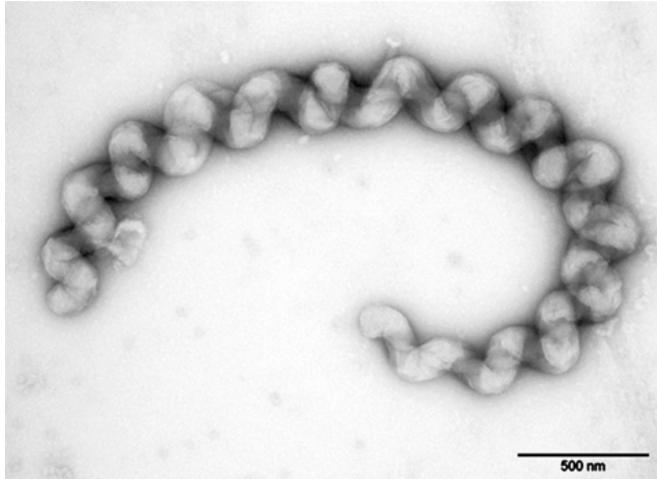


# Epidemiologie von Leptospiren in Deutschland

Duygu Emirhar

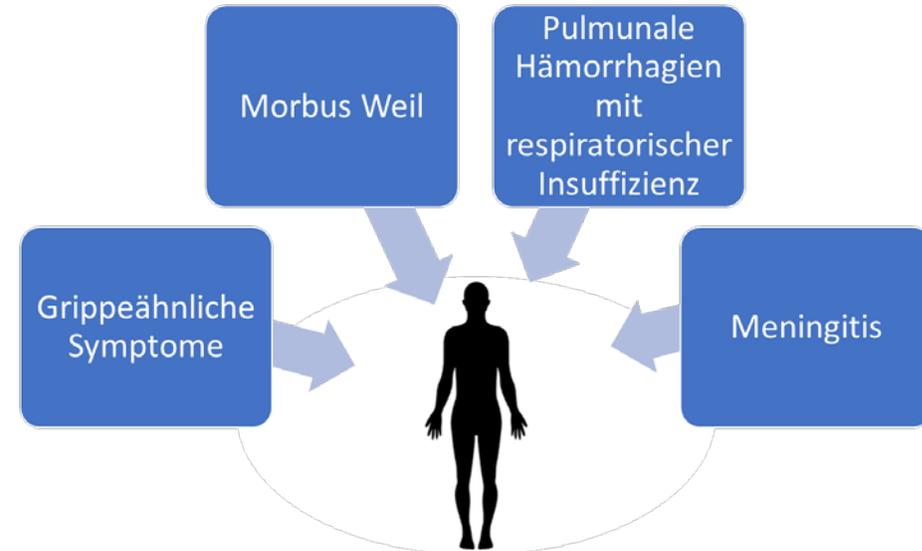
# Die Gattung *Leptospira*

- Korkenzieherförmig
- Gram-negativ
- Aerob
- Beweglich



[1]

- Hauptreservoir: Nagetiere
- Nebenwirte: Haus-, Nutz- und Wildtiere



- Erreger der Krankheit Leptospirose
- Weltweit vorkommende, lebensbedrohliche Zoonose



[2]

