

Untersuchungen von wildlebenden Kleinsäufern und Wasserproben von Pferdebetrieben auf DNA pathogener Leptospiren mittels real-time PCR

Sabrina Cibulski und Bettina Wollanke

Pferdeabteilung der Ludwig-Maximilians-Universität München, Lehrstuhl für Innere Medizin und Chirurgie des Pferdes sowie Gerichtliche Tiermedizin

Zusammenfassung: Bei Pferden, die an der typischen Form der ERU (equinen rezidivierenden Uveitis) leiden, liegt in der Regel eine chronische intraokulare Leptospireninfektion vor. Als Leptospirenüberträger werden vor allem Mäuse und andere Kleinsäuger angesehen. Jedes Jahr erkranken nicht nur Pferde an ERU, sondern auch Menschen an einer in Einzelfällen sogar tödlich endenden Leptospirose. Obwohl Kleinsäuger noch immer als Hauptüberträger angesehen werden, liegen kaum aktuelle Daten zum Durchseuchungsgrad der Kleinsäugerpopulation vor. Im Vergleich mit älteren Forschungsarbeiten sind heute weitaus bessere Möglichkeiten in der Labordiagnostik gegeben. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Studie 299 Kleinsäuger aus Pferdestallungen (v.a. Nagetiere, aber auch Insektivoren) in Baden-Württemberg, Bayern, Hessen und Luxemburg mittels Lipl32 real-time PCR auf das Vorhandensein von DNA pathogener Leptospiren untersucht. Wenn möglich wurde zusätzlich eine Untersuchung des Urins der Tiere durchgeführt. Zusätzlich wurden erstmalig in Bayern und Baden-Württemberg 87 Wasserproben von stehenden Gewässern und Tränkebecken aus der Nähe von Pferdestallungen mittels real-time PCR auf DNA pathogener Leptospiren untersucht. Insgesamt wurden 14 % der untersuchten Kleinsäuger in der PCR positiv auf DNA pathogener Leptospiren getestet. Wühlmäuse stellten sich im Vergleich zu den anderen Kleinsäugerfamilien höchstsignifikant ($p \leq 0,001$) häufiger als Träger von DNA pathogener Leptospiren heraus. Es waren in allen vier Bundesländern, in denen Kleinsäuger untersucht werden konnten, positive Reagenten zu finden. Die Anzahl betroffener Tiere variiert regional. Die PCR als diagnostisches Instrument zum Nachweis von DNA pathogener Leptospiren in Nierengewebe und Urin hat sich bewährt, wobei sich jedoch die Beschaffung von Kleinsäugerurin im Falle von Wildfängen als schwierig herausstellte. Als signifikant beste Fangmethode zur Gewinnung von Urin haben sich Katzen herausgestellt ($p = 0,006$). In 10 % der 87 Wasserproben aus stehenden Gewässern und Tränkebecken konnte DNA pathogener Leptospiren mittels PCR Diagnostik nachgewiesen werden. Auffällig war dabei, dass keine der aus Bayern gewonnenen Wasserproben mit Leptospiren-DNA kontaminiert war. Dieses Ergebnis erwies sich jedoch als nicht signifikant. Wasser muss folglich weiter als Infektionsquelle für Mensch und Tier Beachtung finden.

Schlüsselwörter: Leptospiren, ERU, real-time PCR, Kleinsäuger, stehende Gewässer, Tränkebecken

Testing wild small mammals and water samples for pathogen leptospires using real-time PCR

Normally with horses suffering from the typical form of the ERU (equine recurrent Uveitis) a chronically intraocular leptospiral infection can be detected as the etiologic agent. Mice and other small mammals are mostly regarded as vectors of leptospires. Every year not only horses come down with ERU, but also human beings develop leptospirosis with - in single cases even deadly ending - courses. Most human infections are observed in warm and humid countries, but single cases or even infection of several men can be observed in Europe as well. Infection has been proved to be transmitted by urine of small mammals many years ago by leptospiral cultures, but there are hardly any data on actual infection rates of small mammals. Leptospires can survive for several weeks in humid and warm environments, so infections are supposed to be facilitated in summer times on humid pastures or with drinking troughs on the pasture. Although the small mammals are still regarded as the main vectors, there are not only missing actual data concerning the prevalence of leptospires in the population of small mammals, but there exist no data on the prevalence of leptospires in small mammals or drinking water in riding stables or on stud farms. Besides, looking at older research works it has to be considered that nowadays there are a lot more and better possibilities in the laboratory diagnostic. For this reason in this study 299 small mammals of horse stables (rodents, but also insectivores) were examined for the existence of DNA from pathogen leptospires in Baden-Württemberg, Bayern, Hessen and Luxemburg by means of Lipl32 real-time PCR. All animals had been caught by rodent control measures from the operators of the stables. If possible, an examination of the animals urine was made, too. In addition, according to the literature, for the first time in Bavaria and Baden-Württemberg, 87 water samples of lentic water and drinking troughs from the surrounding of equine stables have been taken and have been examined by real-time PCR for DNA of pathogen Leptospires. Results were that 14 % of the small mammals could be tested positive in the PCR for pathogen leptospires. Small mammals with positive PCR could be found in Baden- Württemberg, Bayern and Hessen as well as in Luxemburg. In comparison to the other small mammals families, voles were highly significantly ($p \leq 0,001$) most often positive tested compared to other small mammals and thus turned out to be important vectors of DNA of pathogen leptospires. The amount of concerned affected animals varied regionally. The PCR as a diagnostic tool has been proved to be of value for the analysis of DNA of pathogen leptospires in the kidney tissues and urine. Collecting urine from wild living small mammals was difficult. It was noticed that cats provided the significantly best catch method to get urine from small mammals. Other methods (live catch traps or deathtraps) lead to an empty bladder in order that no urine could be collected. In 10 % of the 87 water samples of lentic waters and drinking troughs, DNA of pathogen leptospires could be proved by means of PCR diagnostic. It was eye-catching that no water samples from Bayern were contaminated with leptospiral DNA, though this result did not turn out to be significant. As a result, not only urine of small mammals was proved to be a source of infection, but drinking water in the stables and on the pastures has to be considered as a source of infection for human beings and animals as well.

