

Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen der Veterinärmedizinischen
Universität Wien

(Leiter: Univ.-Prof. Dr.med.vet. Martin Wagner, Dipl.ECVPH)

Abteilung für Öffentliches Veterinärwesen und Epidemiologie

(Leiterin: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Annemarie Käsbohrer)

**Nachweis von *Leptospira* bei geschlachteten und symptomatischen Rindern in
Niederösterreich: Wie kann eine Rekrutierungs- und gezielte Probenahmestrategie
umgesetzt werden?**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Nicole Deitzer

Wien, im Juni 2023

Betreuerin: Ass.-Prof. Amélie Desvars-Larrive, DVM, PhD
Abteilung für Öffentliches Veterinärwesen und Epidemiologie

Co- Betreuerin: Mag.med.vet. Cynthia Sohm
Abteilung für Öffentliches Veterinärwesen und Epidemiologie
Universitätsklinik für Wiederkäuer

Gutachterin: Ao.Univ.-Prof. Dr.med.vet. Friederike Hilbert, Dipl.ECVPH
Abteilung für Hygiene und Technologie von Lebensmitteln

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all jenen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Diplomarbeit unterstützt haben.

Besonderer Dank kommt meiner Betreuerin Ass.-Prof. Dr. Amélie-Desvars-Larrive und Mag. med. vet. Cynthia Sohm zu, die mir immer sofort mit Rat und Tat zur Seite gestanden sind und es ermöglicht haben, meine Arbeit so schnell wie möglich fertigzustellen.

Weiters möchte ich mich herzlichst bei meiner Schwester Dr. med. Michelle Deitzer bedanken, die mir stets die allergrößte Hilfe war.

Mein Dank gilt auch Herrn Klaus Grandits, der einen wesentlichen Beitrag zu unseren erfolgreichen Probennahmen leistete.

Auch möchte ich mich bei Herrn Dr. Franz Strobel bedanken, der sich sehr für das Projekt engagiert hat.

Abschließend möchte ich mich besonders bei meinen Eltern bedanken, die mich während des gesamten Studiums uneingeschränkt und liebevoll unterstützt haben und mir immer wieder Zuversicht gegeben haben, auch in schwierigen Phasen nicht aufzugeben und mein Ziel konsequent weiterzuverfolgen.

Ich widme diese Arbeit meinen über alles geliebten Haustieren, die heute leider nicht mehr bei mir sind.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Der Erreger	1
1.2	Epidemiologie	1
1.3	Leptospirose: eine zoonotische Krankheit	3
1.4	Rinderleptospirose: Klinische Anzeichen und beteiligte Serovare	4
1.5	Methoden der Diagnose	5
1.5.1	PCR	5
1.5.2	Kultur	6
1.6	Situation in Österreich	6
1.7	Rekrutierungsmethoden	7
1.8	Das LORN-Projekt „in a nutshell“	10
1.8.1	Ziel	10
1.9	Forschungsfrage und zu lösendes spezifisches Problem	10
2	Material und Methoden	11
2.1	Studienort	11
2.2	Proben	12
2.3	Statistischer Probenahmeplan	12
2.4	Entwicklung des geplanten Protokolls	14
2.4.1	Feldarbeit	14
2.4.2	Kriterien für die Aufnahme von Tieren in die Studie	14
2.4.3	Rekrutierung der StudienteilnehmerInnen	16
2.4.4	Zeit von Probenentnahme bis zum Labor	20
2.4.5	Ethische Stellungnahme	20
2.5	Umsetzung des geplanten Protokolls	21
2.5.1	Ablauf am landwirtschaftlichen Betrieb	21
2.5.2	Ablauf am Schlachthof	22
3	Erste Ergebnisse (November – Dezember 2021)	24
3.1	Rekrutierung der StudienteilnehmerInnen	24
3.1.1	TierärztInnen	24
3.1.2	TierbesitzerInnen	24
3.2	Probenanzahl	25
3.3	Identifizierung der Projektbedürfnisse und – beschränkungen	25
3.3.1	Beschränkungen im Zusammenhang mit der Projektkonzeption	25
3.3.2	Beschränkungen in Zusammenhang mit der COVID-19-Pandemie	26
4	Vorgeschlagene Lösungen für das Projekt	27
4.1	Kommunikationsstrategie	27
4.2	Neue Probenahmestrategie und Einschränkungen	29

4.3	Entwicklung und Umsetzung einer Semi-Targeted-Sampling Strategie.....	30
4.3.1	Rekrutierung von Schlachthöfen	30
4.3.2	Auswahl der Tiere am Schlachthof	30
4.3.3	Über die Verwendung des Viehverkehrsscheins	32
4.3.4	Datenerhebung Schlachthof	32
5	Endergebnisse nach Verbesserung des Protokolls Jänner-April 2022.....	34
5.1	Rekrutierung der TierärztInnen.....	34
5.2	Rekrutierung der TierbesitzerInnen	35
5.3	Rekrutierung der Schlachthöfe.....	36
5.4	Zeit von Probe bis zum Labor	36
5.5	Probenanzahl	36
5.6	Über LORN hinaus: Informationsfluss in der Rinderproduktion.....	38
6	Diskussion	39
7	Abstract	43
8	Zusammenfassung.....	44
9	Abbildungsverzeichnis	46
10	Tabellenverzeichnis	46
11	Literaturverzeichnis.....	47

1. Einleitung

1.1 Der Erreger

Die Leptospirose ist eine weltweit auftretende Zoonose, die durch Spirochäten der Gattung *Leptospira* verursacht wird. *Leptospira* sind spiralförmige, gramnegative Bakterien und periplasmatische Geißeln verleihen ihnen ihre Bewegungsfähigkeit. Sie haben einen Durchmesser von ca. 150 µm und sind ca. 20 µm lang (Nakamura 2022). Leptospiren wachsen langsam, mit einer Verdopplungszeit von sechs bis acht Stunden unter optimalen Laborbedingungen (Faine et al. 1999).

Ursprünglich wurden in der historischen Klassifizierung alle nicht-pathogenen (saprophytischen) Stämme in einem "Komplex", dem "biflexa-Komplex", zusammengefasst, während die pathogenen *Leptospira* im "interrogans"-Komplex zusammengefasst wurden. Später wurden diese Komplexe als Spezies anerkannt, welche in unterschiedliche Serovare unterteilt werden. Serovare mit gemeinsamen Antigenen werden in Serogruppen eingeteilt, welche jedoch keinen taxonomischen Status haben (Faine et al. 1999). Derzeit sind mehr als 300 Serovare von *Leptospira* bekannt, von denen 60 saprophytisch sind (Picardeau 2017). Diese serologische Klassifizierung existiert neben einer neueren, molekularen Klassifizierung, die auf molekularen Methoden und phylogenetischer Verwandtschaft beruht. Diese Klassifizierung benennt 68 *Leptospira*-Arten (Parte et al. 2020, Vincent et al. 2019), welche in zwei Hauptkladen mit den Bezeichnungen „Pathogene—(P) und „Saprophyten—(S) und vier Unterkladen, nämlich P1 (früher als Pathogengruppe beschrieben), P2 (früher als Intermediärgruppe beschrieben), S1 (früher als Saprophytengruppe beschrieben) und S2 (neue Unterklade), unterteilt (Vincent et al. 2019) werden.

1.2 Epidemiologie

Die Leptospirose ist eine Zoonose, die, außer in der Polarregion, weltweit vorkommt (Ellis 2015). Die Krankheit ist in tropischen und subtropischen Regionen endemisch und die Inzidenz in Europa nimmt, wahrscheinlich aufgrund des globalen Wandels, einschließlich der Verstädterung, der veränderten Landnutzung, der globalen Erwärmung und der zunehmenden Häufigkeit extremer Wetterereignisse, zu (Dupouey et al. 2014, Semenza und Menne 2009). In Europa ist die Leptospirose saisonabhängig, wobei die meisten Fälle beim Menschen im

Sommer und im frühen Herbst gemeldet werden (Cappelleri, C., Heuss, L. T., & Schorn, R. 2014, Radl et al. 2011). Da die Krankheit asymptomatische oder milde Manifestationen aufweisen kann, wird die Zahl der Fälle höchstwahrscheinlich stark unterschätzt (Costa et al. 2015).

Viele Säugetiere können mit *Leptospira* infiziert werden und damit Überträger der Leptospirose sein (Barragan et al. 2016, Cosson et al. 2014, Dietrich et al. 2014). Nagetiere gelten als die wichtigsten Reservoirwirte (Bharti et al. 2003, Levett 2001). Mehrere Serovare weisen eine bevorzugte Assoziation mit bestimmten Wirten auf (Bharti et al. 2003, Levett 2001), die chronisch infiziert sein können, aber keine oder nur geringe Symptome zeigen (Sykes et al. 2022). Beispiele für Serovar-Wirt-Assoziationen sind Ratten mit den Serovaren Copenhagenii, Ballum und Icterohaemorrhagiae (Andersen-Ranberg et al. 2016), Schwein mit Pomona, Australis oder Tarassovi, Rind mit Hardjo, Pferd mit Bratislava, Hund mit Canicola und Fledermäuse mit Cynopteri (Bharti et al., 2003).

Der Erreger wird intermittierend über den Urin ausgeschieden und kann über direkten Kontakt mit dem Urin oder indirekt über die kontaminierte Umgebung (Ko et al. 2009), kontaminierte Lebensmittel oder verunreinigtes Wasser auf andere empfängliche Wirte, wie zum Beispiel Nutztiere und Menschen, übertragen werden (Faine et al. 1999). Eine weitere Übertragungsquelle ist der direkte Kontakt mit Abortmaterial, postpartalem Material und Vaginalausfluss eines infizierten Tieres (Ellis et al. 1985, Ellis, Songer et al. 1986).

Die Bakterien gelangen durch Hautläsionen oder über Schleimhäute in den Körper (Islam Aqib et al. 2019). Eine direkte Übertragung von Mensch-zu-Mensch kommt nur sehr selten vor (Haake und Levett 2015).

Im Wirten siedeln sich die Bakterien in erster Linie in den proximalen Tubuli der Nieren an (Lilenbaum und Martins 2014). Bei Rindern, Schafen, Ziegen und Pferden kann es zudem auch zu einer Kolonisation im Urogenitaltrakt kommen (Ellis, Cassells, Doyle 1986, Loureiro und Lilenbaum 2020, Maria Isabel Nogueira Di Azevedo und Walter Lilenbaum 2022, Silva et al. 2019). In der chronischen Phase werden *Leptospira* in der Regel vorübergehend oder über einen längeren Zeitraum, manchmal lebenslang, über den Urin ausgeschieden (Adugna 2016, Bharti et al. 2003, Levett 2001). *Leptospira*-Stämme sind in der Lage, in feuchter Erde und Süßwasser mehrere Wochen lang zu überleben (Andre-Fontaine et al. 2015, Casanovas-Massana et al. 2018). Starker Regen, Hochwasser und überlaufendes Kanalisationswasser

gelten daher als Risikofaktoren für Ausbrüche von Leptospirose (Ko et al. 1999, Radl et al. 2011, Trevejo et al. 1998). Gegen Trockenheit und niedrigen pH-Wert sind Leptospiren dahingegen sensibel (Picardeau 2013).

Bei Rindern können die Bakterien während der akuten Phase der Krankheit für einige Tage mit der Milch ausgeschieden werden, aber Pasteurierungsprozesse töten die Bakterien ab (Adugna 2016). Im Falle der genitalen Rinderleptospirose ist das Bakterium im Vaginalausfluss vorhanden, sodass eine vertikale Übertragung auf den Fötus möglich ist (Loureiro und Lilenbaum 2020). Mehrere Studien aus Südamerika erwähnen die „bovine genitale Leptospirose—(BGL) als eigenständige Krankheit. BGL weist eine andere Pathogenität und Symptomatik auf als die eher traditionell beschriebene bakterielle Nierenkolonisation, bei der Leptospiren den Genitaltrakt besiedeln und Fruchtbarkeitsstörungen verursachen (Loureiro und Lilenbaum 2020). Bei der BGL siedeln sich die Bakterien vorzugsweise im Uterus an und können dort über Proben vom Zervikovaginalschleim betroffener Kühe nachgewiesen werden (Loureiro und Lilenbaum 2020).

1.3 Leptospirose: eine zoonotische Krankheit

In Österreich handelt es sich bei der humanen Leptospirose um eine anzeigepflichtige Krankheit (Sarajlic 2020). Beim Menschen kann Leptospirose unterschiedliche Krankheitsbilder hervorrufen, die von subklinischen oder leichten grippeähnlichen Symptomen bis hin zu schweren Verläufen mit multiplen Organversagen reichen können (Evangelista und Coburn 2010). Es wird geschätzt, dass weltweit 1,03 Millionen Krankheitsfälle pro Jahr vorkommen (Costa et al. 2015).

Im Jahr 2020 wurden europaweit 565 Leptospirose-Fälle beim Menschen bestätigt. Mit 127 Fällen wies Frankreich die meisten Fälle auf, gefolgt von Deutschland mit 118 Fällen. Im Jahr 2020 waren die meisten erkrankten Personen in Europa zwischen 25 und 65 Jahre alt. Männer waren häufiger betroffen als Frauen (ECDC, 2020). Im Vergleich dazu gab es im Jahre 2019 1049 gemeldete Fälle in Europa (ECDC, 2019). Der große Unterschied in den Fallzahlen der beiden Jahre wurde auf die COVID-19 Pandemie im Jahre 2020 zurückgeführt. Man geht davon aus, dass in dieser Zeit aufgrund der Pandemie weniger Fälle gemeldet wurden (ECDC, 2022). Die Zahl der jährlichen Todesfälle beträgt ungefähr 60.000 weltweit (Costa et al.

2015). Aufgrund der Epidemiologie und der Risikofaktoren in Zusammenhang mit der Krankheit, zählen LandwirtInnen (Binti Daud et al. 2018, Waitkins 1986), VeterinärmedizinerInnen (Waitkins 1986), JägerInnen (Deutz et al. 2003), SchlachthofmitarbeiterInnen (Chan et al. 1987, Waitkins 1986) sowie FleischfacharbeiterInnen (Waitkins 1986) zu den Berufsgruppen mit erhöhtem Infektionsrisiko. In den letzten Jahren wurde aber auch die Exposition mit Wasser bei Freizeitaktivitäten als zunehmende Infektionsquelle beschrieben (Radl et al. 2011). Dazu zählen unter anderem Schwimmen in natürlichen Gewässern, Kanufahren und Wasserskifahren (Radl et al. 2011).

1.4 Rinderleptospirose: Klinische Anzeichen und beteiligte Serovare

Weltweit gelten Rinder als Erhaltungswirte für *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo (Typ Hardjobovis) und *Leptospira interrogans* serovar Hardjo (Typ Hardjoprajitno), die beide zur Serogruppe Sejroe gehören (Adler 2014, Ellis 1990, Ellis 2015).

Häufige Folgen für die betroffenen Tiere sind Fruchtbarkeitsprobleme, Totgeburten, verlängerte Intervalle zwischen den Kalbungen, lebensschwache Kälber (Lilenbaum und Martins 2014) und Aborte, insbesondere Spätaborte (Ellis 2015, Loureiro und Lilenbaum 2020). Auch eine Abnahme der Milchleistung wurde beschrieben (Grégoire et al. 2020). Aufgrund dieser Symptome ist eine Infektion mit dem Serovar Hardjo bei Rindern von besonderer ökonomischer Bedeutung (Grégoire et al. 2020).

Eine Infektion mit pathogenen *Leptospira* spp. kann bei Rindern auch zu Fieber, Anämie, Gelbsucht, Hämoglobinurie und petechialen Blutungen führen (Ellis 2015, Islam Aqib et al. 2019, Loureiro und Lilenbaum 2020). Diese schweren Formen, die mit dem Tod der Tiere enden können, kommen nur gelegentlich vor und werden meist durch Infektion mit "nicht angepassten" Rinderserovaren, d. h. anderen Serovaren als Hardjo ausgelöst (Loureiro und Lilenbaum 2020).

In vielen Fällen erweisen sich Rinder allerdings als asymptomatische Träger der Bakterien (Lilenbaum und Martins 2014, Suepaul et al. 2011). Trotzdem wird der Erreger oft intermittierend ausgeschieden und kann so die restliche Herde sowie die Umwelt, Menschen und andere Tiere infizieren (Vijayachari et al. 2008).

1.5 Methoden der Diagnose

Zur Diagnostik von Leptospiren im Labor kommen sowohl der direkte Erregernachweis (z. B. aus Urin-, Milch- oder Nierenproben) als auch der indirekte Erregernachweis mittels serologischer und molekularbiologischer Methoden zum Einsatz (Breu 2014). Im Speziellen werden folgende Verfahren häufig angewandt: Mikroagglutinationstest (MAT), ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), PCR (Polymerase Chain Reaktion) und die kulturelle Anzucht des Erregers (Levett 2001). Auf die beiden letzten Verfahren soll hier näher eingegangen werden, da diese für das LORN-Projekt von Relevanz sind.