# Übertragungswege

Indirekte Übertragung



Kontaminierte Umwelt



Infizierte Nagetiere  
->Urin



Freilebende  
Leptospiren

Direkte Übertragung



Urin der Nagetiere

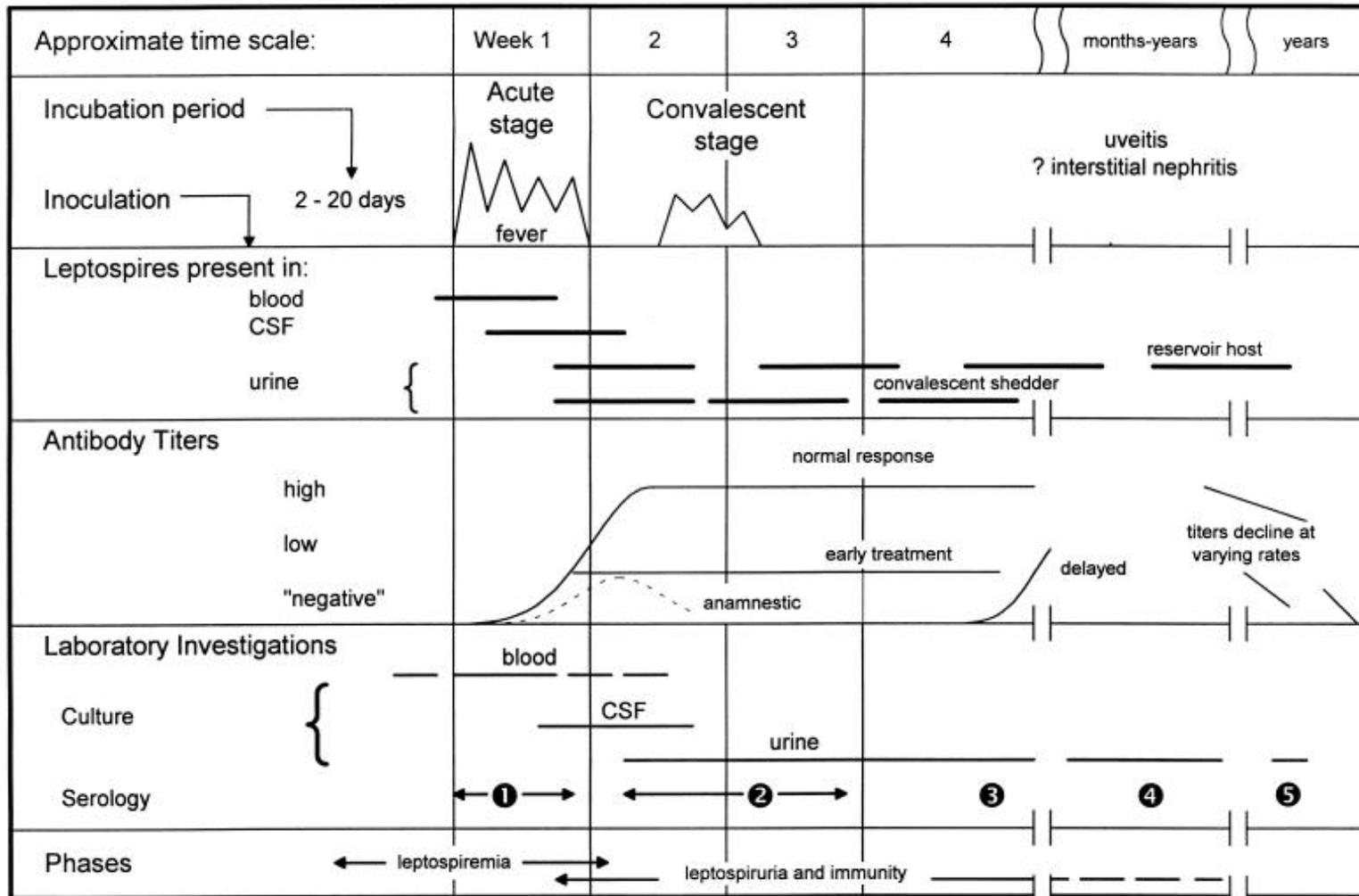


Infizierte Tiere  
->Urin



Freilebende  
Leptospiren

# Verlauf und Diagnose der Leptospirose



## Direkter Nachweis:

- PCR
- Kultivierung
- Mikroskopischer Nachweis

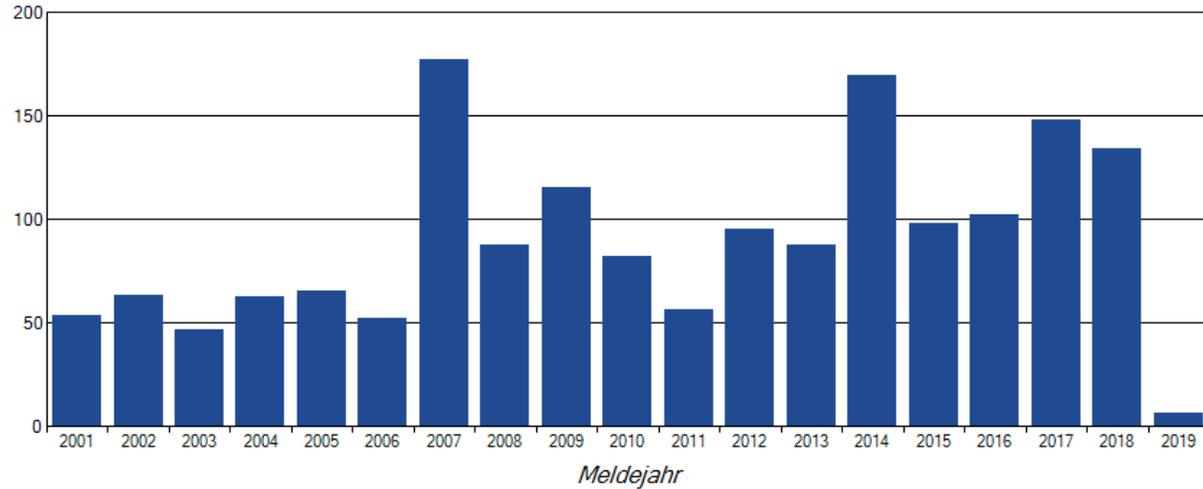
## Indirekter Nachweis:

- MAT (Goldstandard)
- ELISA
- KBR

[3]

# Situation in Deutschland

Anzahl Fälle



Inzidenz: 0,1/100.000 pro Jahr  
→ **Dunkelziffer (90% subklinisch)**

2007 und 2014 Ausbruchsjahre

→ **Erdbeerfeld**

Prävalenzstudie bei Feldmäusen in Deutschland

→ **ca. 30% (Fischer et al., 2018)**

[4]

## Bekannt als:

- Schweinehüter-Krankheit
- Feldfieber
- Arbeiterkrankheit



[5]

