<b>0,035</b>
	2 - 4	0,428
	3 - 4	1,000

Eine Übersicht der ct-Werte des LipL32-Screenings auf pathogene *Leptospira* spp. im Gewebevergleich ist der Abbildung 4 zu entnehmen.



**Abbildung 4: Darstellung der ct-Wert-Verteilung des LipL32-Screenings auf pathogene *Leptospira* spp. mittels Box-Plots im Gewebevergleich (Pool- (n = 20), Nieren- (n = 19), Leber- (n = 17), Mageninhalts- (n = 15) und Mekoniumproben (n = 14))**

## **2.2. Untersuchung mittels genotypspezifischer qPCR auf die Subclade P1 und P2 auf Basis der 16S RNA**

Die Untersuchung mittels genotypspezifischer qPCR auf Basis der 16S RNA in Gewebepoolproben von Ferkeln aus SMEDI-assoziierten Würfen ergab, dass 11,39 % (18 / 158) der untersuchten Ferkel aus 15 % (6 / 40) der Würfe von 11,11 % (2 / 18) der Bestände positiv auf die Subclade P1 getestet wurden.

### **2.2.1. Auswertung der genotypspezifischen qPCR der Poolproben nach phänotypischem Erscheinungsbild der Ferkel**

Die Auswertung der genotypspezifischen qPCR der Poolproben unter Berücksichtigung des phänotypischen Erscheinungsbildes der Ferkel in Bezug auf die Gesamtpopulation (n = 158) ergab, dass 16,70 % (8 / 48) aller Mumien, 1,5 % (1 / 66) der frisch totgeborenen, 27,27 % (9 / 33) aller autolytisch totgeborenen, und 0 % (0 / 11) der lebensschwachgeborenen klassifizierten Ferkel positiv auf die Subclade P1 getestet wurden.

Unter Berücksichtigung der P1-positiven Proben ergab sich folgendes Bild: 44,44 % (8 / 18) der P1-positiv getesteten Ferkel waren mumifiziert, 5,56 % (1 / 18) der Ferkel frisch totgeboren, 50 % (9 / 18) der Ferkel autolytisch und 0 % (0 / 18) der Ferkel lebensschwachgeboren. Diese Ergebnisse mit den Mittelwerten der ct-Werte inklusive Minimum, Maximum und Standardabweichung in Abhängigkeit vom Phänotyp der Ferkel sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

**Tabelle 14: Nachweisrate der Subclade P1 in Poolproben in Abhängigkeit vom Phänotyp der Ferkel und ct-Werte (inklusive Minimum, Maximum und Standardabweichung)**

Phänotyp	LipL- pos. Proben (n = 20)	P1- pos. Proben (n = 18)	% an ges. Studien- popul. (n = 158)	% an P1- pos. Proben (n = 18)	P1 Mw. (ct) (Min.; Max.; SD)
Mumifiziert	8	8	5,06	44,44	35 (32; 37; 1,604)
Tot- Geb.	Frisch	1	0,63	5,56	32
	Auto- lytisch	10	5,7	50	33,56 (33; 35; 0,726)
Lebensschw.- geboren	1	0	0	0	-

Dabei lag die Nachweisrate von Leptospiren-DNA der Subclade P1 mittels subtypspezifischer PCR bei autolytisch totgeborenen Ferkeln signifikant höher als bei frisch totgeborenen Ferkeln ( $p = 0,000$ ; OR 24,375; KI: 2,931 – 202,747) und bei mumifizierten Ferkeln ebenfalls signifikant höher als bei frisch totgeborenen Ferkeln ( $p = 0,003$ ; OR 13,000; KI: 1,567 – 107,859).

Aufgrund der Tatsache, dass alle ct-Werte der subtypspezifischen qPCR so eng beieinanderlagen (Minimum 33, Maximum 37), wurde auf eine weitere statistische quantitative Auswertung mittels nicht-parametrischer Tests verzichtet.

### 2.2.2. Ergebnisse der genotypspezifischen qPCR auf die Subclade P1 im Gewebevergleich

Die Untersuchung mittels genotypspezifischer qPCR auf Basis des 16S-RNA-Gens hat ergeben, dass 11,39 % (18 / 158) der Nierenproben, 10,13 % (16 / 158) der Leberproben, 8,86 % (14 / 158) der Mageninhaltproben und 6,96 % (11 / 158) der Mekoniumproben positiv auf die Subclade P1 getestet wurden. Diese Ergebnisse sind gemeinsam mit den ct-Mittelwerten inklusive Minimum, Maximum und Standardabweichung in Tabelle 15 zusammengefasst.

**Tabelle 15: Positiv getestete Proben mittels subtypspezifischer qPCR auf die Subclade P1 im Gewebevergleich in Bezug auf die gesamte Studienpopulation (n = 158) und die im LipL32-Screening positiv getesteten Ferkel (n = 20), inklusive Mittelwerte der ct-Werte (mit Minimum; Maximum und Standardabweichung)**

Material	P1- pos. Proben (n)	% an Stu- dienpopul. (n = 158)	% an LipL32-pos. Proben (n= 20)	Mw. (ct) (Min.; Max.; SD)
Pool	18	11,39	90	34,11 (32; 37; 1,451)
Niere	18	11,39	90	33,50 (30; 37; 1,948)
Leber	16	10,13	80	34,69 (33; 38; 1,702)
Magen- inhalt	14	8,86	70	36,36 (34; 40; 1,646)
Mekonium	11	6,96	55	35,27 (32; 38; 1,849)

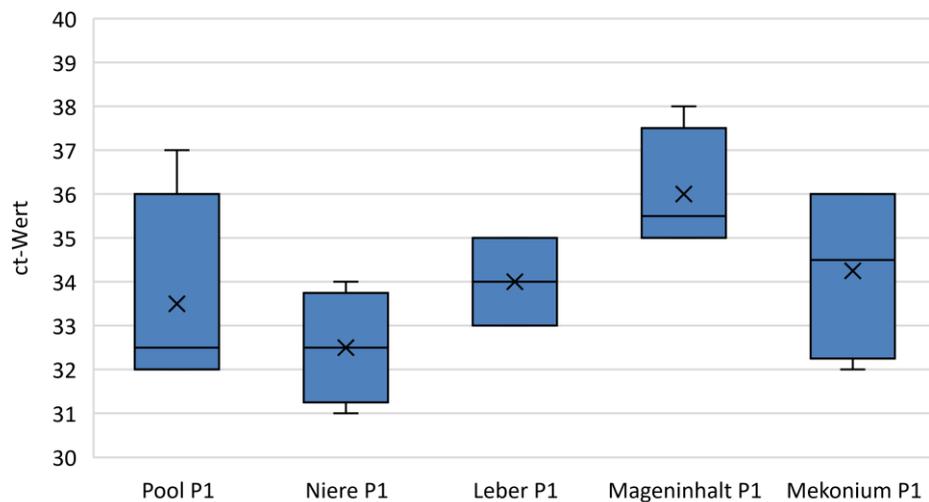
Mittels Chi<sup>2</sup>-Test konnte keine statistisch signifikante Assoziation zwischen den verschiedenen mittels PCR untersuchten Geweben und der Nachweishäufigkeit dargestellt werden ( $p = 0,075$ ).

Die Auswertung mittels Kruskal-Wallis-Test ergab, dass die qPCR der Nierenproben signifikant niedrigere ct-Werte ergab als bei den Mageninhaltproben ( $p = 0,001$ ). In Bezug auf die ct-Werte der subtypspezifischen qPCR auf die Subclade P1 konnten keine weiteren statistisch signifikanten Ergebnisse im Gewebevergleich gezeigt werden, siehe Tabelle 16.

**Tabelle 16: ct-Wertvergleich der subtypspezifischen qPCR auf pathogene *Leptospira* spp. in Abhängigkeit des untersuchten Gewebes in SMEDI-assoziierten Ferkeln**

Gruppe	Paarweiser Vergleich der Gruppen	p-Wert Kruskal-Wallis-Test (nach Bonferroni)
(1) Niere (ct-Werte)	1 - 2	0,806
(2) Leber (ct-Werte)	<b>1 - 3</b>	<b>0,001</b>
(3) Mageninhalt (ct-Werte)	1 - 4	0,149
(4) Mekonium (ct-Werte)	2 - 3	0,130
	2 - 4	1,000
	3 - 4	1,000

Die ct-Werte der P1-genotypspezifischen qPCR im Gewebevergleich sind der Abbildung 5 zu entnehmen.



**Abbildung 5: Darstellung der ct-Wert-Verteilung der genotypspezifischen 16S-RNA-qPCR der Subclade P1 mittels Box-Plots in den Pool- (n = 20), Nieren- (n = 19), Leber- (n = 17), Mageninhalts- (n = 15) und Mekoniumproben (n = 14)**

Mittels genotypspezifischer qPCR war die Subclade P2 nur in einer (0,63 %) der 158 untersuchten Poolproben von dem Ferkel mit der Nummer 4.3.2. nachzuweisen. Obwohl dieses Tier im Rahmen des LipL32-Screenings und auch bei der anschließenden Untersuchung der einzelnen getesteten Gewebe kein positives Ergebnis zeigte, war dennoch

Leptospirenmaterial (der Subclade P2) in der Poolprobe nachzuweisen. In Bezug auf die Gesamtnachweisraten ergab sich folgendes Ergebnis:

Es wurden insgesamt 13,29 % (21 / 158) der Ferkel aus 17,5 % (7 / 40) der Würfe mittels qPCR positiv auf pathogene *Leptospira* spp. getestet. Diese stammten von 16,67 % (3 / 18) der Bestände.

Bei der Muttersau des P2-positiven Ferkels handelte es sich um eine ungeimpfte, multipare Sau, sodass sich in Bezug auf die Paritäten der Muttersauen folgendes Ergebnis zeigte: 2 / 7 (28,57 %) Muttersauen mit PCR-positiven Ferkeln waren primipar, während es sich bei 5 / 7 (71,43 %) dieser Sauen um multipare Sauen handelte.

### **2.3. Weitere statistische Auswertungen**

Neben den phänotypischen Erscheinungsbildern der Ferkel und den Geweben wurden weitere dichotome Variablen auf Assoziation mit dem PCR-Ergebnis der Ferkel untersucht, siehe Tabelle 24 im Anhang.

Die Ergebnisse aller Variablen, die mittels Chi<sup>2</sup>-Test auf Abhängigkeit mit dem PCR-Ergebnis überprüft wurden, sind in Tabelle 25 im Anhang zu finden.

Mittels Chi<sup>2</sup>-Test konnte eine Assoziation des MAT-Ergebnisses und des autolytischen Phänotyps (jeweils  $p < 0,001$ ) mit dem PCR-Ergebnis der Ferkel gezeigt werden. Im Rahmen der binär logistischen Regression konnte gezeigt werden, dass die Wahrscheinlichkeit für ein positives PCR-Ergebnis der Ferkel signifikant erhöht ist, wenn die Sau MAT-positiv ( $p = 0,001$ ; OR 19,216; KI 4,283 - 86,217) ist. Während 90,48 % (19 / 21) der PCR-positiven Ferkel von MAT-positiven Muttersauen stammten, hatten nur 9,52 % (2 / 21) der PCR-positiven Ferkel MAT-negative Muttersauen.

### 3. Serologische Ergebnisse

#### 3.1. Diagnostisches Screening auf *Leptospira* spp. bei Sauen

##### 3.1.1. Nachweishäufigkeiten von Leptospirenantikörpern in mittels MAT untersuchten Serumproben der Muttersauen

Von den 40 Seren der Sauen, die im Rahmen routinediagnostischer Untersuchungen eingeschickt wurden, konnten 36 Seren aus 16 Beständen ausgewertet werden. Die anderen vier Seren aus zwei Beständen waren aufgrund von Hämolyse ungeeignet für eine serologische Untersuchung.

Die serologische Untersuchung mittels MAT ergab, dass 44,44 % (16 / 36) der Serumproben positiv auf Antikörper gegen *Leptospira* spp. getestet wurden. Diese 16 Serumproben stammten aus zehn verschiedenen Beständen; das entspricht 62,5 % (10 / 16) der Bestände.

Das diagnostische Screening mittels MAT ergab, dass Antikörper gegen sieben von elf getesteten Leptospirenservaren nachweisbar waren. Einen Überblick über die Nachweishäufigkeiten der einzelnen Serovaren in Bezug auf die gesamte Studienpopulation (n = 36) und die MAT-positiven Sauen (n = 16) gibt Tabelle 17.

**Tabelle 17: Nachweishäufigkeiten der einzelnen Serovaren in Bezug auf die gesamte Studienpopulation (n = 36) und die MAT-positiven Sauen (n = 16); geordnet nach abnehmender Nachweishäufigkeit**

Serovar / Serogruppe	Nachweishäufigkeit (n)	% an ges. Studienpopulation (n = 36)	% an pos. Sauen (n = 16)
Bratislava / AUS	14	38,89	87,5
Pomona / POM	7	19,45	43,75
Australis / AUS	6	16,67	37,5
Copenhageni / ICT	6	16,67	37,5
Icterohaemorrhagiae / ICT	6	16,67	37,5
Autumnalis / AUT	5	13,89	31,25
Canicola / CAN	2	5,56	12,5

Antikörper gegen die Serovaren / Serogruppen Grippotyphosa / GRI, Hardjo / SEJ, Saxkoebing / SEJ und Tarassovi / TAR waren in keinem der untersuchten Seren zu finden.

Aufgrund der geringen Anzahl der Sauen, die für die einzelnen Serovaren positiv getestet wurden, wurde auf eine statistische quantitative Auswertung der einzelnen Titerhöhen pro Serovar mittels nicht-parametrischer Tests verzichtet.

### **3.1.2. Nachweishäufigkeiten einzelner Serovaren mittels MAT in Abhängigkeit von dem Impfstatus der Sau und dem Leptospiren-PCR-Ergebnis der Ferkel**

Im Rahmen des diagnostischen Screenings mittels MAT wurden die Nachweishäufigkeiten der Serovaren in Abhängigkeit von dem Impfstatus der Sau und dem Leptospiren-PCR-Ergebnis der Ferkel ausgewertet. Bei 6 der 16 (37,5 %) Sauen, die im MAT positive Ergebnisse zeigten, waren die Ferkel bei der molekularbiologischen Untersuchung positiv. Zwei von 16 (12,5 %) MAT-positiven Sauen waren gegen *Leptospira* spp. geimpft. Eine Übersicht über die Bestands- und Wurfnummern (entsprechend der Sauennummern) mit dem jeweiligen MAT- und PCR-Ergebnisse inklusive des Impfstatus der Sau gibt Tabelle 18.

**Tabelle 18: Nachweishäufigkeiten einzelner Serovaren / Serogruppen (n = 7) der 16 MAT-positiven Würfe (bzw. Sauen), inklusive Bestandsnummern und PCR-Ergebnissen der Ferkel; \* geimpfte Sauen; A. AUS = Australis, AUS; B. AUS = Bratislava, AUS; A. AUT = Autumnalis, AUT; C. CAN = Canicola, CAN; C. ICT = Copenhageni, ICT; I. ICT = Icterohaemorrhagiae, ICT; P. POM = Pomona, POM**

Be-stand	Wurf (Sau)	A. AUS	B. AUS	A. AUT	C. CAN	C. ICT	I. ICT	P. POM	Pos. Serovaren (n/n)	Wurf PCR pos.
2.	2.1.		X						1 / 7	
3.	3.1.	X	X	X				X	4 / 7	X
4.	4.2.					X	X		2 / 7	
	4.3.		X			X	X		3 / 7	X
5.	5.1.		X						1 / 7	
6.	6.1.*	X	X	X	X	X	X		6 / 7	
	6.2.*	X	X		X	X	X	X	6 / 7	
7.	7.1.		X						1 / 7	
10.	10.1.		X					X	2 / 7	X
	10.2.		X	X		X		X	4 / 7	X
	10.3.	X	X	X			X	X	5 / 7	X
	10.5.	X	X	X		X	X	X	6 / 7	X
14.	14.1.		X						1 / 7	
15.	15.1.							X	1 / 7	
16.	16.1.		X						1 / 7	
	16.3.	X	X						2 / 7	
Ge-samt (n)	16	6	14	5	2	6	6	7		6

Die Sauen wurden abhängig von ihrem Impfstatus und dem PCR-Ergebnis ihrer Ferkel in drei Gruppen unterteilt: (1) geimpfte Sauen mit PCR-negativen Ferkeln (n = 2), (2) ungeimpfte Sauen mit PCR-negativen Ferkeln (n = 8) und (3) ungeimpfte Sauen, deren Ferkel mindestens ein positives Ergebnis in der PCR zeigten (n = 6). Die theoretische vierte Gruppe (4) (geimpfte Sau mit PCR-positiven Ferkeln) konnte nicht ausgewertet werden, da keine geimpfte Sau PCR-positive Ferkel hatte. Eine Übersicht über die Nachweishäufigkeiten der einzelnen Serovaren in Abhängigkeit von dem Impfstatus der Sau und dem Leptospiren-PCR-Ergebnis der Ferkel gibt Tabelle 19.