1.5.1 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ist ein Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren mit hoher Sensitivität (Adler 2014). Das grundlegende Prinzip der PCR ist die Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte (Rassow et al. 2008). Um eine PCR zu starten, werden neben der Ausgangs-DNA, zwei künstliche hergestellte Startmoleküle, sogenannte Primer benötigt. Weiters werden Desoxyribonukleotide (dATP, dGTP, dCTP und dTTP) und hitzestabile DNA-Polymerasen benötigt. Folgende Reaktionsschritte eines Zyklus lassen sich unterscheiden: Zunächst erfolgt die Denaturierung der DNA. Dabei wird doppelsträngige DNA bei ca. 95°C in Einzelstränge aufgetrennt. Im nächsten Schritt, der als Annealing bezeichnet wird, werden die Primer zwischen 40°C und 70°C hybridisiert, sodass sie an die komplementäre Seite ihrer Einzelstränge binden können. Schließlich erfolgt die DNA-Synthese. Dabei verlängert die DNA-Polymerase bei ca. 70°C die Primer an deren 3'OH-Ende, sodass wieder doppelsträngige DNA entsteht. Die PCR-Zyklen bestehen immer aus denselben drei Arbeitsschritten und es müssen mindestens 20 Zyklen durchlaufen werden. Mittels Gel-Elektrophorese wird die vervielfältigte DNA anschließend nachgewiesen (Rassow et al. 2008). Als Ansatzpunkte für die Primer zum Nachweis von Leptospiren sind verschiedene Genabschnitte bekannt. Das lipL32 Gen kodiert z.B. für ein Oberflächenprotein pathogener Leptospiren (Pinne und Haake 2013). Ein weiteres Zielgen ist das lfb1 Gen, welches für ein Protein mit unbekannter Funktion kodiert (Merien et al. 2005). Es gibt auch PCR-Protokolle, welche eine Amplifikation der 16S-rRNA (Backstedt et al. 2015) und 23S-rRNA Gene vorsehen (D'Andrea et al. 2012).

1.5.2 Kultur

Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis von Leptospiren ist die kulturelle Anzucht des Erregers (Faine et al. 1999, Koizumi und Picardeau 2020). Diese Methode gestaltet sich oft schwierig, da sich *Leptospira* langsamer vermehrt als andere Bakterien, welche daher das Wachstum von *Leptospira* behindern können (Robert Koch-Institut 2015).

Die Kultur benötigt in der Regel einen längeren Zeitraum, bevor sie zu erkennbaren Ergebnissen führt (Picardeau 2013). Daher eignet sich die Kultur nicht für die Routinediagnostik, sondern eher für epidemiologische Zwecke (Adler und La Peña Moctezuma 2010). Während die Sensitivität sehr niedrig ist, liegt die Spezifität des Testverfahrens bei nahezu 100 % (Adler 2014).

1.6 Situation in Österreich

Im Jahre 2009 wurden 382 in Österreich lebende gesunde Männer im Rahmen einer Studie auf Antikörper gegen Leptospiren untersucht. Das Ergebnis war eine Seropositivität von 23 % (Poepl et al. 2013). Aus einer im Jahre 2011 durchgeführten Studie über den Nachweis von Zoonoseerregern bei oberösterreichischen TierärztInnen ging hervor, dass etwa ein Drittel der 69 untersuchten Veterinäre positiv auf Antikörper gegen Leptospiren waren (Stadler 2011). Im Jahr 2010 wurde in der Gemeinde Langau in Niederösterreich der erste österreichische Ausbruch einer Leptospirose-Erkrankung beim Menschen gemeldet. Nach der Teilnahme an einem Triathlon, dem ein starker Regentag voranging, erkrankten einige Personen nachweislich an Leptospirose (Radl et al. 2011). 2017 wurden in Österreich 68 humane Leptospirose-Fälle gemeldet (ECDC 2017). In diesem Jahr wurde in Niederösterreich ein starker Anstieg der humanen Leptospirose im Vergleich zu den Vorjahren verzeichnet (von null Fällen im Jahr 2015 und 2016 auf 20 Fälle im Jahr 2017) (Amt der Niederösterreichischen Landesregierung 2021). Im Jahr 2019 wurden 24 und im Jahr 2020 elf Fälle von humaner Leptospirose in ganz Österreich gemeldet (ECDC 2019, ECDC 2020).

Bislang wurde in Österreich kein einziger lokaler Stamm isoliert, was eine wichtige Wissenslücke darstellt, die das Verständnis der Biologie und Epidemiologie der Krankheit stark einschränkt. Darüber hinaus stützt sich der MAT in Österreich auf „fremde—Stämme, während die WHO die Verwendung lokal isolierter Stämme in der serologischen

Routinediagnostik empfiehlt, da dies die Sensitivität des Tests erhöht und somit die Erfassung einer größeren Anzahl seroreaktiver Menschen und Tiere ermöglicht (World Health Organization 2003).

Das Fehlen lokal isolierter Stämme schränkt den Fortschritt bei der Etablierung angemessener serodiagnostischer Verfahren, Kontroll- und Präventionsmaßnahmen bei Menschen und Tieren aus Österreich ein.

1.7 Rekrutierungsmethoden

Potenzielle StudienteilnehmerInnen zu rekrutieren, umfasst drei Phasen: Identifizierung, Kontaktaufnahme und die Einholung der Zustimmung der potenziellen TeilnehmerInnen (Preston et al., 2016).

Um möglichst viele Bakterien-Isolate zu gewinnen, eignet sich eine gezielte Probenahmestrategie (EFSA 2006). Bei der gezielten Beprobung werden sogenannte Hochrisikogruppen ausgewählt, welche vorab anhand von wissenschaftlicher Recherche spezifiziert werden (EFSA 2006, EFSA 2012 b).

Zur Akquirierung der StudienteilnehmerInnen gibt es verschiedene Verfahren. Zum Einsatz kommen Analysen von Datenbanken, die Verbreitung des Forschungsprojektes in den Medien, das Senden von Briefen, die telefonische Kontaktaufnahme und das Schreiben von E-Mails (Manohar et al. 2019). Von Bedeutung ist außerdem das Erstellen eines Flyers (Joseph et al. 2016). Flyer sind kostengünstig, können persönlich übergeben, per Mail verschickt oder auf Websites veröffentlicht werden (Joseph et al. 2016). Außerdem geben sie einen schnellen Überblick über das Projekt und die bildlichen Darstellungen der Inhalte erwecken die Aufmerksamkeit der TeilnehmerInnen (Joseph et al. 2016). Es kann sinnvoll sein, das Logo der für die Studie verantwortlichen Institution anzuführen, da dies die Glaubwürdigkeit der Studie fördern kann (Joseph et al. 2016).

Als umfangreiche Informationsquelle für Viehbestandserhebungen käme die Rinderdatenbank in Frage. Die Kennzeichnung und Registrierung von Rindern wird durch die Rinderkennzeichnungs-Verordnung 2008, BGBl. II Nr. 201/2008 geregelt. Die Registrierung erfolgt in der Rinderdatenbank, die in der Agrarmarkt Austria (AMA) geführt wird. Verbringungsdaten und Bestandsdaten von Rindern werden im VIS tagesaktuell übernommen. Allerdings schützt die Datenschutz-Grundverordnung der Europäischen Union

(DSGVO) personenbezogene Daten von Einzelpersonen. Folglich ist es nicht möglich, zu Forschungszwecken eine Liste der RinderzüchterInnen aus Niederösterreich und deren Kontaktdaten zu erhalten, ebenso wenig wie Informationen über landwirtschaftliche Betriebe und Viehbestände in Niederösterreich.

Voraussetzung für das Forschungsvorhaben ist daher die Beteiligung von Dritten am wissenschaftlichen Prozess. In der Literatur wird in diesem Zusammenhang der Begriff Citizen Science verwendet (Haklay 2012). Darunter versteht man die Einbeziehung von Nicht-WissenschaftlerInnen in ein wissenschaftliches Projekt (Haklay 2012). In der vorliegenden Studie kommen TierärztInnen, LandwirtInnen und SchlachthofmitarbeiterInnen in Frage, um bei der Datenerhebung zu helfen.

Die LandwirtInnen verfügen über die zu beprobenden Tiere. Studien weisen darauf hin, dass die Einbindung von Vertrauenspersonen der StudienteilnehmerInnen in die Etablierung eines Projekts zweckmäßig sein kann (Manohar et al. 2019). In der vorliegenden Arbeit sollen deshalb TierärztInnen angeworben werden, um potenzielle landwirtschaftliche Betriebe und Tiere zu identifizieren. Die TierärztInnen besitzen überdies wichtige Informationen bezüglich ihrer Betreuungsbetriebe.

Nach Akquirierung der StudienteilnehmerInnen hat die Verfolgung der Tiere vom landwirtschaftlichen Betrieb zum Schlachthof zu erfolgen. Die Etikettierungsverordnung der EU (Verordnung [EG] Nr. 1760/2000) sieht vor, dass jedes Rind ab dem Zeitpunkt der Geburt bis hin zur Vermarktung im Einzelhandel nachverfolgt werden kann. Die Ohrmarken eines Rindes entsprechen der amtlichen Kennzeichnung des Tieres, die für die gesamte Lebenszeit des Rindes dieselbe bleibt (Agrarmarkt Austria o. D.). Seit 2019 müssen Rinder sowohl über eine elektronische-, als auch eine konventionelle Ohrmarke verfügen. Die elektronische Marke muss am linken Ohr des Tieres angebracht werden (§ 4. Abs. 1. BGBl. II Nr. 174/2021). Sie wird mittels Zange in der Ohrmuschelmitte befestigt (Baumgartner 2009). Beide Ohrmarken setzen sich aus dem Ländercode, der sich in Österreich als „AT—darstellt, einem Code aus neun Zahlen und einem Strichcode zusammen (§ 4. Abs. 1. BGBl. II Nr. 174/2021). Der Ländercode bezieht sich auf das jeweilige Land, in dem das Tier zum ersten Mal gekennzeichnet wurde (Agrarmarkt Austria 2004).

Abbildung 1 stellt die Abfolge der Verfolgung des Rindes bis hin zur Beprobung der Nieren am Schlachthof dar. Zunächst werden die jeweiligen Rinder von ihrem Betrieb abgeholt oder

von den LandwirtInnen selbst zum Schlachthof gebracht. In dieser Zeit besitzt jedes Tier einen gültigen Viehverkehrsschein, der unter anderem die Ohrmarkennummer enthält. Diese Scheine müssen dann den SchlachthofmitarbeiterInnen vorgelegt werden. Anschließend werden die Tiere in das System des Schlachthofs eingetragen und erhalten demnach zusätzlich eine laufende Schlachtnummer, die am Computer beim Schlachtband abrufbar ist.

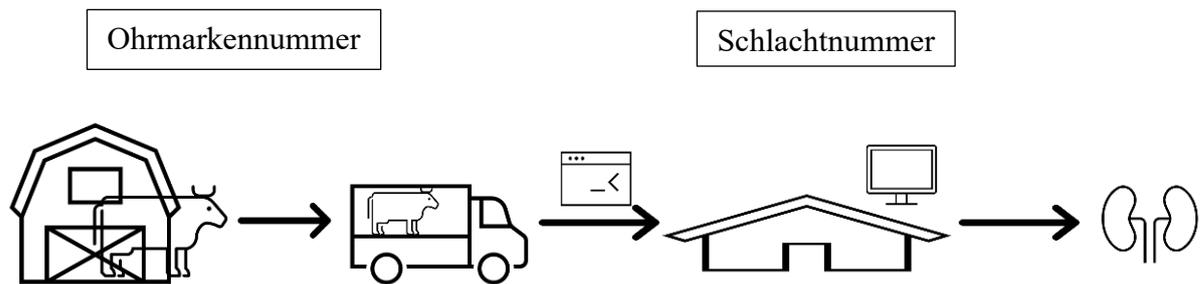


Abbildung 1: Schema Nachverfolgung Rind.

1.8 Das LORN-Projekt „in a nutshell“

1.8.1 Ziel

Das Projekt LORN (Leptospirose bei Rindern in Niederösterreich) zielt darauf ab, lokale *Leptospira*-Stämme von niederösterreichischen Rindern zu isolieren, um die Sensitivität und Spezifität der serologischen Diagnostik von Leptospirose in Österreich für Mensch und Tier zu optimieren. Zudem soll das Verständnis der Epidemiologie und des Auftretens dieser Zoonose in Niederösterreich gesteigert werden. Die Ergebnisse sollen eine Einschätzung der Gefährdung bestimmter Arbeitsgruppen, wie TierärztInnen im Schlachtbetrieb und am Hof, sowie LandwirtInnen und SchlachthofmitarbeiterInnen, liefern. Das Projekt LORN wird durch das Land Niederösterreich gefördert.

1.9 Forschungsfrage und zu lösendes spezifisches Problem

Zu den StudienteilnehmerInnen zählen in erster Linie TierärztInnen und TierhalterInnen sowie Schlachtbetriebe. Bisher gibt es keine einheitliche Strategie, um TierärztInnen und LandwirtInnen zu erreichen und in eine Forschungsstudie einzubeziehen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht darin, das Forschungsteam in folgenden Punkten zu unterstützen:

- (1) eine sinnvolle Strategie zur Rekrutierung von TierärztInnen und LandwirtInnen in Niederösterreich zu etablieren.
- (2) die Verfolgung der Tiere vom Herkunftsbetrieb bis hin zum Schlachthof zu optimieren, um gezielte Probenahmen durchführen zu können.
- (3) das Probenahmeprotokoll von Rindern im Schlachthof und im landwirtschaftlichen Betrieb umzusetzen und zu optimieren.

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt dabei auf der Ermittlung von Fehlern und Mängeln im Protokoll sowie auf der Entwicklung und Umsetzung von Lösungen.

2 Material und Methoden

2.1 Studienort

Die Studie wurde im Bundesland Niederösterreich, welches an Wien grenzt, durchgeführt. Es hat eine Fläche von 19.186 km² (Abbildung 2).

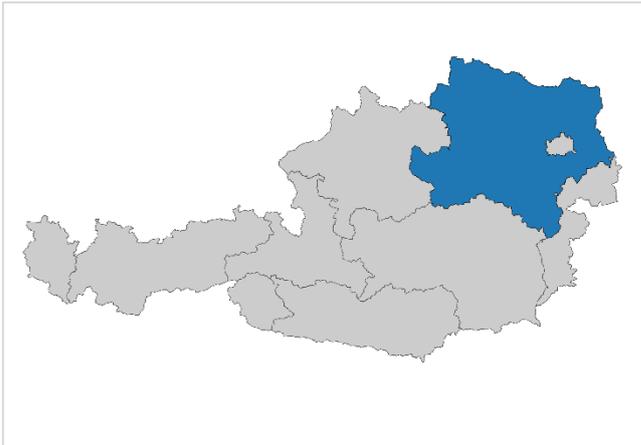


Abbildung 2: Karte von Österreich, Niederösterreich ist in blau dargestellt (Die Karte wurde mit QGIS v.3.4.15 erstellt. Diese Dateien wurden aus der GADM-Version 1.0 vom März 2009 extrahiert.).

Die landwirtschaftliche Situation in Niederösterreich stellt sich wie folgt dar: Im Jahr 2020 gab es in Österreich eine Gesamtzahl von 154.953 Land- und forstwirtschaftlichen Betrieben (Statistik Austria 2020a). Davon waren 37.453 Betriebe (24 %) in Niederösterreich (Statistik Austria 2020a).

Die Anzahl der landwirtschaftlichen Betriebe in Österreich, die Rinder hielten, betrug im Jahre 2020 54.800. Davon befanden sich 9.756 (17,8 %) Betriebe in Niederösterreich (Statistik Austria 2020a).

In Niederösterreich, sowie allgemein in Österreich, stellen Milchkuhbetriebe die dominierende Betriebsart dar. Im Jahre 2020 waren in Österreich von insgesamt 54.800 Betrieben, 25.972 als Milchkuhbetriebe klassifiziert, wovon 4.245 Betriebe auf Niederösterreich entfielen. Mutterkuhbetriebe gab es österreichweit 17.917, 2.300 gemischte kuhhaltende Betriebe und 8.611 sonstige rinderhaltende Betriebe (Statistik Austria 2020a).

Die österreichweite Gesamtzahl an Rindern betrug mit Dezember 2020 ca. 1,86 Millionen Rinder (Statistik Austria 2020a). Österreichweit wurden im Jahr 2020 644.651 Rinder geschlachtet; 23,4 % davon in Niederösterreich (Statistik Austria 2020b).

Mit Stichtatum Februar 2022 waren niederösterreichweit insgesamt 1.043 TierärztInnen tätig. Schätzungsweise praktizierten ungefähr 120 davon mit einer Spezialisierung auf Rinder (Niederösterreichische Tierärztekammer, persönliche Kommunikation, 22.08.2022) (Abbildung 3).

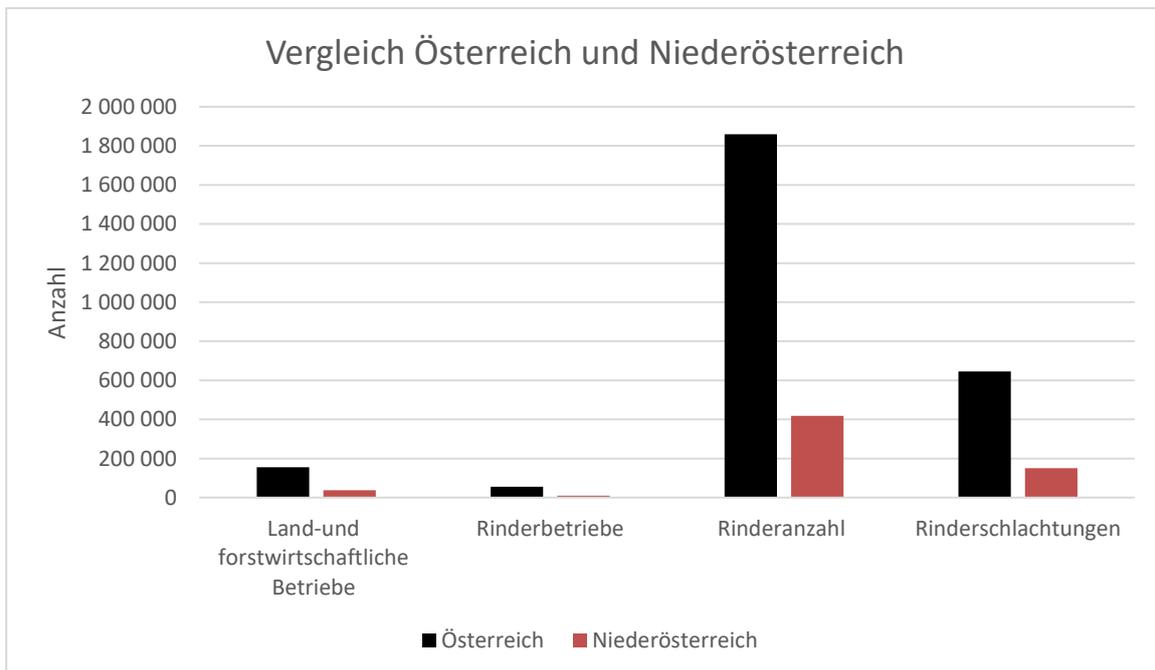


Abbildung 3: Situation der Rinderproduktion in Österreich und Niederösterreich.