Keywords: Leptospires, ERU, real-time PCR, small mammals, lentic waters, drinking troughs

Zitation: Cibulski S., Wollanke B. (2016) Untersuchungen von wildlebenden Kleinsäufern und Wasserproben von Pferdebetrieben auf DNA pathogener Leptospiren mittels real-time PCR. *Pferdeheilkunde* 32, 634-640

Korrespondenz: PD Dr. Bettina Wollanke, Universität München, Klinik für Pferde, Veterinärstraße 13, 80539 München, E-mail: wollanke@lmu.de

Einleitung

Die Leptospirose ist eine Zoonose, die in früheren Zeiten (Gochenour et al. 1958, Gsell 1968, Hupka und Behrens 1951, Kathe 1959, Krampitz 1967, Mino 1941, Schüffner u. Bohlander 1943, Wolter 1939, Zwierzchowski 1967a,b), aber auch heute noch, bei Mensch und Tier, mit inapparentem bis perakutem Verlauf vorkommt (Brockmann et al. 2010, Desai et al. 2009, Haake und Levett 2015, Nattermann 2006, Pappachan et al. 2007, William und Londree 2014, Zwierzchowski 1967a,b). Bekannt wurde sie unter anderem unter den Namen: Morbus Weil, Stuttgarter Hundeseuche, Feld-, Ernte- und Sumpffieber, sowie Schweinehüterkrankheit (Wiesmann 1949).

Bei Equiden ist die equine rezidivierende Uveitis (ERU) eine häufige Erkrankung, die als Spätfolge einer chronischen Infektion des Glaskörpers mit Leptospiren (Brandes et al. 2007, Brem et al. 1998, Brem et al. 1999, Faber et al. 2000, Gerhards und Wollanke 2001, Hartskeerl et al. 2004, Niedermaier et al. 2006, Rimpau 1947, Wollanke et al. 2001, Wollanke 2002) in vielen Fällen zur Erblindung der betroffenen Augen führt (Szemes und Gerhards 2000).

Da infektiöse Leptospiren bei wärmeren Temperaturen wochenlang in Gewässern überleben können (Faine et al. 2000), werden stehende Gewässer und feuchte Koppeln als Infektionsquellen vermutet (Ellis 2015, Faine et al. 2000, Nattermann 2006, Wollanke 2002). Weiterhin wird vor allem der Urin von infizierten Mäusen und Ratten als Infektionsquelle angesehen. Nachweise zur Infektionsrate der Kleinsäuger liegen jedoch etwa 80 Jahre zurück (Rimpau 1942) und es existierten zu Beginn der vorliegenden Untersuchung keine aktuellen Berichte über Untersuchungen von Mäusen und Ratten in Pferdebeständen auf einen Leptospirenbefall.

Die hohe Sensitivität von PCR-Untersuchungen ermöglicht im Falle von Urinproben die weitgehende Aufhebung inhibitorischer Agentien durch Verdünnung der Probe (van Eys et al. 1989). Durch den Nachweis kleinster Mengen an DNA in Blut oder Urin (z.B. Proben von Rindern im Schlachthaus und von infizierten Farmländer) kann im Falle einer chronischen Infektion die Klärung des Carrier-Status erfolgen (van Eys et al. 1989). Ein großer Vorteil der PCR gegenüber dem kulturellen Nachweis ist der, dass auf die Vitalität der Erreger verzichtet werden kann und das Handling der Proben (Entnahme, Lagerung, Versand) unproblematischer ist (Bal et al. 1994, van Eys et al. 1989).

Im Gegensatz zur konventionellen PCR ermöglicht die real-time PCR zudem eine quantitative Bestimmung der nachgewiesenen Erreger (Levett et al. 2005). Die LipL32 real-time PCR hat sich im Vergleich zur 16S rRNA real-time PCR als die bessere Methode herausgestellt, da hier die Spezifität nahe am „Limit of Detection“, d.h. annähernd bei 100% liegt und die Bildung von Primerdimeren minimal ist (Roczek 2008, Viljumsen et al. 2012). Es wird ausschließlich DNA pathogener Leptospiren nachgewiesen (Mérien et al. 1992, Roczek 2008, Stoddard et al. 2009). Als Beitrag zur Ätiologie sollte in der vorliegenden Arbeit mittels PCR geprüft werden, ob und zu welchem Anteil bei Kleinsäufern und in Wasserproben aus Pferdebeständen Leptospiren-DNA nachgewiesen werden kann. Zu diesem Zweck wurden die Kleinsäuger, die im Rah-

men der Schädnerbekämpfung durch die Stallbetreiber oder deren Katzen gefangen wurden, sowie aus den Stallungen und deren Umgebung gewonnene Wasserproben mittels PCR auf DNA pathogener Leptospiren getestet.

Material und Methoden

Kleinsäuger

Die Kleinsäuger wurden aus Pferdestallungen bezogen, die unabhängig von dieser Untersuchung eine reguläre Schädnerbekämpfung durchführten. Bei der Kontaktaufnahme zu Stallbesitzern oder Einstellern wurde jeweils von einer Person ein kurzer Fragebogen mit Fragen zu den eingestellten Pferden, den geographischen Gegebenheiten und der Kleinsäugerpopulation ausgefüllt. Da in den Betrieben routinemäßig eine Schädnerbekämpfung durchgeführt wurde und keine Kleinsäuger speziell für die vorliegende Untersuchung gefangen wurden, zudem auch keine Manipulation an lebend gefangenen Kleinsäufern durchgeführt wurde, handelte es sich hier nicht um einen Tierversuch.

Die Pferdestallungen, die zuvor schon Totschlagfallen zur Schädnerbekämpfung eingesetzt hatten, wurden mit Plastiktotschlagfallen mit Naturköder der Firma Deufa ausgestattet. Ausgewählt wurde diese Art von Falle, um aufgrund der leichten Handhabung Verletzungen zu vermeiden und durch den Dauerköder ein ständiges Wiederbefüllen der Fallen unnötig zu machen. Außerdem soll diese Art der Falle für Hunde und Katzen uninteressant und dadurch ungefährlich sein. Fallen, bei denen der Dauerköder versagte, wurden unter anderem mit Nutella® wieder befüllt.

Die gefangenen Kleinsäuger wurden mit Handschuhen aus den Fallen entfernt, in verschließbare Plastiktüten verpackt und mit dem Fangdatum versehen eingefroren bzw. wenn ein Einfrieren nicht möglich war, bis zur Abholung gekühlt.

Kleinsäuger, die durch die in den Stallungen ansässigen Katzen gefangen, jedoch nicht gefressen wurden, wurden ebenfalls mit dem Fangdatum versehen bis zur Abholung eingefroren/ gekühlt und schließlich in die Untersuchung auf DNA pathogener Leptospiren mit einbezogen. Die Stallungen befanden sich in Baden-Württemberg im Osten der Schwäbischen Alb vorwiegend im Zollernalbkreis.