**Tabelle 19: Nachweishäufigkeiten der Antikörper gegen die einzelnen Serovaren in Abhängigkeit von dem Impfstatus der Sau und dem Leptospiren-PCR-Ergebnis der Ferkel**

Impfstatus Sau / PCR-Ergebnis Ferkel	Nachweishäufigkeit der einzelnen Serovaren (n / n)						
	Aus- tralis	Bratis- lava	Autum- nalis	Cani- cola	Copen- hageni	Icterohae- morhagiae	Pomo- na
geimpft / negativ (n = 2)	2 / 6	2 / 14	1 / 5	2 / 2	2 / 6	2 / 6	1 / 7
ungeimpft / negativ (n = 8)	1 / 6	6 / 14	0 / 5	0 / 2	1 / 6	1 / 6	1 / 7
ungeimpft / positiv (n = 6)	3 / 6	6 / 14	4 / 5	0 / 2	3 / 6	3 / 6	5 / 7
geimpft / positiv	-	-	-	-	-	-	-
n <sub>gesamt</sub> = 16	6	14	5	2	6	6	7

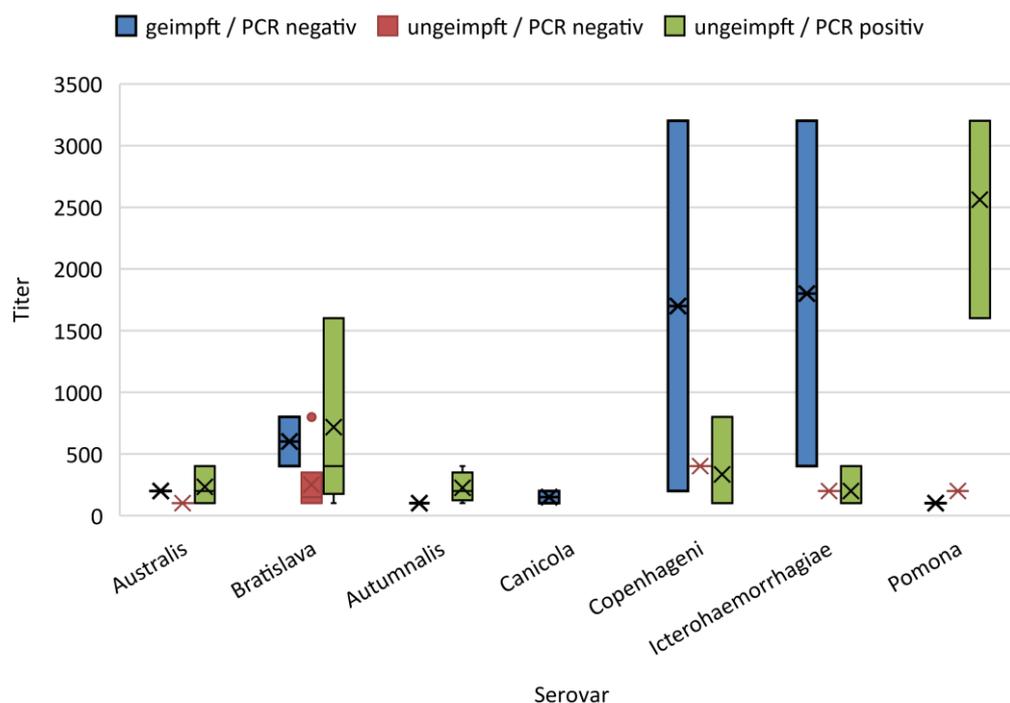
Mittels Chi<sup>2</sup>-Test konnte eine Assoziation des PCR-Ergebnisses der Ferkel, der Parität und der Leptospirenimpfung der Sau mit dem MAT-Ergebnis der Sau gezeigt werden. Die anschließende binär logistische Regression ergab, dass die Wahrscheinlichkeit für ein positives MAT-Ergebnis der Sau signifikant höher war, wenn der dazugehörige Wurf PCR-positiv getestet wurde ( $p = 0,014$ ; OR 11,4000; KI 1,200 - 108,293). Weder die Parität der Sau noch die Leptospirenimpfung zeigten eine signifikante Assoziation mit dem MAT-Ergebnis der Sau, siehe Tabelle 20. Die Ergebnisse aller mittels Chi<sup>2</sup>-Test auf Assoziation mit dem MAT-Ergebnis der Sau überprüften Variablen, inklusive derjenigen Variablen, für die keine Assoziationen gezeigt werden konnten, sind in Tabelle 26 im Anhang zu finden.

**Tabelle 20: Übersicht über die Ergebnisse der Prüfung auf Assoziation der PCR-Ergebnisse der Ferkel, der Parität und des Impfstatus der Sau mit dem MAT-Ergebnis der Sau, inklusive binär logistischer Regression**

Unabhängige Variable	Abhängige Variable	p-Wert		Konfidenzintervall		
		Chi <sup>2</sup> -Test	Binär log. Regr.	OR	Unteres	Oberes
Ferkel PCR (positiv / negativ)		0,014	0,034	11,400	1,200	108,293
Parität der Sau (JS / AS)	Sau MAT (positiv / negativ)	0,418	-	-	-	-
Leptospirenimpfung (ja / nein)		0,418	-	-	-	-

Bei 37,5 % (6 / 16) der MAT-positiven Muttersauen wurden ihre Ferkel im Rahmen der molekularbiologischen Untersuchung positiv auf pathogene *Leptospira* spp. getestet. Innerhalb der Gruppe Leptospiren-Antikörpernegativer Sauen war in einem Fall (5 %) ein PCR-positiver Wurf nachzuweisen. Bei dieser MAT-negativen Muttersau handelte es sich um eine multipare Sau mit der Nummer 3.2., bei der die Ferkel 3.2.1. und 3.2.3. positive Ergebnisse im LipL32-Screening zeigten, vergleiche Tabelle 12.

Die Titerhöhen der Antikörper gegen die einzelnen Serovaren mit Vergleich der drei Gruppen der Sauen (geimpft / PCR negativ, ungeimpft / PCR negativ / ungeimpft / PCR positiv) sind in Abbildung 6 zusammengefasst.



**Abbildung 6: MAT-Titer-Verteilung der Antikörper gegen die einzelnen Serovaren mittels Box-Plots mit Vergleich der drei Gruppen der Sauen (geimpft / PCR negativ (n = 2), ungeimpft / PCR negativ (n = 8), ungeimpft / PCR positiv (n = 6))**

Wie weiter oben bereits erwähnt, wurde aufgrund der geringen Anzahl an Sauen, die für die einzelnen Serovaren positiv getestet wurden, auf eine statistische quantitative Auswertung der einzelnen Titerhöhen der Antikörper in Bezug auf die Gruppenzugehörigkeit der Sau mittels nicht-parametrischer Tests verzichtet.

### **3.2. Serologische Untersuchung von Herzblut von Ferkeln mit einem errechneten Alter von mindestens 70 Tagen (SSL $\geq$ 160 mm) mittels MAT**

Von den 104 Ferkeln, deren SSL auf ein Alter von mindestens 70 Tagen schließen ließ (SSL  $\geq$  160 mm), waren aufgrund von Hämolyse nur 24 (15,19 %) Herzblutproben im Rahmen der serologischen Untersuchung auf das Vorkommen von Leptospirenantikörper auswertbar. Alle 24 (100 %) auswertbaren Herzblutproben dieser SMEDI-assoziierten Ferkel zeigten bei der serologischen Untersuchung mittels MAT negative Ergebnisse.

## V. DISKUSSION

### 1. Auswahl der Studientiere und Studiendesign

Um in der Studienpopulation vergleichbare Anteile der mumifizierten, frisch und autolytisch totgeborenen und lebensschwachgeborenen Ferkel zu beproben, wurden die Studientiere mittels *stratified random sampling* ausgewählt. Die Auswertung ergab, dass die Anteile dieser Gruppen in der Studienpopulation nahezu identisch wie in der Gesamtpopulation waren und die Auswahlmethode demnach gut funktioniert und die Studienpopulation die Gesamtpopulation gut widerspiegelt hat, siehe Tabelle 8. Außerdem konnten bei der Untersuchung der verschiedenen Materialien *Leptospira* spp. nachgewiesen werden, weshalb das Studiendesign in Summe als sinnvoll angesehen werden kann.

### 2. Molekularbiologische Ergebnisse

#### 2.1. Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung mittels LipL32-Screening auf pathogene Leptospiren in Poolproben von Ferkeln aus SMEDI-assoziierten Würfeln

In der vorliegenden Studie zeigten 12,66 % (20 / 158) der Ferkel positive Ergebnisse bei der molekularbiologischen Untersuchung mittels LipL32-Screening auf pathogene Leptospiren. Im Gegensatz dazu ergaben andere Studien niedrigere Prävalenzen: So konnten NATHUES et al. (2011) in nur 0,8 % der untersuchten Proben (317 lebensschwach geborene Ferkel und Uterusproben von 714 Sauen, die abortiert hatten) aus deutschen Beständen Leptospiren-DNA mittels PCR-Screening nachweisen. Diese vergleichsweise geringe Prävalenz lässt sich damit erklären, dass bei dieser Studie keine fetalen Organe, sondern ausschließlich Uterusproben und lebensschwachgeborene Ferkel (keine Angaben zum untersuchten Gewebe) untersucht wurden. Außerdem wurden die PCR-Assays und damit die Spezifität und Sensitivität über die Jahre kontinuierlich verbessert und eine höhere Nachweisrate mit moderneren Verfahren im Gegensatz zu den Verfahren aus dem Jahr 2011 ist zu erwarten. Es kann vermutet werden, dass fetale Gewebeproben höhere Nachweisraten

ermöglichen als Uterusmaterial. In den USA evaluierten POUDEL et al. (2020) molekularbiologische Methoden zum Nachweis von Leptospiren in den Nieren von Wildschweinen und konnten dabei eine Prävalenz von 3,2 % (10 / 315) nachweisen. Bei dieser Studie wurde kein fetales, sondern nur Gewebe von adulten Tieren untersucht und es wurde keine Vorauswahl wie in der vorliegenden Studie (nur SMEDI-assoziierte Würfe) vorgenommen, was die geringere Nachweisrate erklären könnte.

Da der serologische Nachweis beim Schwein laut OIE mittels MAT als Goldstandard in der Leptospirendiagnostik gilt (OIE, 2021) und der Nachweis im Abortmaterial sowohl bei Feldinfektionen, als auch bei experimentellen Studien normalerweise als sehr gering gilt (NATHUES et al., 2011; STRUTZBERG-MINDER & KREIENBROCK, 2011), beschäftigen sich die meisten Studien mit den Leptospiren-Seroprävalenzen. Zusätzlich steht die molekularbiologische Untersuchung erst seit ein paar Jahren für die Leptospirendiagnostik zur Verfügung, weshalb weitere Studien nötig sind, die sich mit der molekularbiologischen Diagnostik von Leptospiren beim Hausschwein auseinandersetzen (FERREIRA et al., 2014). Die meisten derzeit veröffentlichten Studien beschäftigen sich noch mit der Etablierung neuer PCR-Methoden oder nutzen Tiermodelle, zum Beispiel mit Meerschweinchen (LOURDAULT et al., 2009). Von den 158 untersuchten Ferkeln aus SMEDI-assoziierten Würfen wurden 12,66 % (20 / 158) mittels LipL32-Screening positiv auf *Leptospira* spp. getestet. Bei den Muttersauen wurden 44,44 % (16 / 36) mittels MAT positiv getestet. Für die verwendete LipL32-multiplex-PCR nach FERREIRA et al. (2014) konnte eine gute Sensitivität und Spezifität gezeigt werden: mittels Testung der Amplifikationsreaktion mit genomischer DNA sowohl vieler verschiedener pathogener und nicht pathogener Leptospirenstämme als auch anderer nicht verwandter Bakterien konnte eine analytische Spezifität von 100 % nachgewiesen werden. Die analytische Sensitivität konnte ebenfalls als sehr hoch eingeschätzt werden (weniger als 10 Genomequivalenten im Reaktionsmix) (FERREIRA et al., 2014).

Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass der molekularbiologische Nachweis im Rahmen der Leptospirendiagnostik erfolgreich sein und damit eine evtl. weniger arbeits- / zeitintensive und gleichzeitig hoch

sensitive und spezifische Methode im Vergleich zur serologischen Untersuchung mittels MAT darstellen könnte.

### **2.1.1. Auswertung des LipL32-Screenings der Poolproben nach phänotypischem Erscheinungsbild der Ferkel**

Bei der Auswertung des LipL32-Screenings der Poolproben nach phänotypischem Erscheinungsbild der SMEDI-assoziierten Ferkel lag die Nachweisrate bei autolytisch totgeborenen Ferkeln signifikant höher als bei frisch totgeborenen Ferkeln ( $p = 0,000$ ; OR 28,261; KI: 3,427 - 233,091) und bei mumifizierten Ferkeln ebenfalls signifikant höher als bei frisch totgeborenen Ferkeln ( $p = 0,003$ ; OR 13,000; KI: 1,567 - 107,859). Auch im Rahmen der binär logistischen Regression konnte gezeigt werden, dass die Wahrscheinlichkeit, *Leptospira*-DNA nachzuweisen, in autolytisch totgeborenen Ferkeln 5,452-fach erhöht war ( $p = 0,001$ ; OR 5,452; KI 2,074 - 14,332).

Im Rahmen von Challenge-Versuchen mit pathogenen *Leptospiren* wird in der Literatur das vermehrte Vorkommen von autolytisch totgeborenen und mumifizierten Ferkeln beschrieben (FENNESTAD & BORG-PETERSEN, 1966; VALENÇA et al., 2013). Die *Leptospirendiagnostik* jedoch gestaltet sich für die praktizierenden Tierärzte / Tierärztinnen aufgrund fehlender Empfehlungen für die Probenentnahme oft schwierig.

Dass *Leptospiren*-DNA am häufigsten in autolytischen Ferkeln nachgewiesen werden konnte, lässt sich damit erklären, dass Mumifikationen weitestgehend steril ablaufen und damit auch weniger Erreger in deren Organen zu erwarten sind (GIVENS & MARLEY, 2008). Im Gegensatz dazu zeigen autolytische Ferkel ihre charakteristischen rotbraun verfärbten Gewebe und serosanguinösen Flüssigkeitsansammlungen in den Körperhöhlen (FENNESTAD & BORG-PETERSEN, 1966) aufgrund von hämolytischen Prozessen, die in Folge von bakteriellen Infektionen entstehen (GIVENS & MARLEY, 2008). Frisch totgeborene und lebensschwachgeborene Ferkel, die im Gegensatz zu den mumifizierten Ferkeln keine Dehydratation und im Gegensatz zu den autolytisch totgeborenen Ferkeln keine Verfärbung der Haut aufweisen, können teilweise auch erst während des Geburtsvorganges gestorben

sein: Überleben infolge einer SMEDI-Infektion nur einzelne Ferkel, so setzt die Geburt verzögert und schleppend ein, was zum Absterben der Ferkel während des Geburtsvorganges oder beim Übertragen infolge der Alterung der Plazenta führen kann (PLONAIT, 2004a). Demnach kann vermutet werden, dass die Nachweishäufigkeiten in frisch totgeborenen bzw. lebensschwachgeborenen Ferkeln geringer bzw. die ct-Werte höher sind als in mumifizierten und autolytisch totgeborenen Ferkeln, da diese teilweise nicht nur infolge einer SMEDI-Infektion, sondern auch erst während des Geburtsvorgangs gestorben sein können (PLONAIT, 2004a).

Für die praktizierenden Tierärztinnen / Tierärzte bedeutet dies, dass autolytisch totgeborene Ferkel bei der Leptospirendiagnostik mittels PCR besser geeignet sein müssten als frisch totgeborene, mumifizierte oder lebensschwachgeborene Ferkel. Es konnte mittels binär-logistischer Regression gezeigt werden, dass die Chance, Leptospiren-DNA nachzuweisen, in autolytisch totgeborenen Ferkeln 5,452-fach erhöht war ( $p = 0,001$ ; OR 5,452; KI 2,074 - 14,332).