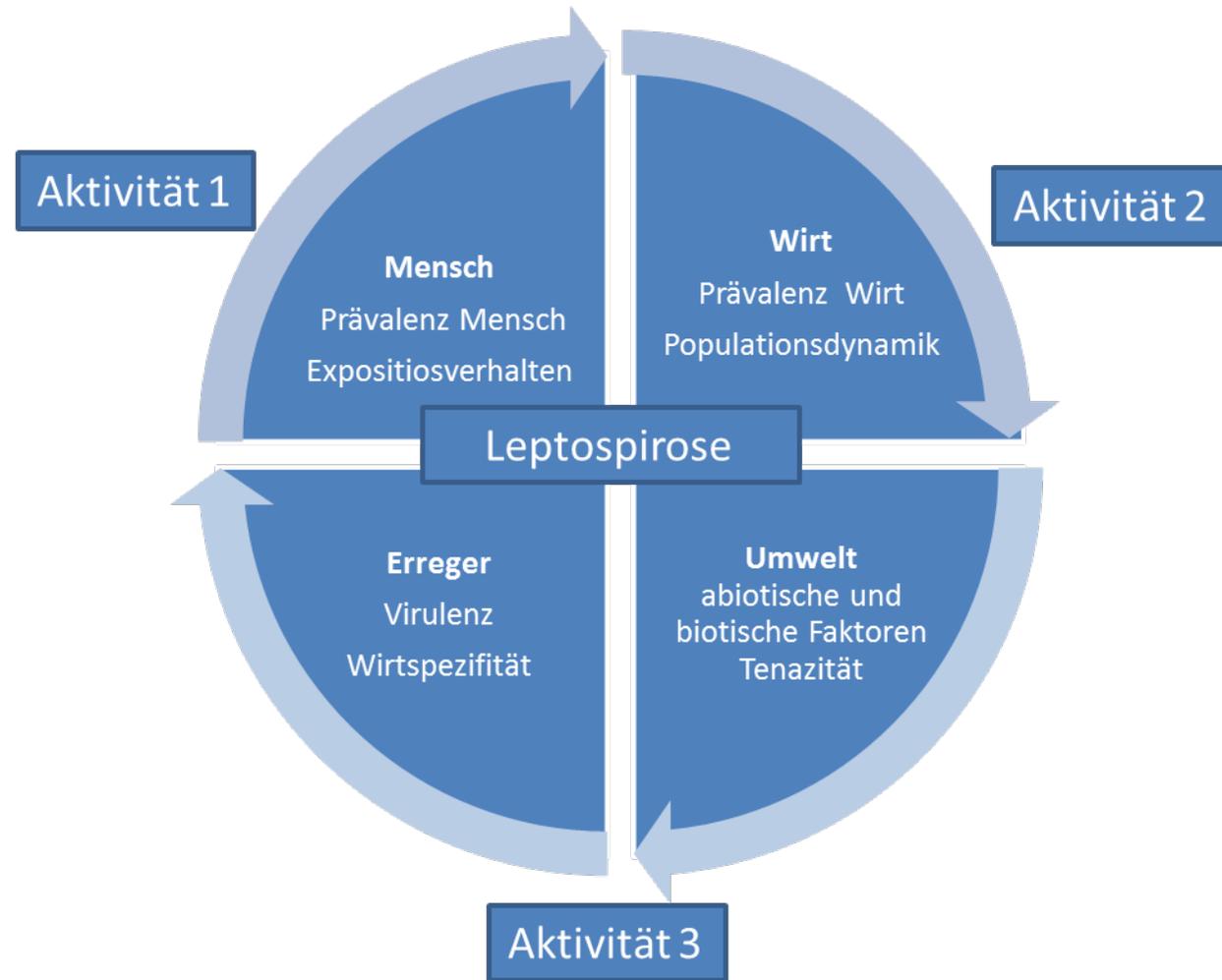
## Weitere Risikofaktoren:

- Outdoor-Aktivitäten
- Haustiere

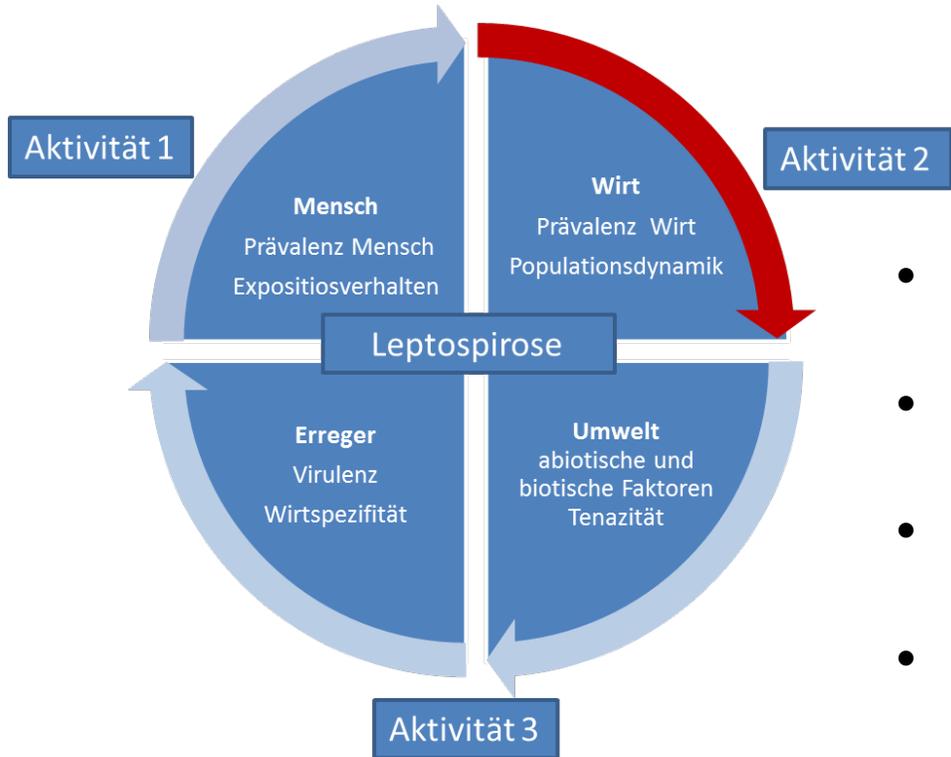


[6]