Im Rahmen der Zusammenarbeit mit Frau M. Bourg der tierärztlichen Fakultät der Universität Gießen konnten Kleinsäuger oder deren Organe aus Bayern auch aus den Landkreisen Eichstätt, Günzburg und Erlangen, sowie einzelne Tiere aus Hessen und Luxemburg bezogen werden. Die Organe dieser Tiere wurden unter anderem am LGL (Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit) in Oberschleißheim bis zur Abholung bei -80°C zwischengelagert oder deren Nieren in der Tierpathologie in Gießen bis zu einem Treffen tiefgekühlt. Nach Abholung der tiefgefrorenen oder gekühlten Kleinsäuger wurden diese ggf. nach dem Auftauen fotografiert, gewogen, vermessen und mittels einer Bestimmungshilfe der Arbeitsgruppe Säugetierökologie vom Institut für Tierökologie und Spezielle Zoologie der Justus-Liebig-Universität Gießen nach ihrer Art bestimmt. Zur Hilfe wurden auch die Beschreibungen von Krampitz (1967) herangezogen.

Zur Präparation wurde jedes Tier einzeln mittels Stecknadeln auf dem Rücken liegend auf einer Pinnwand, die mit Alufolie vor Kontamination geschützt wurde, fixiert, um eine Laparotomie durchzuführen. Wenn möglich wurde Urin mittels einer Spritze aus der Blase des Tieres entnommen und auf einen sterilen Wattetupfer überführt. Des Weiteren wurden Nieren und Blase entnommen und in NaCl-Lösung ins Labor (Vet-MedLab Idexx Laboratories) versandt, wo sie mittels einer LipL32 PCR auf DNA pathogener Leptospiren untersucht wurden (Cibulski 2016). Von lebenden Kleinsäugetieren gewonnener Urin wurde ebenfalls an das Labor zur LipL32 PCR-Diagnostik versandt. Zwischen der Präparation zweier Kleinsäugetiere wurde das chirurgische Besteck, sowie die Stecknadeln gereinigt und in Helipur®-Lösung desinfiziert. Andere Materialien zur Präparation und Vermessung wurden mittels Flächendesinfektion gereinigt und die Alufolienabdeckung auf der Pinnwand ausgetauscht.

Bei der verwendeten PCR (Polymerase Chain Reaktion) handelte es sich um eine real-time PCR mittels Light cycler 480 von Roche®. Nachgewiesen wurde das leptospirenspezifische Gen LipL32, welches für ein Protein der äußeren Membran des Organismus codiert und für dessen Pathogenität mitverantwortlich ist (IDEXX Laboratories Diagnostic update Canine Leptospirose – eine Krankheit im Wandel, Januar 2015, www.idexx.de und telefonische Rücksprache mit Hr. Dr. Balzer von IDEXX Laboratories). Die LipL32 real-time PCR ermöglicht folglich den Nachweis aller pathogenen Leptospirenarten. Zum Nachweis der Gensequenz LipL32 wird bei der Durchführung der real-time PCR durch spezifische Primer eine Amplifizierung dieser Zielsequenz erreicht. Zudem ermöglicht der Einsatz fluoreszenzmarkierter Sonden eine maschinelle Auswertung der Amplifikatbildung durch Messung der emittierten Fluoreszenz. Obwohl in dieser Arbeit kein quantitativer Nachweis von DNA pathogener Leptospiren erzielt werden sollte, wurde diese Methode dennoch aufgrund der geringeren Kontaminationsgefahr als geeignete Methode herangezogen.

Wasserproben

Alle Wasserproben wurden in örtlicher Nähe zu den in die Studie eingeschlossenen Stallungen aus stehenden bis ruhigen Gewässern, Pfützen, sowie Tränken und Zisternen entnommen. Es wurde jeweils ein Volumen von 10ml genom-

men und zur PCR Diagnostik auf das Vorkommen von Leptospiren-DNA an das IDEXX VET MED LAB in Ludwigsburg verschickt.

Statistische Auswertung

Die deskriptive Auswertung der erhobenen Daten erfolgte in der Kategorie alle Daten und in Häufigkeitsdaten in Form von relativen Häufigkeiten in Prozent, sowie dem 95% Konfidenzintervall. Wenn $n < 50$ erfolgte zusätzlich eine Darstellung in der Form x/n .

Die Analyse der Daten erfolgte durch den Vergleich von Häufigkeitsdaten mittels exaktem Test nach Fisher, dem Chi2 Test und dem Einstichprobentest. Zusammenhänge zwischen den Daten wurden mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten nach Spearman und Cramers V Test analysiert.

Ergebnisse

Kleinsäugetiere

Insgesamt wurden 299 Kleinsäugetiere gefangen von denen bei 294 eine Bestimmung der Art möglich war (Abb. 1). Darunter befanden sich 93 Wühlmäuse (32%), 133 Langschwanzmäuse (45%) sowie 68 Insektivoren (67 Spitzmäuse und 1 Maulwurf) (23%) (Abb. 2). Die Feldmaus gehört zu den Wühlmäusen und machte in dieser Familie mit 61 Tieren (66%) den größten Anteil aus. Insgesamt wurden am häufigsten Hausmäuse, gefolgt von den Feldmäusen und zahlreichen anderen Arten in geringerer Anzahl gefangen (Abb. 1).

Real-time PCR auf DNA pathogener Leptospiren bei Kleinsäugetieren

Insgesamt wurde bei 14% der gefangenen Kleinsäugetiere DNA pathogener Leptospiren im Harnapparat nachgewiesen. Unter den Wühlmäusen befanden sich mit 27% (25/93; CI95% = 18,2%-37,1%) die meisten positiven Reagenten, gefolgt von den Langschwanzmäusen mit 10% (13/133; CI95% = 5,3%-16,1%) und den Insektivoren mit 6% (4/68; CI95% = 1,6%-14,4%) positiven Reagenten (Abb. 2). Unter den Feldmäusen aus der Familie der Wühlmäuse waren auf-

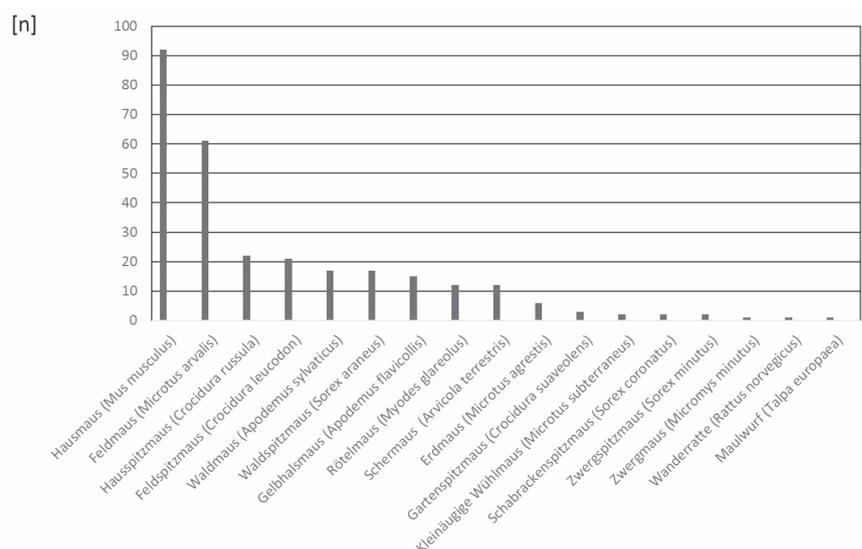


Abb. 1 Anzahl und Arten der gefangenen Kleinsäugetiere (n = 294).

fallend viele positive PCR-Nachweise: es konnte bei rund 30% (18/61 Feldmäusen) DNA pathogener Leptospiren im Nierengewebe nachgewiesen werden.

