

# DVG-Konsiliarlabor für *Leptospira* spp.

## Aufgaben, Tätigkeiten und Projekte

Katrin Strutzberg-Minder, Karen Dohmann, Jan Böhmer, Astrid Ullerich, Renate Frase, Sebastian Fischer, Jens-Peter Minder, Matthias Homuth und Team

Am 01.07.2018 wurde die IVD Gesellschaft für Innovative Veterinär diagnostik mbH (IVD GmbH) von der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) zum Konsiliarlabor für *Leptospira* spp. ernannt, das hier vorgestellt wird.

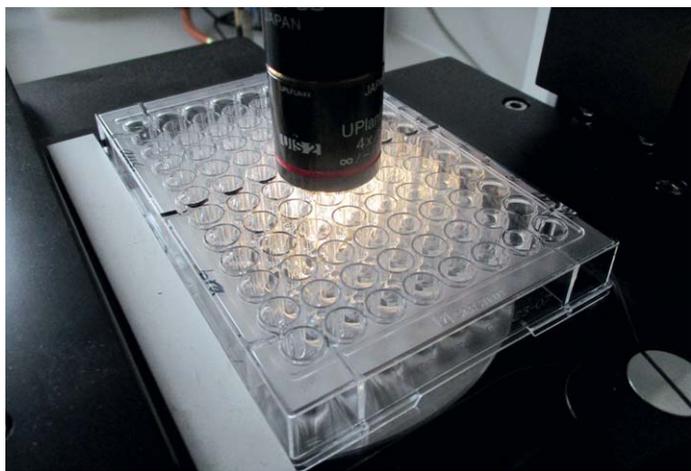


Abb. 1: Beurteilung von MAT-Reaktionen in den Wells einer Mikrotiterplatte mit dem Dunkelfeldmikroskop.

Als klassische Zoonoseerreger können Leptospiren prinzipiell jedes Säugetier infizieren. Die meisten Infektionen bei Mensch und Tier verlaufen aber subklinisch und bleiben deshalb oft unbemerkt. Dennoch kann es je nach betroffener Tierart, Reservoirwirt und Serovar (wirtsadaptiert oder nicht) bzw. Umweltfaktoren auch zu schwerwiegenden Erkrankungen (Leptospirosen) mit einer Vielzahl an beteiligten Organsystemen kommen. In Deutschland wurden seit dem Jahr 2000 jährlich zwischen 37 und 166 humane Leptospirosefälle an das Robert Koch-Institut übermittelt [1]. Aufgrund der häufig unspezifischen klinischen Symptomatik der Leptospirose kann man jedoch von einer deutlichen Dunkelziffer ausgehen. Als meldepflichtige Tierkrankheit werden pro Jahr durchschnittlich 98 Leptospirosefälle an das Friedrich-Loeffler-Institut gemeldet [2]. Im Vergleich dazu wurde bei Schweinen in Deutschland eine durchschnittliche Antikörperprävalenz von 20,2 Prozent festgestellt [3].

Nach Abwägung aller Indikatoren sollte man in der tierärztlichen Praxis eine Leptospiroseinfektion zumindest in Betracht ziehen. Zum Ausschluss oder bei Erhärtung eines Verdachts stehen gute diagnostische Möglichkeiten zur Klärung zur Verfügung.

## Nachweismethoden

Die IVD GmbH nahm erstmals 1997 ihre Tätigkeiten als diagnostisches Labor mit dem Schwerpunkt Nutztiere (Schwein und Rind) auf. Da die Leptospirose beim Schwein und Schaf in Deutschland meldepflichtig ist, stammen die meisten Proben, die bei uns auf Leptospiren untersucht werden, vom Schwein, gefolgt von Proben vom Rind, Pferd und Hund, neben Schaf, Ziege, Ratte und Maus sowie eher außergewöhnlichen Tieren wie das Alpaka.

### Diagnostische Untersuchungen

zum Nachweis von Antikörpern gegen Leptospiren werden seit 2001 in Form des Mikroskopischen-Agglutinations-Tests

(MAT) nach den jeweils gültigen Vorgaben der Welt-Tiergesundheitsorganisation (OIE) prinzipiell für alle Tierarten angeboten (Abb. 1 und 2). Unser Team (Abb. 3) untersucht jährlich rund 10000 Serumproben mittels MAT. Seit 2003 ist die IVD GmbH ein akkreditiertes Prüflabor und nimmt seit 2005 regelmäßig an den nahezu jährlich stattfindenden internationalen MAT-Ringversuchen teil (International Proficiency Testing Scheme for the Leptospirosis for the Leptospirosis MAT), die im Auftrag der International Leptospirosis Society (ILS) stattfinden und an denen alle Laboratorien teilnehmen können.