2.2 Proben

Aufgrund des Nierentropismus von *Leptospira* spp. (Haake und Levett 2015, Vijayachari et al. 2008) konzentrierte sich die Probenentnahme auf Urin und Nierengewebe von Rindern aus Niederösterreich.

2.3 Statistischer Probenahmeplan

Eine über einen Zeitraum von 33 Monaten in Uruguay durchgeführte Studie (Zarantonelli et al. 2018), in der Rinder beprobt wurden, bei denen der Verdacht bestand, dass sie *Leptospira*-Träger sind, ergab eine Erfolgsrate von 3,3% für die *Leptospira*-Isolierung in Urinproben

symptomatischer Tiere, die in landwirtschaftlichen Betrieben beprobt wurden. Sie erzielten ferner eine Isolationserfolgsrate von 3% aus Nieren- oder Urinproben, die aus Schlachthöfen entnommen wurden.

Um 10 *Leptospira*-Stämme (Anzahl der Erfolge = 10) mit einer Erfolgswahrscheinlichkeit von 0,033 zu isolieren und in Kultur weiter zu erhalten, wurde eine negative Binomialverteilung, NB ($r = 10$, $p = 0,033$) verwendet, um den Bedarf abzuschätzen (Stichprobengröße). Die kumulative Dichtewahrscheinlichkeit, eine Anzahl von weniger als oder gleich 10 zu beobachten, zeigt, dass 410 Tiere beprobt werden müssen, um das Ziel von 10 erfolgreich isolierten Stämmen zu erreichen ($p = 0,8$) (Abbildung 4). Die Feldarbeit ist für einen Zeitraum von 11 Monaten geplant, was zu einer Anzahl von 37 Tieren führt, die pro Monat beprobt werden.

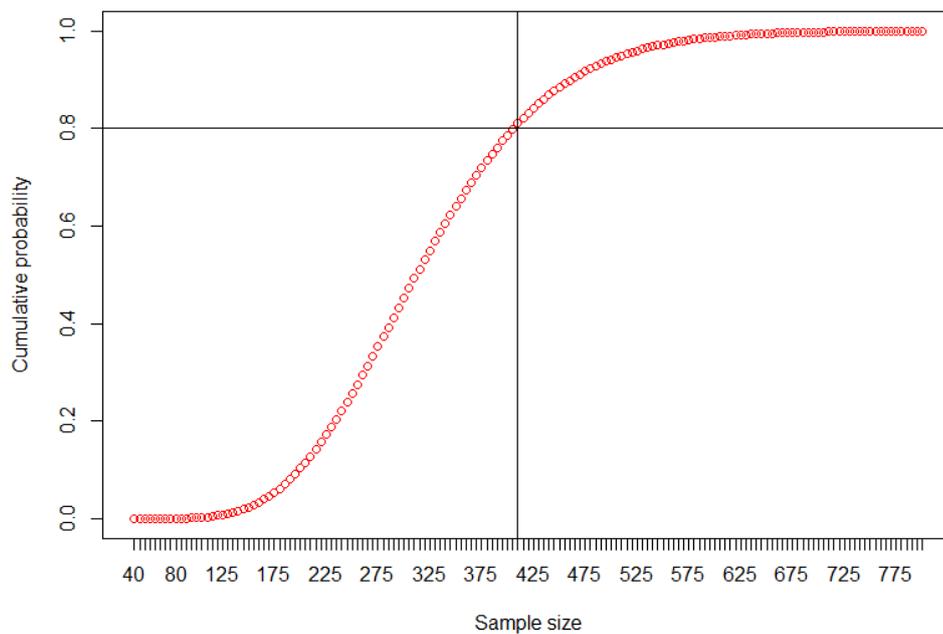


Abbildung 4: Komplementäre kumulative Verteilungsfunktion der negativen Binomialverteilung NB ($r = 10$, $p = 0,033$) (Wahrscheinlichkeit, dass die Variable X einen Wert kleiner oder gleich $r = 10$ annimmt).

2.4 Entwicklung des geplanten Protokolls

2.4.1 Feldarbeit

Es wurden zwei Protokolle festgelegt:

- Protokoll 1: Probenahme von Urin lebender Tiere mit Symptomen, die in der Literatur am häufigsten mit einer *Leptospira*-Infektion in Verbindung gebracht wurden. Diese Tiere wurden am Betrieb beprobt.
- Protokoll 2: Probenahme von Nierengewebe (und, wenn möglich Urin) von routinemäßig geschlachteten Rindern aus Niederösterreich, die (laut statistischer Analyse und Literaturrecherche) als besonders infektionsgefährdet galten. Von diesen klinisch gesunden Tieren wurden die Proben am Schlachthof entnommen.

Die geplante Feldarbeit, bestehend aus Betriebs- und Schlachthoffahrten, wurde für einen Zeitraum von 11 Monaten angesetzt (01.11.2021 bis 30.09.2022).

2.4.2 Kriterien für die Aufnahme von Tieren in die Studie

Um die Chance zu erhöhen, lokale *Leptospira*-Stämme zu isolieren, wurde eine gezielte Probenahmestrategie gewählt, d. h. die Probenahme sollte auf die Tiere und Herden mit dem höchsten Infektionsrisiko ausgerichtet sein. Daher wurde in der ersten Phase des Projekts eine systematische Literaturrecherche durchgeführt, um Risikofaktoren und Hauptsymptome der Leptospirose bei Rindern in Europa zu ermitteln (Sohm et al. 2023). Parallel dazu wurde von der AGES Graz eine statistische Analyse durchgeführt, bei der serologische Daten verwendet wurden (d. h. anonymisierte serologische Ergebnisse für jedes in der Routinepraxis von TierärztInnen getestete Tier; Datenquelle: Institut für veterinärmedizinische Untersuchungen Mödling, Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit, AGES) sowie Betriebs- und Viehbestandsdaten aus dem Verbrauchergesundheitsinformationssystem (VIS), um spezifische Risikofaktoren für eine Infektion bei österreichischen Rindern zu ermitteln. Die Ergebnisse aus beiden Ansätzen wurden kombiniert, um die am häufigsten gemeldeten klinischen Symptome und Risikofaktoren der Leptospirose bei europäischen Rindern zu charakterisieren, die dann als Einschlusskriterien für die Auswahl von Rindern formuliert wurden. Ausgewählt wurden:

- (1) Rinder aus Betrieben mit hohem *Leptospira*-Infektionsrisiko;

(2) Rinder mit Symptomen, die eine klinische oder subklinische Leptospirose-Infektion vermuten lassen.

2.4.2.1 Symptomatisches Tierprofil: Gezielte Probenahme in Betrieben (Protokoll 1)

Die Ergebnisse der systematischen Literaturrecherche zeigten unterschiedliche klinische Zeichen bei *Leptospira*-infizierten Kühen und wir haben die in der Literatur am häufigsten genannten ausgewählt. Unsere gezielte Probenahme konzentrierte sich daher auf ausgewachsene Kühe mit einem oder mehreren der folgenden Symptome, die den sechs am häufigsten berichteten, klinischen Anzeichen entsprachen (in der Reihenfolge ihrer Häufigkeit):

- Abort
- Schlechte Fruchtbarkeit
- Photosensibilisierung
- Abnahme der Milchleistung
- Hämaturie
- Ikterus

2.4.2.2 Betriebsprofil: gezielte Probenahme im Schlachthof (Protokoll 2)

Die Ergebnisse der statistischen Analyse und Systematischen Literaturrecherche zeigten, dass Betriebe mit folgendem Profil ein höheres *Leptospira*-Risiko aufwiesen (d. h. lokale Besonderheiten der Rinder in Österreich wurden berücksichtigt). Unser Ziel war es, Betriebe in Niederösterreich mit **mindestens zwei** der folgenden Kriterien in die Studie aufzunehmen:

- Betriebe, auf denen Tiere Zugang zu einer Weide haben;
- Betriebe mit Abortproblemen;
- Betriebe, die Tiere zukaufen;
- Betriebe mit großer Herdengröße (> 30 Rinder)¹

¹ Durchschnittliche Herdengröße in Österreich: 34 Rinder (Statistik Austria. Viehbestand https://www.statistik.at/fileadmin/publications/Rinderbestand_Juni_2021.pdf (2021)).

2.4.3 Rekrutierung der StudienteilnehmerInnen

Es wurde ein zweistufiges Rekrutierungsprotokoll eingeführt:

- (1) Es wurden TierärztInnen in Niederösterreich rekrutiert, die für die Identifizierung von Betrieben und Tieren zuständig waren, welche dem jeweiligen identifizierten Risikoprofil entsprachen.
- (2) Die niederösterreichischen LandwirtInnen wurden von ihren HoftierärztInnen informiert und bei Interesse vom LORN-Team in die Studie aufgenommen.

Eine enge Zusammenarbeit zwischen den ProjektpartnerInnen, d. h. den MitarbeiterInnen der Vetmeduni Vienna, der AGES (Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit) Mödling, den niederösterreichischen TierärztInnen und LandwirtInnen sowie den SchlachthofmitarbeiterInnen war erforderlich.

2.4.3.1 Aufbau eines Netzwerks von TierärztInnen

In den ersten Monaten des Projekts (Dezember 2021) wurde in der Zeitschrift Klautierpraxis mit einem Artikel über die Studie (Sohm et al. 2021) auf das Projekt aufmerksam gemacht. Weiters wurden Tierärzttagungen des Österreichischen Gewerkschaftsbundes (ÖGB) in Oberösterreich und der Steiermark besucht, bei denen das Projekt vor praktizierenden TierärztInnen vorgestellt wurde (3. und 4. November 2021). Ein Beitrag in einer TierärztInnen-Gruppe auf der Social-Media Plattform Facebook sollte zusätzlich auf LORN aufmerksam machen (2.11.2021). Die Klinik für Wiederkäuer der Vetmeduni schickte eine Informations-E-Mail an den Pool der mitarbeitenden TierärztInnen. Die Namen der in der Vergangenheit mit der Klinik für Wiederkäuer zusammenarbeitenden TierärztInnen wurde mit der Tierärzteliste der Tierärztekammer Österreich abgeglichen, um die praktizierenden TierärztInnen herauszufiltern. Die Kontaktdaten dieser TierärztInnen wurden aus öffentlich zugänglichen Webseiten herausgesucht und es erfolgte eine direkte Kontaktaufnahme mittels Emails und Telefonanrufen.

Um die Ausschöpfungsquote zu erhöhen, wurden außerdem zwei Arten von Flyern entworfen (Abbildung 5 und 6). Der Flyer für die TierärztInnen beschrieb die Kriterien, die ein landwirtschaftlicher Betrieb beziehungsweise dessen Tiere erfüllen mussten, um die Voraussetzungen für die Teilnahme an der Studie zu erfüllen (Abbildung 5).

Im Zeitraum von November bis Dezember 2021, welcher Phase 1 unseres Projektes darstellte, wurden 39 niederösterreichische TierärztInnen für die Studie kontaktiert. In diesem Zeitraum wurden 34 Anrufe getätigt und 26 Emails verschickt. Ein Tierarzt wurde auch persönlich über das Projekt informiert.

2.4.3.2 *Aufbau eines Netzwerks von TierbesitzerInnen*

Die teilnehmenden TierärztInnen stellten die Verbindung zwischen den LandwirtInnen, die sie für geeignet hielten, und dem Forschungsteam her. Die rekrutierten TierärztInnen kontaktierten das Forschungsteam und gaben erste Angaben zu den Daten von potenziell geeigneten Betrieben. Wenn die oben angeführten Voraussetzungen (siehe Überschrift 2.4.2.1.) für das Projekt erfüllt waren, stellten die TierärztInnen den Kontakt zwischen den LandwirtInnen und den MitarbeiterInnen des LORN-Projekts her. Die ProjektmitarbeiterInnen traten daraufhin mit den LandwirtInnen in Kontakt, erklärten das Projekt nochmals kurz, beantworteten mögliche offene Fragen und übermittelten einen Flyer, welcher der Informationsübermittlung über das Projekt allgemein diente und die Hauptsymptome, die eine Leptospirose-Infektion bei Rindern mit sich bringen kann, enthielt (Abbildung 6).

Wenn der Landwirt/die Landwirtin der Teilnahme am Projekt zustimmte, wurde ein Termin zur Unterzeichnung der Einwilligungserklärung vereinbart, wodurch der Betrieb in die Studie aufgenommen wurde. Die Einwilligung der LandwirtInnen war Voraussetzung für die Entnahme von Tierproben und die anschließende anonyme Veröffentlichung der Laborergebnisse in einer wissenschaftlichen Publikation. Dies galt sowohl für Proben von lebendigen Tieren als auch für Probenentnahmen von den Schlachtkörpern. Die LandwirtInnen wurden zudem vom Forschungsteam über den Ablauf der Untersuchung sowie mögliche Nebenwirkungen aufgeklärt.

Sobald die Einwilligung unterzeichnet war, erfolgte die weitere Kommunikation zwischen LandwirtInnen und Forschungsteam, um:

- (1) einen Termin zur Urinprobenentnahme symptomatischer Rinder am Hof zu vereinbaren und/oder
- (2) einen Termin zur Nierenprobenentnahme am Schlachthof zu vereinbaren.

vetmeduni vienna
vetfarm
AGES

LeptOspirose bei Rindern in Niederösterreich (LORN)

Ein gezielter Ansatz zur Verbesserung der Veterinärdiagnostik und zur Verhinderung einer beruflichen Exposition gegenüber Zoonosen

Algemeines Ziel des Projekts
 Ziel des LORN-Projekts ist die Vertiefung der epidemiologischen und klinischen Kenntnisse bezüglich Leptospirose in Niederösterreich. Das Projekt basiert auf der Durchführung der Leptospirose-Diagnostik bei symptomatischen Tieren oder bei Tieren mit Fertilitätsstörungen in ihrer Anamnese. Die Diagnostik erfolgt mittels PCR-Test und Kultivierung der aus Urinproben gewonnenen Bakterien in einem speziellen Medium.

Symptome und Auswirkungen von Leptospirose bei Rindern

- Die Rinderleptospirose ist primär eine Fortpflanzungskrankheit.
- Rinder werden durch kontaminierten Urin, Umgebung, Sperma oder Vaginaausfluss infiziert.
- Die Bakterien werden durch den Urin in der Umgebung verbreitet.
- Es gibt akute und schwere klinische Formen.
- Bei Kälbern kann die Krankheit zu seltenen sporadischen Ausbrüchen führen (Fieber, Gelbsucht, Hämoglobinurie, hohe Sterblichkeit).
- Bei ausgewachsenen Kühen verläuft die Erkrankung meist subklinisch, es treten jedoch Agalaktien ("akutes Milchverlust-Syndrom") und unspezifische Fertilitätsstörungen wie früher Embryonalverlust oder Östrusrezidive auf.

Partnerinstitutionen: VetFarm der Veterinärmedizinischen Universität Wien (VETMEDUNI), Institut für Veterinärmedizinische Untersuchungen – Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit (IVET AGES)

Wissenschaftliche Partner: Abteilung für Öffentliches Veterinärwesen und Epidemiologie (VETMEDUNI), Universitätsklinik für Wiederkäufer (VETMEDUNI), Fachbereich Integrative Risikobewertung, Daten und Statistik (AGES), Abteilung Biologie der Spirochäten, Institut Pasteur, Paris, Frankreich

Das LORN-Projekt setzt auf eine enge Zusammenarbeit von einem Netzwerk aus TierärztInnen, LandwirtInnen und Schlachthöfen in NÖ.

SIE VERMUTEN EINEN FALL VON LEPTOSPIROSE UND MÖCHTEN EINE SICHERE DIAGNOSE MITTELS PCR-TEST? RUFEN SIE UNS AN!

Wir kommen in Ihren Betrieb und nehmen Urinproben von den verdächtigen Tieren, um einen PCR-Test durchzuführen und die Bakterien zu kultivieren (zur Isolierung / für weitere Studien oder weitere Forschungszwecke).

Wir suchen Milch-, Zucht- und Mastrinder, weiblich und männlich, jedes Alter, jede Rasse!

Ein/e Projekt-TierärztIn wird einen Katheter verwenden, um sterilen Urin der verdächtigen Kuh/Kühe zu sammeln. Die Proben werden an das IVET-AGES-Labor geschickt. Die Ergebnisse werden dem/der Hof-TierärztIn direkt mitgeteilt.