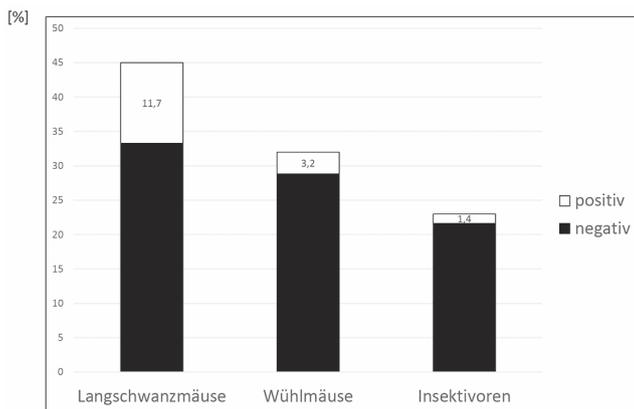


Abb. 2 Anteil (%) der Kleinsäuger in den 3 Familien, bei denen mit der PCR DNA pathogener Leptospiren im Harnapparat nachgewiesen werden konnte.

Auffallend war, dass ein Nachweis im Urin nur dann möglich war, wenn auch in den Nieren desselben Tieres DNA pathogener Leptospiren vorhanden war. Andererseits gelang längst nicht in jedem Fall der Nachweis von DNA pathogener Leptospiren im Harn, auch wenn dies im Nierengewebe möglich war. Die PCR mit Nierengewebe war somit zuverlässiger als mit Harn.

In der Familie der Wühlmäuse war der Anteil der mittels PCR positiv auf DNA pathogener Leptospiren getesteten Tiere im zweiseitigen exakten Test nach Fisher im Vergleich zu den Langschwanzmäusen mit $p = 0,001$ und im Vergleich zu den Insektivoren mit $p < 0,001$ höchstsignifikant höher. Der Unterschied zwischen den Insektivoren und der Familie der Langschwanzmäuse erwies sich im exakten Test nach Fisher mit $p = 0,430$ als nicht signifikant.

Regionale Verteilung der mittels PCR positiv auf DNA pathogener Leptospiren getesteten Kleinsäuger

Auffallend war, dass in Bayern deutlich mehr Kleinsäuger positiv in der PCR getestet wurden, als in Baden-Württemberg. Dieser Unterschied war signifikant (exakter Test nach Fisher, $p < 0,001$). Aufgrund der geringen Anzahl gefangener Tiere in Hessen und Luxemburg erfolgte für diese Regionen keine weitere Auswertung (Tab. 1).

Wasserproben

Alle Proben wurden im Gebiet der Schwäbischen Alb in Baden-Württemberg und in Bayern gewonnen. Aufgrund der hohen Verdünnung und des geringen Probenvolumens, das

zur PCR eingesetzt werden konnte, ist hier nur ein positives Ergebnis als aussagekräftig anzusehen und mit falsch negativen Ergebnissen zu rechnen.

In insgesamt 9 der 87, also rund 10% der Wasserproben konnte mittels PCR DNA pathogener Leptospiren nachgewiesen werden (95% KI = 4,8%–18,7%). In keiner der 10 in Bayern entnommenen Proben (95% KI = 0% bis 25,9%) wurde DNA pathogener Leptospiren nachgewiesen. In Baden-Württemberg hingegen wurde in 12% der Proben (9/77) DNA pathogener Leptospiren nachgewiesen (95% KI = 5,5%–21%). Im exakten Test nach Fisher bestand jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl der in der PCR positiv reagierenden Proben aus Bayern und Baden-Württemberg ($p = 0,59$).

Diskussion

Die Leptospiren-bedingte Uveitis ist bei Pferden eine häufige Erkrankung (Szemes und Gerhards 2000) und die Besitzer betroffener Pferde fragen regelmäßig nach der Ursache dieser Erkrankung. Erste Untersuchungen an Kleinsäugetieren im Hinblick auf ein Erregerreservoir wurden vor etwa 80 Jahren durchgeführt und die einzige Möglichkeit, Leptospiren nachzuweisen, war damals die oft problematische Kultur (Faine 1962, Ido et al. 1917, Mino 1941, Popp 1950). Die vorliegende Studie wurde durchgeführt, um hier auf aktuelle Ergebnisse verweisen zu können, die mittlerweile mit der einfacher durchzuführenden und sensitiveren PCR möglich geworden sind (Stoddard et al. 2009).

Die Gewinnung von Urin bei Tieren, die in einer Totschlagfalle zu Tode gekommen waren, war problematisch, da oft keine für die PCR-Diagnostik ausreichende Menge entnommen werden konnte. Offenbar wurde der intraabdominale Druck im Kleinsäugerkörper bei Zuschlagen der Falle so stark erhöht, dass die Blase weiter entleert wurde, als dies nach anderen Todesumständen (z. B. Erlegung durch eine Katze) der Fall war. Da die Gewinnung einer zur Untersuchung ausreichenden Menge Urin in vielen Fällen scheiterte und von einer intermittierenden Ausscheidung ausgegangen werden muss, hat sich die Untersuchung des Nierengewebes in der vorliegenden Untersuchung als zuverlässigere Nachweismöglichkeit herausgestellt.

Die Nieren wurden aufgrund der Ergebnisse anderer Arbeiten als geeignetes Gewebe zur Untersuchung auf Leptospiren angenommen (Aviat et al. 2009, Desai et al. 2009, Faine 1962, Mayer-Scholl et al. 2011). Die Persistenz der Leptospiren in der Niere ermöglicht es zudem bei Haustieren, Ratten und Feldmäusen, auch außerhalb der akuten Phase der Infektion und in Zeiten, in denen keine Leptospirenausscheidung über den Harn stattfindet, einen Leptospirennachweis zu erbringen (Broom und Gibson 1953, Faine 2000, Ido et al.

Tab. 1 Regionale Verteilung der mittels PCR positiv auf DNA pathogener Leptospiren getesteten Kleinsäuger

Fangregion	Anzahl gefangener Kleinsäuger	Anteil der mittels real-time PCR positiv auf DNA pathogener Leptospiren getesteten Kleinsäuger
Baden-Württemberg	157	5 %
Bayern	104	26 %
Hessen	26	4 %
Luxembourg	10	60 %

1917, Kathe und Mochmann 1967, Kathe et al. 1967, Krüger 1952, Mino 1941). Genau dieses Ergebnis konnte mit der vorliegenden Untersuchung nachvollzogen werden, da die Nieren nicht nur zuverlässiger zu gewinnen waren als Harnproben, sondern auch der Nachweis von DNA pathogener Leptospiren in den Nieren viel häufiger gelang als in den vorhandenen Harnproben.