Nach einer konventionellen PCR (Polymerase-Kettenreaktionen) zum direkten Nachweis von Leptospiren, je nach Tierart und Infektionsmanifestation in verschiedenen Probenmaterialien, wird seit Februar 2017 eine real-time-PCR zum direkten Nachweis von pathogenen Leptospiren bei der Diagnostik von Leptospiroseinfektionen verwendet [4], die auch eine relative Quantifizierung anhand der ct-Werte<sup>1</sup> erlaubt (Abb. 4). Der direkte Nachweis von Leptospiren mittels PCR in diversen inneren Organen (wie Lunge, Leber, Gehirn und Niere) und Körperflüssigkeiten (Blut, Milch, Zerebrospinal-, Thorax- und Peritonealflüssigkeit) von klinisch kranken Tieren erlaubt

die Diagnose einer akuten klinischen Erkrankung oder im Falle eines Fetus den Nachweis für die chronische Leptospiroseinfektion beim Muttertier. Mit dem Nachweis von Leptospiren in der Niere, dem Harn oder Genitaltrakt von Tieren ohne klinische Symptome kann dagegen ein chronischer Trägerstatus festgestellt werden.

Zu den Aufgaben als Konsiliarlabor gehört es, Ringversuche durchzuführen; kürzlich wurde der erste nationale Leptospirose-PCR-Ringversuch abgeschlossen. Weiterhin soll Referenzmaterial für die Diagnostik von Leptospiren bereitgestellt werden. Da diese aber vom Leptospirosis Reference Centre, dem OIE Reference Laboratory for Leptospirosis in Amsterdam, bezogen werden können, wird darauf auch zur Sicherstellung vergleichbarer Diagnoseergebnisse verzichtet.

Abgerundet wird unser diagnostisches Angebot durch den immunhistochemischen Nachweis von pathogenen Leptospiren in Organen bzw. Geweben (Abb. 4). Zurzeit wird an der Etablierung einer *in-situ*-Hybridisierung gearbeitet, da Primer (speziesspezifische Oligonukleotide) als Sonden viel einfacher zu beziehen sind als gute Primäntikörper und auch ihre Qualität weniger Schwankungen unterworfen ist. Obwohl diese histologischen Nachweisverfahren selten nachgefragt werden, haben sie doch bei einigen Fallstudien Bedeutung.

## Forschungsprojekte

Eine Dissertation mit dem Titel „Entwicklung eines ELISA zur Serodiagnose der Leptospirose und einer PCR zum direkten Nachweis des Erregers“ wurde von Dimitrios Theodoridis 2004 in unserem Institut fertiggestellt [5] und es folgten diverse Projekte, in denen u. a. die Empfindlichkeit von Leptospiren gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen mittels modifiziertem Bouillon-Mikrodilutionsverfahren geprüft wurde [6].

Aufgrund der besonders hohen Probenzahlen vom Schwein wurde eine epidemiologische Analyse (Passive Surveillance) von diagnostischen Daten zu Leptospiroseinfektionen beim Schwein (2011 bis September 2016) in Zusammenarbeit mit Prof. Lothar Kreienbrock, Institut für Biometrie, Epidemiologie und Informationsverarbeitung (IBEI), Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, und WHO Collaborating Centre for Research and Training for

<sup>1</sup> Cycle Threshold = Zyklus des Schwellenwertes



Abb. 2: Mikroskopischer Agglutinations-Test (MAT), Ansicht im Dunkelfeldmikroskop bei einer Vergrößerung von 100 x links: Beispiel für eine stark positive Reaktion – fast alle Leptospiren sind mit Antikörpern im getesteten Serum agglutiniert. rechts: Beispiel für eine negative Reaktion – alle Leptospiren liegen einzeln, frei beweglich und nicht agglutiniert vor.

Health at the Human-Animal-Environment Interface, durchgeführt [3].

Diverse Forschungsprojekte und kleinere Studien hat die IVD GmbH immer wieder mit diagnostischen Untersuchungen auf Leptospiren bei Schwein, Hund und Pferd unterstützt, wie auch das Projekt der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) von Nicole de Buhr, PhD, und Prof. Maren von Köckritz-Blickwede, Forschungsgruppe Infektionsbiochemie am Institut für Physiologische Chemie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, mit dem Titel „Die Rolle von neutrophilen extrazellulären Netzen bei equiner rezidivierender Uveitis (ERU) und der humanen autoimmunen Uveitis“ [7].