KONTAKTE

Probenverwaltung
 Mag.med.vet Cynthia SOHM
 Handy: +43 699 10531267
cynthia.sohm@vetmeduni.ac.at

Labor IVET AGES
 Dr.med.vet Romana STEINPARZER
 Telefon: +43 50 555-38279
romana.steinparzer@ages.at

Fragen zum Projekt
 Ass.-Prof. Dr. Amélie DESVARIS-LARRIVE
 Telefon: +43 1 25077 3538 / amelie.desvars@vetmeduni.ac.at

ETHIK: Diese Forschung wurde von der Ethikkommission der VETMEDUNI unter der Nummer ETH-03/02/2021 genehmigt.

GEFÖRDERT DURCH: Land Niederösterreich.

Abbildung 5: Informationsflyer für TierärztInnen aus Niederösterreich (Version 1).

Das LORN-Projekt setzt auf eine enge Zusammenarbeit von einem Netzwerk aus TierärztInnen, LandwirtInnen und Schlachthöfen in NÖ.

LEPTOSPIROSE BEIM MENSCHEN

Leptospirose eine Vielzahl von Symptomen verursachen, darunter: hohes Fieber, Kopfschmerzen, Schüttelfrost, Muskelkater, Erbrechen, Gelbsucht (gelbe Haut und Augen), rote Augen, Bauchschmerzen, Durchfall, Hautausschlag. Viele dieser Symptome können mit anderen Krankheiten verwechselt werden. Darüber hinaus haben einige infizierte möglicherweise überhaupt keine Symptome. Studien zeigen ein erhöhtes Ansteckungsrisiko im Zusammenhang mit bestimmten Berufs- oder Freizeitaktivitäten (z. B. Jäger, Wassersport). Blutbefunde in Studien zeigen eine hohe Prävalenz von Antikörpern bei österreichischen JägerInnen und TierärztInnen, aber auch in der Allgemeinbevölkerung.

Sie möchten mehr über die Bakterien *Leptospira* / Leptospirose erfahren oder vermuten eine Infektion durch *Leptospira*? Im Verdachtsfall wenden Sie sich an Ihre/n TierärztIn!
 Ihre TierärztIn wird die Situation beurteilen und uns bei Bedarf kontaktieren.

Kontakt Probenverwaltung: Mag.med.vet Cynthia SOHM
 Handy: 0699 10531267 / cynthia.sohm@vetmeduni.ac.at

Fragen zum Projekt
 Ass.-Prof. Dr. Amélie DESVARIS-LARRIVE
amelie.desvars@vetmeduni.ac.at

Dr.med.vet. Clair FIRTH clair.firth@vetmeduni.ac.at

ETHIK: Diese Forschung wurde von der Ethikkommission der VETMEDUNI unter der Nummer ETH-03/02/2021 genehmigt.

GEFÖRDERT DURCH: Land Niederösterreich.

vetmeduni vienna
vetfarm
AGES

LeptOspirose bei Rindern in Niederösterreich (LORN)

Leptospirose: eine Bedrohung für Rinder und Landwirte

Die durch das Bakterium *Leptospira* spp. ausgelöste Infektionskrankheit wird als Leptospirose bezeichnet. Leptospirose – betrifft sowohl Mast- als auch Milchkühe

- Das Bakterium kann monatelang in feuchter Umgebung in der Umwelt überleben, bevor ein Tier infiziert wird.
- Es kann in stehendem Wasser eine lange Zeit überleben und kann durch Hochwasser über große Flächen verteilt werden.
- Rinder können bei einer Infektion die Bakterien über den Harn ausscheiden. Eine Ausscheidung kann auch lange Zeit nach der Erstinfektion noch bestehen.

Algemeines Ziel des Projekts

Unser Ziel ist es, Proben von infizierten Rindern im Stall und an Schlachthöfen in Niederösterreich zu sammeln, um regionale krankmachende *Leptospira*-Keime nachzuweisen. Mit diesem Projekt wollen wir das Wissen über Leptospirose in Niederösterreich vertiefen, indem wir diese Krankheit bei Tieren, welche für die Krankheit typische Symptome aufweisen. Dies geschieht mittels eines PCR-Tests und der Kultivierung der Bakterien aus Urinproben verdächtiger Kühe in einem speziellen Medium.

Typische Symptome der Leptospirose bei Rindern.

NIEREN: Leptospiren siedeln sich in den Nieren an und vermehren sich auch dort.

UTERUS: Die wichtigste Auswirkung hat eine Leptospirose-Infektion auf die Fruchtbarkeit: Sie senkt die Trächtigkeitsraten und erhöht die Abortrate. Der Abort erfolgt in der Regel 6-12 Wochen nach der Erstinfektion. In Herden, die sich zum ersten Mal mit der Krankheit anstecken, können bis zu 30 % der Tiere verwerfen. Bei chronisch infizierten Herden kann es zu einer Abortrate von bis zu 5 % kommen.

EUTER: Bei Rindern verursachen Leptospiren häufig einen Milchleistungsverlust, der mit Fieber und Mastitis einhergehen kann.

LOKALISIERTE INFektion IN SCHLÜSSELORGANEN: Harnausscheidung, Infektion

Abbildung 6: Informationsflyer für RinderhalterInnen aus Niederösterreich (Version 1).

2.4.3.3 Organisation der gezielten Probenahme im Schlachthof

Die Kontaktaufnahme mit den Schlachthöfen erfolgte über Telefonate und persönliche Gespräche mit den SchlachthofmanagerInnen. Die TierbesitzerInnen der für die Studie geeigneten Tiere teilten dem LORN-Team dabei zuvor mit, wo und wann sie ihre Rinder schlachten ließen. So konnte das Team mit diesen Schlachthöfen in Verbindung treten. Den ManagerInnen wurde der Sachverhalt des Projekts erklärt und gemeinsam mit ihnen wurde dann nach Möglichkeiten gesucht, wie man die Probennahme von einem bestimmten Tier durchführen und das zeitliche Management am besten umsetzen konnte.

Die Verordnung BGBl. II Nr. 23/2019 schreibt vor, dass Schlachtkörper am Schlachtbetrieb zusätzlich zur Ohrmarkennummer mit einer fortlaufenden Schlachtnummer markiert werden müssen (RIS - Schlachtkörper-Klassifizierungs-Verordnung 2018 - Bundesrecht konsolidiert, Fassung vom 08.07.2022, 08.07.2022). Jedes Viertel des Rinderschlachtkörpers muss die Nummer aufweisen. Daraus ergeben sich vier Stempel pro Tierkörper. Die Nummerierung startet monatlich mit dem ersten Schlachtkörper des Monats als Nummer „1—Durch diese Art der Kennzeichnung, ist die Identifizierung der Rinder zu jeder Zeit gegeben, beispielsweise auch bei eventuellem Verlust der Ohrmarken durch unabsichtliche Trennung des Ohres vom Schlachtkörper. Um die Lesbarkeit der Schlachtnummer durchgehend zu gewährleisten, wird sie an geeigneten erhabenen Stellen des Tierkörpers angebracht. So kann das Verwischen der Nummern durch Berührung mit anderen Schlachtkörpern verhindert werden. Außerdem muss bei der Platzierung darauf geachtet werden, dass der Stempel eines jeweiligen Viertels auch noch nach Abtrennung der Viertel lesbar ist. Am Hinterviertel ist diese Stelle zum Beispiel am sogenannten „Knöpfel—(Hinterextremität) und am Vorderviertel auf der Schulter des Rindes. Weiters werden die „Platte—(Bauchwand) und das „Englische—(Rücken) gestempelt (Agrarmarkt Austria 2004, Bauer und Smulders 2015). Der Stempel soll eine 3- oder 4-stellige Nummer in der Größe von mindestens 30 mm enthalten. Die beispielhafte Schlachtnummer 0143 kennzeichnet die 143. Schlachtung im Monat.

Vor jeder geplanten Schlachtung eines gezielt ausgewählten Tieres setzte das Team sich mit den SchlachthofmanagerInnen in Verbindung. Diese konnten dann die ungefähre Ankunftszeit der Tiere mitteilen. So wurde gewährleistet, dass das LORN-Team zur Zeit der Schlachtung vor Ort war und die entsprechenden Nieren, direkt nach der Schlachtung, sicherstellen konnte.

2.4.4 Zeit von Probenentnahme bis zum Labor

Nach der Entnahme wurden die Proben (Urin und Nieren) an die veterinärmedizinische Untersuchungsstelle der AGES in Mödling gebracht, um für die Kultur und PCR aufbereitet zu werden. Da es sich bei einigen *Leptospira*-Stämmen, insbesondere bei *L. borgpetersenii* serovar Hardjo, um anspruchsvoll wachsende Bakterien handelt, war das Risiko einer Kontamination der Kulturen durch andere Bakterien, die viel schneller wachsen als Leptospiren, hoch (Chideroli et al. 2017). In einer Arbeit von Zarantonelli und Kollegen zeigte sich, dass die Chance auf Isolierung sank, je mehr Zeit zwischen Probennahme und Inokulation im Medium verging (Zarantonelli et al. 2018). Daher war es entscheidend, die Probe so schnell wie möglich in das Kulturmedium zu überführen. Um die Chance auf eine Isolierung zu optimieren, wurde die maximale Zeit zwischen der Probenahme und dem Eintreffen im Labor auf 2 Stunden für Urin (Zarantonelli et al. 2018) und 6 Stunden für Nierenproben festgelegt (Prof. Walter Lilenbaum, persönliche Kommunikation, 29.06.2021). Diese zeitliche Beschränkung von der Probenahme bis zur Inokulation stellt eine wesentliche Herausforderung bei der Durchführung der Isolierung von *Leptospira* aus Feldproben dar.

2.4.5 Ethische Stellungnahme

Diese Studie folgte den institutionellen und nationalen Standards für die Pflege und Verwendung von Tieren in der Forschung. Sie wurde vom institutionellen Ethik- und Tierschutzausschuss der Veterinärmedizinischen Universität Wien, Österreich, in Übereinstimmung mit den Leitlinien für gute wissenschaftliche Praxis und den nationalen Rechtsvorschriften diskutiert und genehmigt (ETK-038/03/2021). Vor der Probenahme wurde die schriftliche Zustimmung der TierbesitzerInnen und der SchlachthofbetreiberInnen eingeholt.

Da die Studie die Erhebung von Daten über menschliche Probanden (z. B. Kontaktdaten), Tiere und landwirtschaftliche Praktiken erforderte, wurde sie der Ethikkommission der Medizinischen Universität Wien, Österreich, vorgelegt. Diese Ethikkommission entschied, dass eine offizielle Entscheidung über die vorliegende Studie in Übereinstimmung mit der geltenden österreichischen Gesetzgebung nicht erforderlich ist.

2.5 Umsetzung des geplanten Protokolls

2.5.1 Ablauf am landwirtschaftlichen Betrieb

Die Terminvereinbarung mit den LandwirtInnen erfolgte über Telefonanrufe.

Um die Organisation der Feldarbeit für die Urinprobenahme bei lebenden Tieren auf dem landwirtschaftlichen Betrieb zu optimieren, wurde eine Liste mit erforderlichen Materialien erstellt, darunter: Einwilligungserklärung für die TierbesitzerInnen, Fragebogen über die zu beprobenden Tiere und den Betrieb, Probenbegleitscheine, Überziehschuhe, Einwegoverall, FFP2-Maske (die Feldarbeit wurde während der COVID-19-Pandemie durchgeführt), Fieberthermometer, sterile Harnkatheter, Handschuhe, Rektalhandschuhe, Urinprobenbecher, ein Eimer, Papiertücher und Seife zum gründlichen Reinigen der Rinder, antibakterielle Seife zur Händewaschung, Desinfektionsmittel und eine Styroporbox zum Transportieren der Proben. Die TierbesitzerInnen wurden lediglich gebeten warmes Wasser und ihre Unterstützung beim Handling der Tiere zur Verfügung zu stellen.

Im landwirtschaftlichen Betrieb wurden Informationen über den Gesundheitszustand der/des zu beprobenden Tiere/s gesammelt. Dabei interessierten insbesondere Details bezüglich der letzten Zyklen und Trächtigkeiten.

Im Betrieb wurde ein strenges Biosicherheitsprotokoll eingehalten (z. B. Verwendung von betriebsspezifischer persönlicher Schutzausrüstung). Die Schutzkleidung umfasste einen Einwegoverall, Gummistiefeln inklusive Überziehschuhe, Handschuhe und eine FFP-2-Maske.

Damit sollte einerseits der Eintrag von Krankheitserregern in die Betriebe und somit die Gefährdung der Tiere verhindert werden, andererseits die LandwirtInnen vor einer möglichen Ansteckung mit COVID-19 geschützt werden.

Für jeden Betrieb und jedes Tier wurden Daten gesammelt, die später helfen sollten, Risikofaktoren für Leptospirose bei österreichischen Rindern zu ermitteln. Die vor Ort erhobenen Daten wurden später in eine spezielle Datenbank eingegeben.

Vor der Entnahme der Probe wurde die innere Körpertemperatur der Rinder gemessen, das Allgemeinverhalten bewertet sowie ihre Lidbindehäute untersucht.

Das Team, bestehend aus zwei Personen, teilte sich die Arbeit für die Probenentnahme auf. Eine Person bereitete das Tier durch gründliches Reinigen mit Jodlösung und Wasser vor. Die andere Person führte ein chirurgisches Händewaschen und Desinfizieren durch, um ein möglichst steriles Arbeiten zu gewährleisten. Dann wurde der Harnkatheter steril aus der Verpackung entnommen, in die Harnblase eingeführt und die Urinprobe mit dem Probenbehälter aufgefangen.

2.5.2 Ablauf am Schlachthof

TierbesitzerInnen mit Tieren aus Betrieben, bei denen ein hohes Risiko für eine *Leptospira*-Infektion festgestellt wurde, wurden gebeten, sich mit dem Forschungsteam in Verbindung zu setzen, wenn die Tiere zum Schlachthof gebracht wurden, und folgendes mitzuteilen:

- die Ohrmarkennummern der Tiere,
- den Tag der Schlachtung,
- den Namen des Transportunternehmens, wenn das Tier bzw. die Tiere nicht von dem Tierbesitzer/der Tierbesitzerin selbst transportiert wurden.

Diese Informationen waren für die Identifizierung des Tieres/der Tiere am Schlachthof unerlässlich. In der Regel wurden diese Informationen per WhatsApp-Nachricht oder per Telefonanruf übermittelt.

Für die Probeentnahme wurden folgende Utensilien vorbereitet und mitgenommen: Alkohol, steriles Wasser, Einmalspritzen, Kanülen, Skalpell, Probenbecher mit Deckel, Styroporbox zum Transportieren und Handschuhe. Die beiden anwesenden Personen des LORN-Teams, die für die Probennahme zuständig waren, bekleideten sich mit selbst mitgebrachter Schutzkleidung. Darunter weiße Stiefel, ein Einwegoverall, FFP2-Masken, Überziehschuhe und Handschuhe.

Am Schlachthof meldete sich das LORN-Team zunächst bei den MitarbeiterInnen des Schlachthofbüros an, bevor es sich in einem speziellen Raum umzog. Beim Betreten des

Schlachtbereichs wurden die Biosicherheitsmaßnahmen beachtet (insbesondere das Tragen von persönlicher Schutzausrüstung).

Die TierärztInnen der Schlachthöfe unterstützten das Team bei seiner Arbeit, indem sie mittels Computer bei der Identifizierung der gesuchten Ohrmarken- und der zugehörigen Schlachtnummern der entsprechenden Rinder halfen. Mithilfe der Schlacht- und der Ohrmarkennummern konnte der Tierkörper am Schlachtband identifiziert werden. Kurz bevor die gewünschten Tierkörper bei diesen MitarbeiterInnen ankamen, wurde ihnen mitgeteilt, dass eine Niere benötigt wird.

Die Niere wurde dann von den SchlachthofmitarbeiterInnen an das LORN-Team übergeben, welches diese dann in mit der Ohrmarkennummer beschrifteten Plastiktüten sammelten. Danach konnte die Probennahme in einem meist von den TierärztInnen bereitgestellten Raum stattfinden. Als Unterlage für die Nieren wurden Plastiksäcke verwendet. Zuerst wurden makroskopisch erkennbare Auffälligkeiten der Nieren notiert. Dann wurden diese mit Alkohol und sterilem Wasser abgespült. Mithilfe einer Skalpellklinge wurde aus dem Nierengewebe eine Probe gewonnen, die Gewebe aus der Nierenrinde und dem Nierenmark enthielt. Diese Stelle wurde gewählt, da die Leptospiren meistens in den Nierentubuli sitzen (Levett 2001). Aus jeder Niere wurden ca. 1x1 cm große Stücke an jeweils zwei verschiedenen Stellen herausgeschnitten und anschließend in ein beschriftetes Probenröhrchen verbracht. Dieses wurde verschlossen und für den anschließenden Transport zusammen mit den anderen Röhrchen in eine Styroporbox gelegt.

3 Erste Ergebnisse (November – Dezember 2021)

3.1 Rekrutierung der StudienteilnehmerInnen

3.1.1 TierärztInnen

Tabelle 1 zeigt die Anzahl an kontaktierten TierärztInnen im Zeitraum von November bis Dezember 2021 und ihre Rückmeldungen. Von den insgesamt 39 TierärztInnen haben in dieser Zeit vier landwirtschaftliche Betriebe übermittelt.

Tabelle 1: Kontaktierte TierärztInnen Nov-Dez. 2021 (Phase 1) und Teilnahmequote.