Der Anteil der positiven Reagenten unter den Kleinsäugetieren ist in der vorliegenden Arbeit mit 14% relativ hoch im Vergleich mit anderen Untersuchungen. Mayer-Scholl und Mitarbeiter (2014) identifizierten in vergleichbarer Vorgehensweise lediglich 10% der Kleinsäugetiere in Deutschland als Träger von Leptospiren-DNA. Dies könnte auf eine erhöhte Infektionsgefahr in Pferdebeständen schließen lassen. Die Pferde selbst könnten als vorübergehende Ausscheider nach einer Infektion dazu beitragen, dass ein erhöhter Infektionsdruck besteht.

Es muss jedoch auch beachtet werden, dass eine regionale und zeitliche Differenz der Infektionsraten unter den Kleinsäugetieren besteht (Maghami et al. 1977, Parnas et al. 1961, Popp 1950, Schöffner und Bohlander 1943). So konnte auch in der vorliegenden Studie eine unterschiedliche Verteilung von Leptospiren-DNA tragenden Kleinsäugetieren in Pferdebeständen im Hinblick auf die verschiedenen in die Untersuchungen einbezogenen Regionen (Bayern/Baden-Württemberg) verzeichnet werden.

Im Vergleich mit der von Rimpau (1943) beschriebenen Infektionsrate bei Feldmäusen in Süddeutschland von 13–27%, liegt der Anteil der in der PCR positiv reagierenden Feldmäuse in der hier durchgeführten Studie mit 30% deutlich darüber und entspricht eher den Ergebnissen von Schöffner und Bohlander (1942) in den Niederlanden, die Nieren von 275 holländischen Feldmäusen untersuchten und 32% der Feldmäuse als mit Leptospiren infiziert befundeten. Die Kultur von Leptospiren ist anspruchsvoller sowie störanfälliger gegenüber Kontaminationen und damit weniger sensitiv, als eine Untersuchung mittels PCR. Bei den Untersuchungen von Desai und Mitarbeitern im Rahmen des Leptospiroseausbruchs unter Erntehelfern auf Erdbeerfeldern im Jahre 2007 konnten sogar bei 64% der Wühlmäuse Antikörper gegen Leptospiren nachgewiesen werden (Desai et al. 2009).

Eine mögliche Erklärung für die signifikant höhere Nachweisrate von DNA pathogener Leptospiren bei den Feldmäusen bietet deren Lebensweise mit engem Kontakt zu Wasser und Boden. Dem entgegen bewohnen die von der Familie der Langschwanzmäuse am häufigsten gefangenen Hausmäuse Gebiete in und um Wohngebäude, wodurch der Kontakt zu kontaminiertem Boden und Wasser weitgehend eingeschränkt wird. Zudem leben sowohl die Haus-, als auch die Zwergmaus im Vergleich zur Feldmaus (Krampitz 1967) in kleineren Gemeinschaften beisammen, was den Infektionsdruck minimiert.

Der hohe Befall der Feldmäuse mit DNA pathogener Leptospiren untermauert deren Bedeutung als Überträger im Hinblick auf die ERU. Bei Pferden in Deutschland wird mit Abstand am häufigsten die Serovar Grippotyphosa im Glaskörper nachgewiesen und für diese Serovar gilt die Feldmaus als Haupt-Überträger (Rimpau 1943, Wollanke 2002, Wollanke et al. 2004a, b, Desai et al. 2009). Es wäre zu vermuten, dass in anderen Regionen und den im Osten angrenzenden Ländern, in denen die Serovar Pomona häufiger vor-

kommt, entsprechend häufig DNA pathogener Leptospiren bei der Brandmaus nachgewiesen werden kann, die als Überträger für die Serovar Pomona gilt.

Der hohe Anteil Leptospirose-positiver Kleinsäugetiere im Bundesland Bayern deckt sich auch heute noch mit Berichten von Leptospirose in dieser Region aus vergangener Zeit (Rimpau 1927 und 1938, Wolter 1939). Ein Grund für das geringere Vorkommen positiver PCR Befunde bei Kleinsäugetieren in Baden-Württemberg könnte die vorwiegend trockene Bodenbeschaffenheit auf der schwäbischen Alb im Vergleich zum wasserreichen, vielerorts überflutungsgefährdeten Bayern darstellen.

Bei den getesteten Wasserproben muss beachtet werden, dass die eventuell enthaltenen Leptospiren oder Bestandteile von Leptospiren in vielen Fällen sehr stark verdünnt vorlagen und falsch-negative Ergebnisse zu erwarten waren. Nur ein positives Ergebnis ist darum wirklich aussagekräftig. Die Lipl32 real-time PCR hat sich jedoch auch in der vorliegenden Arbeit als geeignet für den Nachweis von DNA pathogener Leptospiren in Gewässern erwiesen (Transuphasiri et al. 2006, Vein et al. 2012, Vital-Brazil et al. 2010).

Die PCR-Diagnostik kann zwar nichts über die Vitalität der Leptospiren aussagen, wenn DNA pathogener Leptospiren nachgewiesen werden kann, ist dennoch davon auszugehen, dass auch infektiöse Bakterien dort gewesen waren. Die Ergebnisse dieser Studie untermauern somit die Übertragung der Infektion über Wasser, wie sie durch verschiedene Autoren in den vergangenen fast 100 Jahren wiederholt beschrieben wurde (Babudieri 1957 und 1958, Brockmann 2010, Diesch und McCulloch 1966, Faine et al. 2000, Haake und Levett 2015, Kathe 1950, Murray 2015, Parnas 1967, Rimpau 1950, Uhlenhuth und Grossmann 1926, Uhlenhuth und Zülzer 1922, Zwierzchowski 1967 a, b). Hier spielen Freizeitaktivitäten ebenso wie eine berufliche Exposition eine Rolle.

Sogar Wasser aus städtischen Regionen mit schlechter Hygiene konnte als vermehrt mit Leptospiren-DNA belastet identifiziert werden (Ganoza et al. 2006). Henry und Johnson (1978) konnten sogar durch kulturelle Anzucht von Leptospiren aus Proben von stehenden bis leicht fließenden Gewässern und aus Bodenproben von an die Gewässer angrenzenden feuchten Böden nachweisen, dass sich dort infektiöse Erreger aufhalten.