Aufgrund der Tatsache, dass alle ct-Werte des LipL32-Screenings auf pathogene *Leptospira* spp. so eng beieinanderlagen (Minimum 33, Maximum 39), wurde auf eine weitere statistische quantitative Auswertung mittels nicht-parametrischer Tests verzichtet. So wurden in der Studie von PEDERSEN et al. (2017) sogar lediglich diejenigen Nierenproben als positiv gewertet, die in der PCR-Untersuchung ct-Werte unter 35 zeigten. Die relative schwach-positiven Ergebnisse der PCR auf Leptospiren-DNA lassen jedoch Rückschlüsse auf eine insgesamt geringe *bacterial-load* zu. Dies könnte bedeuten, dass schon relativ geringe Mengen an *Leptospira* spp. zu einer SMEDI-Symptomatik führen können und mit Blick auf die relativ hohen Seroprävalenzen vermutet werden könnte, dass *Leptospira* spp. eine evt. größere Rolle im Rahmen von SMEDI-Infektionen beim Schwein spielen könnten als bislang angenommen.

### **2.1.2. Ergebnisse des LipL32-Screenings auf pathogene *Leptospira* spp. im Gewebevergleich**

Im Gewebevergleich konnten die höchsten Nachweisraten in der Niere gezeigt werden (95 %; 19 / 20), worauf Leber (85 %; 17 / 20), Mageninhalt

(75 %; 15 / 20) und Mekonium (70 %; 14 / 20) folgten. Die ct-Werte der Niere lagen signifikant niedriger als die von Mageninhalt- und Mekoniumproben und die ct-Werte der Leber waren ebenfalls signifikant niedriger als die der Mageninhaltproben. Somit ist eine Empfehlung des Nierengewebes für die molekularbiologische Leptospirendiagnostik möglich.

FORNAZARI et al. (2012) konnten in Brasilien Leptospiren mittels qPCR ebenfalls am häufigsten in Nierenproben (1,72 %; 8 / 465) und Leberproben (0,65 %; 3 / 465) von Schweinen nachweisen. Auch in Bezug auf die ct-Werte stimmen die Ergebnisse mit der vorliegenden Studie überein: sie konnten im Rahmen der Quantifizierung die höchsten Nachweisraten in Leber- (4.3 Bakterien /  $\mu\text{l}$ ) und Nierengewebe (36.6 Bakterien /  $\mu\text{l}$ ) der Schweine nachweisen. Es handelte sich bei dieser Studie um Organproben von ausgewachsenen Schweinen (und nicht fetale Gewebe) aus Schlachthöfen ohne Vorauswahl, was die niedrigere Prävalenz erklären könnte. In Österreich konnten UNTERWEGER et al. (2018) im Mageninhalt von untersuchten Feten von zwei Sauen, die am 95. und 110. Trächtigkeitstag abortiert hatten, Leptospiren nachweisen. Es wurde allerdings weder angegeben, wie viele Ferkel untersucht und wie viele davon positiv getestet wurden, noch wurde eine quantitative Analyse der ct-Werte durchgeführt. Die Autoren wiesen jedoch darauf hin, dass die Auswahl und Anzahl des untersuchten Probenmaterials von großer Bedeutung sei und mehrere Ferkel aus mehreren Würfen, möglichst frisch und am besten mit den Plazenten für den Direktnachweis zu untersuchen seien (UNTERWEGER et al., 2018). Diesbezüglich empfehlen BENSON et al. (2002) vier bis sechs Feten pro Wurf von mindestens drei Würfen zu untersuchen. Davon ausgehend, dass 50 % der Ferkel infiziert sind und ein Wurf im Schnitt aus 12 Ferkeln besteht, befindet sich mit einer Wahrscheinlichkeit von 90 bis 95 % ein infizierter Fetus unter den untersuchten Tieren (BENSON et al., 2002).

LOURDAULT et al. (2009) konnten nach experimenteller Infektion eines Meerschweinchens mit einem Leptospirenstamm der Serovar Copenhageni (Spezies *L. interrogans*) die höchsten Nachweisraten ( $5 \times 10^4$  Leptospiren  $\text{ml}^{-1}$ ) mittels qPCR fünf Tage post infectionem ebenfalls in

Leber- und Nierengewebe verzeichnen. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von FAINE (1957) konnten sie zeigen, dass Leptospiren sich nach einer anfänglich geringen Bakteriämie exponentiell im Blut des infizierten Tieres vermehren können, wobei die Verdopplungszeit circa 10 Stunden beträgt (LOURDAULT et al., 2009). Als zentrales Stoffwechselorgan wird die Leber als erstes infiziert, dicht gefolgt von den Nieren (LOURDAULT et al., 2009), in deren renalen Tubuli die Leptospiren persistieren können (LEVETT, 2001; BHARTI et al., 2003). Diese Reihenfolge der Organbesiedelung im Rahmen einer Leptospireninfektion kann eine mögliche Erklärung für die höheren Nachweisraten in den beiden genannten Organen liefern.

Da die höchsten Nachweisraten in Niere- und Lebergewebe und die PCR-Untersuchung dieser beiden Gewebe statistisch signifikant niedrigere ct-Werte ergaben als in Mageninhalt- und Mekoniumproben, stimmen die Ergebnisse mit den Ergebnissen anderer Studien überein (LOURDAULT et al., 2009; FORNAZARI et al., 2012) und eine Empfehlung dieser beiden Materialien für den molekularbiologischen Nachweis von Leptospiren kann ausgesprochen werden. Mageninhalt und Mekonium zeigten ebenfalls positive Ergebnisse, allerdings bei weniger Ferkeln und mit höheren ct-Werten als es bei Nieren- und Lebermaterial der Fall war. Somit kann die ursprünglich formulierte Hypothese, dass Mageninhalt- bzw. Mekoniumproben hinsichtlich der Nachweisrate den Nieren- oder Leberproben überlegen oder zumindest gleichwertig seien, nicht bestätigt werden.

## **2.2. Untersuchung mittels genotypspezifischer qPCR auf die Subclade P1 und P2 auf Basis der 16S RNA**

Die Untersuchung mittels genotypspezifischer qPCR auf Basis des 16S RNA-Gens zur Differenzierung zwischen der Subclade 1 und der Subclade 2 ergab, dass von den 20 im LipL32-Screening positiv getesteten Ferkeln insgesamt 90 % (18 / 20) bzw. in Bezug auf die Gesamtpopulation 11,39 % (18 / 158) der Ferkel der Subclade P1 zugeordnet werden konnten. 2 der 20 im LipL32-Screening positiv getesteten Ferkel zeigten weder bei der P1- noch bei der P2-genotypspezifischen PCR positive Ergebnisse. Eine Poolprobe (0,63 % (1 / 158)), die allerdings im Screening auf das

LipL32-Gen ein negatives Ergebnis zeigte, wurde mittels genotypspezifischer qPCR der Subclade P2 zugeordnet.

Zu der Subclade P1, die alle ehemals als pathogen eingestuften Leptospiren zusammenfasst, gehört auch die Leptospirenspezies *L. interrogans* (VINCENT et al., 2019). Zu der Leptospirenspezies *L. interrogans* wiederum gehören alle sieben Leptospirenservaren, gegen die Antikörper im Serum der Muttersauen nachgewiesen werden konnten (vergleiche Tabelle 17). Die Subclade P2 hingegen umfasst die ehemals intermediären Spezies (VINCENT et al., 2019), die den pathogenen Spezies nahe verwandt sind, allerdings nur eine moderate Pathogenität bei Tier und Mensch aufweisen (PEROLAT et al., 1998). Dieser Unterschied in der Pathogenität kann eine mögliche Erklärung für die wesentlich häufigere Nachweisrate der Subclade P1 im Gegensatz zu der von der Subclade P2 in Ferkeln aus SMEDI-assoziierten Würfen sein.

Die Muttersau (Nr. 4.3.) des Ferkels (Nr. 4.3.2.), welches mittels qPCR positiv auf die Subclade P2 getestet wurde, zeigte im MAT Antikörpertiter gegen die Serovaren Bratislava, Copenhageni und Icterohaemorrhagiae, die allesamt mit der pathogenen Leptospirenspezies *L. interrogans* assoziiert sind (BOLIN, 1994; LEVETT, 2001; ELLIS, 2006; STRUTZBERG-MINDER & KREIENBROCK, 2011; ELLIS, 2015; STRUTZBERG-MINDER et al., 2018). Die Titerhöhe betrug allerdings für alle drei Serovaren 100, was als Mindesttiter bei der Leptospirendiagnostik gilt und eher nicht für eine akute Infektion bzw. eine hohe Pathogenität der infizierenden Serovar spricht (OIE, 2021). Aufgrund der niedrigen Titerhöhen bei der Muttersau und des positiven Nachweises der Subclade P2 (ehemals intermediäre Leptospiren) in der Poolprobe des Ferkels kann in diesem Fall eine infizierende Serovar vermutet werden, die nur über eine relativ geringe Pathogenität verfügt bzw. nur eine schwache Immunantwort hervorruft.

Eine weitere mögliche Erklärung für dieses Ergebnis wäre, dass alle drei nachgewiesenen Serovaren zur renalen Besiedelung fähig sind und es somit zu asymptomatischen Trägertieren kommen kann (STRUTZBERG-MINDER & KREIENBROCK, 2011). In diesem Fall könnte die untersuchte Sau zwar mit den pathogenen Leptospiren aus der Subclade P1 infiziert sein, während das dazugehörige Ferkel ausschließlich mit intermediären

Leptospirenarten infiziert war. Da im MAT keine Serovaren der Subclade P2 verwendet wurden, kann allerdings nicht beurteilt werden, ob die Sau auch Antikörper gegen Serovaren der Subclade P2 entwickelt hatte.

### **2.2.1. Auswertung der genotypspezifischen qPCR der Poolproben nach phänotypischem Erscheinungsbild der Ferkel**

Die Ergebnisse der genotypspezifischen qPCR der Poolproben deckten sich im Hinblick auf den Phänotyp der Ferkel mit denen des LipL32-Screenings: Auch hier waren die meisten der P1-positiv getesteten Ferkel autolytisch totgeboren (9 / 158 (5,7 %)), gefolgt von mumifizierten (8 / 158 (5,06 %)), und frisch totgeborenen Ferkeln (1 / 158 (0,63 %)). Keines der P1-positive getesteten Ferkel war lebensschwachgeboren. Ebenso wie beim LipL32-Screening auf pathogene *Leptospira* spp. lag die Nachweisrate der autolytisch totgeborenen Ferkel signifikant höher als die der frisch totgeborenen und die der mumifizierten Ferkel ebenso signifikant höher als die der frisch totgeborenen Ferkel. Die ct-Werte lagen vergleichbar mit denen des LipL32-Screenings so engbeieinander, dass auf die statistische quantitative Auswertung aufgrund von mangelnder medizinischer Relevanz verzichtet wurde.

Diese fast identischen Ergebnisse des LipL32-Screenings und der subtypspezifischen qPCR auf die Subclade P1 können wie folgt erklärt werden: Im Rahmen des LipL32-Screening wird auf das LipL32-Gen getestet wird, welches für das Hauptoberflächenprotein LipL32 codiert (HOKE et al., 2008). Dieses LipL32 ist einzigartig für pathogene *Leptospira* spp. und stets hoch konserviert vorkommend (ADLER & DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Da alle pathogenen Leptospiren unter der Subclade P1 zusammengefasst werden, waren diese ähnlichen Ergebnisse zu erwarten. Da diese Art der Taxonomie nach VINCENT et al. (2019) erst seit wenigen Jahren existiert und auch die verwendete Kombination aus einer LipL32-multiplex-PCR nach FERREIRA et al. (2014) und einer Multiplex-PCR auf Basis des 16S RNA-Gens nach PÉREZ et al. (2020) erst seit Kurzem zur Verfügung steht, fehlen vergleichbare Daten zum Vorkommen der Subclade 1 bzw. 2 in Hinblick auf den Phänotyp bei Ferkeln aus SMEDI-assoziierten Würfen. Es bleibt lediglich der Vergleich mit den Studien, die nicht zwischen P1 und P2 differenzieren, die im Kapitel 2.1.1.

im Rahmen des LipL32-Screenings besprochen wurden. Da in der vorliegenden Studie jedoch beide Subclades detektiert werden konnten (P1 mit einer Nachweisrate von 11,39 % (18 / 158) und P2 mit 0,63 % (1 / 158)), könnte es auch in zukünftigen Studien von Interesse sein, die Differenzierung zwischen P1 und P2 vorzunehmen, um epidemiologische Aussagen zum Vorkommen der beiden Subclades treffen zu können.

### **2.2.2. Ergebnisse der genotypspezifischen qPCR auf die Subclade P1 im Gewebevergleich**

Auch in Bezug auf die Gewebe decken sich die Ergebnisse der genotypspezifischen qPCR mit denen des LipL32-Screenings: Die höchsten Nachweisraten konnten bei den Nierenproben (11,39 % (18 / 158)) ermittelt werden, gefolgt von Leber (10,13 (16 / 158)), Mageninhalt (8,86 % (14 / 158)) und Mekonium (6,96 % (11 / 158)). Es konnten ebenfalls keine Assoziationen zwischen den getesteten Geweben und dem Outcome des PCR-Ergebnis gezeigt werden. Bei der quantitativen Auswertung konnten jedoch signifikant niedrigere ct-Werte in den Nierenproben gefunden werden als in den Mageninhaltsproben. Auch hier gilt, dass ähnliche Ergebnisse zu denen des LipL32-Screenings in Bezug auf den Gewebevergleich zu erwarten waren, die detailliert in Kapitel 2.1.2 diskutiert wurden.

Auch wenn die genotypspezifische qPCR die Differenzierung zwischen der Subclade P1 und P2 ermöglicht, so ist es bis heute nicht mittels molekularbiologischen Methoden möglich, zwischen den einzelnen Serovaren zu unterscheiden bzw. die infizierende Serovar zu identifizieren. Daher gilt der arbeits- und zeitaufwendige MAT bis heute als Goldstandard in der Leptospirendiagnostik. In Zukunft wären daher PCR-Assays, die nicht nur die einzelnen Subclades, sondern auch die einzelnen Serovaren detektieren können sehr hilfreich, um genauere Aussagen über die beteiligten Serovaren treffen zu können.

### **2.3. Assoziation des PCR-Ergebnisses der Ferkel mit den MAT-Ergebnissen der Sauen**

Es konnte gezeigt werden, dass die Wahrscheinlichkeit, in Geweben der Feten Leptospiren-DNA zu finden, signifikant höher war, wenn die Muttersau ein positives MAT-Ergebnis zeigte (OR = 19,216; KI 4,283 - 86,217): 90,5 % (19 / 21) der PCR-positiven Ferkel hatten MAT-positive Muttersauen, während 33,1 % (44 / 133) der PCR-negativen Ferkel von MAT-positiven Sauen stammten.

Auch UNTERWEGER et al. (2018) untersuchten je zwei Feten von zwei Sauen aus österreichischen Ferkelerzeugerbetrieben, die im ersten Wurf am 95. und 110. Trächtigkeitstag abortierten auf das Vorkommen von Leptospiren-DNA mittels PCR. Drei Wochen post partum wurden Blutproben der Sauen mittels MAT in zwei unterschiedlichen Laboren untersucht. Die Ergebnisse sind mit denen der vorliegenden Studie vergleichbar: sowohl die PCR als auch die MAT-Untersuchungen verliefen positiv, die serologischen Ergebnisse der beiden miteinander verglichenen Labore waren allerdings nicht deckungsgleich in Bezug auf die Titerhöhen und die beteiligten Serovaren, was die Schwierigkeit der Leptospirendiagnostik und die geringe Vergleichbarkeit von MAT-Ergebnissen betont. Auch bei bovinen Leptospireninfektionen hält die qPCR nach und nach Einzug in die diagnostischen Untersuchungen: Eine aktuelle Studie von TOMCKOWIACK et al. (2022) evaluierte verschiedene Diagnostikmöglichkeiten bei 42 abortierten Rinderfeten, bei denen die klinischen Symptome auf eine Leptospireninfektion hindeuteten: 14,3 % (6 / 42) der untersuchten Rinderfeten zeigten ein positives qPCR-Ergebnis. Die MAT-Ergebnisse der Mutterkühe waren jedoch alle negativ. Die Studie von TOMCKOWIACK et al. (2022) zeigt daher zum einen den diagnostischen Wert der qPCR und zum anderen die Schwierigkeit bei der Diagnostik von Leptospiren und unterstreicht ebenso wie die Studie von UNTERWEGER et al. (2018) die Bedeutung der richtigen Auswahl des Probenmaterials und Nachweisverfahrens.