Methode	Kontaktiert	Positive Rückmeldung	Absage	Keine Rückmeldung/nicht erreicht	Positive Rückmeldungen in %
Telefon + E-Mail mit Flyer	20	7	6	7	35
nur Telefon	8	1	6	1	12,5
nur E-Mail	6	-	1	5	0
Tagungen	2	2	-	-	100
persönlich	1	1	-	-	100
Facebook	2	2	-	-	100

Unsere Erfahrungen zeigten, dass die direkte telefonische Kontaktaufnahme mit den HoftierärztInnen die geeignetste Methode war, um passende Betriebe zu rekrutieren. Nach telefonischer Absprache wurden den interessierten TierärztInnen zusätzlich Emails mit Flyern zugesandt. Zudem wurden bei einigen TierärztInnen Erinnerungsanrufe getätigt.

3.1.2 TierbesitzerInnen

Im Zeitraum November bis Dezember haben, durch Mithilfe rekrutierter niederösterreichischer TierärztInnen, sieben LandwirtInnen die Datenschutzerklärung des LORN-Projekts unterzeichnet und nahmen damit offiziell an der Studie teil. An drei Betrieben konnten im genannten Zeitraum Proben gewonnen werden.

3.2 Probenanzahl

In den ersten beiden Monaten der Probennahme konnten Proben von vier Rindern entnommen werden, wohingegen das Ziel 37 Proben pro Monat waren (um unser Ziel von 410 beprobten Rindern bis zum Ende des Feldarbeitszeitraums zu erreichen). Bei zwei dieser Proben handelte es sich um Urinproben von Kühen eines landwirtschaftlichen Betriebes. Die anderen beiden waren Nierenproben von Rindern, die am Schlachthof gewonnen wurden.

Aufgrund der geringen Teilnahme an TierärztInnen wurden folglich nur wenige LandwirtInnen in die Studie aufgenommen und dementsprechend konnte nur eine geringe Probenanzahl generiert werden. Daraufhin wurde nach Lösungen und neuen Strategien gesucht.

3.3 Identifizierung der Projektbedürfnisse und – beschränkungen

3.3.1 Beschränkungen im Zusammenhang mit der Projektkonzeption

Im Laufe der ersten zwei Monate konnten einige Kommunikationsschwierigkeiten identifiziert werden: Eine ausführliche Erklärung der Studie über Telefonanrufe erwies sich oftmals als kontraproduktiv, da viele TierärztInnen während ihres stressigen Alltags kontaktiert werden mussten. Ebenfalls erhielt das LORN-Team Zurückweisungen nach dem Erwähnen der Vetmeduni Wien.

In der Regel reichte ein Anruf nicht aus, sondern es waren einige Erinnerungen notwendig.

Anhand der Telefonate, sowie späteren persönlichen Gesprächen stellte sich heraus, dass die Verständlichkeit der erstellten Flyer nicht optimal war. Die Trennung der beiden dort genannten, voneinander unabhängigen Protokolle, wurde in vielen Fällen nicht verstanden. Als Hauptsymptom wurde ausschließlich Abort angesehen, die anderen Symptome wurden meist nicht beachtet. Von manchen TierärztInnen wurde außerdem angenommen, dass alle Kriterien am Betrieb vorliegen müssen, um in die Studie eingeschlossen zu werden. Tatsächlich wäre es ausreichend gewesen, dass eines der Symptome beim Tier vorhanden ist und mindestens zwei Punkte der Kriterien für die Betriebe erfüllt sind, aber nicht alle am Flyer erwähnten Kriterien.

Die Organisation der gezielten Probennahmen (Targeted Sampling) am Schlachthof gestaltete sich als äußerst schwierig und langwierig. Dieser Vorgang setzte die Zusammenarbeit folgender AkteurInnen voraus:

1. Die Rekrutierung der TierärztInnen war der erste essenzielle Schritt, um LandwirtInnen in die Studie aufzunehmen.
2. Eine Kontaktaufnahme mit dem Forschungsteam durch die LandwirtInnen war danach eine wichtige Voraussetzung. Die meisten LandwirtInnen transportieren ihre Tiere mit Hilfe der
3. ViehhändlerInnen (beispielsweise der österreichischen Rinderbörse) zum Schlachtbetrieb. Viele Abholungen wurden den LandwirtInnen erst am Vorabend der Schlachtung mitgeteilt. Diese Tatsache setzte eine entsprechende Spontanität der
4. Projekt-MitarbeiterInnen seitens der Feldarbeit sowie der
5. LabormitarbeiterInnen voraus.
6. Für die Planung der ungefähren Probenentnahmezeit am Schlachthof mussten die SchlachthofmanagerInnen, die in ständigem Austausch mit den ViehhändlerInnen standen, immer miteinbezogen werden.

Die eigenständige Kontaktaufnahme mit den ViehhändlerInnen, stellte sich teilweise als hilfreich dar. Diese konnten bei Ankunft am Schlachthof, dem dortigen Personal melden, dass sie bestimmte Tiere für die Probenentnahme des LORN-Projekts anliefern. Obwohl dem Projektteam ungefähre Uhrzeiten für das Eintreffen am Schlachthof mitgeteilt wurden, konnten diese nicht immer eingehalten werden (z. B. aufgrund schlechter Witterungsverhältnisse oder erhöhtem Verkehrsaufkommen), weshalb einige Probennahmen mit längeren Wartezeiten am Schlachthof verbunden waren. Aufgrund der guten Kommunikation zwischen den oben genannten AkteurInnen konnte jedoch sichergestellt werden, dass keine der ausgewählten Rinder verpasst wurden.

3.3.2 Beschränkungen in Zusammenhang mit der COVID-19-Pandemie

Zur Zeit des Probeentnahmebeginns, stellte COVID-19 eine weitere Einschränkung dar. Am 22.11.2021 trat ein landesweiter Lockdown in Kraft. Eine Sondergenehmigung für weitere Probefahrten während des Lockdowns musste angefordert werden. Auf die positive

Bestätigung musste einige Tage gewartet werden. Krankheitsfälle in Verbindung mit Quarantäne resultierten in Terminabsagen oder Terminverschiebungen. Hinsichtlich der Verbreitung des Virus stellte das Forschungsteam auf freiwilliger Basis sicher stets frisch PCR getestet bei den vereinbarten Terminen zu erscheinen. Dies diente dem Selbstschutz, aber insbesondere der Vermeidung einer Einschleppung von COVID-19 in die landwirtschaftlichen Betriebe und Schlachthöfe.

4 Vorgeschlagene Lösungen für das Projekt

4.1 Kommunikationsstrategie

Um die Anzahl an teilnehmenden TierärztInnen zu erhöhen, wurde versucht die Kommunikationsstrategie bei Telefonaten zu verbessern. Das Forschungsteam war sich einig, die Telefonate in Zukunft auf die wichtigsten Informationen der LORN-Studie zu beschränken. Außerdem sollte betont werden, dass die TierärztInnen nur passende Tiere und Betriebe übermitteln müssen und sonst kein weiterer Arbeitsaufwand für sie bestand. Die Bitte an der Teilnahme als persönliches Anliegen aufgrund der eigenen Abschlussarbeit resultierte oftmals in positiveren Rückmeldungen als nach dem Erwähnen der Vetmeduni Wien. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Festlegung einer kurzen und klaren Ansprache die Kommunikation mit den TierärztInnen positiv beeinflusst hat.

Eine Änderung des Flyers stellte einen weiteren wichtigen Schritt dar, um die Kommunikation zu verbessern:

- am wichtigsten war es, eine Trennung zwischen der Beprobung am landwirtschaftlichen Betrieb und am Schlachthof zu verdeutlichen.
- verdeutlicht werden musste auch die Tatsache, dass für jene Tiere, deren Nieren am Schlachthof beprobt werden sollten, nur zwei der gelisteten Kriterien (Zugang zur Weide, Zukauf, > 30 Rinder, Abortprobleme) zutreffen mussten, egal ob diese Tiere akut symptomatisch waren oder nicht.
- im Gegensatz dazu spielten diese vier Kriterien bei der Beprobung von symptomatischen Tieren am landwirtschaftlichen Betrieb keine Rolle. Bei diesen war eines der sechs am Flyer gelisteten Symptome (Abort, schlechte Fruchtbarkeit,

Photosensibilisierung, Abnahme der Milchleistung, Hämaturie, Ikterus) ausreichend für die Teilnahme.

- die Betriebsart war nicht von Bedeutung. Sowohl Milch,- Mast,- als auch Mutterkuhbetriebe wurden in die Studie aufgenommen.

Dahingehend wurden die Flugblätter für die TierärztInnen überarbeitet. Abbildung 7 zeigt, dass die Trennung der beiden Protokolle ersichtlicher gestaltet wurde, indem man diese in zwei separate Flyer und damit zwei Studien teilte. Studie 1 beschreibt die Kriterien, die ein Betrieb für die Untersuchung von Nierenproben routinemäßig geschlachteter Tiere erfüllen sollte. Studie 2 erklärt die Bedingungen, die für die Untersuchung von Harnproben symptomatischer Tiere gelten sollten.

LEPTOSPIROSE BEI RINDERN IN NIEDERÖSTERREICH (LORN)

PARTNERINSTITUTIONEN

- VetFarm der Veterinärmedizinischen Universität Wien (VETMEDUNI)
- Institut für Veterinärmedizinische Untersuchungen – Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit (IVET AGES)

WISSENSCHAFTLICHE PARTNER

- Abteilung für Öffentliches Veterinärwesen und Epidemiologie (VETMEDUNI)
- Universitätsklinik für Wiederkäuer (VETMEDUNI)
- Fachbereich Integrative Risikobewertung, Daten und Statistik (AGES)
- Abteilung Biologie der Spirochäten, Institut Pasteur, Paris, Frankreich

Studie 1:
Untersuchung von Nierenproben von routinemäßig geschlachteten Rindern aus Niederösterreich

Auswahl der Betriebe:
Unsere Probenahme zielt auf Betriebe mit dem höchsten Risiko für eine *Leptospira*-Infektion ab. Hierfür wurde ein Profil für die Betriebe erstellt, von denen wir Rinder beproben wollen:

- Betrieb ist in Niederösterreich
- Egal welche Art von Betrieb (Milch-, Mastbetrieb oder Mutterkuhhaltung)
- Mindestens 2 der folgenden Punkte treffen zu:
 - Betrieb hat ≥ 30 Rinder im Betrieb
 - Die Tiere haben Zugang zu einer Weide
 - Es werden Tiere zugekauft
 - Betrieb hat Abortprobleme

Sollten Sie einen Betrieb haben, auf den diese Punkte zutreffen, melden Sie sich bitte bei uns.

Probenverwaltung
Mag.med.vet Cynthia SOHM
Handy: +43 1 25077 5231
cynthia.sohm@vetmeduni.ac.at

Labor IVET AGES
Dr.med.vet Romana STEINPARZER
Telefon: +43 50 555-38279
romana.steinparzer@ages.at

Fragen zum Projekt
Ass.-Prof. Dr. Amélie DESVARS-LARRIVE
Telefon: +43 1 25077 3538 / amelie.desvars@vetmeduni.ac.at

LEPTOSPIROSE BEI RINDERN IN NIEDERÖSTERREICH (LORN)

Studie 2:
Untersuchung von Harnproben von symptomatischen Rindern aus Niederösterreich

Auswahl der Tiere:
Unsere Probenahme zielt auf Tiere mit dem höchsten Risiko für eine *Leptospira*-Infektion ab. Um dies zu erreichen, werden Rinder von niederösterreichischen Betrieben mit mindestens einem der folgenden Symptome beprobt:

- Abort
- Schlechte Fruchtbarkeit
- Photosensibilisierung
- Abnahme der Milchleistung
- Hämaturie
- Ikterus

Sollten Sie einen oder mehrere Patienten haben, auf den/die einer oder mehrere Punkte zutreffen, melden Sie sich bitte bei uns.

Probenverwaltung
Mag.med.vet Cynthia SOHM
Handy: +43 1 25077 5231
cynthia.sohm@vetmeduni.ac.at

Labor IVET AGES
Dr.med.vet Romana STEINPARZER
Telefon: +43 50 555-38279
romana.steinparzer@ages.at

Fragen zum Projekt
Ass.-Prof. Dr. Amélie DESVARS-LARRIVE
Telefon: +43 1 25077 3538 / amelie.desvars@vetmeduni.ac.at

GEFÖRDERT DURCH
Land Niederösterreich.

WISSENSCHAFTLICHE FORSCHUNG
NIEDERÖSTERREICH

Abbildung 7: Neue Informationsflyer für TierärztInnen in Niederösterreich.

4.2 Neue Probenahmestrategie und Einschränkungen

Die gezielten Probenahmen am landwirtschaftlichen Betrieb und am Schlachthof haben sich aufgrund einer geringen Anzahl von beprobten Tieren (Protokoll 1) und rekrutierten Betrieben (Protokoll 2) nicht bewährt, um die geplante Zahl an Proben zu erreichen. Die gezielte Probenahme auf der Grundlage von Symptomen und Risikofaktoren in einem Gebiet, in dem die Leptospirose vermutlich nicht zirkuliert, war möglicherweise nicht optimal: Die Symptome wurden häufig auf andere Erkrankungen zurückgeführt.

Es wurde deshalb eine Semi-Targeted-Sampling Strategie vorgeschlagen, da sie den Stichprobenumfang schnell erhöhen konnte und auch das Verwaltungsverfahren vereinfachte, da nur die Zustimmung des Schlachthofs erforderlich war. Der Nachteil dabei war, dass die Rinder aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht mehr zum Herkunftsbetrieb zurückverfolgt werden konnten, da das LORN-Team keinen Zugriff auf personenbezogene Daten hatte. Damit konnten potenziell wichtige Informationen der Risikofaktoren nicht erhoben werden. Um die Wahrscheinlichkeit, Leptospiren nachzuweisen trotzdem zu erhöhen, sollten studieninternen Auswahlkriterien für die zu beprobenden Tiere festgelegt werden. Für die Auswahl dieser Rinder wurden am Schlachthof verfügbare Tierdaten (z. B. Alter, Geschlecht) verwendet.

Somit wurde Anfang Jänner 2022 eine Änderung des Protokolls für eine Implementierung einer Semi-Targeted-Sampling Strategie beantragt, um zumindest einige wenige tierbezogene Daten erheben zu können. Dabei wurde eine Änderungsmitteilung an die Ethikkommission der Vetmeduni Wien erteilt. Diese wurde am 20.1.2022 genehmigt. Dieser Zeitpunkt markiert den Start der Phase 2 des Projekts.

4.3 Entwicklung und Umsetzung einer Semi-Targeted-Sampling Strategie

4.3.1 Rekrutierung von Schlachthöfen

Die Kontaktaufnahme mit den SchlachthofmanagerInnen erfolgte mittels Telefonanrufe. Die Bereitschaft zur Kooperation gestaltete sich von Betrieb zu Betrieb sehr unterschiedlich. Insgesamt konnten fünf Schlachthöfe in die Studie aufgenommen werden. Davon handelte es sich bei einem um einen Landwirt mit eigener Hofschlachtung.

4.3.2 Auswahl der Tiere am Schlachthof

Die Organisation einer Semi-Targeted-Sampling Strategie am Schlachtbetrieb erwies sich als einfacher umsetzbar als die gezielte Probennahme (Targeted Sampling). Da nur ältere Tiere auf BSE (Bovine spongiforme Enzephalopathie) getestet werden, hatte sich das Forschungsteam überlegt, dass unter jenen Rindern, die auf BSE getestet werden auch mehr *Leptospira*-Träger sein könnten.

Abbildung 8 beschreibt diesen Plan: für jedes Tier wollte das Forschungsteam (i) Informationen über den Bovine spongiforme Enzephalopathie-Test (BSE-Test) (als Ersatz für das Alter, da nur ältere Tiere auf BSE getestet werden); (ii) Informationen über die Haltungspraktiken, zum Beispiel Zugang zu Weideland und die Größe der Herde (da TierbetreuerInnen oder SchlachthofleiterInnen oft über die Betriebe Bescheid wissen, von denen Tiere geliefert werden) sammeln. Zusätzlich erhoffte das Team sich dann, bei den jeweiligen Tieren Informationen bezüglich ihrer Herkunft vom Viehverkehrsschein des zugehörigen landwirtschaftlichen Betriebs zu generieren, da dort zumindest Biobetriebe vermerkt werden, was zum Beispiel einen Weidezugang für die Rinder voraussetzen würde (Abbildung 8).