Eine experimentelle Infektion durch kontaminiertes Wasser konnten Diesch und McCulloch (1966) an Meerschweinchen demonstrieren. Einen Zusammenhang zwischen der Infektion des Menschen mit infizierten Nagern und kontaminiertem Wasser sahen Aviat und Mitarbeiter (2009) als gegeben. In der vorliegenden Studie konnte erstaunlicherweise in keiner Probe, die aus einer Zisterne oder einem anderen Wasserbehälter, in dem das Trinkwasser der Tiere über längere Zeit auf den Koppeln in der Sonne stand (von der Sonne erwärmtes, stehendes Gewässer), DNA pathogener Leptospiren nachgewiesen werden. Dies könnte durch die in den Zisternen vorliegende, anzunehmend mikroaerophile oder anaerobe Luftzusammensetzung und der geringen Kontaminationsmöglichkeit durch Kleinsäugetiere in Zusammenhang stehen.

Ein ausgesprochen hoher Infektionsdruck muss z.B. auch in den sehr warmen und zum Teil wasserreichen Stollen in Berg-

werken vorgelegen haben, in denen früher massenhaft Kleinsäugeter (auch Ratten) vorhanden waren (Freiholz 2003, Höllerhage 2002). Ratten gelten als Überträger der Serovar Icterohaemorrhagiae und im Glaskörper an ERU erkrankter Pferde konnte neben den Serovaren Grippotyphosa, Bratislava und Pomona unter anderem auch die Serovar Icterohaemorrhagiae nachgewiesen werden (Hartskeerl et al. 2004, Wollanke 2002, 2004 a und b, Wollanke et al. 1998 und 2001). Es sind also verschiedene Leptospirenserovare geeignet, eine ERU auszulösen. Möglicherweise sind die regelmäßig bei Grubenpferden aufgetretenen Erblindungen („trübe Augen“) (Freiholz 2004) somit auf chronische Leptospireninfektionen des Glaskörperaums zurückzuführen und nicht darauf, dass sie so lange unter Tage in der Dunkelheit gewesen waren.

Die Gefahr einer Leptospireninfektion über kontaminiertes Wasser bleibt somit nicht allein auf die tropischen Regionen begrenzt. Dies wird durch auch aktuell immer wieder auftretende Leptospirosefälle in der Zone des gemäßigten Klimas bestätigt (Brockmann 2010, Desai 2009, Goris 2013, Jansen et al. 2005). Sowohl für Menschen als auch für Pferde ist kontaminiertes Wasser neben einem durch viele Kleinnager bedingten hohen Infektionsdruck somit als eine mögliche Infektionsquelle anzusehen.

Literatur

- Aviat F., Blanchard B., Michel V., Blanchet B., Branger B., Hars J., Mansonette F., Brasme L., De Champs C., Bolut P., Mondot P., Falu J., Rocherau S., Kodjo A., Andre-Fontaine G. (2009) Leptospira exposure in the human environment in France: A survey in feral rodents and in fresh water (Abstract). Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 32, 463-476; DOI: 10.106/j.cimid.2008.05.004
- Babudieri B. (1957) Schutzimpfung gegen Leptospiren. Zentralbl. Bakt. I, Abt. Orig. 168, 280-283
- Babudieri B. (1958) Animal reservoirs of leptospires. Ann. N.Y. Acad. Sci. 70, 393-413; DOI: 10.1111/j.1749-6632.1958.tb35398.x
- Bal A. E., Gravekamp C., Hartskeerl R., De Meza-Brewster J., Korver H., Terpstra W. J. (1994) Detection of Leptospira in Urine by PCR for Early Diagnosis of Leptospirosis. J. Clin. Microbiol. 32, 1894-1898
- Balzer J., IDEXX Laboratories (2016), persönl. Mitteilung
- Brandes K., Wollanke B., Niedermaier G., Brem S., Gerhards H. (2007) Recurrent uveitis in horses: vitreal examinations with ultrastructural detection of leptospires. J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med. 54, 270-275; DOI: 10.1111/j.1439-0442.2007.00921.x
- Brem S., Gerhards H., Wollanke B., Meyer P., Kopp H. (1998) Intraokularer Leptospirennachweis bei 4 Pferden mit rezidivierender Uveitis (ERU). Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 111, 415-417
- Brem S., Gerhards H., Wollanke B., Meyer P. und Kopp, H. (1999) 35 leptospira isolated from the vitreous body of 32 horses with recurrent uveitis (ERU). Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 112, 390-393
- Brockmann S., Piechotowski I., Bock-Hensley O., Winter C., Oehme R., Zimmermann S., Hartelt K., Luge E., Nöckler K., Schneider T., Stark K., Jansen A. (2010) Outbreak of Leptospirosis among triathlon participants in Germany, 2006. BMC Infect. Dis. 10, 91; DOI: 10.1186/1471-2334-10-91
- Broom J. C., Gibson E. A. (1953) Infection rates of Rattus norvegicus with Leptospira icterohaemorrhagiae in Great Britain. J. Hygiene 51, 416-425
- Cibulski S. (2016) Untersuchung von wildlebenden Kleinsäugetern und Wasserproben auf DNA pathogener Leptospiren mittels real-time PCR. Diss. Med. Vet. München
