

Aus dem
Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Untersuchung zu den Einflüssen von Saison, Populationsdichte und individuellen Faktoren auf die
Prävalenz der Leptospiren in Rötelmäusen in Nordwest-Deutschland**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Elisabeth Schmidt
aus Gera

Leipzig, 2022

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Dr. Thomas Vahlenkamp

Betreuer: Prof. Dr. Martin Pfeffer

Gutachter: Prof. Dr. Martin Pfeffer, Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen,
Universität Leipzig, Leipzig

Prof. Dr. Reinhard Straubinger, Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen, Ludwig-
Maximilians-Universität München, München

Tag der Verteidigung: 24.05.2022

Für meine Familie

Inhalt

1	Einleitung.....	1
2	Literaturübersicht.....	3
2.1	<i>Leptospira</i> spp.	3
2.1.1	Taxonomie und Morphologie von <i>Leptospira</i> spp.....	3
2.1.2	Verbreitung von <i>Leptospira</i> spp.	3
2.1.3	Übertragungszyklus von <i>Leptospira</i> spp.....	4
2.1.3.1	Transmission.....	4
2.1.3.2	Haupt- und Nebenwirt.....	5
2.1.3.3	Kleinsäuger als Reservoir.....	5
2.1.4	Klinik der Leptospirose	6
2.1.4.1	Leptospirose des Menschen.....	6
2.1.4.2	Leptospirose der Nutz- und Haustiere	7
2.1.5	Diagnostik von <i>Leptospira</i> spp.....	9
2.2	Die Rötelmaus (<i>Clethrionomys glareolus</i>)	10
2.2.1	Taxonomie und Morphologie der Rötelmaus	10
2.2.2	Verbreitung der Rötelmaus	10
2.2.3	Populationsdynamik der Rötelmaus	11
2.2.4	Die Rötelmaus als Reservoir und Überträger von Zoonosen	13
3	Publikation.....	14
4	Diskussion und Schlussfolgerung	34
5	Zusammenfassung.....	43
6	Summary.....	45
7	Referenzen	47
7.1	Literaturverzeichnis.....	47
7.2	Abbildungsverzeichnis	59
7.3	Tabellenverzeichnis	59
8	Danksagung.....	60

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
df	Freiheitsgrad/degree of freedom
DWD	Deutscher Wetterdienst
ELISA	Enzyme-linked-Immuno-Sorbent Assay
EMJH	Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris
FLI	Friedrich Löffler-Institut
FSMEV	Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus
g	Gramm
IgM	Immunglobulin M
KI	Konfidenzintervall
<i>L.</i>	<i>Leptospira</i>
LAVES	Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
m ü. NN	Meter über Normalnull
MAT	Mikroagglutinationstest
MLST	Multi-Lokus Sequenztypisierung/Multi Locus Sequencing Typing
mm	Millimeter
MULNV	Ministerium für Umwelt, Landwirtschaft, Natur- und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen
NW-FWA	Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt
p	Signifikanzwert
PCR	polymerase chain reaction
pH	potentia hydrogenii
PubMLST	Public databases for molecular typing and microbial genome diversity
PUUV	Puumala Orthohantavirus
RKI	Robert Koch-Institut
SLST	Single-Lokus-Sequenztypisierung/Single locus sequence typing
spp.	species pluralis
ST	Sequenztyp
TI	Thünen-Institut
UV	Ultraviolett
WHO	Weltgesundheitsorganisation
χ ²	Chi-Quadrat

1 Einleitung

Die Leptospirose ist eine weltweit vorkommende Zoonose. Es wird geschätzt, dass jährlich über eine Million Menschen daran erkranken (COSTA et al. 2015). Der Krankheitsverlauf beim Menschen ist häufig unspezifisch mit grippeähnlichen Symptomen, aber schwere Krankheitsverläufe mit Fieber, Ikterus, Nierenversagen und Lungenblutungen können auftreten. Die Sterblichkeit liegt bei 5% aller bestätigten Leptospirosefälle (COSTA et al. 2015, MUNOZ-ZANZI et al. 2020). Aufgrund des häufig unspezifischen Krankheitsverlaufes und einem geringen Bewusstsein für die Erkrankung, wird die Leptospirose meist nicht diagnostiziert, weshalb von einer hohen Dunkelziffer an Patienten auszugehen ist (BROCKMANN et al. 2016, ELLIS et al. 2008).