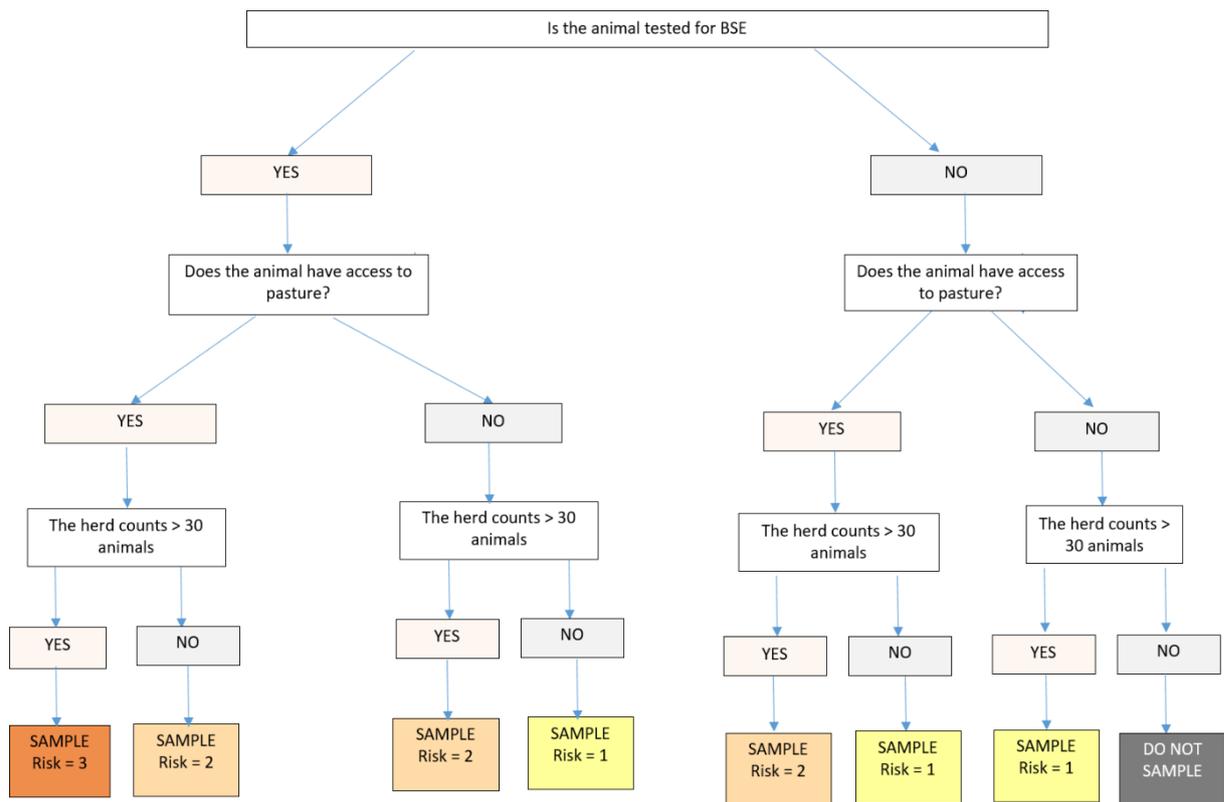


Abbildung 8: Theoretische Strategie zur Umsetzung einer halb-gezielten Probenahme in Schlachthöfen für das LORN-Projekt.

Nach Besprechung mit den SchlachthofmanagerInnen erwies sich diese Strategie als nicht beziehungsweise nur sehr schwer umsetzbar. Tatsächlich werden heutzutage nur noch verdächtige Rinder, sowie notgeschlachtete Tiere, die über 24 Monate alt sind, einer BSE-Probe unterzogen. In einem Schlachtbetrieb mit ungefähr 36.000 Schlachtungen pro Jahr waren das zum Beispiel im Jahre 2021 nur 33 Proben (Dr. Franz Strobel, persönliche Kommunikation, 29.11.2022). Daher wurde der Ansatz, BSE-Testungen als Auswahlkriterium heranzuziehen, alsbald verworfen. Außerdem bekommt der Schlachthof betriebsbezogene Daten der LandwirtInnen nicht automatisch übermittelt. Insbesondere die Herdengröße hätte mittels zusätzlicher Fragebögen oder telefonischen Kontaktaufnahmen mit den LandwirtInnen erfolgen müssen. Aufgrund der DSGVO war eine derartige Rückverfolgung aber nicht möglich. Deshalb wurde diese theoretische Strategie zur Umsetzung einer Semi-Targeted-Sampling Strategie in Schlachthöfen nicht angewandt.

4.3.3 Über die Verwendung des Viehverkehrsscheins

Eine weitere Idee war es, den Viehverkehrsschein als Informationsquelle heranzuziehen. Der Viehverkehrsschein oder auch Lieferschein stellt eine elementare Komponente des Rinderkennzeichnungssystems dar und dient der Rückverfolgbarkeit bei der Beförderung von Rindern (Agrarmarkt Austria 2007). Er enthält unter anderem Informationen zur Herkunft, Geburtsdaten, Geschlecht, und Ohrmarkennummern der Rinder, die von den LandwirtInnen auszufüllen sind. Deren Name, Anschrift und LFBIS-Nummer sind ebenfalls vermerkt. Werden die Tiere mittels ViehhändlerInnen zum jeweiligen Schlachthaus gebracht, müssen diese ihren Namen und die Adresse ebenfalls anführen. Zusätzliche Angaben zu den landwirtschaftlichen Betrieben, wie beispielsweise eingetragene Biobetriebe werden notiert. Verantwortlich für die Richtigkeit der eingetragenen Informationen sind immer die Personen, die sie ausgefüllt haben. Zum Beispiel haften die LandwirtInnen nur für Angaben in den orangenen Feldern und die ZwischenhändlerInnen nur für die in den grauen Kästchen (Agrarmarkt Austria 2007).

Auch der Plan, die Viehverkehrsscheine als Informationsquelle zu nutzen, wurde besonders aus Zeitgründen und zu hohem organisatorischem Aufwand verworfen. Die Scheine befanden sich nicht im Schlachtbereich, sondern den Bürogebäuden, weshalb diese auch nur in geringem Ausmaß zur Verfügung standen.

4.3.4 Datenerhebung Schlachthof

Die Datenentnahme aus Computern unmittelbar neben dem Schlachtband erwies sich schließlich als die schnellere und praktischere Methode, war aber mit Einbußen bei der Datenerhebung verbunden.

Man beschränkte sich hierbei auf folgende tierbezogene Informationen:

- Schlachtnummer;
- Alter;
- Herkunft (nur Niederösterreich wurde berücksichtigt).

Anders als beim Beprobieren der lebenden Tiere auf den Bauernhöfen, wo immer nach demselben Schema vorgegangen wurde, musste die grundsätzliche Vorgehensweise von

Schlachthof zu Schlachthof angepasst werden. Eine einheitliche Strategie konnte daher nicht entwickelt werden.

5 Endergebnisse nach Verbesserung des Protokolls Jänner-April 2022

5.1 Rekrutierung der TierärztInnen

Im Zeitraum Jänner bis April (Phase 2 des Projekts) wurden 55 niederösterreichische TierärztInnen für die Studie telefonisch (n = 29) und per Email (n = 26) kontaktiert. Neun davon haben landwirtschaftliche Betriebe übermittelt. Tabelle 2 zeigt die Anzahl an kontaktierten TierärztInnen und deren Rückmeldungen.

Tabelle 2: Kontaktierte TierärztInnen Jan-Apr. 2022 (Phase 2).

Methode	Kontaktiert	Positive Rückmeldung	Absage	Keine Rückmeldung/nicht erreicht	Positive Rückmeldungen in Prozent
Telefon + Email mit Flyer	26	19	2	4	73,1
Nur Telefon	29	7	10	12	24,1
Nur E-Mail	-				
Tagungen	-				
Persönlich	-				
Facebook	-				

5.2 Rekrutierung der TierbesitzerInnen

Durch die Mithilfe der rekrutierten VeterinärInnen haben im Zeitraum von Jänner bis April weitere 21 LandwirtInnen die Datenschutzerklärung des LORN-Projekts unterzeichnet und nahmen damit offiziell an der Studie teil. Die Verteilung dieser Betriebe ist in Abbildung 9 dargestellt.

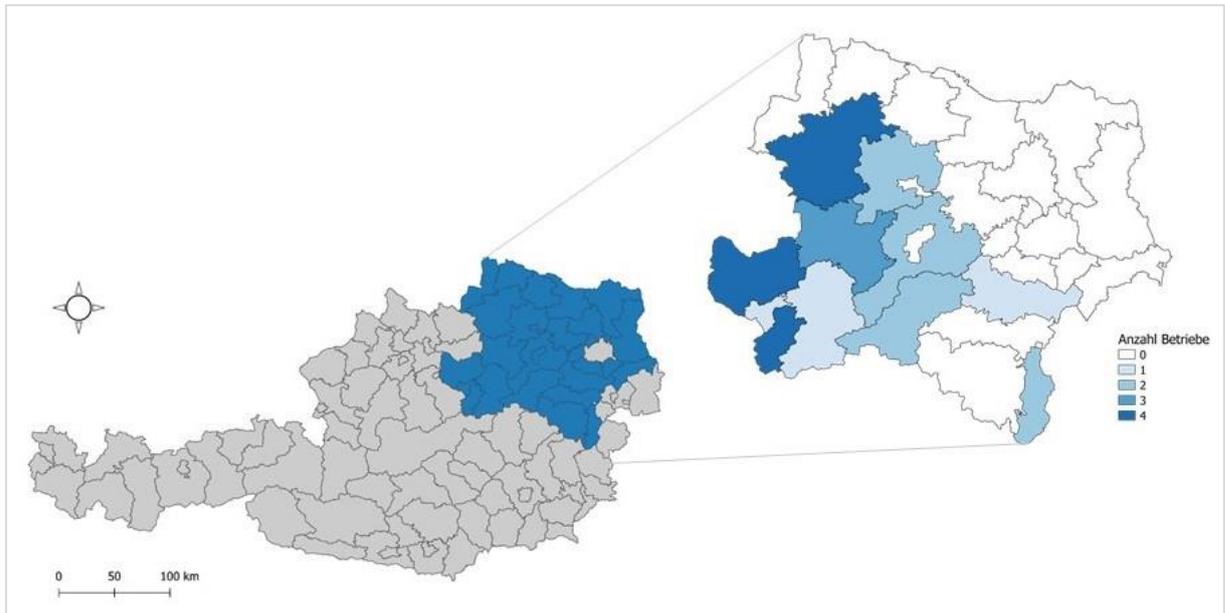


Abbildung 9: Geografische Lage der rekrutierten Betriebe (Phase 2) (die Daten sind pro Bezirk aggregiert), Jänner - April 2022. Die Karte wurde mit QGIS v.3.4.15 erstellt (Diese Dateien wurden aus der GADM-Version 1.0 vom März 2009 extrahiert).

5.3 Rekrutierung der Schlachthöfe

Von den insgesamt fünf Schlachthöfen, die schließlich am Projekt teilnahmen, wurden vier erst in Phase 2 für das Projekt rekrutiert. In Abbildung 10 ist die geographische Verteilung dieser Schlachthöfe dargestellt.

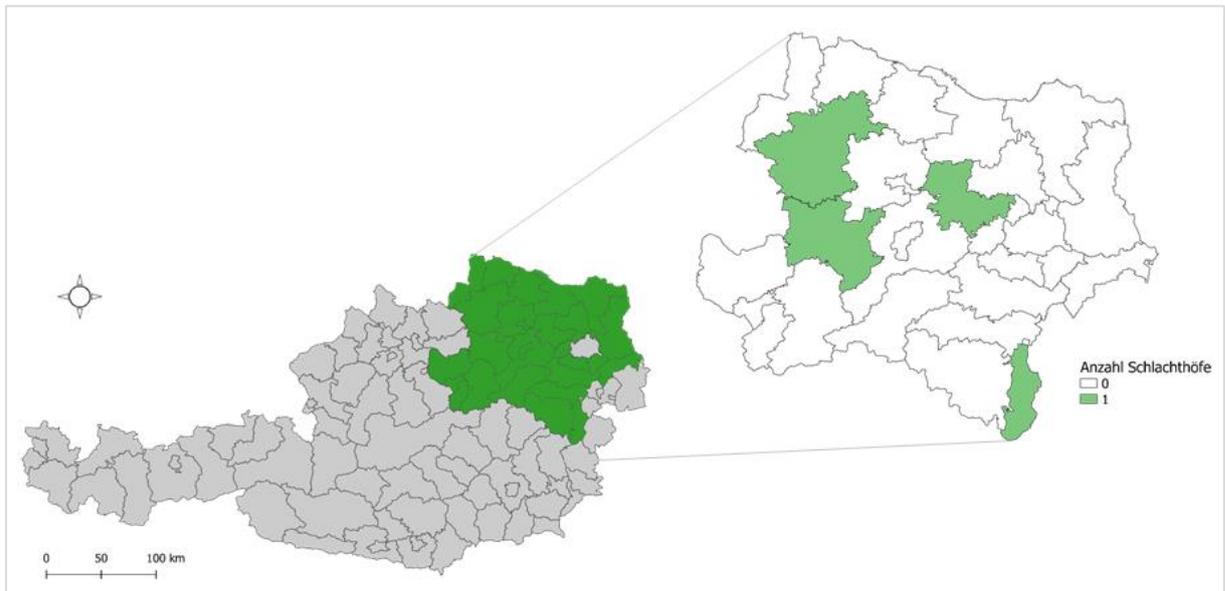


Abbildung 10: Geografische Lage der besuchten rekrutierten Schlachthöfe (Phase 2) (die Daten sind nach Bezirken aggregiert), Jänner - April 2022. Die Karte wurde mit QGIS v.3.4.15 erstellt (Diese Dateien wurden aus der GADM-Version 1.0 vom März 2009 extrahiert).

5.4 Zeit von Probe bis zum Labor

Die durchschnittliche Zeit von der Urinprobenahme bis zur Übermittlung an das AGES-Labor betrug 1:58 Stunden (Ziel < 2 Stunden). Die durchschnittliche Zeit für die Nierenentnahme bis zur Ablieferung der Proben im AGES-Labor betrug 2:35 Stunden (Ziel < 6 Stunden). Daher haben wir diesen Teil des Protokolls erfolgreich umgesetzt und das Zeitziel erreicht.

5.5 Probenanzahl

Die neue Strategie in der zweiten Phase des Projekts (Jänner-April 2022) erzielte den gewünschten Effekt. An landwirtschaftlichen Betrieb konnten 61 Proben, am Schlachthof 159 Proben gewonnen werden. Die Probenanzahl war damit signifikant von vier (erste Phase des

Projekts) auf 220 (zweite Phase des Projekts) gestiegen, was den Erfolg der verbesserten Rekrutierungs- und Stichprobenstrategie zeigte.

Nach Beendigung der vorliegenden Diplomarbeit wurde das Studiendesign beibehalten. Die Zusammenarbeit von TierärztInnen, LandwirtInnen und Schlachthöfen verlief reibungslos und alle AkteurInnen des aufgebauten Netzwerks haben sich sehr für das Projekt engagiert. Das Projektteam konnte somit erfolgreich die angestrebten 410 Tiere beproben.

5.6 Über LORN hinaus: Informationsfluss in der Rinderproduktion

Eine der Hauptschwierigkeiten des Studiendesigns bestand darin, die Rinder von den als "risikoreich" eingestuften Betrieben bis zum Schlachthof für die Probenahme zu verfolgen. Eine wichtige Errungenschaft der vorliegenden Arbeit bestand darin, die verschiedenen Informationsflüsse vom Betrieb zum Schlachthof zu ermitteln und festzustellen, wer über welche Informationen verfügt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 zusammengefasst. Die Abbildung beinhaltet die nötigen Informationen, um Rinder vom landwirtschaftlichen Betrieb bis zum Schlachthof zurückzuverfolgen. Die Kenntnisse sollen weitere Feldstudien in Österreich unterstützen und die Identifizierung wichtiger AkteurInnen in der Rinderproduktion und des Datenflusses erleichtern.

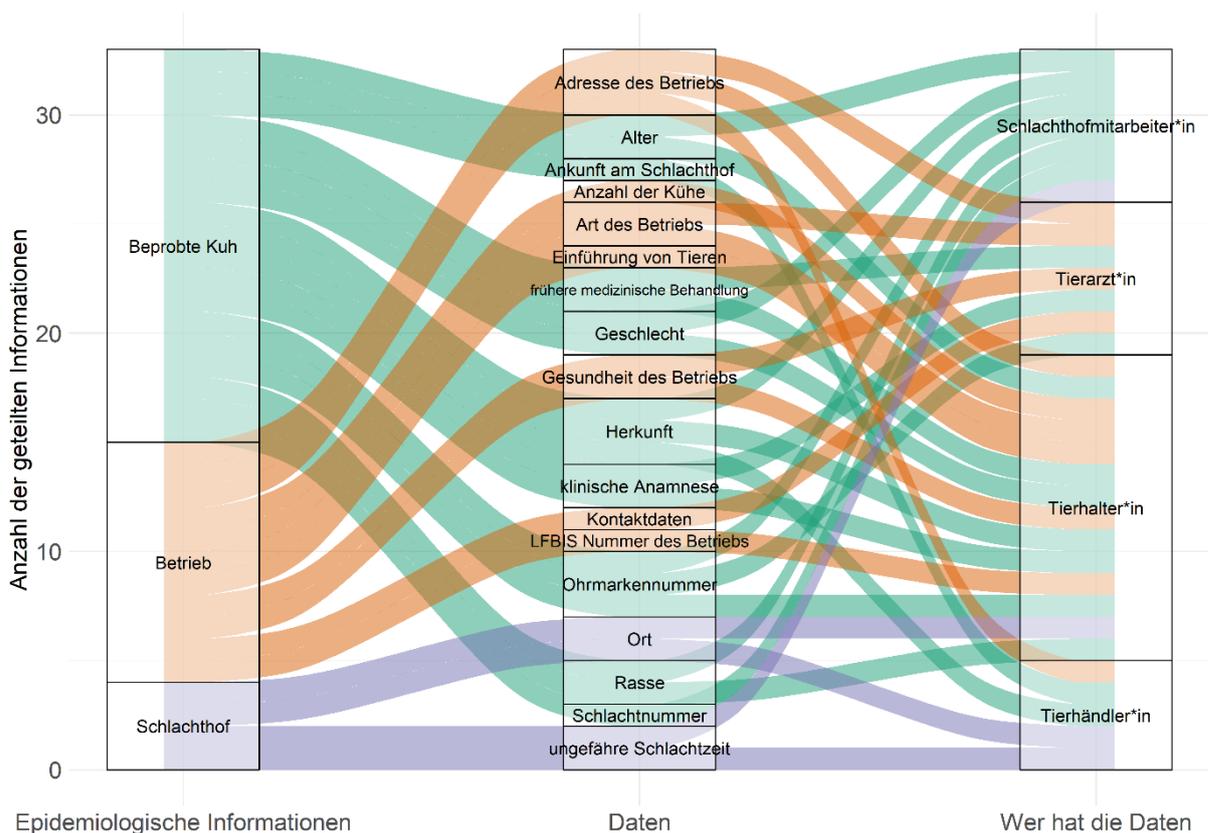


Abbildung 11: Informationsfluss des Rindes vom landwirtschaftlichen Betrieb zum Schlachtbetrieb.