# Leptospirose

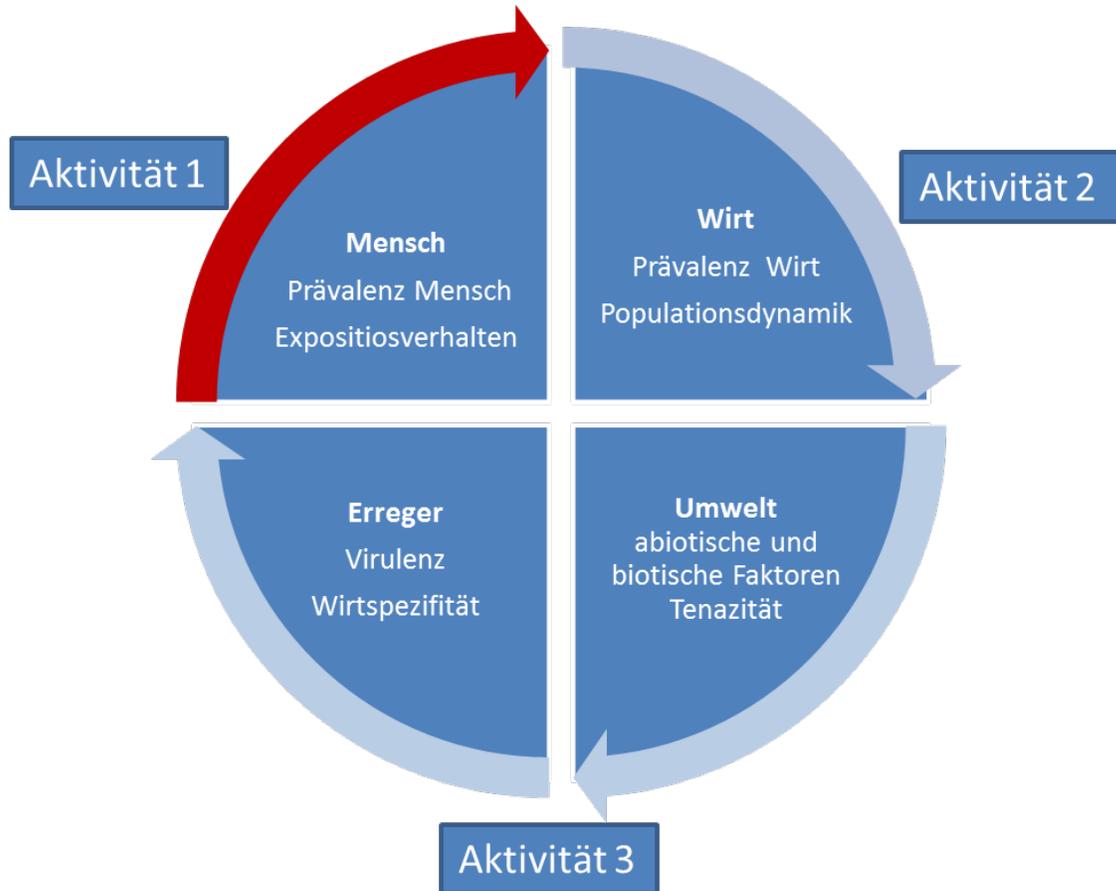


# Prävalenzuntersuchung Nagetiere



- Validierung qPCR
- 87 untersuchte Mäuse (JKI und LAVES)
- Drei positive Mäuse: konventionelle PCR und qPCR
- Stämme konnten erfolgreich isoliert und angezchtet werden
- MLST : *Leptospira kirschneri* Serovar *Grippotyphosa* ST 110
- Untersuchung weiterer Nagetiere
- Erste NGS Daten vorhanden für WGS →vergleichende Genomanalysen

# Humanprävalenz



## Ziel:

Humane Seroprävalenz bei Risikogruppen in Deutschland (Waldarbeiter und ggf. Erdbeerpflücker)

## Methoden:

MAT (Goldstandard)

In-house ELISA (BfR)

Virion/Serion ELISA (NLGA)

→ **MAT ist nicht optimal (epidemiologische Studien, subklinische Fälle)**

→ **Erfahrung des BfR mit kommerziellen Kits während des Ausbruchs (Erdbeerfeld 2007): Schlechte Sensitivität**

→ Methodenvergleich

# Humanprävalenz

**Ziel:** Zuverlässiger Test für Deutschland

- Klinische und subklinische Fälle
- Epidemiologische Untersuchungen

**Problem:** Bestimmen der Sensitivität und Spezifität ohne:

1. Referenzmethode
2. Referenzseren

(n=525)

Gruppe	Anzahl	Beschreibung	Vermutete Prävalenz Wahrscheinlichkeit
A	4	Leptospirose Patienten	100%
B	92	Klinische Fälle mit Fieber und Leptospirose-ähnlichen Symptomen	hoch
C	71	Leptospirose Ausbruch Erdbeerfeld (2007)	hoch
D	90	Waldarbeiter	Höher als in der Allgemeinbevölkerung
E	92	Humanseren vom betriebsärztlichen Dienst	Sehr gering

Schlichting et al., 2015

# Ergebnisse Methodenvergleich

- Virion/Serion
- 15% positiv
  
- In-house ELISA
- 29% positiv

Gruppe	Anzahl	Beschreibung	Vermutete Prävalenz Wahrscheinlichkeit
A	4	Leptospirose Patienten	100%
B	92	Klinische Fälle mit Fieber und Leptospirose-ähnlichen Symptomen	hoch
C	71	Leptospirose Ausbruch Erdbeerfeld (2007)	hoch
D	90	Waldarbeiter	Höher als in der Allgemeinbevölkerung
E	92	Humanseren vom betriebsärztlichen Dienst	Sehr gering

# Ergebnisse Methodenvergleich

## Mikroagglutinations Test (Goldstandard):

- Niedrige Sensitivität in subklinischen Fällen

## BfR In-house ELISA

- Hohe Sensitivität in allen Gruppen

## Virion/Serion ELISA

- Niedrige Sensitivität in klinischen Fällen

Panel	In-house ELISA	Virion/Serion ELISA	MAT
	Positiv	Positiv	Positiv
Leptospirosepatienten	94%	62%	94%
Klinische Fälle	38%	21%	28%
Ausbruchsfälle (Erdbeerfeld)	37%	14%	32%
Waldarbeiter	24%	13%	0%
Betriebsärztlicher Dienst	2%	1%	0%
$\Sigma$	<b>29%</b>	<b>15%</b>	<b>14%</b>