Die Leptospirose des Menschen ist in Süd-, Lateinamerika und Asien endemisch. Extreme Wetterereignisse wie Starkregen und Überflutungen, sowie schlechte Hygieneverhältnisse sind oft der Grund für Krankheitsausbrüche (LAU et al. 2018, MUNOZ-ZANZI et al. 2020). Die Ansteckung des Menschen erfolgt über den direkten Kontakt zu infizierten Tieren oder durch Kontakt zu kontaminiertem Wasser oder Schlamm. Eintrittspforten sind hierbei Verletzungen und die serösen Schleimhäute (BHARTI et al. 2003).

Jedes Säugetier kann an Leptospirose erkranken und ein potentieller Überträger sein (ELLIS. 2015). Eine besondere Rolle nehmen jedoch Kleinsäuger ein. Nach der Ansteckung sind Kleinsäuger persistent infiziert und scheiden Leptospiren lebenslang über den Urin aus. Aufgrund ihrer weiten Verbreitung und teilweise engen Kontaktes zu Menschen, sind sie eine wichtige Infektionsquelle (BHARTI et al. 2003). Vorangegangene Studien zeigen eine weite Verbreitung von *Leptospira* spp. in Kleinsäugetieren verschiedener Spezies mit einer Prävalenz von 6% bis 21,3% in Deutschland (FISCHER et al. 2018, JESKE et al. 2021b, MAYER-SCHOLL et al. 2014, OBIEGALA et al. 2017, OBIEGALA et al. 2016). Die Rötelmaus (*Clethrionomys glareolus*) ist eine in Deutschland und Europa weit verbreitete Kleinsäugetierspezies. Sie besiedelt Wälder, Heiden und Gebüschlandschaften. Neben ländlichen Regionen werden auch urbane Gebiete wie Parks, Industriegebiete und Gärten bewohnt (AULAGNIER et al. 2009). Es ist bekannt, dass es alle zwei bis drei Jahre zu einer Massenvermehrung aufgrund der Buchenmast kommen kann (IMHOLT et al. 2017). Trotz der weiten Verbreitung und dem potentiell engen Kontakt zu Menschen gibt es bisher nur wenige Studien zur Verbreitung von Leptospiren in Rötelmäusen. In vorangegangenen Studien wurden vordergründig die Prävalenz und die Verbreitung verschiedener Leptospirenspezies untersucht. Der Einfluss von Populationsdichte, Saison und individueller Faktoren auf die Prävalenz in Rötelmäusen wurde bisher wenig untersucht. Ziel dieser Studie war es daher die Verbreitung von *Leptospira* spp. in Rötelmäusen in einem zusammenhängenden Gebiet in Teilen Nordrhein-Westfalens und Niedersachsens zu analysieren. Neben der Prävalenz sollten die Speziesverteilung und die vorkommenden Sequenztypen bestimmt werden. Um einen detaillierten

Einblick in die Infektionsdynamik von *Leptospira* spp. zu erhalten, sollte zusätzlich der Einfluss individueller Faktoren wie Gewicht und Geschlecht, sowie von Jahreszeit und Abundanz auf die Prävalenz von *Leptospira* spp. in Rötelmäusen untersucht werden.

2 Literaturübersicht

2.1 *Leptospira* spp.