6 Diskussion

Die vorliegende Arbeit analysiert Strategien zur Rekrutierung von TierärztInnen, LandwirtInnen und SchlachthofmitarbeiterInnen für die Teilnahme an einem wissenschaftlichen Projekt sowie die Möglichkeiten der Verfolgung von Rindern vom Herkunftsbetrieb bis hin zum Schlachthof.

Eine angemessene Auswahl an StudienteilnehmerInnen ist für wissenschaftliche Studien von Bedeutung, um die gewünschte Zielpopulation zu akquirieren (Manohar et al. 2018). Am einfachsten wäre es gewesen, die Informationen aus der Rinderdatenbank zu sammeln. Auf Grund der Datenschutz-Grundverordnung der Europäischen Union (DSGVO) war dies nicht möglich. Die größte Herausforderung war daher die Einbindung Dritter in den Forschungsprozess. Da TierärztInnen über das notwendige Wissen der Betriebsdaten verfügen, wurden diese im ersten Schritt kontaktiert. In der vorliegenden Arbeit konnte eine vertrauensvolle Beziehung zwischen TierärztInnen und LandwirtInnen die Rekrutierung vorantreiben. Die Einbindung von Fachpersonal zur Stärkung des Vertrauens wird auch in einer anderen Untersuchung als vorteilhaft beschrieben (Manohar et al. 2018). Als Nachteil bei der Einbeziehung von medizinischem Fachpersonal ist allerdings deren stressiger Arbeitsalltag zu erwähnen (Manohar et al. 2018). In der vorliegenden Arbeit wurde Zeitmangel on den TierärztInnen häufig als Grund für eine Absage rückgemeldet. Zeit als limitierender Faktor für die Partizipation an Projekten wird auch in anderen Studien genannt (Cunha et al. 2017).

Bei der Rekrutierung von StudienteilnehmerInnen ist im Allgemeinen auf eine klare Darstellung der Vorinformationen sowie die verständliche Beschreibung des Forschungsvorhabens zu achten (Dickinson et al. 2012). Dies wurde auch in der vorliegenden Arbeit deutlich. Die Festlegung einer kurzen, aber klaren Ansprache hat die Kommunikation mit den TierärztInnen positiv beeinflusst. Außerdem kann sich die Verdeutlichung einer regionalen Wissenslücke in der Forschung positiv auf die Rücklaufquote auswirken (Van der Wal et al. 2015). Von besonderer Bedeutung war es daher, den TierärztInnen und LandwirtInnen den konkreten Nutzen der Studie aufzuzeigen. In der Literatur wird das intrinsische Interesse an dem jeweiligen Thema des Projekts als Anreiz für die Teilnahme beschrieben (Vohland et al. 2021). Am LORN-Projekt waren jene TierärztInnen eher

interessiert, die in den von ihnen betreuten landwirtschaftlichen Betrieben mit potentiellen Leptospirose-Symptomen konfrontiert waren. Als weitere Motivation für die Teilnahme in Studien wird das Teilen wertvoller Erfahrungen genannt (MacPhail & Colla 2020). In der vorliegenden Arbeit wurden von einigen LandwirtInnen, die am Projekt teilnahmen, Rückmeldungen bezüglich des Gesundheitszustandes ihrer Tiere erbeten. Als positiver Nebeneffekt können die Sensibilisierung auf Leptospirose in den Betrieben und die damit einhergehenden Verhaltensänderungen genannt werden. Im Rahmen der Studie konnten den LandwirtInnen Empfehlungen zur Hygiene, z.B. das Tragen von Handschuhen bei Hautverletzungen, gegeben werden.

Es gibt Hinweise, dass die persönliche Kontaktaufnahme mit den StudienteilnehmerInnen zu einer höheren Rücklaufquote führt als die Kontaktaufnahme per E-Mail (Eastwood et al. 1996). Daher erfolgte zusätzlich zur Kontaktaufnahme per E-Mail auch eine telefonische Kontaktaufnahme mit den TierärztInnen. Außerdem erfolgten Face-to-Face-Interaktionen. Diese waren vorteilhaft, da die Einwilligung der LandwirtInnen Voraussetzung für die Entnahme von Tierproben war.

In diesem Kontext wird empfohlen, sich im Vorhinein auf die Gespräche im Sinne von Schulungen (z.B. Rollenspiele) vorzubereiten (Leonard et al. 2003). Aus Zeitgründen war ein Üben der Telefongespräche im vorliegenden Projekt nicht eingeplant. Die Erfahrungen der ForschungsmitarbeiterInnen zeigten jedoch, dass die Telefonate auf die wichtigsten Informationen der LORN-Studie zu beschränken sind. Die Bitte an der Teilnahme als persönliches Anliegen aufgrund der eigenen Abschlussarbeit resultierte oftmals in positiveren Rückmeldungen als nach dem Erwähnen der Vetmeduni Wien. Vermutlich waren negative Erfahrungen aus der Vergangenheit, wie zum Beispiel die Assoziierung der Universität mit viel Arbeit für die TierärztInnen sowie etwaiger nachfolgender Konsequenzen für TierbesitzerInnen oder TierärztInnen, der Grund.

Weiteres ist zu erwähnen, dass nur ein kleiner Teil der Personen, die ihr Interesse an einem Projekt bekunden, auch einen Beitrag dazu leisten (Andow et al. 2016, Birkin & Goulson 2015). Trotz Zusage mancher TierärztInnen, das Projekt zu unterstützen, haben nicht alle einen Betrieb an das Forschungsteam übermittelt. In diesem Kontext wurde festgestellt, dass es sinnvoll ist, die TeilnehmerInnen mehrmals an das Projekt zu erinnern. Dies betonen auch andere Studien (Patel et al. 2003).

Eine weitere Akquirierungsmethode, die in der vorliegenden Arbeit nicht zum Einsatz gekommen ist, ist die Kontaktaufnahme per Post. Weigel und Kollegen untersuchten Rekrutierungsstrategien von US-LandwirtInnen und stellten fest, dass regelmäßige Einladungen per Post effektiver sind als Einladungen per E-Mail (Weigel 2021). Es könnte sein, dass E-Mails durch die vielen Werbungen, die heutzutage versendet werden, oft ungeöffnet wieder gelöscht werden. Die Ausstellung persönlicher Briefe könnte in nachfolgenden Studien in Erwägung gezogen werden.

Die Änderung des Flyers stellte einen wichtigen Schritt dar, um die Kommunikation zu verbessern. Viele Studien betonen die Wichtigkeit eines Flyers und empfehlen die Rekrutierungsmaterialien vorab zu testen (Joseph et al. 2016). Häufig gab es Verständnisschwierigkeiten in Bezug auf die Studie. Eigentlich wurden die ersten Entwürfe der Flyer sorgfältig geprüft und an KollegInnen getestet. Vermutlich hätten diese vorab auch an Personen, mit fehlendem Vorwissen in Bezug auf das LORN-Projekt, getestet werden sollen.

Nach Optimierung der Akquirierungsstrategie stellte sich heraus, dass mit der gezielten Probennahme nicht die geplante Anzahl von Tieren erreicht werden konnte, sodass eine neue Strategie, d. h. eine Semi-Targeted-Sampling Strategie, entwickelt werden musste.

Im Rahmen der ersten Phase des Projektes wurde der Urin von Tieren mit bestimmten Symptomen an einem landwirtschaftlichen Betrieb beprobt. Auch für die Nierenproben am Schlachthof wurden explizit Tiere anhand von Kriterien ausgewählt. Somit mussten die Tiere und die speziellen Betriebe identifiziert werden. Deshalb war die Verfolgung des Rindes vom Betrieb, über den Transport bis hin zum Schlachthof erforderlich. Bedeutsam für das organisatorische Vorgehen am Schlachthof waren die Ohrmarkennummern und Schlachtnummern der jeweiligen Rinder, um die Tiere gezielt am Schlachtband zu identifizieren. Essenziell war darüber hinaus die Information, durch welchen Transporteur die Tiere zum Schlachthof verbracht wurden, um den ungefähren Zeitpunkt der Probenentnahme festzulegen. Die gezielte Beprobung auf der Grundlage von Symptomen und Risikofaktoren in einem Gebiet, in dem die Leptospirose vermutlich nicht zirkuliert, war möglicherweise nicht optimal.

Daher wurden in der zweiten Phase die Kriterien für die Rinder am Schlachthof auf Alter und Herkunft beschränkt. Dies war über den Computer am Schlachtband zu eruieren, ohne dabei

gegen Datenschutzverordnungen zu verstoßen. Damit war die Rückverfolgung nicht nötig. Durch diese wichtige Erkenntnis war es schließlich möglich genug Proben zu sammeln. Das LORN-Projekt konnte in Niederösterreich erfolgreich durchgeführt werden. Es konnten insgesamt 410 Rinder beprobt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden geeignete Rekrutierungsmethoden identifiziert und ein besseres Verständnis für den Informationsfluss vom landwirtschaftlichen Betrieb zum Schlachthof generiert.

7 Abstract

The aim of the LORN project was to isolate local *Leptospira* strains from Lower Austrian cattle to improve the sensitivity and specificity of the serological diagnostic test for humans and animals in Austria. For this purpose, the project planned to sample animals at increased risk for infection through a targeted sampling conducted on farm and at slaughterhouse. The present work aimed to support the team in building up a network of farmers and slaughterhouses to participate to the project and collaborate with the research team. However, the recruitment of veterinarians, animal owners, and slaughterhouses revealed challenging. Therefore, an objective evaluation of the recruitment strategy was needed to identify areas for improvement and propose changes that would enhance the overall effectiveness of the protocol. This work aimed to i) establish an efficient strategy for recruiting veterinarians and farmers in Lower Austria, ii) optimize the tracking of the animals from the farm of origin to the slaughterhouse to facilitate the targeted sampling, and iii) optimize the sampling protocol of cattle in the slaughterhouses and on farms.

Results of the evaluation revealed that short, focused phone calls were the most efficient method for contacting veterinarians, farmers, and slaughterhouse managers. More generally, communication about the project needed to be enhanced. Finally, the targeted sampling revealed unsuccessful in achieving the planned number of animals and a new strategy, i. e., a semi-targeted sampling, had to be developed and was implemented. Overall, the project required great flexibility of the project staff because there is no “one fits all” strategy and the organization of the workflow at the slaughterhouses had to be tailored and adjusted individually for each slaughterhouse.

One of the main challenges of the study design was the tracking of the cattle to be sampled from farms to slaughterhouses. An important achievement of the present work was to identify the different information flows from the farm to the slaughterhouse and establish which actors possess specific information on the animals.

8 Zusammenfassung

Ziel des LORN-Projekts war es, lokale *Leptospira*-Stämme von niederösterreichischen Rindern zu isolieren, um die Empfindlichkeit und Spezifität des serologischen Diagnosetests für Menschen und Tiere in Österreich zu verbessern. Zu diesem Zweck sah das Projekt vor, Tiere mit erhöhtem Infektionsrisiko durch eine gezielte Probenahme im Betrieb und im Schlachthof zu untersuchen. Die vorliegende Arbeit sollte das Team beim Aufbau eines Netzwerks von Landwirten und Schlachthöfen unterstützen, die sich an dem Projekt beteiligen und mit dem Forschungsteam zusammenarbeiten. Die Rekrutierung von TierärztInnen, TierhalterInnen und Schlachthöfen erwies sich jedoch als schwierig. Daher war eine objektive Bewertung der Rekrutierungsstrategie erforderlich, um verbesserungswürdige Bereiche zu ermitteln und Änderungen vorzuschlagen, die die Gesamtwirksamkeit des Protokolls erhöhen würden. Ziel dieser Arbeit war es, i) eine effiziente Strategie für die Rekrutierung von TierärztInnen und LandwirtInnen in Niederösterreich zu entwickeln, ii) die Verfolgung der Tiere vom Herkunftsbetrieb bis zum Schlachthof zu optimieren, um die gezielte Probenahme zu erleichtern, und iii) das Probenahmeprotokoll für Rinder in den Schlachthöfen und auf den Bauernhöfen zu optimieren.

Die Ergebnisse der Evaluierung zeigten, dass kurze, gezielte Telefonanrufe die effizienteste Methode zur Kontaktaufnahme mit TierärztInnen, LandwirtInnen und SchlachthofbetreiberInnen waren. Generell musste die Kommunikation über das Projekt verbessert werden. Schließlich stellte sich heraus, dass mit der gezielten Probenahme nicht die geplante Anzahl von Tieren erreicht werden konnte, sodass eine neue Strategie, d. h. eine Semi-Targeted-Sampling Strategie, entwickelt werden musste, die auch umgesetzt wurde. Insgesamt erforderte das Projekt von den ProjektmitarbeiterInnen ein hohes Maß an Flexibilität, da es keine "Einheitsstrategie" gibt und die Organisation der Arbeitsabläufe in den Schlachthöfen individuell auf jeden Schlachthof zugeschnitten und angepasst werden musste.

Eine der größten Herausforderungen des Studiendesigns war die Verfolgung der zu beprobenden Rinder von den Betrieben zu den Schlachthöfen. Eine wichtige Errungenschaft der vorliegenden Arbeit bestand darin, die verschiedenen Informationsflüsse vom

landwirtschaftlichen Betrieb zum Schlachthof zu ermitteln und festzustellen, welche AkteurInnen über spezifische Informationen über die Tiere verfügten.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema Nachverfolgung Rind.	9
Abbildung 2: Karte von Österreich, Niederösterreich ist in blau dargestellt (Die Karte wurde mit QGIS v.3.4.15 erstellt. Diese Dateien wurden aus der GADM-Version 1.0 vom März 2009 extrahiert.).....	11
Abbildung 3: Situation der Rinderproduktion in Österreich und Niederösterreich.	12
Abbildung 4: Komplementäre kumulative Verteilungsfunktion der negativen Binomialverteilung NB ($r = 10$, $p = 0,033$) (Wahrscheinlichkeit, dass die Variable X einen Wert kleiner oder gleich $r = 10$ annimmt).	13
Abbildung 6: Informationsflyer für RinderhalterInnen aus Niederösterreich (Version 1).....	18
Abbildung 7: Neue Informationsflyer für TierärztInnen in Niederösterreich.	28
Abbildung 8: Theoretische Strategie zur Umsetzung einer halb-gezielten Probenahme in Schlachthöfen für das LORN-Projekt.....	31
Abbildung 9: Geografische Lage der rekrutierten Betriebe (Phase 2) (die Daten sind pro Bezirk aggregiert), Jänner - April 2022. Die Karte wurde mit QGIS v.3.4.15 erstellt (Diese Dateien wurden aus der GADM-Version 1.0 vom März 2009 extrahiert).....	35
Abbildung 10: Geografische Lage der besuchten rekrutierten Schlachthöfe (Phase 2) (die Daten sind nach Bezirken aggregiert), Jänner - April 2022. Die Karte wurde mit QGIS v.3.4.15 erstellt (Diese Dateien wurden aus der GADM-Version 1.0 vom März 2009 extrahiert).....	36
Abbildung 11: Informationsfluss des Rindes vom landwirtschaftlichen Betrieb zum Schlachtbetrieb.	38

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kontaktierte TierärztInnen Nov-Dez. 2021 (Phase 1) und Teilnahmequote.....	24
Tabelle 2: Kontaktierte TierärztInnen Jan-Apr. 2022 (Phase 2).	34

11 Literaturverzeichnis

- Adler B. 2014. *Leptospira and leptospirosis*. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Adler B, La Peña Moctezuma A de. 2010. *Leptospira and leptospirosis*. *Veterinary Microbiology*, 140 (3-4): 287–296.
- Adugna S. 2016. A review of bovine leptospirosis. *European Journal of Applied Sciences*, 8 (6): 347–355.
- Amt der Niederösterreichischen Landesregierung. 2021. Statistisches Handbuch des Landes Niederösterreich. https://www.noe.gv.at/noe/Zahlen-Fakten/Statistische_Handbuch_2021.pdf (Zugriff: 10.03.2023).
- Andersen-Ranberg EU, Pippert C, Jensen PM. 2016. Global patterns of *Leptospira* prevalence in vertebrate reservoir hosts. *Journal of Wildlife Diseases* 52: 468 – 477.
- Andow, D. A., Borgida, E., Hurley, T. M., & Williams, A. L. 2016. Recruitment and retention of volunteers in a citizen science network to detect invasive species on private lands. *Environmental management*, 58, 606-618.
- Agrarmarkt Austria. [Online] o.D. <https://www.ama.at/fachliche-informationen/lebendrinderkennzeichnung/systembestandteile> (Zugriff: 22.07.2022).
- Agrarmarkt Austria. 2004. Sichere Identifizierung von Rindern und Rinder-Schlachtkörpern am Schlachthof. https://www.ama.at/getattachment/a77718d0-0591-4fc1-8108-50264c63da19/Handbuch_Slachthof.pdf.
- Agrarmarkt Austria. 2007. Ausstellen und Verwenden von Viehverkehrsscheinen/Lieferscheinen (VVS). https://amainfo.at/fileadmin/user_upload/B2B/Documents/R%C3%BCckverfolgbarkeit_Fleisch_bos/Infobriefe_und_Merkbl%C3%A4tter/bos_-_Merkblatt_1_Vieverkehrsschein.pdf.
- Andre-Fontaine G, Aviat F, Thorin C. 2015. Waterborne leptospirosis: survival and preservation of the virulence of pathogenic *Leptospira* spp. in fresh water. *Current Microbiology*, 71: 136–142.
- Backstedt BT, Buyuktanir O, Lindow J, Wunder Jr EA, Reis MG, Usmani-Brown S, Ledizet M, Ko A, Pal U. 2015. Efficient detection of pathogenic leptospires using 16S ribosomal RNA. *PloS One*, 10 (6): e0128913.
- Barragan V, Chiriboga J, Miller E, Olivas S, Birdsell D, Hepp C, Hornstra H, Schupp JM, Morales M, Gonzalez M. 2016. High *Leptospira* diversity in animals and humans complicates

the search for common reservoirs of human disease in rural Ecuador. *PloS Neglected Tropical Diseases*, 10 (9): e0004990.