Es wurden außerdem Studien zu vermehrten Vorkommen von totgeborenen / lebensschwachgeborenen Ferkeln in Abhängigkeit vom MAT-Ergebnis der Muttersau veröffentlicht (NETO et al., 1997). Da es im

Rahmen von SMEDI und Leptospireninfektionen zu einem solchen vermehrten Vorkommen kommt, lassen diese Studien einen gewissen Vergleich mit der vorliegenden Studie zu. So konnten NETO et al. (1997) ebenfalls eine signifikant erhöhte Wahrscheinlichkeit für das vermehrte Vorkommen von lebensschwachgeborenen Ferkeln nachweisen, wenn die Sau seropositiv war (OR 1,67; KI: 1,02 - 2,72).

Dass es jedoch bislang noch nicht viele Studien zu diesem Thema gibt, kann zum einen an der zuweilen schwierigen und zeitaufwendigen Diagnostik liegen. Zum anderen sind moderne Nachweismethoden wie die in dieser Studie genutzte Multiplex-qPCR noch nicht lange verfügbar, und weitere Studien sind nötig, um zum einen die Diagnostik zu verbessern und zum anderen Prävalenzen von Leptospiren besser erforschen und vergleichen zu können. Aufgrund der intrauterinen Übertragung von Leptospiren (PEDERSEN et al., 2015) ist allerdings davon auszugehen, dass die Wahrscheinlichkeit, in den Feten von seropositiven Muttersauen Leptospirenmaterial mittels PCR zu finden, höher sein müsste als in denen von seronegativen Muttersauen, was in Einklang mit der errechneten Assoziation der vorliegenden Studie steht.

Kein Ferkel von geimpften Sauen war in der PCR positiv. Die meisten Studien belegen die Wirksamkeit der Impfung beim Schwein auf Basis der als Goldstandard geltenden MAT-Untersuchung (JACOBS et al., 2015; SCHOMMER et al., 2021). Da Goldhamster (*Mesocricetus auratus*) und Meerschweinchen (*Cavia porcellus*) als hoch empfänglich für pathogene Leptospirenarten gelten (HAAKE, 2006), finden diese in Tiermodellen bei der Entwicklung von Leptospirenimpfstoffen vielfach Verwendung (DELLAGOSTIN et al., 2011). Bei solchen Impfstoffstudien mit Meerschweinchen wurde die Wirksamkeit ebenfalls meist anhand von MAT-Daten ermittelt (HE et al., 2008). Auch bei Impfstoffstudien mit Tiermodellen für Rinder findet laut Literatur vor allem der MAT Verwendung (SENTHILKUMAR et al., 2022).

JACOBS et al. (2015) infizierten in ihrer Studie 40 Sauen in einem portugiesischen Bestand mit nachgewiesener Leptospireninfektion im Rahmen von Sicherheits- und Effizienztestungen des in Deutschland

zugelassenen Impfstoffs Porcilis® Ery+Parvo+Lepto. Die Wirksamkeit der Impfung konnte mit signifikant niedrigeren Abortraten in den 20 geimpften im Gegensatz zu den 20 ungeimpften Sauen bestätigt werden.

Um das Prinzip des Übertragens des Impfschutzes von der Muttersau auf ihre Ferkel zu untersuchen, wurden auch bei anderen Erregern, die Antikörpertiter bei Ferkeln von geimpften und nicht geimpften Sauen miteinander verglichen. So konnten PÉREZ-PÉREZ et al. (2021) Antikörpertiter gegen das Virus der klassischen Schweinepest, welches ebenso wie *Leptospira* spp. zu Reproduktionsstörungen beim Schwein führen kann, im Serum von Ferkeln von geimpften Muttersauen zeigen. Im Gegensatz dazu waren im Serum von Ferkeln von ungeimpften Sauen keine Antikörper nachweisbar (PÉREZ-PÉREZ et al., 2021).

Es kann zusammenfassend gesagt werden, dass in der vorliegenden Studie mittels qPCR keine *Leptospira* spp. in Ferkeln von geimpften Sauen nachgewiesen werden konnten. Bei ungeimpften Sauen hingegen konnte mittels qPCR in 12,66 % (20 / 158) der Ferkel Leptospiren-DNA nachgewiesen werden.

### **3. Serologische Ergebnisse**

#### **3.1. Diagnostisches Screening auf *Leptospira* spp. bei Sauen**

##### **3.1.1. Nachweishäufigkeiten von Leptospirenantikörpern in mittels MAT untersuchten Serumproben der Muttersauen**

In der vorliegenden Studie wurden 36 Serumproben aus 16 verschiedenen Beständen mittels MAT auf das Vorkommen von Antikörper gegen *Leptospira* spp. untersucht. 44,44 % (16 / 36) der Serumproben wurden positiv auf Antikörper gegen *Leptospira* spp. getestet.

Eine der aktuellsten Studie aus Deutschland, die Seroprävalenzen von Leptospirenantikörpern bei Sauen untersuchte, stammt aus dem Jahr 2018: STRUTZBERG-MINDER et al. (2018) werteten 29.829 Seren von Schweinen aus 2.571 Beständen aus, die in den Jahren 2011 bis 2016 im Rahmen von diagnostischen Routineuntersuchungen eingeschickt worden waren. Sie konnten eine Seroprävalenz von 20,2 % (6025 / 29.829) zeigen.

Die Untersuchung erfolgte in demselben Labor wie in der vorliegenden Studie. Im Mittel waren 64,5 % der Bestände positiv. Dies deckt sich sehr gut mit der vorliegenden Studie, in der 62,5 % (10 / 16) der Bestände positiv waren. In der Studie von STRUTZBERG-MINDER et al. (2018) waren Informationen über den Grund der Einsendung für 46,36 % der Seren bekannt, wovon 86,9 % aufgrund von Reproduktionsstörungen untersucht werden sollten. Für die restlichen Seren war der Einsendungsgrund allerdings unbekannt. In der vorliegenden Studie wurden ausschließlich SMEDI-assoziierte Würfe und die Seren der dazugehörigen Sauen und damit ausschließlich klinisches Material ausgewertet, was eine mögliche Erklärung für die höhere Seroprävalenz in der Studie von STRUTZBERG-MINDER et al. (2018) sein könnte. Außerdem konnten STRUTZBERG-MINDER et al. (2018) zeigen, dass die Seroprävalenzen in den getesteten deutschen Schweinebeständen über die Jahre hinweg nahezu kontinuierlich gestiegen sind (von 9,2 % in 2011 auf 30,6 % in 2016). In der vorliegenden Studie wurde eine noch höhere Prävalenz (44,44 %) festgestellt, woraus geschlossen werden kann, dass die Leptospirose in deutschen Schweinebeständen in der Zukunft an Bedeutung zunehmen könnte. Weiterhin werden *Leptospira* spp. in der Literatur zwar regelmäßig mit SMEDI in Verbindung gebracht, jedoch fehlen weiterführende Studien zur Nachweishäufigkeit von *Leptospira* spp. in solchen Fällen. Basierend auf den serologischen Ergebnissen dieser Studie kann daher vermutet werden, dass *Leptospira* spp. eine größere Rolle im Rahmen von SMEDI-Infektionen beim Schwein spielen könnten, als bislang angenommen. Diese Vermutung deckt sich mit der weiter oben beschriebenen Schlussfolgerung aus den molekularbiologischen Ergebnissen.

Eine aktuelle Studie aus Frankreich kam ebenfalls zu etwas niedrigeren Ergebnissen: NAUDET et al. (2022) untersuchten zwischen 2011 und 2017 die Leptospirenseroprävalenzen von Hausschweinen, wobei 22,7 % (4.402 / 19.395) der Sauen und 48 % (1.124 / 2.325) der Bestände positiv auf *Leptospira* spp. getestet wurden. Die zu untersuchenden Seren stammten von Schweinen, deren Klinik auf eine potentielle Leptospirose hindeuteten, sodass das Auswahlkriterium, sowie die geographische Nähe und die

ähnlichen Strukturen in der Schweinehaltung von Frankreich und Deutschland einen Vergleich mit der vorliegenden Studie erlaubt.

Zu ähnlichen Ergebnissen in Bezug auf die Seroprävalenz kamen eine weitere Studie aus Frankreich (26,5 % (ANDRÉ-FONTAINE, 2016)), und zwei aus Italien (13,05 % (BERTASIO et al., 2020) und 27,5 % (TAGLIABUE et al., 2016)). Demnach lagen die Nachweisraten in der vorliegenden Studie vergleichsweise hoch. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass in all diesen Studien zum einen eine größere Anzahl an Seren verwendet wurde und zum anderen über einen längeren Zeitraum hinweg nicht ausschließlich Sauen mit Reproduktionsstörungen untersucht wurden.

Die Ergebnisse der Nachweishäufigkeiten der einzelnen Serovaren, die in dieser Studie gezeigt werden konnten sind fast deckungsgleich mit jenen aus der Studie von STRUTZBERG-MINDER et al. (2018) mit Ausnahme der Nachweishäufigkeit der Antikörper gegen die Serovar Pomona. Dies Serovar Pomona wurde in der vorliegenden Studie am zweithäufigsten (19,45 % (7 / 36)) nachgewiesen und damit wesentlich häufiger als in der Studie von (STRUTZBERG-MINDER et al., 2018) (1,2 % (368 / 29.829)). Am häufigsten wurden in beiden Studien Antikörper gegen die Serovar Bratislava nachgewiesen, gefolgt von Australis, Copenhageni und Icterohaemorrhagiae, Autumnalis und Canicola.

Die Serovar Bratislava hat sich in den vergangenen Jahren zu der am häufigsten vorkommenden Serovar bei Leptospireninfektionen beim Schwein entwickelt (ARENT & ELLIS, 2019). Zahlreiche Studien, die auf serologischen Daten basieren, weisen mittlerweile auf Bratislava-Infektionen in Deutschland (SCHÖNBERG et al., 2021), Frankreich (NAUDET et al., 2022), UK (HATHAWAY & LITTLE, 1981), Schweden (SANDSTEDT & ENGVALL, 1985), USA (SCHOMMER et al., 2021), Kanada (KINGSCOTE, 1986), Österreich (UNTERWEGER et al., 2018) und zahlreichen weiteren Ländern hin. Es ist daher anzunehmen, dass diese Serovar inzwischen in allen bedeutenden Ländern mit konventioneller Schweinehaltung präsent ist (ELLIS, 2006; STRUTZBERG-MINDER & KREIENBROCK, 2011), was durch die vorliegende Studie bestätigt werden konnte.

Im Gegensatz zur vorliegenden Studie konnten STRUTZBERG-MINDER et al. (2018) allerdings Antikörper gegen die Serovaren Grippotyphosa, Hardjo, Sejroe und Tarassovi nachweisen, jedoch nur in relativ geringen Anteilen (< 1 %). Da die Ergebnisse in Hinblick auf die anderen Seroprävalenzen und die Nachweisraten der einzelnen Serovaren nahezu identisch waren, lässt sich vermuten, dass die Serogruppen Australis, Autumnalis, Canicola und Icterohaemorrhagiae in Deutschland eine wichtigere Rolle spielen als die Serovaren der Serogruppen Grippotyphosa, Sejroe und Tarassovi. Da die die Nachweisraten der Serovar Pomona in der vorliegenden Studie vergleichsweise hoch waren, kann vermutet werden, dass diese Serovar im Rahmen von SMEDI von bedeutender Relevanz sein könnte und in zukünftigen Studien ein besonderes Augenmerk auf sie gelegt werden könnte.

Allerdings gilt es bei der Interpretation von MAT-Ergebnissen immer zu beachten, dass diese subjektiv und somit von der durchführenden Person abhängig sind (STRUTZBERG-MINDER et al., 2018). Außerdem kann es neben regionalen Unterschieden beim Vorkommen von *Leptospira* spp. auch aufgrund von unterschiedlichen verwendeten Serovaren als Testantigen und differierenden Serumverdünnungsreihen bzw. der unterschiedlich gewählten Grenzwert-Titer im MAT zu heterogenen Ergebnissen kommen (STRUTZBERG-MINDER & KREIENBROCK, 2011). Des Weiteren kann es zu Kreuzreaktionen im MAT kommen (OIE, 2021), welche die Ergebnisinterpretation erschweren können. Dies gilt es beim Vergleichen von MAT-Ergebnissen zu beachten. Eine bessere regionale Vergleichbarkeit könnte mit dem Verwenden derselben Leptospirenstämme für den MAT erreicht werden. Nationale bzw. internationale Absprachen bezüglich der verwendeten Leptospirenstämme, Verdünnungsreihen und Grenzwert-Titer bei der MAT-Untersuchung wären demnach sinnvoll.

### **3.1.2. Nachweishäufigkeiten von Antikörpern gegen die einzelnen Serovaren in Abhängigkeit von dem Impfstatus der Sau und dem Leptospiren-PCR-Ergebnis der Ferkel**

Die Sauen wurden abhängig von ihrem Impfstatus und dem PCR-Ergebnis ihrer Ferkel in drei Gruppen unterteilt: (1) geimpfte Sauen mit nur PCR-negativen Ferkeln ( $n = 6$ ), (2) ungeimpfte Sauen mit nur PCR-negativen Ferkeln ( $n = 27$ ) und (3) ungeimpfte Sauen, deren Ferkel mindestens ein positives Ergebnis in der PCR zeigten ( $n = 7$ ). *Leptospira*-spp.-positive Ferkel von geimpften Sauen lagen nicht vor.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Impfung zu einem erheblichen Anstieg der Antikörper gegen die Serovaren Copenhageni und Icterohaemorrhagiae führte, während die restlichen Serovaren auch nach Impfung kaum nachzuweisen waren. Die höchsten Titerwerte bei Tieren, die ungeimpft waren, konnten für die Serovar Pomona gezeigt werden, siehe Abbildung 6. In einer Studie aus 2021 aus den USA wurden ebenfalls die MAT-Titer von 8 ungeimpften mit 9 gegen Leptospiren geimpften Sauen miteinander verglichen (SCHOMMER et al., 2021). Die Ergebnisse stimmen insofern mit der vorliegenden Studie überein, als dass auch in dieser Studie ein starker Anstieg der Titer gegen die Serovar Icterohaemorrhagiae gezeigt werden konnten, was vermuten lässt, dass diese Serovar recht stark immunogen ist. Allerdings lässt sich aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Studie nicht sagen, ob die hohen Titer allein auf die Impfung zurückzuführen waren. Im Rahmen einer zusätzlichen Leptospireninfektion kann es zu einer sogenannten Boosterung kommen, welche ebenfalls hohe Titer nach sich ziehen kann. Solche sogenannten Hybridimmunitäten, die zu verstärkten Immunreaktionen auf eine Infektion bei geimpften im Gegensatz zu nicht geimpften Patienten führen, werden derzeit vielfach im Rahmen der COVID-19-Pandemie untersucht (BATES et al., 2022). In Bezug auf die Leptospirenimpfung beim Schwein konnten JACOBS et al. (2015) allerdings keinen signifikant unterschiedlichen Anstieg der Antikörper zwischen ungeimpften und geimpften Sauen nach einer Leptospireninfektion feststellen. Anhand der Daten der vorliegenden Studie kann zusammenfassend gesagt werden, dass die Titer der

Serovaren Copenhageni und Icterohaemorrhagiae bei geimpften Sauen höher waren als bei ungeimpften. Ob die geimpften Sauen allerdings zusätzlich infiziert waren und es somit zur Ausbildung einer Hybridimmunität kommen konnte, ist nicht bekannt.

Dass die Antikörpertiter der ungeimpften Sauen mit PCR-positiven Ferkeln gegen die der Serovar Bratislava wesentlich geringer waren als die gegen die Serovar Pomona stimmt mit den Ergebnissen der Studie von BOLIN (1994) überein, die ebenfalls vergleichsweise geringe Titerhöhen für die Serovar Bratislava nachweisen konnte. BOLIN (1994) konnte weiterhin zeigen, dass die Antikörpertiter gegen Bratislava nach einer Impfung zum einen nicht stark anstiegen und zum anderen rasch wieder fielen.