2.1.1 Taxonomie und Morphologie von *Leptospira* spp.

Die Leptospirose wird nach ihrem Erstbeschreiber Adolf Weil (1848 – 1916) auch Weilsche Krankheit genannt. Die Bakterien wurden 1907 erstmals in der Niere eines verstorbenen Patienten beschrieben und konnten 1914 von japanischen Wissenschaftlern isoliert und angezüchtet werden (ADLER. 2015, STIMSON. 1907, INADA et al. 1915). In antiken Berichten aus Asien wird das Krankheitsbild des „Reisfiebers“ mit Symptomen ähnlich der Leptospirose beschrieben. In anderen Regionen der Welt gibt es ebenfalls Berichte über Herbstfieber, Schlammfieber oder die Schweinehüterkrankheit. Es ist daher zu vermuten, dass das Krankheitsbild der Leptospirose schon vor der Erstbeschreibung bekannt war (ADLER. 2015).

Leptospiren sind spiralgig gebogene Bakterien mit hakenförmigen Enden, die zur Gruppe der Spirochäten gehört. Der Erreger ist circa 6-20 µm lang und 0,1 µm im Durchmesser breit (CAMERON. 2015). Im Periplasma befinden sich Endoflagellen. Diese geben dem Bakterium seine spiralgige Form und ermöglichen eine eigenständige Fortbewegung (CHARON und GOLDSTEIN. 2002).

Innerhalb der Gattung *Leptospira* erfolgt eine Unterscheidung in 66 Spezies, die entsprechend ihrer Virulenz in pathogen und saprophytisch unterschieden werden. Zusätzlich erfolgt eine Einteilung in jeweils zwei Untergruppen (P1, P2, S1, S2) (PICARDEAU. 2020, CAIMI und RUYBAL. 2020). Mittels serologischer Untersuchung werden Leptospirenspezies in Serogruppen und in über 300 Serovare unterteilt. Mehrere Serovare können hierbei mehreren Serogruppen zugeordnet werden (CAIMI und RUYBAL. 2020). Auf molekularbiologischer Ebene kann weiterhin der Sequenztyp ermittelt werden. Der Sequenztyp kann einer Spezies und einem oder mehrerer Serovare und Serogruppen zugeordnet werden (CAIMI und RUYBAL. 2020, BOONSILP et al. 2013).

2.1.2 Verbreitung von *Leptospira* spp.

Leptospirose ist eine weltweit vorkommende zoonotische Erkrankung, mit über 1,03 Millionen humanen Fällen jährlich (COSTA et al. 2015). In tropischen und subtropischen Regionen kommt es vor allem in Folge starker Regenfälle und Überflutungen zu regelmäßigen Ausbrüchen (LAU et al. 2018, MUNOZ-ZANZI et al. 2020).

Besonders betroffen sind Entwicklungsländer mit niedrigen Hygienestandards und extensiver Landwirtschaft (BHARTI et al. 2003). Sowohl urbane als auch ländliche Regionen können gleichermaßen betroffen sein (BHARTI et al. 2003). In einer retrospektiven Studie zu Leptospirose-Ausbrüchen im Zeitraum 1970 – 2012 wurde ermittelt, dass die häufigsten Ausbrüche in Lateinamerika

und der Karibik (35,8%) gemeldet wurden, gefolgt von Südasien (12,9%) und Nordamerika (10,7%) (MUNOZ-ZANZI et al. 2020).

Feld-, Forst-, Minenarbeiter, Landwirte, Fleischer und Tierärzte sind aufgrund ihres engen Kontaktes zu Wild- und Nutztieren einem besonders hohen Infektionsrisiko mit *Leptospira* spp. ausgesetzt (LEVETT. 2001, BHARTI et al. 2003).

Weiterhin sind Outdoor- und Wassersportler einem erhöhten Risiko ausgesetzt. Zum Beispiel infizierten sich 80 Triathleten mit Leptospirose bei der Teilnahme am „Eco-Challenge multisport race“ 2000 in Malaysia (SEJVAR et al. 2003). Die private Haltung von Haustieren, insbesondere Ratten, erhöht ebenfalls das Risiko einer Infektion (BROCKMANN et al. 2016, MORI et al. 2017).