- Desai S., Van Treeck U., Lierz M., Espelage W., Zota L., Czerwinski M., Sadkowska-Todys M., Avdicová M., Reetz J., Luge E., Guerra B., Nöckler K., Jansen A. (2009) Resurgence of field fever in a temperate country: An epidemic of Leptospirosis among seasonal Strawberry Harvesters in Germany in 2007. Clin. Infect. Dis. 48, 691-697, DOI: 10.1086/597036
- Diesch S., McCulloch W. F. (1966) Isolation from pathogenic leptospires from waters used for recreation. Public Health Reports 81, 299-304
- Ellis W. A. (2015) Animal Leptospirosis. In B. Adler (Hrsg.): Leptospira and Leptospirosis. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. ISBN: 978-3-662-45059-8
- Faber N. A., Crawford M., LeFebvre R. B., Buyukmihci N. C., Madigan J. E., Willits N. H. (2000) Detection of Leptospira spp. in the aqueous humor of horses with naturally acquired recurrent uveitis. J. Clin. Microbiol. 38, 2731-2733
- Faine S. (1962) The growth of Leptospira australis B in the kidneys of mice in the incipient experimental carrier state. J. Hygiene 60, 435-442
- Faine S., Adler B., Bolin C., Perolat P. (2000) Leptospira and Leptospirosis (2. Auflage.). Medi Sci, Melbourne, Australia
- Freiholz H. (2003) „Glückauf?“ Untertage stirbst du dreimal. Verlag Die Blaue Eule, Essen.
- Freiholz H. (2004) Max, das Grubenpferd. Druckerei zum Stickling GmbH, Gütersloh.
- Ganoza C. A., Matthias M. A., Collins-Richard D., Brouwer K., Cunningham C. B., Segura E. R., Gilman R. H., Gotuzzo E., Vinet J. M. (2006) Determining Risk for severe Leptospirosis by molekular analysis of environmental surface waters for pathogenic leptospira. PLo Medicine 3(8), 1329-1340; DOI: 10.1371/journal.pmed.0030308
- Gerhards H., Wollanke B. (2001) Uveitis bei Pferden – Diagnose und Therapie. Pferdeheilkunde 17, 319-329
- Gochenour W. S., Gleiser C. A., Ward M. K. (1958) Laboratory diagnosis of leptospirosis. Ann. N. Y. Acad. Sci. 70, 421-426, DOI: 10.1111/j.1749-6632.1958.tb35400.x
- Goris M. G. A., Boer K. R., Duarte T. A. T. E., Kliffen S. J., Hartskeerl R. A. (2013) Human Leptospirosis Trends, the Netherlands, 1925-2008. Emerg. Infect. Dis. 19, 371-378
- Gsell O. (1968) VIII. Krankheiten durch Spirochaetales - Leptospiren. In Gsell u. Mohr (Hrsg.), Infektionskrankheiten Band II/ 2. Berlin, Heidelberg, New York, Springer Verlag.
- Haake D. A., Levett P. N. (2015) Leptospirosis in Human. In B. Adler (Hrsg.): Leptospira and Leptospirosis. Berlin, Heidelberg, Springer Verlag; ISBN: 978-3-662-45059-8
- Hartskeerl R. A., Goris M. G. A., Brem S., Meyer P., Kopp H., Gerhards H. (2004) Classification of Leptospira from the Eyes of Horses Suffering from Recurrent Uveitis. J. Vet. Med. B 51, 110-115
- Henry R. A., Johnson R. C. (1978) Distribution of the genus Leptospira in soil and water Appl. Environ. Microbiol. 35, 492-499
- Höllerhage E. (2002) Mein Freund in dunkler Erde. Noxxon Verlag, Recklinghausen.
- Hupka E., Behrens H. (1951) Untersuchungen über die Leptospirose des Pferdes. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 58, 344-348
- IDEXX Laboratories (2015) Diagnostic update Canine Leptospirose - eine Krankheit im Wandel. www.idexx.de
- Ito Y., Hoki R., Ito H., Wani H. (1917) The rat as carrier of spirochaeta icterohaemorrhagiae, the causative agent of weill's disease (Spirochaetosis icterohaemorrhagica). J. Exp. Med. 26, 341-353; DOI: 10.1084/jem.26.3.341
- Jansen A., Sschönberg I., Frank C., Alpers K., Schneider T., Stark K. (2005) Leptospirosis in Germany 1962-2003. Emerg. Infect. Dis. 11, 1048-1054; DOI: 10.3201/eid1107.041172
- Kathe J. (1950) Die Epidemiologie der Leptospirenkrankungen. Zbl. Bakt. I Orig. 155, 199-226
- Kathe J. (1959) Die Leptospirose als Berufskrankheit. Arch. Gewerbe-pathol. Gewerbehyg. 17, 316-328; DOI: 10.1007/BF00388138
- Kathe J., Mochmann H. (1967) A Leptospiren der Serogruppe icterohaemorrhagiae. In J. Kathe J und Mochmann H. (Hrsg.) Leptospiren und Leptospiren. Band I Teil II, 551-559, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Kathe J., Popp L., Mochmann H. (1967) A Vorkommen und Verbreitung in Europa. In Kathe J. und Mochmann H. (Hrsg.): Leptospiren und Leptospiren. Band I Teil II, 686-696, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena
- Krampitz H. E. (1967) A. Freilebende Kleinsäugetiere als Reservoir und Infektionsquellen für Leptospiren. In Kathe J. und Mochmann H. (Hrsg.): Leptospiren und Leptospiren. Band I Teil II. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena
- Krüger A. (1952) Vorkommen und Verbreitung der Leptospiren bei den Haustieren. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 65, 121-124