# Ergebnisse Methodenvergleich

	MAT vs. In-house ELISA	MAT vs. Virion/Serion ELISA	In-house ELISA vs. Virion/Serion ELISA
Cohen's Kappa Koeffizient:	0,569 Mittelmäßige Übereinstimmung	0,55 Mittelmäßige Übereinstimmung	0.31 ausreichende Übereinstimmung

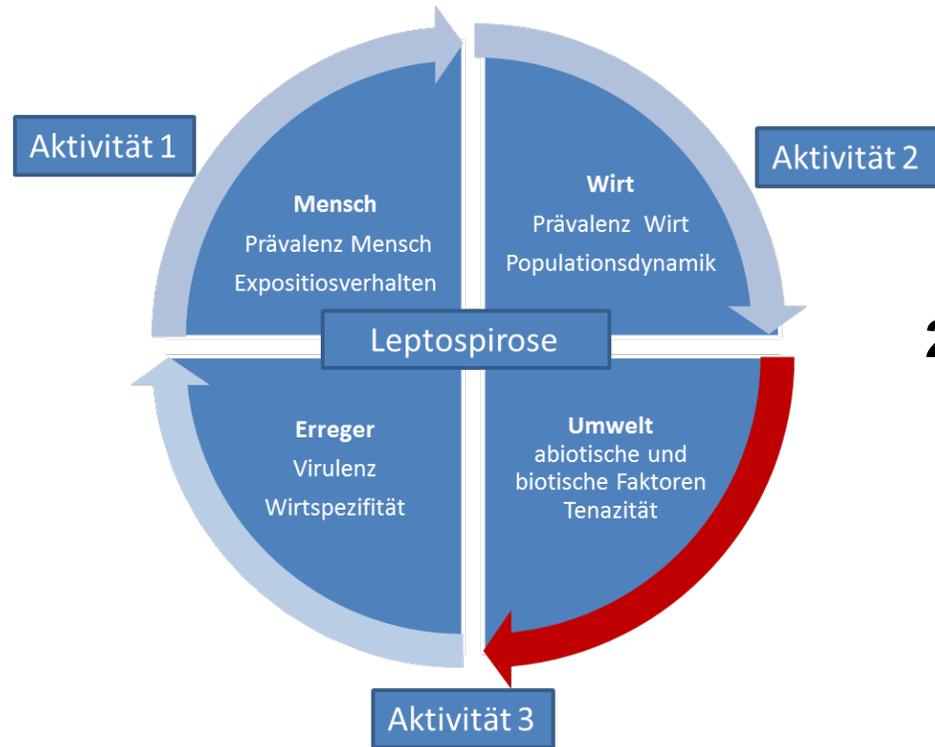
## Fazit:

- Mangelnde Übereinstimmung zwischen dem BfR In-house ELISA und kommerziellen ELISA

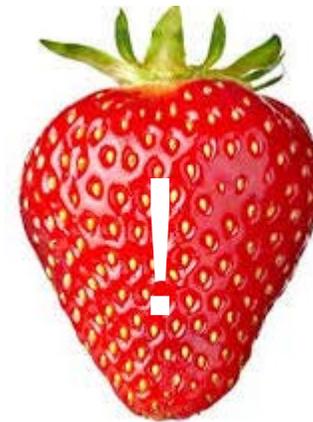
## Ausblick:

- Weiterführende Statistik
- Bedeutung für andere Nutzer des kommerziellen Tests?

# Überlebenszeit von *L. kirschneri* auf Erdbeeren



**„Die Rückkehr des Feldfiebers in Deutschland:  
*Leptospira-Grippotyphosa*-Ausbruch  
unter Erdbeerpflückern“ (RKI)  
2007 in Nordrhein-Westfalen und 2014 in Niedersachsen**



# Überlebenszeit von *L. kirschneri* auf Erdbeeren

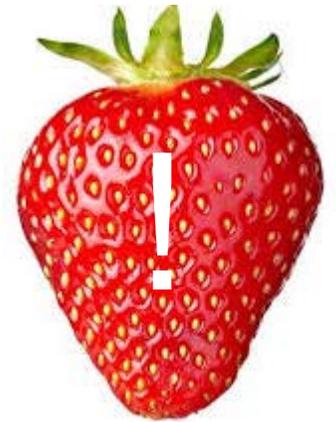
## Risikofaktoren:

Exposure	Exposed individuals			Unexposed individuals			Univariate risk ratio or OR <sup>a</sup> (95% CI)	Multivariate OR (95% CI)
	Case patients	All	Attack rate, %	Case patients	All	Attack rate, %		
Accidental contact with rodents	7	18	39	16	131	12	3.2 (1.5–6.7)	4.8 (1.5–15.9)
Harvesting with open hand wounds	15	49	31	9	102	9	3.5 (1.6–7.4)	... <sup>b</sup>
Eating unwashed strawberries	23	113	20	1	38	3	7.7 (1.1–55.4)	... <sup>b</sup>
Harvesting in the rain with open hand wounds/working day	...	...	...	...	...	...	1.1 (1.04–1.1) <sup>a</sup>	1.1 (1.04–1.1)
No. of days harvesting in the rain	...	...	...	...	...	...	1.05 (0.996–1.1) <sup>a</sup>	... <sup>b</sup>
Harvesting with open hand wounds/working day	...	...	...	...	...	...	1.05 (1.02–1.1) <sup>a</sup>	... <sup>b</sup>

<sup>a</sup> For continuous variables, ORs were calculated by univariate regression analysis.

<sup>b</sup> Variables were excluded from the final multivariate regression model by stepwise backward elimination.