Leptospirose ist nicht nur eine Gefahr in tropischen Ländern, sondern stellt ebenfalls in gemäßigten Klimazonen eine Gefahr für die Öffentliche Gesundheit dar. In Deutschland schwankt die humane Inzidenz seit dem Beginn der Meldepflicht 2001 zwischen 0,06 und 0,24 Fällen pro 100.000 Einwohnern (RKI, SurvStat@RKI 2.0, <https://survstat.rki.de/>, Abrufdatum: 18.08.2021). Lokale Ausbrüche unter Erntehelfern wurden 2007 in Nordrhein-Westfalen und 2014 in Niedersachsen dokumentiert (DESAI et al. 2009, FIECEK et al. 2017, RKI. 2015b). Weiterhin erkrankten 2007 in Deutschland 5 Sportler nach Teilnahme an einem Triathlon bei Heidelberg. Infektionsquelle war die Schwimmdisziplin im Fluss Neckar (BROCKMANN et al. 2010).

Im Jahr 2019 wurde eine hohe Anzahl an gemeldeten Krankheitsfällen (n=159) dokumentiert. Die Ansteckung erfolgte bei über 64% der Fälle vermutlich in Deutschland und konnte keinem lokalen Ausbruch zugeordnet werden (RKI. 2020). Ein leichter Rückgang humaner Leptospirosefälle (n=118) wurde im Jahr 2020 verzeichnet, aber 83% der Erkrankungen wurden wahrscheinlich in Deutschland erworben (RKI. 2021). Die geografische Verbreitung stellte sich 2020 unterschiedlich dar. Die meisten Fälle wurden in Süd- und Westdeutschland festgestellt (Baden-Württemberg: 26 Fälle, Bayern: 25 Fälle, Nordrhein-Westfalen: 18 Fälle). Es wurde aber in jedem Bundesland mindestens ein Fall humaner Leptospirose verzeichnet (RKI, SurvStat@RKI 2.0, <https://survstat.rki.de/>, Abrufdatum 07.12.2021). Der hohe Anteil an in Deutschland erworbener Infektionen und die weite geografische Verbreitung zeigen, dass Leptospiren in Deutschland eine potentielle Gefahr für die Öffentliche Gesundheit darstellen.

2.1.3 Übertragungszyklus von *Leptospira* spp.

2.1.3.1 Transmission

Nach Infektion mit Leptospiren persistieren die Erreger im proximalen Nierentubulus von Tieren und Menschen. Die Bakterien werden über den Urin ausgeschieden und in der Umwelt verbreitet (BHARTI et al. 2003). Das Überleben von *Leptospira* spp. ist außerhalb des Wirtes abhängig von Feuchtigkeit der Umgebung, Temperatur, pH-Wert und UV-Strahlung (BIERQUE et al. 2020, NAU et al. 2020). In

verdünntem Tierurin überleben Leptospiren bis zu drei Tage nach der Ausscheidung. In stehenden und langsam fließenden Gewässern können sich die Bakterien ausbreiten (NAU et al. 2020).

Die Ansteckung erfolgt durch direkten Kontakt zu Urin infizierter Tiere, oder indirekt durch Kontakt zu kontaminiertem Wasser oder Schlamm (BHARTI et al. 2003). Mögliche Eintrittspforten sind hierbei die Schleimhäute der Augen, Mund, Nase und Genitaltrakt, Verletzungen der Haut und orale Aufnahme (STERN et al. 2010, BHARTI et al. 2003, HAAKE und LEVETT. 2015). Zusätzlich ermöglicht die Persistenz auf genitalen Schleimhäuten eine horizontale und vertikale Übertragung innerhalb einer Wirtspopulation (ELLIS. 2015).

2.1.3.2 Haupt- und Nebenwirt

Die verschiedenen Serovare von *Leptospira* spp. haben sich an verschiedene Spezies als Haupt- und Nebenwirt angepasst und unterscheiden sich im Krankheitsbild teils erheblich. Nahezu jedes Säugetier kann sich mit *Leptospira* spp. infizieren und als Haupt- oder Nebenwirt fungieren (ELLIS. 2015).