In Zusammenarbeit mit PD Dr. Bettina Wollanke (Klinik für Pferde, Ludwig-Maximilians-Universität München) arbeitet die IVD GmbH an der Etablierung eines Leptospiren-ELISA zur Differenzierung verschiedener Immunglobulinklassen, der u. a. eine Entscheidungshilfe für eine Vitrektomie bei der ERU des Pferdes bieten könnte. Auch für andere Tier-

arten könnte der ELISA als Screening-Test für Infektionen mit Leptospiren nützlich sein.

### Neues zu Leptospiren

In den letzten 15 Jahren haben die Forschungsaktivitäten zu Leptospiren und zur Leptospirose erheblich zugenommen. Insbesondere durch die Weiterentwicklung molekularbiologischer Methoden einschließlich der Voll-Genomsequenzierung (engl. whole genome sequencing, kurz WGS) und der Entwicklung molekularer Typisierungsverfahren wie MLST (multilocus sequence typing [8]) haben sich wesentliche Änderungen bei der Taxonomie [9] und Identifizierung von Leptospiren mit der Ergänzung einiger neuer Spezies [10,11] ergeben.

In der Vergangenheit wurden nach Bergey's Manual 1984 alle pathogenen Stämme der Spezies *Leptospira interrogans* und alle saprophytischen Stämme der Spezies *Leptospira biflexa* zugeordnet. Nach Vincent et al. 2019 [11] haben wir es aber bis dato mit insgesamt 64 neu benannten Spezies zu tun, und es ist

davon auszugehen, dass es noch einige Änderungen in der Systematik des Erregers und weitere neue Erkenntnisse über den Erreger geben wird, obwohl er schon so lange bekannt ist. Schließlich wurde die Weilsche Krankheit 1868 erstmalig von Weil beschrieben und Inada und Ido gelang 1915 die erste Isolierung des Verursachers aus Infektionen beim Menschen [9]. Leptospiren werden nun in zwei Klassen, P = Pathogene und S = Saprophyten eingeteilt, die wiederum in je zwei Subklassen unterschieden werden (P1 und P2, S1 und S2 [11]), was durchaus zu einem besseren epidemiologischen Verständnis der Infektionskrankheit führt.

Neben ihrer genetischen Klassifizierung werden Leptospiren in über 300 verschiedene Serovaren differenziert. Serovaren werden mittels monoklonaler Antikörper oder CAAT (cross agglutination absorption test) definiert und identifiziert und antigenetisch ähnliche Serovaren traditionell wiederum in Serogruppen zusammengefasst [9]. Dabei sind Serovarenbezeichnungen keineswegs mit Speziesbezeichnungen gleichzusetzen. Gleiche Serovaren



Abb. 3: Das Team der IVD GmbH (Stand 2019). Aktuell besteht es aus zwölf wissenschaftlichen, siebzehn technischen, sechs kaufmännischen Mitarbeitern und zwei Biolaboranten-Auszubildenden.