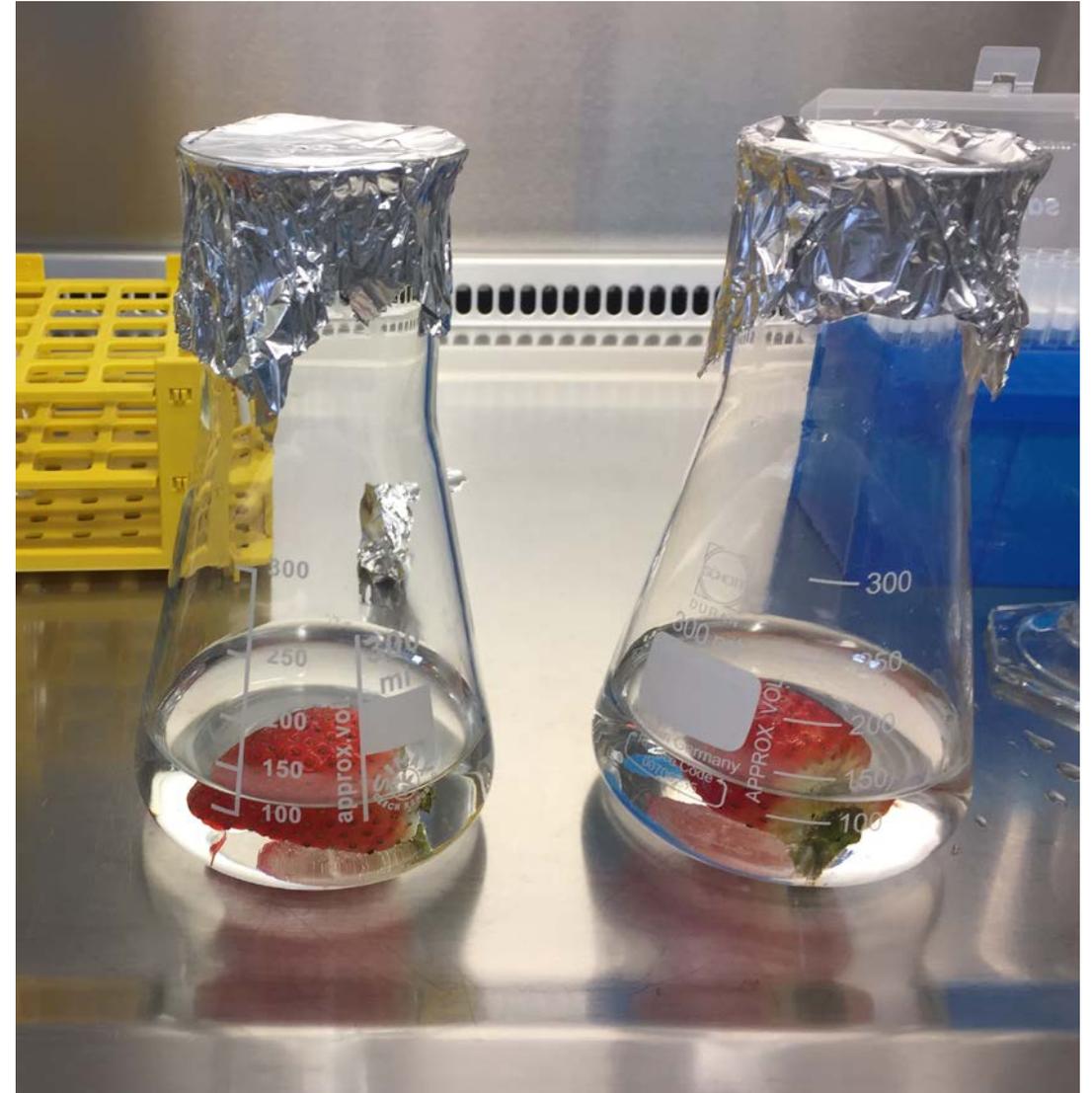
Ist der Konsum von Erdbeeren ein Risikofaktor?



[3]

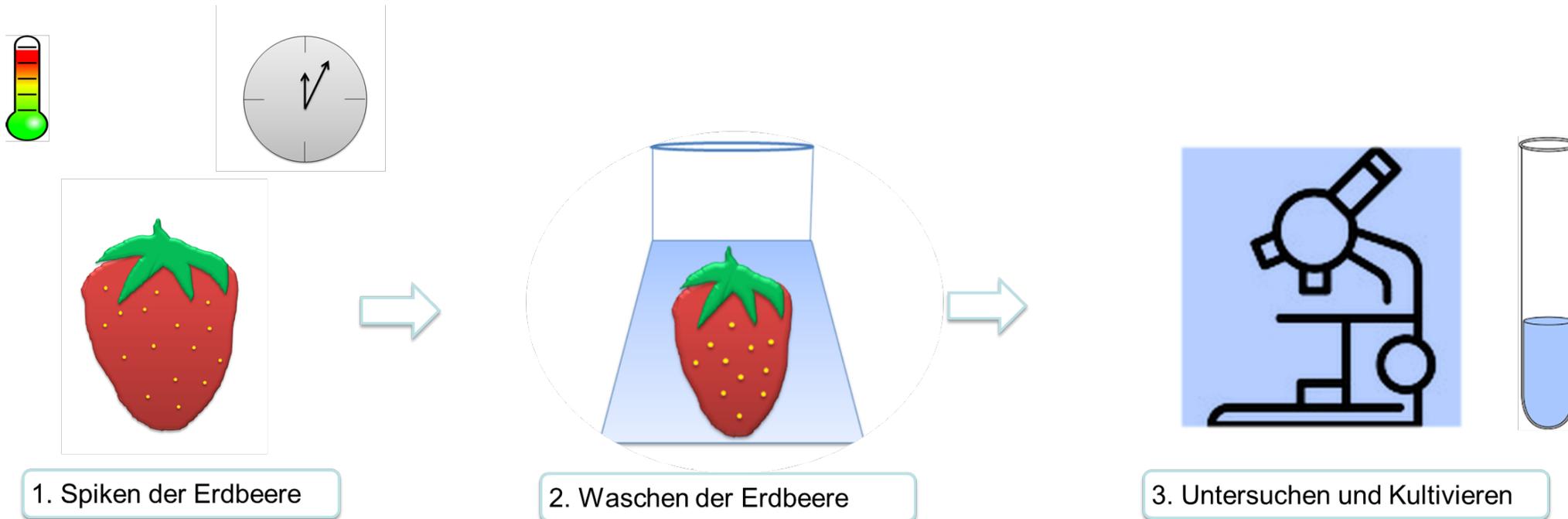
**Ziel:** Untersuchung der Überlebenszeit von *L. kirschneri* auf Erdbeeren