Die Adaptation von Leptospiren an den Hauptwirt ist sehr eng, sodass kaum klinische Veränderungen auftreten. Der Hauptwirt dient als Reservoir und ist hoch empfänglich für eine Infektion.

Nebenwirte hingegen entwickeln teilweise schwere Krankheitsverläufe, die durch Fieber, Ikterus, verminderte Fruchtbarkeit und Multiorganversagen gekennzeichnet sind.

In Tabelle 1 sind die wichtigsten *Leptospira* Serovare mit ihren Haupt- und Nebenwirten dargestellt.

Tabelle 1 Leptospira Serovare und assoziierte Haupt- und Nebenwirte

Serovar	Hauptwirt	Nebenwirt
Icterohaemorrhagiae	Ratten	Menschen, Haustiere
Grippotyphosa	Nagetiere	Rinder, Schweine, Pferde, Hunde
Hardjo	Rinder, Schafe	Menschen
Canicola	Hunde	Schweine, Rinder
Pomona	Schweine, Rinder	Schafe, Pferde, Hunde
Bratislava	Schweine, Igel, Pferde	Hunde
Mozdok	Brandmäuse	Rinder, Schweine, Schafe, Ziegen, Pferde

(STRAUBINGER. 2015, BHARTI et al. 2003, LEVETT. 2001, QUINN et al. 2011, ATXAERANDIO et al. 2005, BOLIN et al. 1991)

2.1.3.3 Kleinsäuger als Reservoir

Eine große Bedeutung im Übertragungszyklus von Leptospiren haben Kleinsäuger, da sie Wirt vieler Leptospirenspezies sind und somit das natürliche Reservoir von Leptospiren bilden. Aufgrund ihrer

weiten Verbreitung und ihrem potentiell engen Kontakt zu Menschen und Nutztieren, sind sie eine wichtige Infektionsquelle (BHARTI et al. 2003, THIERMANN. 1981, KOIZUMI et al. 2009). Es konnte nachgewiesen werden, dass Leptospiren in den Nieren infizierter Kleinsäuger persistieren. Die Infektion führt zu geringgradigen Veränderungen des Epithels und einer diffusen interstitiellen Nephritis (STERLING und THIERMANN. 1981). Es wird jedoch davon ausgegangen, dass Kleinsäuger symptomlos sind und die Infektion mit Leptospiren keinen Einfluss auf die Gesundheit der Tiere hat. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass humane Fälle auf den Kontakt zu infizierten Nagetieren und deren Urin zurück zu führen sind (DESAI et al. 2009, AVIAT et al. 2009, MASUZAWA et al. 2006). Weltweit schwankt die Prävalenz in Kleinsäufern je nach Region und Spezies. In der Wanderratte (*Rattus norvegicus*) konnten Prävalenzen von 1,7% bis zu über 70% nachgewiesen werden (BOEY et al. 2019). In Europa zeigten Untersuchungen verschiedener Kleinsäugerspezies unterschiedliche Prävalenzen: 5,3% in den Niederlanden (KRIJGER et al. 2020), 7,3% in Österreich (SCHMIDT et al. 2014), 10,4% in Korsika, Frankreich (IZQUIERDO-RODRÍGUEZ et al. 2020), 3,1% - 12% in der Tschechischen Republik (BALÁŽOVÁ et al. 2021), 7,9% - 12% in Spanien (MILLÁN et al. 2018, JESKE et al. 2021a) und bis zu 21,5% in Kroatien (TADIN et al. 2016). Mehrere Studien in Deutschland dokumentierten eine Prävalenz von 6% bis 21,3% in Kleinsäufern (OBIEGALA et al. 2017, JESKE et al. 2021b, FISCHER et al. 2018, OBIEGALA et al. 2016, MAYER-SCHOLL et al. 2014, RUNGE et al. 2013, HEUSER et al. 2017, KOCIANOVÁ et al. 1993).