In Bezug auf die auffälligen MAT-Ergebnisse der Serovar Pomona stimmen die Ergebnisse der vorliegenden Studie mit der Studie von SCHOMMER et al. (2021) überein: in beiden Studien konnten keine signifikanten Antikörperanstieg der Serovar Pomona aufgrund der Impfung nachgewiesen werden. Allerdings waren in der vorliegenden Studie die höchsten Antikörpertiter, die von ungeimpften Sauen, deren Ferkel PCR positiv waren, dieser Serovar zuzuordnen. Dies lässt darauf schließen, dass – wie in der Literatur beschrieben ((FENNESTAD & BORG-PETERSEN, 1966; STRUTZBERG-MINDER et al., 2018) - eine Pomonainfektion häufig mit klinischer Symptomatik einhergeht und diese Serovar als relativ pathogen eingeschätzt werden kann. Gegen die Serovar Bratislava konnte hingegen die höchste Nachweisrate gezeigt werden. Da sie aber zu eher niedrigeren Antikörpertitern zu führen scheint, kann vermutet werden, dass sie im Vergleich zur Serovar Pomona eher zu asymptomatischen Verläufen neigt. Demnach könnte man Rückschlüsse darauf ziehen, dass die Serovar Bratislava als weniger virulent einzustufen sein könnte, als die Serovar Pomona.

Um die Verbreitung von Leptospireninfektionen besser einschätzen zu können, wären repräsentative Untersuchungen nötig, wofür sowohl die klinische Bedeutung für die Schweinehaltung als auch die Bedeutung als Zoonoseerreger berücksichtigt werden sollten (STRUTZBERG-MINDER & KREIENBROCK, 2011). Solange allerdings keine repräsentativen Kollektive untersucht werden können, können möglicherweise Studien an

Teilpopulationen wie die vorliegende Studie eine erste Einschätzung der aktuellen Situation erlauben, zumal mit dem ständigen Wandel in der Schweineproduktion auch mit einer Änderung der Prävalenzen gerechnet werden kann, sodass die bislang veröffentlichten empirischen Studien weiter an Aussagekraft einbüßen werden (STRUTZBERG-MINDER & KREIENBROCK, 2011).

Generell kann davon ausgegangen werden, dass sowohl die Infektion als auch die Impfung zu hohen Titeranstiegen führen kann. Der individuelle Titeranstieg scheint allerdings je nach Serovar unterschiedlich zu sein. Hierbei sollte beachtet werden, dass die Interpretation der Ergebnisse oft schwierig ist, da es zum einen zu Kreuzreaktionen kommen kann (CHAPPEL et al., 2004; MILLER et al., 2011), zum anderen nicht alle Serovaren in den verwendeten Impfstoffen vorhanden und in den MAT-Verfahren genutzt werden. Desweiteren können die Titer über Jahre hinweg nachweisbar (ELLIS, 2015) oder unterhalb der Nachweisgrenze von 1:100 sein (ELLIS & THIERMANN, 1986; STRUTZBERG-MINDER & KREIENBROCK, 2011; SCHOMMER et al., 2021).

### **3.2. Serologische Untersuchung von Herzblut von Ferkeln mit einem errechneten Alter von mindestens 70 Tagen (SSL $\geq$ 160 mm) mittels MAT**

Von den 104 untersuchten Herzblutproben der Ferkel waren nur 24 (23,08 %) Proben aufgrund von Hämolyse auswertbar. Alle 24 (100 %) dieser Blutproben waren im MAT negativ. Da der MAT laut OIE als Goldstandard in der Leptospirendiagnostik gilt (OIE, 2021) und nicht nur Serum (SMYTHE et al., 2002), sondern auch Vollblut (VILLUMSEN et al., 2012) in der Literatur als geeignetes Material beschrieben wird, sollte geklärt werden, ob dieser Ansatz einen Mehrwert im Rahmen der Leptospirendiagnostik im Falle vom SMEDI haben könnte. Davon ausgehend, dass Ferkel ab einem Alter von 70 Tagen eine Immunkompetenz ausbilden können (MADSON et al., 2009; GERBER et al., 2012), hätten Antikörper gegen *Leptospira* spp. im Herzblut von Ferkeln, die dieses Alter erreicht hatten, erwartet werden können.

BOLIN et al. (1991) untersuchten das Serum von totgeborenen Ferkeln aus

17 Schweineherden, in denen Fruchtbarkeitsstörungen aufgetreten waren und verglichen die Nachweishäufigkeiten mittels MAT mit denen in der Kultur und im Immunfluoreszenztest. Zwar konnten sie die höchsten Nachweisraten mit 47,06 % (8 / 17) im MAT im Gegensatz zu 35,29 % (6 / 17) im Immunfluoreszenztest und 29,41 % (5 / 17) in der Kultur feststellen. Allerdings waren auch in dieser Studie 35,29 % (6 / 17) der untersuchten Proben nicht mittels MAT auswertbar. In einer Studie aus den Vereinigten Staaten wurden verschiedene Nachweismethoden im Rahmen der Leptospirendiagnostik beim Pferd untersucht (EROL et al., 2015). In dieser Studie lag die Nachweisrate im mittels MAT untersuchten Herzblut von abortierten Fohlen niedriger als die Nachweisrate in mittels PCR untersuchtem fetalen Nierengewebe. Diese Ergebnisse decken sich mit jenen aus der vorliegenden Studie. Dies kann zum einen an der geringeren Sensitivität des MATs im Gegensatz zu der von molekularbiologischen Methoden liegen (FERREIRA et al., 2014). Zum anderen sind die Titer bei einer akuten Infektion oft niedrig, weshalb der MAT einer Einzelprobe nicht immer aussagekräftig ist (MULLAN & PANWALA, 2016). Eine weitere mögliche Erklärung könnte darauf basieren, dass abhängig von der jeweiligen infizierenden Serovar, die zu mehr oder weniger schnellen, akuten fetalen Infektionen führen, die Feten nicht genug Zeit hatten, um Antikörper vor ihrem Absterben zu entwickeln.

Es kann also zusammenfassend vermutet werden, dass sich fetales Herzblut nicht für die serologische Untersuchung eignet. Damit können die beiden ursprünglich formulierten Arbeitshypothesen nicht bestätigt werden: Weder eignet sich Herzblut von Ferkeln, deren Scheitel-Steiß-Längen ein Alter von mindestens 70 Tagen erwarten lassen genauso, um eine Leptospireninfektion eines Wurfes im Fall von SMEDI zu identifizieren wie der Nachweis von DNA aus Gewebeproben. Noch ist die Kombination aus der Untersuchung von Herzblut von SMEDI-Ferkeln deren Scheitel-Steiß-Länge ein Alter von mindestens 70 Tagen erwarten lässt, und der Untersuchung von Mageninhalt, Niere, Leber und Mekonium auf Leptospiren-DNA vergleichbar mit dem Einsatz des MATs mit Serum der Muttersau. Dem als Goldstandard geltendem MAT kommt in der Leptospirendiagnostik dennoch eine bedeutende Wichtigkeit zu, da mittels

MAT eine genauere Serovarenbestimmung als durch die derzeit verfügbaren PCR-Assays möglich ist (EROL et al., 2015). Auch wenn *Leptospira* spp. in der Literatur regelmäßig mit SMEDI in Verbindung gebracht werden, fehlen weiterführende Studien zu diesem Thema und es mangelt an epidemiologischem Wissen sowie diagnostischen Empfehlungen für den Praktiker. Es ist anzunehmen, dass die Leptospirose als weltweit am weitest verbreiteten Zoonose (ADLER & DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010) auch in Zukunft an Bedeutung in der Schweinemedizin zunehmen könnte (STRUTZBERG-MINDER et al., 2018), weshalb zukünftige Studien zum besseren Verständnis von *Leptospira* spp. nötig sind.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

In der Literatur wird die Leptospirose immer wieder im Zusammenhang mit SMEDI (*stillbirth, mummification, embryonic death, infertility*) genannt. Dennoch fehlen weiterführende Studien, weshalb es das Ziel der vorliegenden Arbeit war, Ansatzpunkte zu liefern, um die Diagnostik hinsichtlich einer Leptospireninfektion bei Vorliegen von SMEDI zu optimieren. Dazu wurden die Nachweishäufigkeiten mittels PCR in verschiedenen Geweben und Phänotypen von Ferkeln aus SMEDI-assoziierten Würfen untersucht. Es sollte überprüft werden, ob der Mageninhalt bzw. Mekoniummaterial besser für den molekularbiologischen Nachweis geeignet sind als die klassischerweise empfohlenen Zielorgane Niere und Leber. Zusätzlich sollte der Mehrwert der Untersuchung von fetalem Herzblut auf Antikörper evaluiert werden, und es sollte untersucht werden, ob diese serologische Untersuchung in Kombination mit der molekularbiologischen Untersuchung der oben genannten Gewebe vergleichbar mit dem Einsatz des MATs mit Serum der Muttersau ist. Hierzu wurden insgesamt 158 mittels *stratified random sampling* ausgewählte Ferkel aus 40 SMEDI-assoziierten Würfen aus 18 Beständen untersucht.

In 12,66 % (20 / 158) der untersuchten Poolproben von Ferkeln aus 15 % (6 / 40) der Würfe aus 11,11 % (2 / 18) der Bestände war Leptospiren-DNA mittels LipL32-Screenings nachweisbar. Die höchste Nachweisrate konnte in autolytisch totgeborenen Ferkeln mit 6,33 % (10 / 158), gefolgt von mumifizierten Ferkeln mit 5,06 % (8 / 158) und frisch totgeborenen und lebensschwachgeborenen Ferkeln mit jeweils 0,63 % (1 / 158) gezeigt werden. Sowohl beim LipL32-Screening als auch bei der subtypspezifischen qPCR auf die Subclade P1 war die Nachweishäufigkeit bei autolytisch totgeborenen Ferkeln am höchsten. Eine Empfehlung für die Auswahl von autolytisch totgeborenen Ferkeln in Bezug auf die Probenentnahme kann demnach ausgesprochen werden.

Bei den verschiedenen untersuchten Geweben konnten sowohl im LipL32-Screening als auch bei der subtypspezifischen qPCR auf P1 die höchsten

Nachweisraten in der Niere mit 12,03 % (19 / 158), gefolgt von der Leber mit 10,76 % (17 / 158), vom Mageninhalt mit 9,49 % (15 / 158) und dem Mekonium mit 8,86 % (14 / 158) positiven Ergebnissen gezeigt werden. Dabei lagen die ct-Werte der Niere im LipL32-Screening signifikant niedriger als die der Mageninhalts- und Mekoniumproben, und die der Leberproben ebenfalls signifikant niedriger als die der Mageninhaltsproben. Diese Ergebnisse bestätigen den in der Literatur beschriebenen diagnostischen Wert von Nieren- und Leberproben im Rahmen der molekularbiologischen *Leptospirendiagnostik*. Eine Empfehlung zum Beprobieren von Mageninhalt- und Mekoniummaterial kann nicht ausgesprochen werden.

Im Rahmen der serologischen Untersuchung mittels MAT wurden insgesamt 44,44 % (16 / 36) der Sauen aus 62,5 % (10 / 16) der Bestände positiv auf Antikörper gegen *Leptospira* spp. getestet. Die Serovar Bratislava wurde mit 38,89 % (14 / 36) am häufigsten nachgewiesen. Die höchsten Antikörpertiter konnten bei ungeimpften Sauen gegen die Serovar Pomona gefunden werden.

Außerdem wurden Herzblutproben von 104 Ferkeln, deren Scheitel-Steiß-Länge ein Alter von mindestens 70 Tagen erwarten ließ, mittels MAT auf das Vorkommen von Antikörper gegen *Leptospira* spp. getestet. Alle 24 (100 %) auswertbaren Herzblutproben dieser SMEDI-assoziierten Ferkel zeigten bei der serologischen Untersuchung mittels MAT negative Ergebnisse. Ein Mehrwert dieser serologischen Untersuchung von fetalem Herzblut in Kombination mit dem molekularbiologischen Nachweis von *Leptospira* spp. in Gewebeproben im Gegensatz zum Einsatz des MATs im Serum der Muttersauen konnte somit nicht festgestellt werden.

## VII. SUMMARY

*“Detection of Leptospira spp. in piglets from SMEDI (stillbirth, mummification, embryonic death, infertility) associated litters”*

Leptospirosis is repeatedly mentioned in the literature in connection with SMEDI. However, further studies are missing, which is why the aim of the present work was to provide a basis to optimize the detection of *Leptospira* spp. in SMEDI-associated cases. For that reason, the PCR-detection rate of different tissues and phenotypes from piglets from SMEDI-associated litters were compared. The aim was to investigate whether stomach content and meconium are more suitable for the molecular-biological detection than the tissues of the kidney and liver traditionally recommended. Furthermore, the intention was to evaluate the diagnostic value of the serological examination of fetal heart-blood. This technique in combination with the molecular examination of the above mentioned tissues were to be compared to the use of MAT on the sera from the sows. Therefore a total of 158 piglets from 40 SMEDI-associated litters from 18 farms were chosen by stratified random sampling.

In 12.66 % (20 / 158) of the examined pooled samples from piglets from 15 % (6 / 40) of the litters from 11.11 % (2 / 18) of the farms, *Leptospira*-genome was detected via LipL32-Screening. The most frequent demonstration of *Leptospira*-genome was found in autolytic stillborn piglets with 6.33 % (10 / 158) positive samples, followed by mummified piglets with 5.06 % (8 / 158), and fresh stillborn and weak-born piglets each with 0.63 % (1 / 158) positive samples. The occurrence of *Leptospira*-genome tended to be more frequent in pooled tissue samples from autolytic stillborn piglets. The frequencies of detection of *Leptospira*-genome were significantly higher in autolytic stillborn and in mummified piglets compared to those in fresh stillborn piglets in the LipL32-Screening as well as in the subtype-specific qPCR on Subclade P1. Therefore the sampling of autolytic stillborn piglets can be recommended.

The comparison of the results from different tissues showed that the highest frequency of *Leptospira*-genome detection could be found in

samples of the kidney with 12.03 % (19 / 158) positive samples, followed by the liver with 10.76 % (17 / 158), the stomach-content with 9.49 % (15 / 158) and meconium with 8.86 % (14 / 158) positive samples in the LipL32-screening. The same results were found in the subtype-specific qPCR on Subclade P1 respectively. On the quantitative level the samples of the kidney showed significantly lower ct-values than the samples of stomach-content and meconium. Furthermore, the ct-values of the samples of the liver were significantly lower than those of the stomach-content samples in the detection of *Leptospira* spp. via LipL32-screening. These results confirm the diagnostic value of samples of the kidney and the liver in the molecular-biological detection of *Leptospira* spp. The sampling of stomach content or meconium cannot be recommended.

The serological testing for *Leptospira* spp. specific antibodies using MAT on the blood serum showed positive results for 44.44 % (16 / 36) of the sows from 62.5 % (10 / 16) of the farms. Concerning the frequency of detection on the level of the individual serovars, the Serovar Bratislava showed the highest rate of detection with 38.89 % (14 / 36) Bratislava-positive tested sows. The highest antibody-titers in unvaccinated sows were shown against the serovar Pomona. This might lead to the conclusion that this serovar could possibly play an important role within SMEDI-infections.

Additionally, samples of heart-blood from 104 piglets, whose crown-rump-length allowed the assumption of an age of at least 70 days, were tested for *Leptospira* spp.-specific antibodies using MAT. All 24 (100 %) of the evaluable heart-blood samples showed negative results in the serological testing via MAT. Thus, an increased diagnostic value of this serological examination in combination with the molecular detection of pathogenic *Leptospira* spp. in fetal tissues compared to the use of MAT on the sera from the sows could not be shown.