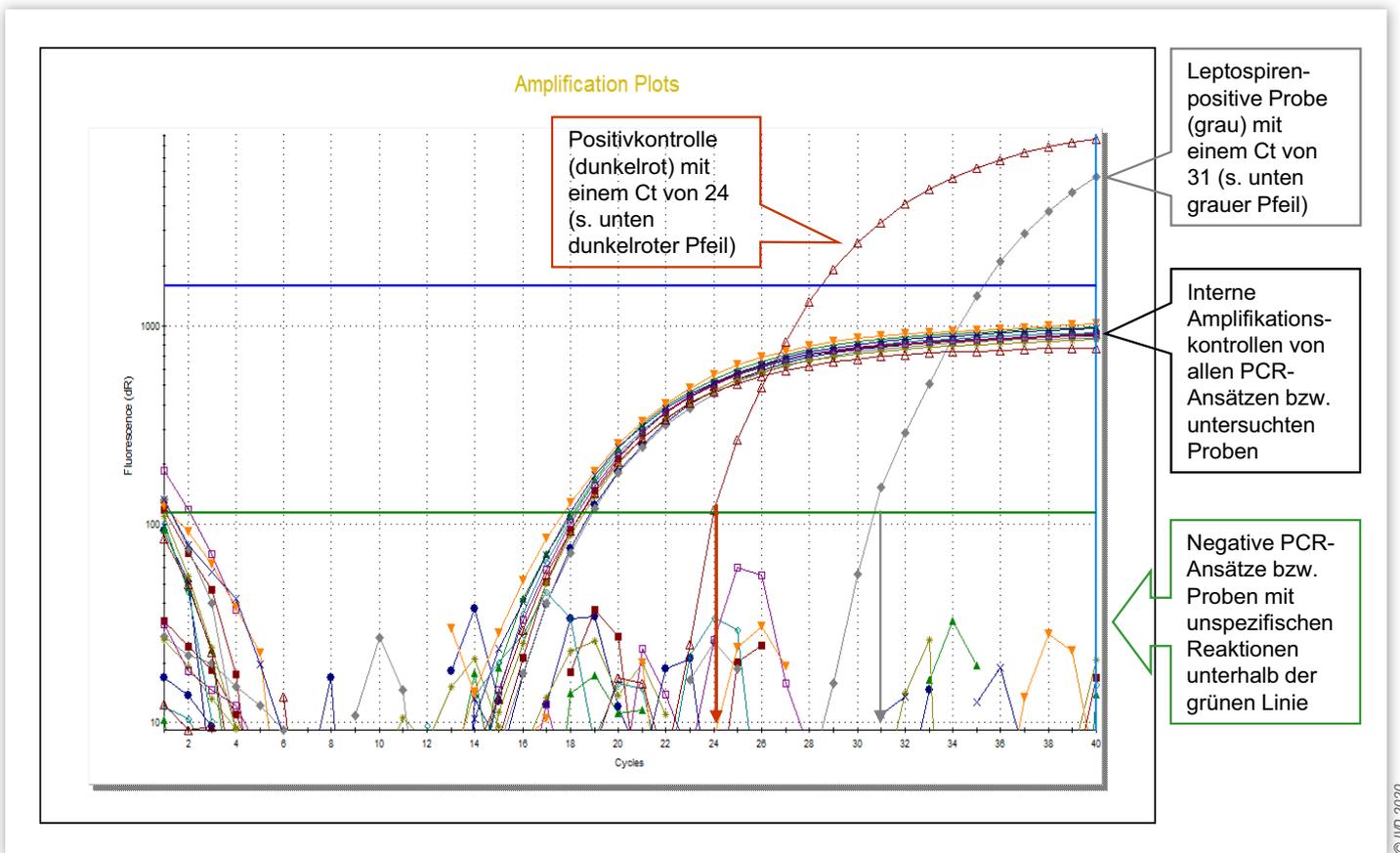


Abb. 4: Amplification Plots der real-time-PCR zum Nachweis von pathogenen Leptospiren.

können sogar in verschiedenen Spezies vorkommen. Obwohl Serovaren und Serogruppen keinen taxonomischen Status haben, ist die antigenetische Differenzierung besonders nützlich bei der serologischen Diagnose (u. a. MAT) und für das epidemiologische Verständnis auf regionaler oder Populationsebene. Daher werden in der IVD GmbH alle Proben mittels MAT auf Anti-

körper gegen Referenzstämmen einer Auswahl an verschiedenen, relevanten Leptospiren-Serovaren getestet.

In allen Belangen rund um die Leptospirendiagnostik beim Tier steht die IVD GmbH seit Langem und Dr. Katrin Strutzberg-Minder als Leiterin des Konsiliarlabors im Besonderen gern beratend zur Verfügung. Mit der Ernennung zum

Konsiliarlabor hat sich die Anfragefrequenz zu Leptospiren deutlich erhöht. Dabei betreffen die meisten Nachfragen die Bewertung von Laborergebnissen. Doch diese Fragen können häufig gar nicht pauschal beantwortet werden, sondern bedürfen der sorgfältigen Berücksichtigung aller verfügbaren Informationen über das Einzeltier oder die Herde einschließlich möglicher Impfmaßnahmen gegen Leptospiren.