Bestimmte Spezies und Serovare von *Leptospira* spp. können einer bestimmten Wirtsspezies zugeordnet werden, zum Beispiel ist *L. kirschneri* Serovar Grippotyphosa in Feldmäusen (*Microtus arvalis*) verbreitet und *L. interrogans* Serovar Icterohaemorrhagiae in Wanderratten (FISCHER et al. 2018, JESKE et al. 2021b, HEUSER et al. 2017, BOEY et al. 2019). Im Gegensatz dazu wurden in Rötelmäusen, Waldmäusen (*Apodemus sylvaticus*), Gelbhalsmäusen (*Apodemus flavicollis*) und Spitzmäusen unterschiedliche Leptospirenspezies gefunden: *L. interrogans*, *L. kirschneri* und *L. borgpetersenii* (FISCHER et al. 2018, JESKE et al. 2021a, JESKE et al. 2021b, MAYER-SCHOLL et al. 2014, OBIEGALA et al. 2016).

2.1.4 Klinik der Leptospirose

2.1.4.1 Leptospirose des Menschen

Die humane Leptospirose verläuft häufig subklinisch oder mit nur milden, erkältungsähnlichen Symptomen (BHARTI et al. 2003). Aber auch schwere Verlaufsformen mit einer durchschnittlichen Sterblichkeitsrate von 5% bis 6,9% sind möglich (MUNOZ-ZANZI et al. 2020, COSTA et al. 2015).

Nach Eindringen in den Körper und Übertritt in den Blutstrom folgt eine unspezifische Phase mit plötzlich einsetzendem Fieber, Schüttelfrost, Kopfschmerz, unproduktivem Husten und

Muskelschmerz. In den ersten 7 Tagen kann eine Bakteriämie nachgewiesen werden, die nach 10 Tagen von Antikörpern neutralisiert wird (KARPAGAM und GANESH. 2020, HAAKE und LEVETT. 2015). Der Patient kann, auch ohne Therapie, nach dieser Phase vollständig genesen. An die initiale Phase kann sich eine zweite Phase mit schwerwiegender Organmanifestation schließen. Bei schweren Verlaufsformen kommt es zu Meningitis, Pankreatitis, reduzierter Leber- und Nierenfunktion mit einhergehenden abdominalen Beschwerden, Ikterus und Hämorrhagien (KARPAGAM und GANESH. 2020, HAAKE und LEVETT. 2015). Eine sehr schlechte Prognose haben Patienten im Endstadium mit Multiorganversagen und Hämorrhagien der Lunge (HAAKE und LEVETT. 2015).

Aufgrund ähnlicher Symptome ist die Unterscheidung zu anderen Infektionskrankheiten wie Malaria, Dengue Fieber oder Influenza schwierig (COSTA et al. 2015, ELLIS et al. 2008). Typisch für Leptospirose sind stark dilatierte Konjunktivalgefäße und Hämorrhagien sowie Ikterus (HAAKE und LEVETT. 2015). Eine sofortige Behandlung mit Antibiotika wird nach Diagnose der Leptospirose empfohlen. Zum Einsatz kommen je nach Schweregrad Penicillin, Amoxicillin, Ampicillin, Doxycyclin, Erythromycin und Cephalosporine der dritten Generation (WHO. 2003).

Spätfolgen sind in Form von Uveitis, chronischer Müdigkeit und kardialen Veränderungen möglich (HAAKE und LEVETT. 2015).

Die humane Leptospirose ist laut §7 Infektionsschutzgesetz in Deutschland meldepflichtig. Eine Impfung für den Menschen ist in Deutschland nicht zugelassen (RKI. 2015a).

2.1.4.2 Leptospirose der Nutz- und Haustiere

Neben dem Menschen können auch Haus-, Nutz- und Wildtiere klinische Symptome einer Leptospirose entwickeln (ELLIS. 2015, ŽELE-VENGUŠT et al. 2021). In der folgenden Tabelle 2 sind die Symptome der wichtigsten Haus- und Nutztiere dargestellt.