Bauer A, Smulders FJM. 2015. Tierproduktion und veterinärmedizinische Lebensmittelhygiene: Ein synoptisches Lehrbuch.

Baumgartner W. 2009. Klinische Propädeutik der Haus-und Heimtiere. Georg Thieme Verlag.

Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Diseases*, 3 (12): 757–771.

Binti Daud A, Fuzi, Nik Mohd Hafiz Mohd, Mohammad, Wan Mohd Zahiruddin Wan, Amran F, Ismail N, Arshad MM, Kamarudin S. 2018. Leptospirosis and workplace environmental risk factors among cattle farmers in northeastern Malaysia. *The International Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 9 (2): 88.

Birkin, L., & Goulson, D. 2015. Using citizen science to monitor pollination services. *Ecological Entomology*, 40, 3-11.

Breu D. 2014. Leptospirose–Was bei der Diagnostik zu beachten ist. *Kleintier Konkret*, 17 (01): 39–40.

Cappelleri, C., Heuss, L. T., & Schorn, R., Hrsg. 2014. Ein nicht alltägliches Urlaubssouvenir. EMH Media, 694-696.

Casanovas-Massana A, Pedra GG, Wunder Jr EA, Diggle PJ, Begon M, Ko AI. 2018. Quantification of *Leptospira interrogans* survival in soil and water microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, 84 (13): e00507-18.

Chan OY, Paul, Sng EH. 1987. Leptospirosis among abattoir workers—a serological survey. *Singapore Medical Journal*, 28 (4): 293–296.

Chideroli RT, Gonçalves DD, Suphoronski SA, Alfieri AF, Alfieri AA, Oliveira AG de, Freitas JC de, Pereira UdP. 2017. Culture strategies for isolation of fastidious *Leptospira* serovar Hardjo and molecular differentiation of genotypes Hardjobovis and Hardjoprajitno. *Frontiers in Microbiology*, 8: 2155.

Cosson J-F, Picardeau M, Mielcarek M, Tatarski C, Chaval Y, Suputtamongkol Y, Buchy P, Jittapalapong S, Herbreteau V, Morand S. 2014. Epidemiology of *Leptospira* transmitted by rodents in Southeast Asia. *PloS Neglected Tropical Diseases*, 8 (6): e2902.

Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, Stein C, Abela-Ridder B, Ko AI. 2015. Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. *PloS Neglected Tropical Diseases*, 9 (9): e0003898.

Cunha, D. G., Marques, J. F., Resende, J. C., Falco, P. B., Souza, C. M., & Loiselle, S. A. 2017. Citizen science participation in research in the environmental sciences: key factors related to projects' success and longevity. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 89, 2229-2245.

D'Andrea A, Martinez YZ, Alduina R, Monteverde V, Molina CF, Vitale M. 2012. Comparison of two PCR methods for detection of *Leptospira interrogans* in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107: 85–88.

Deutz A, Fuchs K, Nowotny N, Auer H, Schuller W, Stünzner D, Aspöck H, Kerbl U, Köfer J. 2003. Seroepidemiologische Untersuchungen von Jägern auf Zoonosen—Vergleich mit Untersuchungen bei Tierärzten, Landwirten und Schlachthofarbeitern. *Wiener klinische Wochenschrift*, 115.

Dickinson, J. L., Shirk, J., Bonter, D., Bonney, R., Crain, R. L., Martin, J., ... & Purcell, K. 2012. The current state of citizen science as a tool for ecological research and public engagement. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 10(6), 291-297.

Dietrich M, Wilkinson DA, Soarimalala V, Goodman SM, Dellagi K, Tortosa P. 2014. Diversification of an emerging pathogen in a biodiversity hotspot: *Leptospira* in endemic small mammals of Madagascar. *Molecular Ecology*, 23 (11): 2783–2796.

Dupouey J, Faucher B, Edouard S, Richet H, Kodjo A, Drancourt M, Davoust B. 2014. Human leptospirosis: an emerging risk in Europe? *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 37 (2): 77–83.

Eastwood, B. J., Gregor, R. D., MacLean, D. R., & Wolf, H. K. 1996. Effects of recruitment strategy on response rates and risk factor profile in two cardiovascular surveys. *International journal of epidemiology*, 25(4), 763-769.

EFSA (2006) Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection. Guidance Document on Good Practices for Design of Field Surveys. *The EFSA Journal*, 93, 1-24. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/93r.pdf>.

EFSA (2012b) European Food Safety Authority; Manual for Reporting on Zoonoses, Zoonotic Agents and Antimicrobial Resistance in the framework of Directive 2003/99/EC and of some other pathogenic microbiological.

agents for information derived from the year 2011. Supporting publication 2012: EN-266.

European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance Atlas of Infectious Diseases. ECDC. [Online] 2017. <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx> (Zugriff: 10.05.2023).

European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance Atlas of Infectious Diseases. ECDC. [Online] 2019. <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx> (Zugriff: 10.05.2023).

European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance Atlas of Infectious Diseases. ECDC. [Online] 2020. <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx> (Zugriff: 10.05.2023).

European Centre for Disease Prevention and Control. Leptospirosis. In: ECDC. Annual Epidemiological Report for 2020. Stockholm: ECDC; 2022. https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Leptospirosis_AER_2020_Final.pdf

Ellis WA. 1990. Leptospirosis-A review of veterinary aspects. *Irish Vet News*, 12: 6–12.

Ellis WA. 2015. Animal leptospirosis. *Leptospira and Leptospirosis*: 99–137.

Ellis WA, Cassells JA, Doyle J. 1986. Genital leptospirosis in bulls. *The Veterinary Record*, 118 (12): 333.

Ellis WA, O'brien JJ, Cassells JA, Neill SD, Hanna J. 1985. Excretion of *Leptospira interrogans* serovar hardjo following calving or abortion. *Research in Veterinary Science*, 39 (3): 296–298.

Ellis WA, Songer JG, Montgomery J, Cassells JA. 1986. Prevalence of *Leptospira interrogans* serovar hardjo in the genital and urinary tracts of non-pregnant cattle. *The Veterinary Record*, 118 (1): 11–13.

Evangelista KV, Coburn J. 2010. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiology*, 5 (9): 1413–1425.

Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. 1999. *Leptospira and leptospirosis*, Melbourne. Australia: MediSci, 259.

Grégoire F, Bakinahe R, Petitjean T, Boarbi S, Delooz L, Fretin D, Saulmont M, Mori M. 2020. Laboratory Diagnosis of Bovine Abortions Caused by Non-Maintenance Pathogenic *Leptospira* spp.: Necropsy, Serology and Molecular Study Out of a Belgian Experience. *Pathogens*, 9 (6): 413.

Haake DA, Levett PN. 2015. Leptospirosis in Humans. *Current topics in microbiology and immunology*, 387: 65–97. DOI 10.1007/978-3-662-45059-8_5.

Haklay, M. 2012. Citizen science and volunteered geographic information: Overview and typology of participation. *Crowdsourcing geographic knowledge: Volunteered geographic information (VGI) in theory and practice*, 105-122.

Islam Aqib A, Ijaz M, Hussain Farooqi S, Shoaib M, Fakhar-e-Alam Kulyar M, Yasmeen K. 2019. Leptospirosis: Rising Nuisance for Cattle and Threat to Public Health. In: Abdel hay El-Sayed Kaoud H, Hrsg. *Bacterial Cattle Diseases*. IntechOpen.

Joseph, R. P., Keller, C., & Ainsworth, B. E. 2016. Recruiting participants into pilot trials: Techniques for researchers with shoestring budgets. *Californian journal of health promotion*, 14(2), 81.

Koizumi N, Picardeau M, editors. 2020. *Leptospira spp.: methods and protocols*. New York (NY): Humana Press.

Ko, Albert I.; Goarant, Cyrille; Picardeau, Mathieu. 2009. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. In: *Nature Reviews Microbiology* 7 (10), S. 736-747.

Ko, Albert I.; Reis, Mitermayer Galvão; Dourado, Cibele M. Ribeiro; Johnson Jr, Warren D.; Riley, Lee W.; Salvador Leptospirosis Study Group. 1999. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. In: *The Lancet* 354 (9181), S. 820-825.

Leonard, N. R., Lester, P., Rotheram-Borus, M. J., Mattes, K., Gwadz, M., & Ferns, B. 2003. Successful recruitment and retention of participants in longitudinal behavioral research. *AIDS Education and Prevention*, 15(3), 269-281.

Levett PN. 2001. Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14 (2): 296–326.

Lilenbaum W. 29.06.2021 Nierenproben.

Lilenbaum W, Martins G. 2014. Leptospirosis in cattle: a challenging scenario for the understanding of the epidemiology. *Transboundary and Emerging Diseases*, 61: 63–68.

Loureiro AP, Lilenbaum W. 2020. Genital bovine leptospirosis: A new look for an old disease. *Theriogenology*, 141: 41–47.

MacPhail, V. J., & Colla, S. R. 2020. Power of the people: A review of citizen science programs for conservation. *Biological Conservation*, 249, 108739.

Manohar, N., MacMillan, F., Steiner, G. Z., & Arora, A. 2018. Recruitment of research participants. *Handbook of research methods in health social sciences*, 71-98.

Manohar, N., MacMillan, F., Steiner, G. Z., & Arora, A. 2019. Recruitment of research participants.

- Maria Isabel Nogueira Di Azevedo, Walter Lilenbaum. 2022. Equine genital leptospirosis: Evidence of an important silent chronic reproductive syndrome. *Theriogenology*, 192: 81–88.
- Merien F, Portnoi D, Bourhy P, Charavay F, Berlioz-Arthaud A, Baranton G. 2005. A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, 249 (1): 139–147.
- Munoz-Zanzi C, Groene E, Morawski BM, Bonner K, Costa F, Bertherat E, Schneider MC. 2020. A systematic literature review of leptospirosis outbreaks worldwide, 1970–2012. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 44: e78.
- Nakamura S. 2022. Motility of the Zoonotic Spirochete *Leptospira*: Insight into Association with Pathogenicity. *International Journal of Molecular Sciences*, 23 (3): 1859.
- Niederösterreichische Tierärztekammer. 22.08.2022. Beschäftigte TierärztInnen NÖ.
- Parte AC, Carbasse JS, Meier-Kolthoff JP, Reimer LC, Göker M. 2020. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70 (11): 5607.
- Patel, M. X., Doku, V., & Tennakoon, L. 2003. Challenges in recruitment of research participants. *Advances in Psychiatric Treatment*, 9(3), 229-238.
- Picardeau M. 2013. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 43 (1): 1–9.
- Picardeau M. 2017. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? *Nature Reviews Microbiology*, 15 (5): 297–307.
- Pinne M, Haake DA. 2013. LipL32 is a subsurface lipoprotein of *Leptospira interrogans*: presentation of new data and reevaluation of previous studies. *PloS One*, 8 (1): e51025.
- Poepll, W.; Orola, M. J.; Herkner, H.; Müller, M.; Tobudic, S.; Faas, A. et al. 2013. High prevalence of antibodies against *Leptospira* spp. in male Austrian adults: a cross-sectional survey, April to June 2009. In: *Eurosurveillance* 18 (25), S. 20509.
- Preston, N. J., Farquhar, M. C., Walshe, C. E., Stevinson, C., Ewing, G., Calman, L. A., ... & Todd, C. 2016. Strategies designed to help healthcare professionals to recruit participants to research studies. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (2).
- Radl C, Müller M, Revilla-Fernandez S, Karner-Zuser S, Martin A de, Schauer U, Karner F, Stanek G, Balcke P, Hallas A. 2011. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants in Langau, Austria, 2010. *Wiener klinische Wochenschrift*, 123 (23): 751–755.

Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R, Hrsg. 2008. Biochemie. Zweite Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

RIS - Schlachtkörper-Klassifizierungs-Verordnung 2018 - Bundesrecht konsolidiert, Fassung vom 08.07.2022. 2022. [Online] <https://www.ris.bka.gv.at/GeltendeFassung.wxe?Abfrage=Bundesnormen&Gesetzesnummer=20010561>, zuletzt aktualisiert am 08.07.2022.

Robert Koch-Institut. 2015. RKI-Ratgeber für Ärzte Leptospirose. RKI-Bib1 (Robert Koch-Institut).

Sarajlic A. 2020. Anzeigenpflichtige Krankheiten in Österreich. https://www.sozialministerium.at/dam/jcr:8da243e6-defc-4001-adce-b9e1fca20241/Anzeigenpflichtige%20Krankheiten%20in%20%C3%96sterreich_01_20.pdf.

Semenza JC, Menne B. 2009. Climate change and infectious diseases in Europe. *The Lancet Infectious Diseases*, 9 (6): 365–375.

Silva, A. F., Farias, P. J. A., Silva, M. L. C. R., Araújo Júnior, J. P., Malossi, C. D., Ullmann, L. S., ... & Alves, C. J. 2019. High frequency of genital carriers of *Leptospira* sp. in sheep slaughtered in the semi-arid region of northeastern Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, 51, 43-47.

Sohm C, Steiner J, Jöbstl J, Wittek T, Firth C, Steinparzer R, Desvars-Larrive A. 2023. A systematic review on leptospirosis in cattle: a European Perspective [preprint]. bioRxiv: 531463.

Sohm C, Firth C, Wittek T, Steinparzer R, Desvars-Larrive A. 2021. Das LORN Projekt - Machen Sie mit! Leptospirose in Niederösterreich. *Klauentierpraxis*, (29(4)): 174–175.

Stadler. 2011. Seroepidemiological survey of bacterial and parasitic zoonotic agents among veterinarians from Upper Austria.

Statistik Austria. Agrarstrukturerhebung. [Online] 2020a. https://www.statistik.at/fileadmin/publications/SB_1-17_AS2020.pdf (Zugriff: 10.05.2023).

Statistik Austria. Untersuchte Schlachtungen. [Online] 2020b. https://www.statistik.at/fileadmin/publications/Untersuchte_Schlachtungen__Jahresergebnisse__2020.pdf (Zugriff: 10.05.2023).

Strobel F. 29.11.2022. BSE Proben.

Suepaul SM, Carrington CV, Campbell M, Borde G, Adesiyun AA. 2011. Seroepidemiology of leptospirosis in livestock in Trinidad. *Tropical Animal Health and Production*, 43 (2): 367–375.

- Sykes JE, Reagan KL, Nally JE, Galloway RL, Haake DA. 2022. Role of diagnostics in epidemiology, management, surveillance, and control of leptospirosis. *Pathogens*, 11 (4): 395.
- Terpstra WJ, Ligthart GS, Schoone GJ. 1980. Serodiagnosis of human leptospirosis by enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA). *Zentralblatt für Bakteriologie. 1. Abt. Originale A, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie*, 247 (3): 400–405.
- Thibeaux R, Iraola G, Ferrés I, Bierque E, Girault D, Soupé-Gilbert M-E, Picardeau M, Goarant C. 2018. Deciphering the unexplored *Leptospira* diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence. *Microbial Genomics*, 4 (1).
- Trevejo, Rosalie T.; Rigau-Pérez, José G.; Ashford, David A.; McClure, Emily M.; Jarquín-González, Carlos; Amador, Juan J. et al. 1998. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. In: *The Journal of Infectious Diseases* 178 (5), S. 1457-1463.
- Van der Wal, R., Anderson, H., Robinson, A., Sharma, N., Mellish, C., Roberts, S., ... & Siddharthan, A. 2015. Mapping species distributions: A comparison of skilled naturalist and lay citizen science recording. *Ambio*, 44, 584-600.
- Vijayachari P, Sugunan AP, an Shriram. 2008. Leptospirosis: an emerging global public health problem. *Journal of Biosciences*, 33 (4): 557–569.
- Vincent AT, Schiettekatte O, Goarant C, Neela VK, Bernet E, Thibeaux R, Ismail N, Mohd Khalid, Mohd Khairul Nizam, Amran F, Masuzawa T. 2019. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13 (5): e0007270.
- Vohland, K., Land-Zandstra, A., Ceccaroni, L., Lemmens, R., Perelló, J., Ponti, M., Samson, R., & Wagenknecht, K. 2021. Editorial: The Science of citizen science evolves. *The Science of Citizen Science*. Springer
- Waitkins SA. 1986. Leptospirosis as an occupational disease. *British Journal of Industrial Medicine*, 43 (11): 721.
- Weigel, C., Paul, L. A., Ferraro, P. J., & Messer, K. D. 2021. Challenges in recruiting US farmers for policy-relevant economic field experiments. *Applied Economic Perspectives and Policy*, 43(2), 556-572.
- World Health Organization. 2003. *Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control*. World Health Organization.

Zarantonelli L, Suanes A, Meny P, Buroni F, Nieves C, Salaberry X, Briano C, Ashfield N, Da Silva Silveira C, Dutra F. 2018. Isolation of pathogenic *Leptospira* strains from naturally infected cattle in Uruguay reveals high serovar diversity, and uncovers a relevant risk for human leptospirosis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12 (9): e0006694.