# Tenazität auf Erdbeeren



# Versuchsaufbau

- Vergleich Laborstamm und Isolat aus Feldmaus (Erdbeerefeldausbruch)
- Erdbeeren mit 100µl einer  $5 \times 10^{10}$  Zellen/ml Suspension spiken
- Inkubieren für 2h, 4h, 6h und 8h
- Inkubieren bei verschiedenen Temperaturen: 15°C, 21°C und 25°C



# Ergebnisse Laborstamm

		15°C				21°C				25°C			
		2h	4h	6h	8h	2h	4h	6h	8h	2h	4h	6h	8h
Trial 1	1	✗	✗	✗ ✓	✗	✓ ✓ 5x10 <sup>6</sup>	✓ ✓ 2x10 <sup>6</sup>	✗	✗	✓ ✓ 2,3x10 <sup>7</sup>	✓ ✓ 1,3x10 <sup>7</sup>	✗ ✓	✗
	2	✗	✗ ✓	✗	✗	✓ ✓ 6x10 <sup>6</sup>	✗ ✓	✗	✗	✓ ✓ 9x10 <sup>6</sup>	✗ ✓	✗ ✓	✗
	3	✗	✗	✗	✗	✓ ✓ 1x10 <sup>6</sup>	✗	✗	✗	✓ ✓ 1x10 <sup>7</sup>	✗	✗	✗
Trial 2	1	✗	✓ ✓ 2x10 <sup>6</sup>	✓ ✓ 2x10 <sup>6</sup>	✗	✗ ✓	✓ ✓ 5x10 <sup>6</sup>	✗	✗	✓ ✓ 1x10 <sup>7</sup>	✗	✗	✗
	2	✗	✗ ✓	✗	✗	✓ ✓ 2x10 <sup>6</sup>	✗	✗	✗	✓ ✓ 2x10 <sup>7</sup>	✓ ✓ 5x10 <sup>6</sup>	✗	✗
	3	✗	✗	✗	✗	✗	✗ ✓	✗	✗	✓ ✓ 7x10 <sup>6</sup>	✗	✗	✗
Trial 3	1	✓ ✓ 2x10 <sup>6</sup>	✗	✗	✗	✗ ✓	✗ ✓	✗ ✓	✗	✓ ✓ 2,5x10 <sup>7</sup>	✗ ✓	✗	✗
	2	✗	✗	✗	✗	✓ ✓ 2x10 <sup>6</sup>	✗	✗	✗	✓ ✓ 7x10 <sup>6</sup>	✗ ✓	✗	✗
	3	✗	✗	✓ ✓ 2x10 <sup>6</sup>	✗	✓ ✓ 9x10 <sup>6</sup>	✗ ✓	✗	✗	✓ ✓ 1x10 <sup>6</sup>	✗	✗	✗

✗ Keine lebenden Leptospiren

✓ Lebende Leptospiren in der Waschsuspension direkt nach dem Waschen [cells/ml]

✓ Positive Kultur

## Überlebensrate

15°C: 4%

21°C: 8%

25°C: 25%

# Ergebnisse Tenazität

Inkubationszeit	Temperatur						
		Strain Moskva V	Field strain	Strain Moskva V	Field strain	Strain Moskva V	Field strain
		15°C		21°C		25°C	
2h		1/9	4/9	8/9	9/9	9/9	9/9
4h		3/9	1/9	6/9	6/9	5/9	4/9
6h		3/9	1/9	1/9	2/9	2/9	2/9
8h		0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9



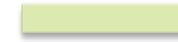
100% aller Versuche positiv



< 50% aller Versuche positiv



> 50% aller Versuche positiv



100% der Versuche negativ

# Fazit: Tenazitätsuntersuchungen auf Erdbeeren

- Überleben bis zu 6 h möglich ( $z=-7.01$ ,  $p<0.001$ )
- Bedingungen  $>21^{\circ}\text{C}$  unterstützen das Überleben ( $z=4.10$ ,  $p<0.001$ )
- Kein Unterschied zwischen beiden Stämmen ( $z= 0$ ,  $p= 1$ )

## Risiko für den Konsumenten gering:

- Supermarkt Erdbeeren

## Risiko ist erhöht:

- Direkter Konsum der Erdbeeren auf dem Feld
- Wetter: warm und feucht, vor allem warmer Winter, häufige Niederschläge!
- Klimawandel → Unterstützende Wetterbedingungen für die Erreger



# Ausblick der Doktorarbeit

	Beschreibung	Projektjahr 1	Projektjahr 2	Projektjahr 3
AS1-AP1	Molekularbiologische Untersuchung Nagetiere	→		
AS1-AP2	Kultivierung aus Nagetierproben	→		
AS1-AP3	qPCR	<b>Abgeschlossen</b>		
AS2-AP1	Tenazitätsuntersuchungen Erdbeeren		<b>Abgeschlossen</b>	
AS2-AP2	Rekrutierung Krankenhäuser		→	
AS2-AP3	Gewinnung von Humanisolaten		→	
AS2-AP4	NGS – vergleichende Genomanalysen	→		
AS3-AP1	Serologische Untersuchungen		→	