Wie in Tabelle 2 ersichtlich, verläuft die Erkrankung in Nutztieren meist mit geringer Klinik. Durch die persistente Ausscheidung kommt es unbemerkt zur gegenseitigen Ansteckung der Tiere. Dadurch besteht ein erhöhter Infektionsdruck bei Haltung großer Herden und verschiedener Spezies auf gleichen Weideflächen (ELLIS. 2015, RYAN et al. 2012).

Aufgrund von reduzierter Milchleistung, Fruchtbarkeit und Geburt lebensschwacher Kälber und Ferkeln, steht die Leptospirose vor allem als wirtschaftlicher Verlust im Vordergrund. Persistent infizierte Nutztiere bilden aber immer ein potentielles Reservoir und sollten deshalb auch als mögliche Ansteckungsquelle für den Menschen betrachtet werden.

Tabelle 2 Klinisches Erscheinungsbild der Leptospirose in Nutz- und Haustieren

Tierart	Symptome	Quelle
Rind	<ul style="list-style-type: none"> • Selten akute Erkrankung mit Fieber, Ikterus, Hämoglobinurie und Anämie • Meist chronischer Verlauf, gekennzeichnet durch Milchrückgang, Abort und Geburt lebensschwacher Kälber • Bis zu 20 Monate Persistenz möglich 	(ELLIS. 2015, LILENBAUM und MARTINS. 2014, STRAUBINGER. 2015)
Schaf	<ul style="list-style-type: none"> • In Deutschland meldepflichtig laut §1TKrMeldpfIV • Selten akute Erkrankung mit Hämaturie, Hämoglobinurie, Ikterus, Abort • Chronische Erkrankung mit reduzierter Milchleistung und Fruchtbarkeit • Meist subklinische Infektion mit persistierender Ausscheidung 	(ELLIS. 2015, MARTINS et al. 2012)
Schwein	<ul style="list-style-type: none"> • In Deutschland meldepflichtig laut §1TKrMeldpfIV • Subklinischer bis fataler Verlauf möglich • Adult: meist subklinisch mit chronischer Minderung der Fruchtbarkeit, Abort und Geburt lebensschwacher Ferkel • Jungtiere: schwere Verlaufsformen mit Hämorrhagien, Ikterus und Nierenversagen möglich 	(STRAUBINGER. 2015) (ELLIS. 2015)
Pferd	<ul style="list-style-type: none"> • Meist subklinischer Verlauf • Selten akuter Verlauf mit Ikterus, Hämoglobinurie und Nierenversagen, Abort und Geburt lebensschwacher Fohlen • Chronisch wird die Leptospirose als Ursache der Equinen Rezidivierenden Uveitis (ERU) diskutiert 	(ELLIS. 2015, CIBULSKI und WOLLANKE. 2016, STRAUBINGER. 2015)
Hund	<ul style="list-style-type: none"> • Akute Erkrankung mit Anorexie, Vomitus, gastrointestinalen Symptomen, Fieber, Ikterus, Pankreatitis, Niereninsuffizienz, Polyurie, Polydipsie, Schwäche und Muskelschmerz • Impfung gegen <i>Leptospira interrogans</i> Serovar Canicola, Icterohaemorrhagiae, Australis und Grippotyphosa vorhanden 	(SCHULLER et al. 2015, RKI. 2015a)
Katze	<ul style="list-style-type: none"> • Meist subklinisch, aber persistenter Träger 	(WEIS et al. 2017)

2.1.5 Diagnostik von *Leptospira* spp.

Leptospiren können abhängig vom Probenmaterial und Zweck der Untersuchung direkt oder indirekt nachgewiesen werden.