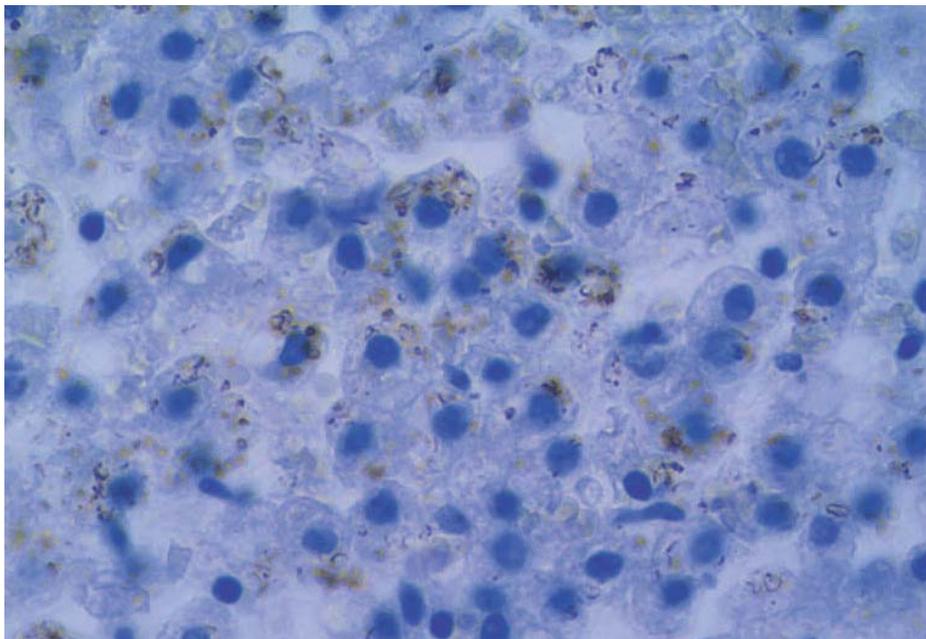


Abb. 5: Immunhistochemischer Nachweis (IHC) von Leptospiren (braun gefärbt) in der Leber eines Schweinefetuses, 40er-Objektiv.

#### Literatur

- [1] Nau LH, Emirhar D, Obiegala A et al. (2019): Leptospirose in Deutschland: Aktuelle Erkenntnisse zu Erregerspezies, Reservoirwirten und Erkrankungen bei Mensch und Tier. Bundesgesundheitsbl 62: 1510–21.
- [2] Tiergesundheitsjahresbericht (2018): 19. Jahrgang 2019. Herausgeber: Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Greifswald – Insel Riems, 32.
- [3] Strutzberg-Minder K, Tschentscher A, Beyerbach M, Homuth M, Kreienbrock L (2018): Passive surveillance of Leptospira infection in swine in Germany. Porcine Health Manag. 4: 10.
- [4] Ferreira AS, Costa P, Rocha T, Amaro A, Vieira ML, Ahmed A et al. (2014): Direct Detection and Differentiation of Pathogenic Leptospira Species Using a Multi-Gene Targeted Real Time PCR Approach. PLoS ONE 9 (11).

- [5] Theodoridis D (2004): Entwicklung eines ELISA zur Serodiagnose der Leptospirose und einer PCR zum direkten Nachweis des Erregers. Dissertation.
- [6] Theodoridis D, Schwarz S, Kietzmann M, Strutzberg-Minder K (2007): In-vitro-Empfindlichkeitsprüfung von Leptospiren gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen mittels modifiziertem Bouillon-Mikrodilutionsverfahren. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 120 (1–2): 50–60.
- [7] Fingerhut L, Ohnesorge B, von Borstel M, Schumski A, Strutzberg-Minder K, Mörgelin M, Deeg CA, Haagsman HP, Beineke A, von Köckritz-Blickwede M et al. (2019): Neutrophil Extracellular Traps in the Pathogenesis of Equine Recurrent Uveitis (ERU). Cells 8: 1528.
- [8] Guglielmini J, Bourhy P, Schiettekatte O, Zinini F, Brisse S, Picardeau M (2019): Genus-wide *Leptospira* core genome multilocus sequence typing for strain taxonomy and global surveillance. PLoS Negl Trop Dis. 13 (4): e0007374.
- [9] Adler B (2015): *Leptospira* and Leptospirosis. Berlin Heidelberg: Springer.
- [10] Thibeaux R, Iraola G, Ferrés I et al. (2018): Deciphering the unexplored *Leptospira* diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence. Microb Genom. 4 (1): e000144.
- [11] 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 (2019): Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. 2019. PLoS Negl Trop Dis. 13 (5): e0007270. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007270>.

Weiterführende Links:

**OIE:** <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/information-on-aquatic-and-terrestrial-animal-diseases/> (Leptospirosis)

**ILS:** [https://leptosociety.org/proficiency\\_testing](https://leptosociety.org/proficiency_testing)

**OIE reference lab:** <https://leptospira.amc.nl/leptospirosis-reference-centre/>

---

### Korrespondierende Autorin

#### Dr. Katrin Strutzberg-Minder



IVD Gesellschaft für Innovative Veterinärmedizin mbH, DVG-Konsiliarlabor für *Leptospira* spp., Albert-Einstein-Straße 5, 30926 Seelze, Tel. +49 511 220029–10, [strutzberg@ivd-gmbh.de](mailto:strutzberg@ivd-gmbh.de)