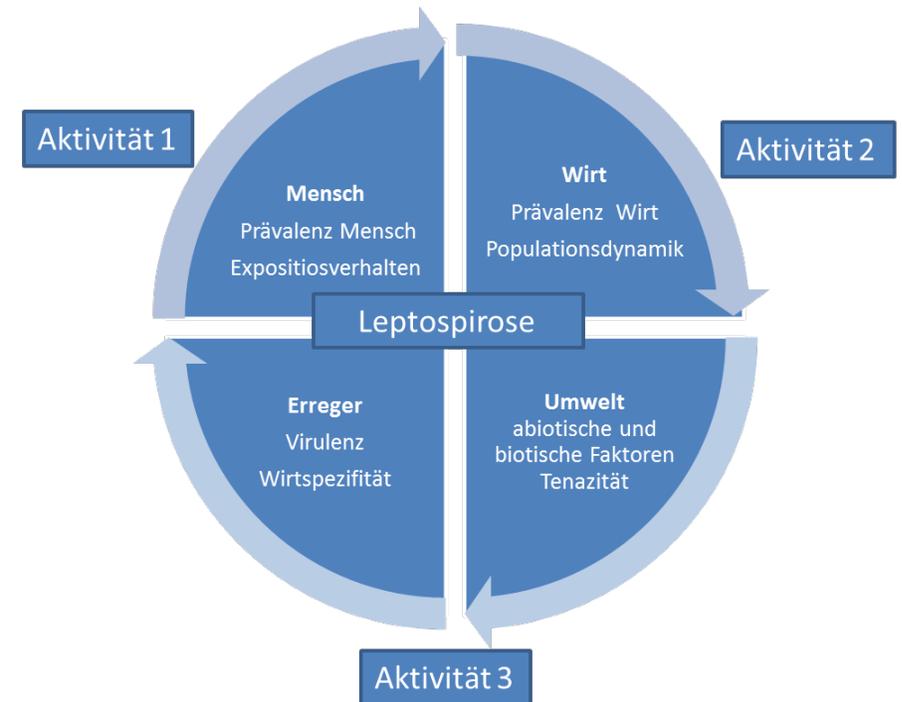
Stand heute



Versuche gestartet

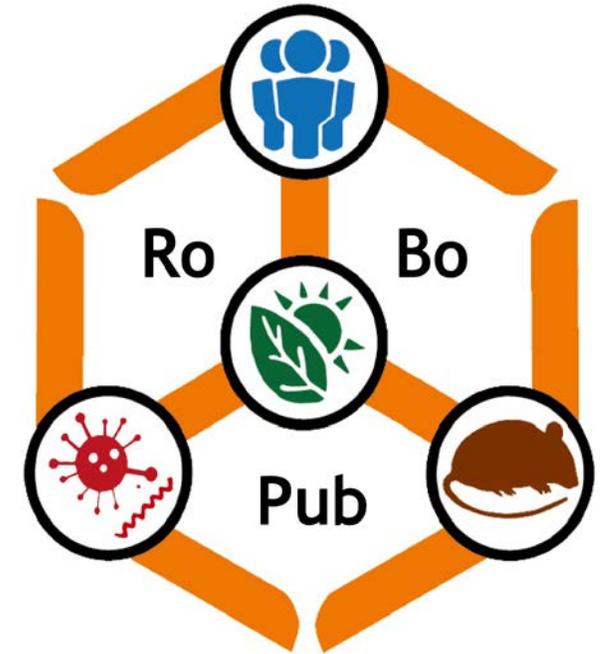
# Ausblick

- Managementstrategien und Gesundheitsempfehlungen entwickeln
- Verringerung des Expositionsrisikos für den Menschen
- Verbesserung der öffentlichen Gesundheit ermöglichen



# Vielen Dank

Prof. Dr. Karsten Nöckler, Dr. Martin Richter, Dr. Anne Mayer-Scholl,  
Dr. Nadja Bier, Enno Luge, Cornelia Göllner



# Literatur

Brockmann, S.O., Ulrich, L., Piechotowski, I., Wagner-Wiening, C., Nockler, K., Mayer-Scholl, A., and Eichner, M. (2016). Risk factors for human *Leptospira* seropositivity in South Germany. *Springerplus* 5, 1796.

Desai, S., van Treeck, U., Lierz, M., Espelage, W., Zota, L., Sarbu, A., Czerwinski, M., Sadkowska-Todys, M., Avdicova, M., Reetz, J., et al. (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.

Faine, S., Adler, B., Bolin, C., and Perolat, P. (1999). In *Leptospira and Leptospirosis* (Melbourne, Australia: Medisci Press), p. 295.

Fischer, S., Mayer-Scholl, A., Imholt, C., Spierling, N.G., Heuser, E., Schmidt, S., Reil, D., Rosenfeld, U.M., Jacob, J., Nockler, K., et al. (2018). *Leptospira* Genomespecies and Sequence Type Prevalence in Small Mammal Populations in Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis* 18, 188-199.

Jansen, A., and Stark, K. (2006). *Leptospirose* (Robert Koch-Institut, Infektionsepidemiologie).

## Abbildungen

[1] Dr. Reetz, BfR

[2] <https://pixabay.com/de/w%C3%BChlmaus-nager-maus-nagetier-tier-688254/>

(06.11.2017, 11:19 Uhr)

[3] Levett et al. 2001

[4] <https://survstat.rki.de/Content/Query/Chart.aspx> (17.03.2019, 14.35 Uhr)

[5] <http://www.freestockphotos.biz/stockphoto/11689>

(08.05.2019, 15:00 Uhr)

[6] <https://pxhere.com/nl/photo/900946> (08.05.2019, 16 Uhr)