## VIII. TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1: Bei Schweinen vorkommende Leptospiren-Serovare und die von ihnen gebildeten Serogruppen, für die das Schwein a) als Reservoirwirt gilt und b) Serovaren und Serogruppen, mit denen sich das Schwein zwar infizieren kann, wobei das Schwein aber eher als Fehlwirt agiert (BOLIN, 1994; LEVETT, 2001; ELLIS, 2006; STRUTZBERG-MINDER &amp; KREIENBROCK, 2011; ELLIS, 2015; STRUTZBERG-MINDER et al., 2018)</i>	4
<i>Tabelle 2: Übersicht über die sechs im Porcilis® Ery+Parvo+Lepto enthaltenen inaktivierten Leptospirenstämme, Quelle: <a href="https://www.msdtiergesundheit.de/produkte/porcilis-eryparvolepto/">https://www.msdtiergesundheit.de/produkte/porcilis-eryparvolepto/</a></i>	25
<i>Tabelle 3: Studienpopulation auf Bestands- (n = 18), Wurf- (n = 40) und Einzeltierebene, inklusive eingeschickter (n<sub>gesamt</sub> = 358) und untersuchter Ferkel (n<sub>untersucht</sub> = 158) und Anteil untersuchter Ferkel pro Bestand (%)</i>	29
<i>Tabelle 4: Übersicht über die Anzahl der zu beprobenden Ferkel in Abhängigkeit von der Wurfgröße (Anzahl Ferkel pro Wurf)</i>	33
<i>Tabelle 5: Übersicht über die Auswahl des Ferkels, bei der das Zählen für die Probenentnahme begann</i>	34
<i>Tabelle 6: Übersicht über die elf im MAT verwendeten Serogruppen / Serovaren</i>	39
<i>Tabelle 7: Sauen und beprobte Ferkel (n / %) in Abhängigkeit von der Parität der Sau</i>	44
<i>Tabelle 8: Anteile (%) der Phänotypen innerhalb der Gesamtpopulation (n = 358) im Vergleich zur randomisiert ausgewählte Studienpopulation (n = 158)</i>	45
<i>Tabelle 9: Anteile der einzelnen Phänotypen an den 20 im LipL32-Screening positiv getesteten Poolproben, sowie Mittelwerte der ct-Werte (inklusive Minimum, Maximum und Standardabweichung)</i>	48
<i>Tabelle 10: Assoziation des autolytischen Phänotyps mit dem Ergebnis des LipL32-Screenings der Ferkel aus SMEDI-assoziierten Würfen</i>	48

<i>Tabelle 11: Vergleich der LipL32-Screening-Ergebnisse der Pool-, Nieren-, Leber-, Mageninhalt- und Mekoniumproben mit jeweiligen Anteilen an der gesamten Studienpopulation (n = 158) und an den positiven Proben aus dem LipL32-Screening (n = 20) in %; sowie Mittelwerte der ct-Werte mit Minimum, Maximum und Standardabweichung .....</i>	<i>49</i>
<i>Tabelle 12: Mittels LipL32-Screening positiv getestete Ferkel (n = 20) mit Vergleich der positiven Gewebeproben (Niere-, Leber-, Mageninhalt- und Mekoniumproben).....</i>	<i>50</i>
<i>Tabelle 13: ct-Wertvergleich des LipL32-Screenings auf pathogene Leptospira spp. in Abhängigkeit des untersuchten Gewebes in SMEDI-assoziierten Ferkeln .....</i>	<i>51</i>
<i>Tabelle 14: Nachweisrate der Subclade P1 in Poolproben in Abhängigkeit vom Phänotyp der Ferkel und ct-Werte (inklusive Minimum, Maximum und Standardabweichung) .....</i>	<i>53</i>
<i>Tabelle 15: Positiv getestete Proben mittels subtypspezifischer qPCR auf die Subclade P1 im Gewebevergleich in Bezug auf die gesamte Studienpopulation (n = 158) und die im LipL32-Screening positiv getesteten Ferkel (n = 20), inklusive Mittelwerte der ct-Werte (mit Minimum; Maximum und Standardabweichung) .....</i>	<i>54</i>
<i>Tabelle 16: ct-Wertvergleich der subtypspezifischen qPCR auf pathogene Leptospira spp. in Abhängigkeit des untersuchten Gewebes in SMEDI-assoziierten Ferkeln .....</i>	<i>55</i>
<i>Tabelle 17: Nachweishäufigkeiten der einzelnen Serovaren in Bezug auf die gesamte Studienpopulation (n = 36) und die MAT-positiven Sauen (n = 16); geordnet nach abnehmender Nachweishäufigkeit .....</i>	<i>57</i>
<i>Tabelle 18: Nachweishäufigkeiten einzelner Serovaren / Serogruppen (n = 7) der 16 MAT-positiven Würfe (bzw. Sauen), inklusive Bestandsnummern und PCR-Ergebnissen der Ferkel; * geimpfte Sauen; A. AUS = Australis, AUS; B. AUS = Bratislava, AUS; A. AUT = Autumnalis, AUT; C. CAN = Canicola, CAN; C. ICT = Copenhageni, ICT; I. ICT = Icterohaemorrhagiae, ICT; P. POM = Pomona, POM .....</i>	<i>59</i>
<i>Tabelle 19: Nachweishäufigkeiten der Antikörper gegen die einzelnen Serovaren in Abhängigkeit von dem Impfstatus der Sau und dem Leptospiren-PCR-Ergebnis der Ferkel .....</i>	<i>60</i>

<i>Tabelle 20: Übersicht über die Ergebnisse der Prüfung auf Assoziation der PCR-Ergebnisse der Ferkel, der Parität und des Impfstatus der Sau mit dem MAT-Ergebnis der Sau, inklusive binär logistischer Regression.....</i>	<i>61</i>
<i>Tabelle 21: Durchgeführte Bestandsimpfung je Bestand (laut Fragebogen) .....</i>	<i>114</i>
<i>Tabelle 22: Ergebnisse des Tests auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test im Rahmen der quantitativen Auswertung der molekularbiologischen Ergebnisse.....</i>	<i>115</i>
<i>Tabelle 23: Ergebnisse des Tests auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test im Rahmen der quantitativen Auswertung der serologischen Ergebnisse.....</i>	<i>116</i>
<i>Tabelle 24: Auf Assoziation mit dem PCR-Ergebnis überprüfte unabhängige Variablen.....</i>	<i>116</i>
<i>Tabelle 25: Ergebnisse der Prüfung auf Assoziation mittels Chi<sup>2</sup>-Test der dichotomen Variablen mit dem PCR-Ergebnis der Ferkel.....</i>	<i>117</i>
<i>Tabelle 26: Ergebnisse der Prüfung auf Assoziation mittels Chi<sup>2</sup>-Test der dichotomen Variablen mit dem MAT-Ergebnis der Sau.....</i>	<i>117</i>



## IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1: Ferkel des Wurfs Nummer 2.2. mit der jeweiligen dreiteiligen Nummer der einzelnen Ferkel inklusive Gewicht (g) und SSL (cm), sowie Übersichtszettel mit den zusätzlichen Daten aus dem Fragebogen (Foto: Klinik für Schweine der LMU München) .....</i>	<i>31</i>
<i>Abbildung 2: Anzahl der Ferkel pro Wurf nach Anzahl der Würfe (n = 40) .....</i>	<i>44</i>
<i>Abbildung 3: Verteilung der Scheitel-Steiß-Längen (mm) und Gewichte (g) innerhalb der beprobten Studienpopulation (n = 158) .....</i>	<i>46</i>
<i>Abbildung 4: Darstellung der ct-Wert-Verteilung des LipL32-Screenings auf pathogene Leptospira spp. mittels Box-Plots im Gewebevergleich (Pool- (n = 20), Nieren- (n = 19), Leber- (n = 17), Mageninhalts- (n = 15) und Mekoniumproben (n = 14)).....</i>	<i>51</i>
<i>Abbildung 5: Darstellung der ct-Wert-Verteilung der genotypspezifischen 16S-RNA-qPCR der Subclade P1 mittels Box-Plots in den Pool- (n = 20), Nieren- (n = 19), Leber- (n = 17), Mageninhalts- (n = 15) und Mekoniumproben (n = 14).....</i>	<i>55</i>
<i>Abbildung 6: MAT-Titer-Verteilung der Antikörper gegen die einzelnen Serovaren mittels Box-Plots mit Vergleich der drei Gruppen der Sauen (geimpft / PCR negativ (n = 2), ungeimpft / PCR negativ (n = 8), ungeimpft / PCR positiv (n = 6)).....</i>	<i>62</i>
<i>Abbildung 7: Fragebogen, der den Betriebsleitern*innen der in die Studie inkludierten Bestände zur freiwilligen Teilnahme zugeschickt wurde..</i>	<i>113</i>



**X. LITERATURVERZEICHNIS**

Adler B, de la Pena Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary Microbiology* 2010; 140: 287-296.

Agampodi SB, Matthias MA, Moreno AC, Vinetz JM. Utility of quantitative polymerase chain reaction in leptospirosis diagnosis: association of level of leptospiremia and clinical manifestations in Sri Lanka. *Clinical Infectious Diseases* 2012; 54: 1249-1255.

Ahmed A, Grobusch M, Klatser P, Hartskeerl R. Molecular approaches in the detection and characterization of *Leptospira*. *Journal of Bacteriology & Parasitology* 2012; 3: 1-12.

Althouse G, Kauffold J, Rossow S. Diseases of the Reproductive System. In: *Diseases of swine*, 11 edn. Jeffrey J. Zimmerman LAK, Alejandro Ramirez, Kent J. Schwartz, Gregory W. Stevenson, Jianqiang Zhang, ed. Hoboken, NJ 07030, USA: John Wiley & Sons, Inc. 2019: 373-392.

Andersen-Ranberg EU, Pipper C, Jensen PM. Global patterns of *Leptospira* prevalence in vertebrate reservoir hosts. *Journal of Wildlife Diseases* 2016; 52: 468-477.

André-Fontaine G. Leptospirosis in domestic animals in France: serological results from 1988 to 2007. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* 2016; 35: 2.

Arent Z, Ellis W. Leptospirosis. In: *Diseases of swine*, 11th edn. Zimmerman J, Kriker L, Ramirez A, Schwartz K, Stevenson G, J Z, eds. Hoboken, NJ 07030, USA: John Wiley & Sons, Inc. 2019: 854-862.

Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides* 2015; 72:

4-15.

Balboni A, Mazzotta E, Boniotti MB, Bertasio C, Bellinati L, Lucchese L, Battilani M, Ceglie L, Marchione S, Esposito G. Outbreak of *Leptospira borgpetersenii* Serogroup Sejroe Infection in Kennel: The Role of Dogs as Sentinel in Specific Environments. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2022; 19: 3906.

Bates TA, McBride SK, Leier HC, Guzman G, Lyski ZL, Schoen D, Winders B, Lee J-Y, Lee DX, Messer WB. Vaccination before or after SARS-CoV-2 infection leads to robust humoral response and antibodies that effectively neutralize variants. *Science Immunology* 2022; 7: eabn8014.

Benson JE, Yaeger MJ, Christopher-Hennings J, Lager K, Yoon K-J. A comparison of virus isolation, immunohistochemistry, fetal serology, and reverse-transcription polymerase chain reaction assay for the identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus transplacental infection in the fetus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2002; 14: 8-14.

Bertasio C, Papetti A, Scaltriti E, Tagliabue S, D’Incau M, Boniotti MB. Serological survey and molecular typing reveal new *Leptospira* serogroup pomona strains among pigs of Northern Italy. *Pathogens* 2020; 9: 332.

Bertelloni F, Cilia G, Turchi B, Pinzauti P, Cerri D, Fratini F. Epidemiology of leptospirosis in North-Central Italy: Fifteen years of serological data (2002–2016). *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 2019; 65: 14-22.

Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM, Peru-United States Leptospirosis C. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infectious Diseases* 2003; 3: 757-771.

BMEL. Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten in der Fassung der Bekanntmachung. <https://www.bmel.de/DE/themen/tiere/tiergesundheit/tierseuchen/meldepflichtige-tierkrankheiten.html#doc7694body>

Text2: Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft 2020: 22.09.2022.

Bolin CA, Cassells JA. Isolation of *Leptospira interrogans* serovar bratislava from stillborn and weak pigs in Iowa. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1990; 196: 1601-1604.

Bolin CA, Cassells JA, Hill HT, Frantz JC, Nielsen JN. Reproductive failure associated with *Leptospira interrogans* serovar bratislava infection of swine. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1991; 3: 152-154.

Bolin CA. Diagnosis of leptospirosis in swine. *Swine Health and Production* 1994; 2: 23.

Boqvist S, Montgomery JM, Hurst M, Thu HT, Engvall EO, Gunnarsson A, Magnusson U. *Leptospira* in slaughtered fattening pigs in southern Vietnam: presence of the bacteria in the kidneys and association with morphological findings. *Veterinary Microbiology* 2003; 93: 361-368.

Brown P, Gravekamp C, Carrington D, Van de Kemp H, Hartskeerl R, Edwards C, Everard C, Terpstra W, Levett P. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *Journal of Medical Microbiology* 1995; 43: 110-114.

Buddle J, Hodges R. Observations on some aspects of the epidemiology of leptospirosis in a herd of pigs. *New Zealand Veterinary Journal* 1977; 25: 56-66.

Bundesamt. [https://www.destatis.de/DE/Themen/Branchen-Unternehmen/Landwirtschaft-Forstwirtschaft-Fischerei/Tiere-Tierische-Erzeugung/\\_inhalt.html](https://www.destatis.de/DE/Themen/Branchen-Unternehmen/Landwirtschaft-Forstwirtschaft-Fischerei/Tiere-Tierische-Erzeugung/_inhalt.html): Statistisches Bundesamt 2022: 19.09.2022.

Calderón A, Rodríguez V, Máttar S, Arrieta G. Leptospirosis in pigs, dogs, rodents, humans, and water in an area of the Colombian tropics. *Tropical Animal Health and Production* 2014; 46: 427-432.

Cameron CE. Leptospiral structure, physiology, and metabolism. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 2015; 387: 21-41.

Chappel R, Goris M, Palmer M, Hartskeerl R. Impact of proficiency testing on results of the microscopic agglutination test for diagnosis of leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42: 5484-5488.

Charon NW, Goldstein SF. Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: the spirochetes. *Annual Review of Genetics* 2002; 36: 47-73.

Choi C, Molitor TW, Joo HS, Gunther R. Pathogenicity of a skin isolate of porcine parvovirus in swine fetuses. *Veterinary Microbiology* 1987; 15: 19-29.

Christianson WT. Stillbirths, mummies, abortions, and early embryonic death. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 1992; 8: 623-639.

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 Neglected Tropical Diseases* 2015; 9: e0003898.

Cullen PA, Haake DA, Adler B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. *FEMS Microbiology Reviews* 2004; 28: 291-318.

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

4863.

Da Silva FT, Gonik B, McMillan M, Keech C, Dellicour S, Bhange S, Tila M, Harper DM, Woods C, Kawai AT. Stillbirth: Case definition and guidelines for data collection, analysis, and presentation of maternal immunization safety data. *Vaccine* 2016; 34: 6057.

Dal Santo AC, Cezario KC, Bennemann PE, Machado SA, Martins M. Full-genome sequences of porcine circovirus 3 (PCV3) and high prevalence in mummified fetuses from commercial farms in Brazil. *Microbial Pathogenesis* 2020; 141: 104027.

De Azevedo SS, Soto FRM, de Morais ZM, Pinheiro SR, de Sousa Américo Batista C, Vuaden E, Vasconcellos SA. The effects of the leptospiral infection on reproductive performance in sows. *Veterinarski Arhiv* 2008; 78: 13-21.

Dellagostin OA, Grassmann AA, Hartwig DD, Felix SR, da Silva EF, McBride AJ. Recombinant vaccines against leptospirosis. *Human Vaccines* 2011; 7: 1215-1224.

Edwards J, Daines D. A leptospirosis outbreak in a piggery. *New Zealand Veterinary Journal* 1979; 27: 247-248.

Ellinghausen HC, Jr., McCullough WG. Nutrition of *Leptospira Pomona* and Growth of 13 Other Serotypes: A Serum-Free Medium Employing Oleic Albumin Complex. *American Journal of Veterinary Research* 1965; 26: 39-44.

Ellis WA, McParland PJ, Bryson DG, Cassells JA. Prevalence of *Leptospira* infection in aborted pigs in Northern Ireland. *The Veterinary Record* 1986; 118: 63-65.

Ellis WA, Thiermann AB. Isolation of *Leptospira interrogans* serovar bratislava from sows in Iowa. *American Journal of Veterinary Research* 1986; 47: 1458-1460.

Ellis WA. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 1994; 10: 463-478.

Ellis WA. Leptospirosis. In: *Diseases of swine*, 9th edn. Straw B, Zimmermann J, D'allaire S, eds. Ames, IA: Blackwell Publishing 2006: 691-700.

Ellis WA. Animal leptospirosis. In: *Leptospira and Leptospirosis*. Adler B, ed. Melbourne, Australia: Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015 2015: 99-137.

Erol E, Jackson CB, Steinman M, Meares K, Donahoe J, Kelly N, Locke S, Smith JL, Carter CN. A diagnostic evaluation of real-time PCR, fluorescent antibody and microscopic agglutination tests in cases of equine leptospiral abortion. *Equine Veterinary Journal* 2015; 47: 171-174.