- Mayer-Scholl A., Draeger A., Luge E., Ulrich R., Nöckler K. (2011) Comparison of two PCR Systems for the Rapid Detection of *Leptospira* spp. from Kidney tissue. *Microbiol.* 62, 1104-1106; DOI: 10.1007/s00284.010.9829.5
- Levett P. N., Morey R. E., Galloway R. L., Turner D. E., Steigerwalt A. G., Mayer L. W. (2005) Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *J. Med. Microbiol.* 54, 45-49; DOI: 10.1099/jmm.0.45860-0
- Mayer-Scholl A., Hammerl J. A., Schmidt S., Ulrich R. G., Pfeffer M., Woll B., Scholz H. C., Thomas A., Nöckler K. (2014) *Leptospira* spp. in Rodents and Shrews in Germany. *Int. J. Environ. Res. Publ. Health* 11, 7562-7574; DOI: 10.3390/ijerph110807562
- Mérien F., Amouriaux P., Baranton G., Saint Girons I. (1992) Polymerase Chain Reaction for Detection of *Leptospira* spp. in Clinical Samples. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2219-2224; DOI: 0095-1137/92/092219-06\$02.00/0
- Mino P. (1941) Weitere Untersuchungen über die Leptospirose der Reisfeldarbeiter (Feldmäuse als Leptospirentäger). *Muench. Med. Wschr.* 96, 96-99
- Maghami G. H., Hooshmand-Rad P., Farhang-Azad A. (1977) Leptospirosis in small mammals of Iran: II: isolation of *Leptospira grippityphosa* from *Mus musculus*. *J. Wildlife Dis.* 13, 286-289
- Murray G. L. (2015) The molecular basis of leptospiral pathogenesis. In Adler B. (Hrsg.): *Leptospira and Leptospirosis*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. ISBN: 978-3-662-45059-8
- Nattermann H. (2006) Leptospirose. In Dietz O. und Huskamp B. (Hrsg.): *Handbuch Pferdepraxis*, 3. Aufl., Enke Verlag, Stuttgart. ISBN: 9783830410287
- Niedermaier G., Wollanke B., Hoffmann R., Matiassek K., Gerhards H. (2006) Darstellung von Leptospiren im Glaskörper augengesunder Pferde und an ERU erkrankter Pferde mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 113, 418-422
- Pappachan J. M., Mathew S., Thomas B., Renjini K., Scaria C. K., Shukla J. (2007) The incidence and clinical characteristics of the immune phase eye disease in treated cases of human leptospirosis. *Indian J. Med. Sci.* 61, 441-447
- Parnas J. (1967) B Naturherde der Leptospirose und Naturherduntersuchungen. In Kathe J. und Mochmann H. (Hrsg.): *Leptospiren und Leptospirosen*. Band I Teil II, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 517
- Parnas J., Koslak A., Krukowska M. (1961) Leptospiren, die bei der Hausmaus (*Mus musculus*) auftreten. *Zbl. Bakt. I Orig.* 182, 121-128
- Popp L. (1950) Eine Feldfieberepidemie bei Erbsenpflückern. *Z. Hyg.* 131, 575-597
- Rimpau W. (1927) Ueber das Vorkommen von Schlamm-(Ernte-) Fieber in Südbayern im Sommer 1926. *Muench. Med. Wschr.* 1, 921
- Rimpau W. (1938) Weiteres über die Epidemiologie des Feldfiebers in Südbayern. *Muench. Med. Wschr.* 2, 1977-1979
- Rimpau W. (1942) Systematische Untersuchungen von Feldmäusen auf Leptospiren. *Muench. Med. Wschr.* 89, 991-992
- Rimpau W. (1943) Über Leptospirose bei den Muriden (mäuseartigen Nagern). *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkunde Infektionskr.* 150, 136-149
- Rimpau W. (1947) Leptospirose beim Pferde (Periodische Augenentzündung). *Tierärztl. Umschau* 2, 177-178
- Rimpau W. (1950) Die Leptospirosen (Feldfieber, Canicola fieber, Weilsche Krankheit). In Gundel M. (Hrsg.): *Die ansteckenden Krankheiten*, 4. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Roczek A. (2008) Entwicklung einer quantitativen PCR zum Nachweis von DNA pathogener Leptospiren in Glaskörper- und Kammerwasserproben von Pferden. *Diss. Med. Vet. München*
- Schüffner W. A. P., Bohlander H. (1942) Die Feldmaus (*Microtus arvalis ar-valis*) als Träger des Schlammfiebers (syn. Ernte-, Wasser-, Feldfieber). *Zentralbl. Bakt., Parasitenk. und Infektionskrankh.* 149, 359-362
- Schüffner W. A. P., Bohlander H. (1943) Die ersten Ergebnisse der Schlammfieberforschung in den Niederlanden. *Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol.* 9, 19-31
- Stoddard R. A., Gee J. E., Wilkins P. P., McCaustland K., Hoffmaster A. R. (2009) Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the *Lipl32* gene. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 64, 247-255; DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2009.03.014
- Szemes P. A., Gerhards H. (2000) Untersuchungen zur Prävalenz der equinen rezidivierenden Uveitis im Großraum Köln-Bonn. *Prakt. Tierarzt* 81, 408-420
- Tansuphasiri U., Thipsuk C., Phulsuksombati D., Chanyasanha C. (2006) Duplex PCR-Hybridisatopn based detection of pathogenic *Leptospira* in environmental water samples obtained from endemic areas in northeast region of Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 37, 729-741
- Uhlenhuth P., Grossmann H. (1926) Die Ätiologie und Epidemiologie der Ansteckenden Gelbsucht (Weilschen Krankheit) im Lichte Experimenteller Untersuchungen über die Typenfrage ihres Erregers (*Spirochaeta Icterogenes*). *Klein. Wschr.* 5, 1113-1117; DOI: 10.1007/BF01737402
- Uhlenhuth P., Zülzer M. (1922) Über die Biologischen und Immunitatorischen Beziehungen des Erregers der Weilschen Krankheit (*Spirochaeta Icterogenes*) Zu der Freilebenden Wasserspirochäte (*Spirochaeta Pseudoictrogenes*). *Klin. Wschr.* 1, 2124-2130; DOI: 10.1007/BF01727672
- Van Eys G. J., Gravekamp C., Gerritsen M. J., Quint W., Cornelissen M. T., Schegget J. T., Terpstra W. J. (1989) Detection of leptospires in urine by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 27, 2258-2262
- Vein J., Perrin A., Bery P. J., Benoit E., Leblond A., Kodjo A. (2012) Adaptation of a real-time PCR method for the detection and quantification of pathogenic leptospires in environmental water. *Can. J. Microbiol.* 58, 828-835; DOI: 10.1139/W2012-060
- Villumsen S., Pedersen R., Borre M. B., Ahrens P., Jensen J. S., Krogfelt K. A. (2012) Novel TagMan(R) PCR for detection of *Leptospira* species in urine and blood: Pit-falls of in silico validation. *J. Microbiol. Methods* 91, 184-190; DOI: 10.1016/j.mimet.2012.06.009
- Vital-Brazil J. M., Balassiano I. T., De Oliveira F. S., De Souza Costa A. D., Hillen L., Pereira M. M. (2010) Multiplex PCR-based detection of *Leptospira* in environmental water samples obtained from slum settlement. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105(3); DOI: 10.1590/S0074-0276201000030020
- William A., Londree M. D. (2014) Leptospirosis: The microscopic Danger in Paradise. *Hawaii J. Med. Public health*, 73 (Suppl. 2), 21-23
- Wiesmann E. (1949) Der heutige Stand der Leptospirenforschung. *Z. Hyg.* 130, 80-96
- Wollanke B. (2002) Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) als intraokulare Leptospirose. *Habil. Med. vet. München*
- Wollanke B., Gerhards H., Brem S., Kopp H. (2004 a) Ätiologie der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU): Autoimmunkrankheit oder intraokulare Leptospireninfektion? *Pferdeheilkunde* 20, 327-340
- Wollanke B., Brem S., Meyer P., Forbrig T., Grassel P., Gerhards H. (2004 b) Prophylaxe der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU): Erste Erfahrungen mit einem Leptospiren-Impfstoff bei Pferden. *Pferdeheilkunde* 20, 447-454
- Wollanke B., Gerhards H., Brem S., Kopp H., Meyer P. (1998) Intraokulare und Serumantikörpertiter gegen Leptospiren bei 150 wegen equiner rezidivierender Uveitis (ERU) vitrektomierter Pferde. *Berl. Muench. Tierärztl. Wschr.* 111, 134-139
- Wollanke B., Gerhards H., Brem S., Wolf E., Kopp H., Meyer P. (2000) Zur Leptospirenätiologie der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU) – Ergebnisse der Untersuchungen von Serum- und Glaskörperproben. *Tierärztl. Prax.* 28(G), 153-158
- Wollanke B., Rohrbach B., H. Gerhards (2001) Serum and vitreous humor antibody titers in and isolation of *Leptospira interrogans* from horses with recurrent uveitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 219, 795-800
- Wolter F. (1939) Zur Ätiologie und Prophylaxe des Ernte- bzw. Feldfiebers in Südbayern. *Arch. Gewerbepathol. Gewerbehyg.* 9, 443-452; DOI: 10.1007/BF02122987
- Zwierchowski J. (1967a) C. Bekämpfung der tierischen Leptospiren. In Kathe J. und Mochmann H. (Hrsg.): *Leptospiren und Leptospirosen*. Band I Teil II, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1107-1112
- Zwierchowski J. (1967b) C. Klinik und Therapie der Leptospirosen der Haus- und Nutztiere. In Kathe J. und Mochmann H. (Hrsg.): *Leptospiren und Leptospirosen*. Teil I, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 79-137