Espy M, Uhl J, Sloan L, Buckwalter S, Jones M, Vetter E, Yao J, Wengenack N, Rosenblatt J, Cockerill III F. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews* 2006; 19: 165-256.

Faine S. Virulence in *Leptospira*. II: The growth in vivo of virulent *Leptospira icterohaemorrhagiae*. *British Journal of Experimental Pathology* 1957; 38: 8.

Fennestad K, Borg-Petersen C. Experimental leptospirosis in pregnant sows. *The Journal of Infectious Diseases* 1966: 57-66.

Ferreira AS, Costa P, Rocha T, Amaro A, Vieira ML, Ahmed A, Thompson

G, Hartskeerl RA, Inácio J. Direct detection and differentiation of pathogenic *Leptospira* species using a multi-gene targeted real time PCR approach. *PLoS One* 2014; 9: e112312.

Field H, Sellers K. *Leptospira icterohaemorrhagiae* infection in piglets. *The Veterinary Record* 1951; 63: 78-81.

Fornazari F, da Silva RC, Richini-Pereira VB, Beserra HEO, Luvizotto MCR, Langoni H. Comparison of conventional PCR, quantitative PCR, bacteriological culture and the Warthin Starry technique to detect *Leptospira* spp. in kidney and liver samples from naturally infected sheep from Brazil. *Journal of Microbiological Methods* 2012; 90: 321-326.

Frantz JC, Hanson LE, Brown A. Effect of vaccination with a bacterin containing *Leptospira interrogans* serovar bratislava on the breeding performance of swine herds. *American Journal of Veterinary Research* 1989; 50: 1044-1047.

Gerber PF, Garrocho FM, Lana ÂM, Lobato ZI. Fetal infections and antibody profiles in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2 (PCV2). *Canadian Journal of Veterinary Research* 2012; 76: 38-44.

Givens MD, Marley M. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. *Theriogenology* 2008; 70: 270-285.

Goarant C. Leptospirosis: risk factors and management challenges in developing countries. *Research and Reports in Tropical Medicine* 2016; 7: 49-62.

Goris MG, Hartskeerl RA. Leptospirosis serodiagnosis by the microscopic agglutination test. *Current Protocols in Microbiology* 2014; 32: Unit 12E 15.

Guernier V, Allan KJ, Goarant C. Advances and challenges in barcoding pathogenic and environmental *Leptospira*. *Parasitology* 2018; 145: 595-607.

Haake DA. Hamster model of leptospirosis. *Current Protocols in Microbiology* 2006; Chapter 12: Unit 12E 12.

Habus J, Persic Z, Spicic S, Vince S, Stritof Z, Milas Z, Cvetnic Z, Perharic M, Turk N. New trends in human and animal leptospirosis in Croatia, 2009–2014. *Acta Tropica* 2017; 168: 1-8.

Hanson L, Tripathy D, Gyles C, Thoen C. *Leptospira*. Pathogenesis of Bacterial Disease Infections in Animals. Iowa State University Press, Ames 1986: 200-204.

Hathaway S, Little T. Prevalence and clinical significance of leptospiral antibodies in pigs in England. *The Veterinary Record* 1981; 108: 224-228.

Hauk P, Macedo F, Romero EC, Vasconcellos SA, de Moraes ZM, Barbosa AS, Ho PL. In LipL32, the major leptospiral lipoprotein, the C terminus is the primary immunogenic domain and mediates interaction with collagen IV and plasma fibronectin. *Infection and Immunity* 2008; 76: 2642-2650.

He H, Wang W, Wu Z, Lv Z, Li J, Tan L. Protection of guinea pigs against *Leptospira interrogans* serovar Lai by LipL21 DNA vaccine. *Cellular & Molecular Immunology* 2008; 5: 385-391.

Heinritzi K, Gindele H, Reiner G, Schnurrbusch U. Planmäßige Bestandsbehandlung. In: *Schweinekrankheiten*. Loeffler K, Strauch D, eds. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer Stuttgart 2006a: 403.

Heinritzi K, Gindele H, Reiner G, Schnurrbusch U. Virale Infektionskrankheiten. In: *Schweinekrankheiten*. Loeffler K, Strauch D,

eds. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer Stuttgart 2006b: 118-120.

Hoke DE, Egan S, Cullen PA, Adler B. LipL32 is an extracellular matrix-interacting protein of *Leptospira* spp. and *Pseudoalteromonas tunicata*. *Infection and Immunity* 2008; 76: 2063-2069.

Jacobs A, Harks F, Hoeijmakers M, Collell M, Segers R. Safety and efficacy of a new octavalent combined Erysipelas, Parvo and *Leptospira* vaccine in gilts against *Leptospira interrogans* serovar Pomona associated disease and foetal death. *Vaccine* 2015; 33: 3963-3969.

Jayasundara D, Gamage C, Senavirathna I, Warnasekara J, Matthias MA, Vinetz JM, Agampodi S. Optimizing the microscopic agglutination test (MAT) panel for the diagnosis of Leptospirosis in a low resource, hyper-endemic setting with varied microgeographic variation in reactivity. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2021; 15: e0009565.

Jobbins SE, Alexander KA. Evidence of *Leptospira* sp. infection among a diversity of African wildlife species: beyond the usual suspects. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2015; 109: 349-351.

Johnson RC, Faine S. *Leptospira*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 1984; 1: 62-67.

Kemenes F, Süveges T. *Leptospira*-induced repeated abortion in sows. *Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae* 1976; 26: 395-403.

Kingscote B. Leptospirosis outbreak in a piggery in southern Alberta. *The Canadian Veterinary Journal* 1986; 27: 188.

Kirkwood RN, Althouse GC, Yaeger MJ, Carr J, Almond GW. Diseases of the reproductive system. In: *Diseases of swine*, 10 edn. Kirkwood RN,

Althouse GC, Yaeger MJ, Carr J, Almond GW, eds. West Sussex, UK: John Wiley and Sons 2012: 329-347.

Ko AI, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature Reviews Microbiology* 2009; 7: 736-747.

Lau CL, Smythe LD, Craig SB, Weinstein P. Climate change, flooding, urbanisation and leptospirosis: fuelling the fire? *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2010; 104: 631-638.

Leman AD, Cropper M, Rodeffer H. Infectious swine reproductive diseases. *Theriogenology* 1974; 2: 149-160.

Lenghaus C, Forman A, Hale C. Experimental infection of 35, 50 and 60 day old pig foetuses with porcine parvovirus. *Australian Veterinary Journal* 1978; 54: 418-422.

Levett PN. Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews* 2001; 14: 296-326.

Levett PN. Systematics of leptospiraceae. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 2015; 387: 11-20.

Lourdault K, Aviat F, Picardeau M. Use of quantitative real-time PCR for studying the dissemination of *Leptospira interrogans* in the guinea pig infection model of leptospirosis. *Journal of Medical Microbiology* 2009; 58: 648-655.

Madson D, Patterson A, Ramamoorthy S, Pal N, Meng X, Opriessnig T. Reproductive failure experimentally induced in sows via artificial insemination with semen spiked with porcine circovirus type 2. *Veterinary Pathology* 2009; 46: 707-716.

Marquez A, Djelouadji Z, Lattard V, Kodjo A. Overview of laboratory methods to diagnose Leptospirosis and to identify and to type leptospire. *International Microbiology* 2017; 20: 184-193.

Merien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology* 1992; 30: 2219-2224.

Mgode GF, Machang'u RS, Mhamphi GG, Katakweba A, Mulungu LS, Durnez L, Leirs H, Hartskeerl RA, Belmain SR. *Leptospira* serovars for diagnosis of leptospirosis in humans and animals in Africa: common *Leptospira* isolates and reservoir hosts. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2015; 9: e0004251.

Miller M, Annis K, Lappin M, Lunn K. Variability in results of the microscopic agglutination test in dogs with clinical leptospirosis and dogs vaccinated against leptospirosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2011; 25: 426-432.

Miotto BA, Hora ASd, Taniwaki SA, Brandão PE, Heinemann MB, Hagiwara MK. Development and validation of a modified TaqMan based real-time PCR assay targeting the *lipL32* gene for detection of pathogenic *Leptospira* in canine urine samples. *Brazilian Journal of Microbiology* 2018; 49: 584-590.

Mitchell D, Robertson A, Corner A, Boulanger P. Some observations on the diagnosis and epidemiology of leptospirosis in swine. *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science* 1966; 30: 211.

Mitchell PS, Mandrekar JN, Yao JD. Adoption of lean principles in a high-volume molecular diagnostic microbiology laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* 2014; 52: 2689-2693.

Morter R, Morse E, Langham R. Experimental leptospirosis. VII. Re-

exposure of pregnant sows with *Leptospira pomona*. American Journal of Veterinary Research 1960; 21: 95-98.

Mullan S, Panwala TH. Polymerase chain reaction: an important tool for early diagnosis of leptospirosis cases. Journal of Clinical and Diagnostic Research 2016; 10: DC08.

Münker W. Die Leptospirose der Haustiere und ihre Bedeutung als Infektionsquelle für den Menschen. Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B 1963; 10: 256-262.

Musso D, La Scola B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: a challenge. Journal of Microbiology, Immunology and Infection 2013; 46: 245-252.

Nagy G. Comparative pathogenicity study of *Leptospira interrogans* serovar pomona strains. Acta Veterinaria Hungarica 1993; 41: 315-324.

Narkkul U, Thaipadungpanit J, Srilohasin P, Singkhaimuk P, Thongdee M, Chaiwattananarungruengpaisan S, Krairojananan P, Pan-Ngum W. Optimization of culture protocols to isolate *Leptospira* spp. from environmental water, field investigation, and identification of factors associated with the presence of *Leptospira* spp. in the environment. Tropical Medicine and Infectious Disease 2020; 5: 94.

Nathues H, Tegeler R, Grummer B. Infectious agent detection in reproductive disorders in swine herds. Retrospective evaluation of diagnostic laboratory examinations. Tierärztliche Praxis. Ausgabe G, Grosstiere / Nutztiere 2011; 39: 155-161.

Nau LH, Emirhar D, Obiegala A, Mylius M, Runge M, Jacob J, Bier N, Nöckler K, Imholt C, Below D. Leptospirose in Deutschland: Aktuelle Erkenntnisse zu Erregerspezies, Reservoirwirten und Erkrankungen bei Mensch und Tier. Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz 2019; 62: 1510-1521.

Naudet J, Crespín L, Cappelle J, Kodjo A, Ayral F. Circulating serogroups of *Leptospira* in swine from a 7-year study in France (2011–2017). *Porcine Health Management* 2022; 8: 1-9.

Neto JF, Vasconcellos SA, Ito FH, Moretti ASA, Camargo CA, Sakamoto SM, Marangon S, Turilli C, Martini M. *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae seropositivity and the reproductive performance of sows. *Preventive Veterinary Medicine* 1997; 31: 87-93.

Niedmann G, Ferrer P, Ugarte G, Fernandez F. Jaundice caused by *Leptospira Icterohaemorrhagiae*. *Revista Medica de Chile* 1964; 92: 399-403.

Nielsen J, Rønsholt L, Sørensen K. Experimental in utero infection of pig foetuses with porcine parvovirus (PPV). *Veterinary Microbiology* 1991; 28: 1-11.

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

OIE WOofAH. Leptospirosis. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines Epizooties OIE, ed. Paris, France: 2000: 12.09.2022.

OIE WOofAH. Leptospirosis Terrestrial Manual. file:///H:/Diss/Literatur/Leptospiren/2021\_OIE\_Leptospirosis\_Terrestrial\_manual.pdf: 2021: 18.09.2022.

Padilha BCR, Simão HQ, Oliveira TL, Hartwig DD. The use of ErpY-like recombinant protein from *Leptospira interrogans* in the development of an immunodiagnostic test for swine leptospirosis. *Acta Tropica* 2019; 193: 31-34.

Palaniappan RU, Ramanujam S, Chang Y-F. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. *Current Opinion in Infectious Diseases* 2007; 20: 284-292.

Paul-Ehrlich-Institut. PEI list of registered vaccines for swine: Paul-Ehrlich-Institut. Paul-Ehrlich-Institut, ed. [https://www.pei.de/DE/arzneimittel/tierarzneimittel/schweine/schweine-node.html;jsessionid=EF6EB880584FB3D71C6322308209016E.intranet242?cms\\_gts=173888\\_list%253DdateOfIssue\\_dt%252Bdesc](https://www.pei.de/DE/arzneimittel/tierarzneimittel/schweine/schweine-node.html;jsessionid=EF6EB880584FB3D71C6322308209016E.intranet242?cms_gts=173888_list%253DdateOfIssue_dt%252Bdesc): 2016: 19.09.2022.

Pedersen K, Pabilonia K, Anderson T, Bevins S, Hicks C, Kloft J, Deliberto TJ. Widespread detection of antibodies to *Leptospira* in feral swine in the United States. *Epidemiology & Infection* 2015; 143: 2131-2136.

Pedersen K, Anderson T, Bevins S, Pabilonia K, Whitley P, Virchow D, Gidlewski T. Evidence of leptospirosis in the kidneys and serum of feral swine (*Sus scrofa*) in the United States. *Epidemiology & Infection* 2017; 145: 87-94.

Pérez-Pérez D, Sordo-Puga Y, Rodríguez-Moltó MP, Sardina T, Santana E, Montero C, Ancizar J, Cabrera Y, Tuero Á, Naranjo P. E2-CD154 vaccine candidate is safe and immunogenic in pregnant sows, and the maternal derived neutralizing antibodies protect piglets from classical swine fever virus challenge. *Veterinary Microbiology* 2021; 260: 109153.

Pérez LJ, Lanka S, DeShambo VJ, Fredrickson RL, Maddox CW. A Validated Multiplex Real-Time PCR Assay for the Diagnosis of Infectious *Leptospira* spp.: A Novel Assay for the Detection and Differentiation of Strains From Both Pathogenic Groups I and II. *Frontiers in Microbiology* 2020: 457.

Perolat P, Chappel RJ, Adler B, Baranton G, Bulach DM, Billingham M, Letocart M, Merien F, Serrano MS. *Leptospira fainei* sp. nov., isolated from pigs in Australia. *International Journal of Systematic and Evolutionary*

Microbiology 1998; 48: 851-858.

Picardeau M, Brenot A, Saint Girons I. First evidence for gene replacement in *Leptospira* spp. Inactivation of *L. biflexa* *flaB* results in non-motile mutants deficient in endoflagella. *Molecular Microbiology* 2001; 40: 189-199.

Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine et Maladies Infectieuses* 2013; 43: 1-9.

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

Picardeau M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? *Nature reviews. Microbiology* 2017; 15: 297-307.

Pijnacker R, Goris MG, Te Wierik MJ, Broens EM, van der Giessen JW, de Rosa M, Wagenaar JA, Hartskeerl RA, Notermans DW, Maassen K. Marked increase in leptospirosis infections in humans and dogs in the Netherlands, 2014. *Eurosurveillance* 2016; 21: 30211.

Plonait H. Fruchttoad und Abort. In: *Lehrbuch der Schweinekrankheiten*, 4 edn. Waldmann K, Wendt M, eds. Stuttgart: Parey 2004a: 450-455.

Plonait H. Leptospirose. In: *Lehrbuch der Schweinekrankheiten*, 4 edn. Waldmann K, Wendt M, eds. Stuttgart: Parey 2004b: 462-465.

Poudel A, Hoque MM, Madere S, Bolds S, Price S, Barua S, Adekanmbi F, Kalalah A, Kitchens S, Brown V. Molecular and serological prevalence of *Leptospira* spp. in feral pigs (*Sus scrofa*) and their habitats in Alabama, USA. *Pathogens* 2020; 9: 857.

Powledge TM. The polymerase chain reaction. *Advances in Physiology Education* 2004; 28: 44-50.

Pozzi P, Alborali G. Reproductive diseases in sows (*Sus scrofa domestica*): a review. *Israel Journal of Veterinary Medicine* 2012; 67: 24-33.

Pozzi P, Alborali G, Etinger M, Hadani Y. Epidemiological investigation of the prevalence of *Leptospira* spp. in pigs in Israel. *Israel Journal of Veterinary Medicine* 2020; 75: 2.

Raguvaran R, Sangeetha P, Prabakar G, Ravindra VJ. Still birth and mummification in swine-A review. *Agricultural Reviews* 2017; 38

Rehmtulla AJ, Prescott JF, Nicholson VM, Bolin CA. Ontario. *Leptospira bratislava* infection in aborted pigs in Ontario. *The Canadian Veterinary Journal* 1992; 33: 345.

Saglam YS, Yildirim S, Ozkaraca M, Altun S. Investigation of leptospiral antigen with immunohistochemical and immunofluorescence methods in cattle kidney. *Microbial Pathogenesis* 2022; 164: 105434.

Sandstedt K, Engvall A. Serum antibodies to *Leptospira bratislava* in Swedish pigs and horses. *Nordisk veterinärmedicin* 1985; 37: 312-313.

Schommer SK, Harrison N, Linville M, Samuel MS, Hammond SL, Wells KD, Prather RS. Serologic titers to *Leptospira* in vaccinated pigs and interpretation for surveillance. *PloS One* 2021; 16: e0260052.

Schönberg A, Hahn-Hey B, Kämpe U, Schmidt K, Ellis WA. The isolation and identification of *Leptospira interrogans* serovar *bratislava* from a pig in Germany. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B* 1992; 39: 362-368.

Schönberg A, Ortmann G, Reetz J, Luge E, Richtzenhain LJ, Cortez A,

Vasconcellos SA, Brem S. Positive PCR for *Leptospira* spp. in a sow from a German herd presenting animals with mat titres for *Leptospira interrogans* serovar Bratislava. *Arquivos do Instituto Biológico* 2021; 72: 117-120.

Senthilkumar K, Aravindhbabu R, Ravikumar G. Prototype Pentavalent Bovine *Leptospira* Vaccines Blended with Oil Adjuvant Provides Protection and Prevents Renal Colonization in Guinea Pig Model. *Indian Journal of Animal Research* 2022; 56: 579-586.

Silva GS, da Costa Lana MV, Dias GB, da Cruz RA, Lopes LL, Machado G, Corbellini LG, Gava D, Souza MA, Pescador CA. Case-control study evaluating the sow's risk factors associated with stillbirth piglets in Midwestern in Brazil. *Tropical Animal Health and Production* 2015; 47: 445-449.

Smythe LD, Smith IL, Smith GA, Dohnt MF, Symonds ML, Barnett LJ, McKay DB. A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. *BMC Infectious Diseases* 2002; 2: 1-7.

Sokal RR. The principles and practice of statistics in biological research. *Biometry* 1995: 451-554.

Soto F, Vasconcellos S, Pinheiro S, Bernarsi F, Camargo S. Swine Leptospirosis: A review. *Arquivos do Instituto Biológico* 2022; 74: 379-395.

Soto FRM, Azevedo SSd, Morais ZMd, Pinheiro SR, Delbem ÁCB, Moreno AM, Paixão R, Vuaden ER, Vasconcellos SA. Detection of leptospires in clinically healthy piglets born from sows experimentally infected with *Leptospira interrogans* serovar Canicola. *Brazilian Journal of Microbiology* 2006; 37: 582-586.

Streck AF, Truyen U. Porcine Parvovirus. *Current Issues in Molecular Biology* 2020; 37: 33-46.

Strutzberg-Minder K, Kreienbrock L. [Leptospire infections in pigs: epidemiology, diagnostics and worldwide occurrence]. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 2011; 124: 345-359.

Strutzberg-Minder K, Tschentscher A, Beyerbach M, Homuth M, Kreienbrock L. Passive surveillance of *Leptospira* infection in swine in Germany. *Porcine Health Management* 2018; 4: 10.

Sumi A, Telan E, Chagan-Yasutan H, Piolo M, Hattori T, Kobayashi N. Effect of temperature, relative humidity and rainfall on dengue fever and leptospirosis infections in Manila, the Philippines. *Epidemiology & Infection* 2017; 145: 78-86.

Sydler T, Brugnera E, Weilenmann R, Zimmermann D, Engels M, Sidler X. Erste diagnostizierte PCV-2-bedingte „SMEDI-Fälle“ in der Schweiz. *Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Großtiere/Nutztiere* 2011; 39: 231-236.

Tagliabue S, Figarolli BM, D’Incau M, Foschi G, Gennero MS, Giordani R, Natale A, Papa P, Ponti N, Scaltrito D. Serological surveillance of Leptospirosis in Italy: Two-year national data (2010–2011). *Veterinaria Italiana* 2016; 52: 129-138.

Takabe K, Nakamura S, Ashihara M, Kudo S. Effect of osmolarity and viscosity on the motility of pathogenic and saprophytic *Leptospira*. *Microbiology and Immunology* 2013; 57: 236-239.

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

Theodoridis D (2004) Entwicklung eines ELISA zur Serodiagnose der Leptospirose und einer PCR zum direkten Nachweis des Erregers.

Hannover, Tierärztliche Hochschule, Dissertation

Thibeaux R, Girault D, Bierque E, Soupe-Gilbert ME, Rettinger A, Douyere A, Meyer M, Iraola G, Picardeau M, Goarant C. Biodiversity of Environmental *Leptospira*: Improving Identification and Revisiting the Diagnosis. *Frontiers in Microbiology* 2018a; 9: 816.

Thibeaux R, Iraola G, Ferres I, Bierque E, Girault D, Soupe-Gilbert ME, Picardeau M, Goarant C. Deciphering the unexplored *Leptospira* diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence. *Microbial Genomics* 2018b; 4.

Tomckowiack C, Matamala S, León C, Moroni M, Salgado M. Detection of pathogenic *leptospira* as a cause of abortion in cattle-observations on diagnosis. *Austral Journal of Veterinary Sciences* 2022; 54: 77-81.

Unterweger C, Ruczizka U, Hiessberger N, Spergser J, Hennig-Pauka I. Diagnostische Abklärung von Aborten bei Zuchtsauen nach *Leptospiren*- und *Chlamydien*infektion. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 2018; 160: 475-480.

Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education* 2005; 29: 151-159.

Valença R, Mota R, Castro V, Anderlini G, Pinheiro Júnior J, Brandespim D, Valença S, Guerra M. Prevalence and risk factors associated with *leptospira* spp. infection in technified swine farms in the state of Alagoas, Brazil risk factors associated with *leptospira* spp. in swine farms. *Transboundary and Emerging Diseases* 2013; 60: 79-86.

Villumsen S, Pedersen R, Borre MB, Ahrens P, Jensen JS, Krogfelt KA. Novel TaqMan® PCR for detection of *Leptospira* species in urine and blood: pit-falls of in silico validation. *Journal of Microbiological Methods* 2012; 91: 184-190.

Vincent AT, Schiettekatte O, Goarant C, Neela VK, Bernet E, Thibeaux R, Ismail N, Mohd Khalid MKN, Amran F, Masuzawa T, Nakao R, Amara Korba A, Bourhy P, Veyrier FJ, Picardeau M. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2019; 13: e0007270.

Wandurski A. Influence of infections with various serotypes of *Leptospira interrogans* on the fertility of animals [pigs]. *Medycyna Weterynaryjna (Poland)* 1982: 218-220.

WHO. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/50594/retrieve>: 2003: 21.09.2022.

Wild CJ, Greenlee JJ, Bolin CA, Barnett JK, Haake AD, Cheville NF. An improved immunohistochemical diagnostic technique for canine leptospirosis using antileptospiral antibodies on renal tissue. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2002; 14: 20-24.

Wrathall A, Bailey J, Hebert CN. A radiographic study of development of the appendicular skeleton in the fetal pig. *Research in veterinary science* 1974; 17: 154-168.

Zhang C, Yang H, Li X, Cao Z, Zhou H, Zeng L, Xu J, Xu Y, Chang Y-F, Guo X. Molecular typing of pathogenic *Leptospira* serogroup Icterohaemorrhagiae strains circulating in China during the past 50 years. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2015; 9: e0003762.

Zimmerman MR. Histological examination of experimentally mummified tissues. *American Journal of Physical Anthropology* 1972; 37: 271-280.

Zuerner R, Haake D, Adler B, Segers R. Technological advances in the molecular biology of *Leptospira*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 2000; 2: 455-462.

## XI. ANHANG

**1. Allgemeine Informationen:**  
 Betrieb (Name, Anschrift): \_\_\_\_\_  
 Betreuende Tierarztpraxis (Name, Anschrift): \_\_\_\_\_

**2. Angaben zum Betrieb:**  
 Anzahl der Sauen: \_\_\_\_\_  
 Betriebsform:                   offen/geschlossen

	Sauen ja	Sauen nein	Ferkel ja	Ferkel nein
Auslauf				
Stroheinstreu				

**Impfungen der Sauen:**

Erreger	Impfung (ja/nein)	Impfzeitpunkt
PCV2		
PPV		
Leptospiren		
PRRSV		
Rotlauf		
Influenza		
Sonstige?		

**Impfungen der Ferkel + Impfzeitpunkt**  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

**Jungsauen-Eingliederung: Impfungen der Jungsauen + Impfzeitpunkt:**  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

**Vorherige Behandlungen der SMEDI-Problematik? Wann? Was?**  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

**Jungsauen-Quarantäne:**                   ja/nein  
**Schadnagerbekämpfung?**               ja/nein

**3. Angaben zum Probenmaterial:**

Sauenummer/Ohrmarkennummer?	
Parität der Sau:	
Geburtsdatum/Abortdatum:	
Datum Probengewinnung:	
Anzahl lebend geborener Ferkel:	
Anzahl tot geborener Ferkel:	
Anzahl mumifizierter Ferkel:	

**4. Kennzahlen der Zucht:**

Remontierungsrate/Jahr (%):	
Umrauschquote (%):	
Abortrate (%):	
Durchgänge pro Sau/Jahr:	

Abbildung 7: Fragebogen, der den Betriebsleitern\*innen der in die Studie inkludierten Bestände zur freiwilligen Teilnahme zugeschiedt wurde

**Tabelle 21: Durchgeführte Bestandsimpfung je Bestand (laut Fragebogen)**

<b>Durchgeführte Bestandsimpfung</b>			
<b>Bestand Nr.</b>	<b>PCV2</b>	<b>PPV</b>	<b>Leptospiren</b>
1		X	
2		X	
3	X	X	
4	X	X	
5	X	X	
6	X	X	X
7	X	X	
8		X	
9	X	X	
10	X	X	
11		X	
12	X	X	X
13	X	X	
14	X	X	
15	X	X	
16	X	X	
17		X	
18		X	

**Tabelle 22: Ergebnisse des Tests auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test im Rahmen der quantitativen Auswertung der molekularbiologischen Ergebnisse**

<b>Metrische Variable</b>	<b>p-Wert Kolmogorov-Smirnov Test</b>
Anzahl Ferkel (gesamt / Wurf)	0,000
Anteil Mumien (%)	0,000
Anteil Totgeborener (%)	0,000
Anteil Autolytischer (%)	0,000
Anteil Lebendgeborener (%)	0,000
Anteil Lebensschwachgeborener (%)	0,000
SSL (mm)	0,200
Gewicht (g)	0,001
Trächtigkeitsdauer (d)	0,000
PCR Titer Pool LipL32	0,200
PCR Titer Pool P1	0,200
PCR Titer Pool P2	-
PCR Titer Niere LipL32	0,200
PCR Titer Niere P1	0,200
PCR Titer Niere P2	-
PCR Titer Leber LipL32	0,127
PCR Titer Leber P1	0,048
PCR Titer Leber P2	-
PCR Titer Mageninhalt LipL32	0,200
PCR Titer Mageninhalt P1	0,045
PCR Titer Mageninhalt P2	-
PCR Titer Mekonium LipL32	0,200
PCR Titer Mekonium P1	0,200
PCR Titer Mekonium P2	-
Sau MAT Titer aller elf Serovaren	0,000

**Tabelle 23: Ergebnisse des Tests auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test im Rahmen der quantitativen Auswertung der serologischen Ergebnisse**

<b>Metrische Variable</b>	<b>p-Wert Kolmogorov-Smirnov- Test</b>
Anzahl Ferkel (gesamt / Wurf)	0,000
Anteil Mumien (%)	0,000
Anteil Totgeborener (%)	0,000
Anteil Autolytischer (%)	0,000
Anteil Lebendgeborener (%)	0,000
Anteil Lebensschwachgeborener (%)	0,000
SSL (mm)	0,200
Gewicht (g)	0,001
Trächtigkeitsdauer (d)	0,000
<hr/>	
MAT Titer aller Sauen	0,000

**Tabelle 24: Auf Assoziation mit dem PCR-Ergebnis überprüfte unabhängige Variablen**

<b>abhängige Variable</b>	<b>unabhängige Variable</b>
PCR (positiv / negativ)	Mumie (ja / nein)
	totgeboren (ja / nein)
	Ferkel- ebene autolytisch (ja / nein)
	lebensschwachgeboren (ja / nein)
	Geschlecht (m / w)
	Wurf- ebene MAT Sau (positiv / negativ)
	Bestands- ebene Jungsauenquarantäne (ja / nein)

**Tabelle 25: Ergebnisse der Prüfung auf Assoziation mittels Chi<sup>2</sup>-Test der dichotomen Variablen mit dem PCR-Ergebnis der Ferkel**

Unabhängige Variable	Abhängige Variable	p-Wert Chi <sup>2</sup> -Test
Autolytisch (ja / nein)	PCR positiv / negativ	< 0,001
Sau MAT (positiv / negativ)		< 0,001
Mumie (ja / nein)		0,409
Lebensschwachgeboren (ja / nein)		0,671
Geschlecht (männlich / weiblich)		0,695
Jungsau-Quarantäne (ja / nein)		0,055

**Tabelle 26: Ergebnisse der Prüfung auf Assoziation mittels Chi<sup>2</sup>-Test der dichotomen Variablen mit dem MAT-Ergebnis der Sau**

Unabhängige Variable	Abhängige Variable	p-Wert Chi <sup>2</sup> -Test
Wurf PCR (positiv / negativ)	MAT Sau (positiv / negativ)	<b>0,014</b>
Bestandsgröße (≤ 300 / >300)		0,126
Parität der Sau (JS / AS)		0,418
Leptospirenimpfung (ja / nein)		0,418
JS Quarantäne (ja / nein)		0,878
Remontierungsrate (≤ 40 / > 40)		0,244
Abferkelungen/Sau/Jahr (< 2,3 / ≥ 2,3)		0,400



## **XII. DANKSAGUNG**

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Mathias Ritzmann bedanken, der mir mit der Anstellung an der Klinik für Schweine die Anfertigung dieser Dissertation ermöglicht hat. Vielen Dank sowohl für die Unterstützung beim Schreiben meiner Arbeit als auch für die schöne Zeit in Oberschleißheim.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Dr. Matthias Eddicks für die umfangreiche wissenschaftliche Betreuung bei der Planung und Umsetzung, sowie bei der Datenauswertung und dem Verfassen dieser Arbeit. Vielen Dank für Dein offenes Ohr und die unzähligen Meetings, ohne die es nicht zu dieser Dissertation gekommen wäre.

Ein großer Dank gilt auch den Tierarztpraxen für das Einsenden des Probenmaterials, ohne welches diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Besonders bedanken möchte ich mich an dieser Stelle bei Herrn Dr. Stefan Wesselmann, der mich nicht nur im Rahmen meines Praktikums in die Welt der Schweinemedizin einführte und dafür begeisterte, sondern sich auch maßgeblich für die Vollendung dieses Projektes für mich eingesetzt hat. Vielen herzlichen Dank, Stefan!

Ebenfalls danke ich der *Intervet Deutschland GmbH* für ihre Unterstützung des Projekts bei der Finanzierung der Laboruntersuchungen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen der Klinik für Schweine für ihre Unterstützung bedanken. In besonderem Maße möchte ich meinen Dank an Julia Gründl ausdrücken, die mit mir als „*Partner in Crime*“ diesen nicht immer leichten Weg bis zur Abgabe dieser Dissertation gegangen ist.

Meiner zwischenzeitlichen „Ziehmutter“ Gisela möchte ich sowohl für das wiederholte Korrekturlesen meiner Arbeit, als auch für die unzähligen Mahlzeiten und schönen Abendstunden danken. Ebenso danke ich meinen Freunden, die mich immer wieder aufgebaut und ermutigt haben. Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle Lucy für all die wertvollen Gespräche,

Co-Working-Sessions, Karten und deine weiteren liebevollen Gesten.

Und zu guter Letzt danke ich meiner Familie, meinen Eltern, meinen Brüdern Finn und Falk und auch Carlo für die jahrelange Unterstützung während des Studiums und der Doktorarbeit, ohne die dieser neunjährige Ausbildungsweg an der LMU nicht möglich gewesen wäre.