In den ersten 10 Tagen nach Infektion kann in Folge der Bakteriämie der Erreger direkt im Blut nachgewiesen werden. 5-7 Tage nach Beginn der Symptome können Antikörper mittels Mikroagglutinationstest (MAT) nachgewiesen werden. Dies gilt als Goldstandard in der humanmedizinischen Diagnostik (CAMERON. 2015). Weiterhin möglich ist der Nachweis von spezifischem Immunglobulin M (IgM) mittels Enzyme-linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA) (ADLER et al. 1980).

Ein direkter Erregernachweis kann aus Blut, Urin und Organgewebe (post mortem) des Patienten durchgeführt werden. Nach Anzucht im Spezialmedium (EMJH-Medium) kann *Leptospira* unter dem Dunkelfeldmikroskop oder durch Silberimprägnation sichtbar gemacht werden. Eine Anzucht aus Probenmaterial ist sehr anspruchsvoll und zeitintensiv und eignet sich deshalb nicht zur Schnelldiagnose am Patienten (CAMERON. 2015).

Molekularbiologisch können Leptospiren mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nachgewiesen werden. Hierbei wird zuerst auf das partielle *lipL32* Gen mittels real-time PCR untersucht (GRAVEKAMP et al. 1993, STODDARD et al. 2009). Im nächsten Schritt kann durch Single-Lokus-Sequenztypisierung (SLST) des *secY* Abschnitts oder *gyrB* Abschnitts eine Unterscheidung der Spezies erfolgen (VICTORIA et al. 2008, SLACK et al. 2006). Zur Bestimmung des Sequenztypes (ST) werden in einer Multi-Lokus-Sequenztypisierung (MLST) sieben spezifische Genabschnitte sequenziert (BOONSILP et al. 2013, AHMED et al. 2006). Die Sequenztypen können anschließend den Serogruppen und Serovaren zugeordnet werden.

2.2 Die Rötelmaus (*Clethrionomys glareolus*)

2.2.1 Taxonomie und Morphologie der Rötelmaus

In der Ordnung Rodentia ist die Superfamilie der Muroidea (Unterordnung Myomorpha) die größte Teilgruppe. Sie ist weltweit mit über 1500 Arten verbreitet (HUTTERER und MAIER. 2010). Die in der Studie untersuchten Rötelmäuse gehören zur Unterfamilie Arvicolinae (Wühlmäuse) der Familie Cricetidae (Hamsterartige) (AULAGNIER et al. 2009).

Mit einer Kopf-Rumpf-Länge von 80 – 120 mm und einem Körpergewicht von 15 – 40 g ist die Rötelmaus ein kleiner Vertreter dieser Unterfamilie. Der Schwanz ist mäßig lang (Schwanzlänge 35 – 60 mm, 50% der Kopf-Rumpf-Länge), stark behaart und endet mit einem kleinen Pinsel. Das Fell von Rücken und Seiten ist rötlich-braun, die Unterseite ist deutlich abgesetzt silbrig-grau (AULAGNIER et al. 2009). Die Rötelmaus ist ein Pflanzenfresser und ernährt sich vorwiegend von Samen, Früchten und Knospen, gelegentlich werden auch kleine Wirbellose verzehrt (AULAGNIER et al. 2009).

2.2.2 Verbreitung der Rötelmaus

Das größtenteils dämmerungsaktive Tier kommt in Laub-, Misch- und Nadelwäldern vor, kann aber alle Biotope Mittel-, Nord- und Osteuropas bis zu einer Höhe von 2600m ü. NN besiedeln. Voraussetzung sind ausreichend Buschwuchs und Hochstauden mit vereinzelt Bäumen (AULAGNIER et al. 2009). Aufgrund der Isolation einzelner Rötelmauspopulationen während der letzten Eiszeit, kam es zur Ausbildung verschiedener genetischer Linien (Karpatische Linie, Westliche Linie, Östliche Linie, Spanische Linie, Italienische Linie, Balkan-Linie, Kalabrische Linie und Ural-Linie). Aufgrund der unterschiedlichen Genetik können Rückschlüsse über die Wiederbesiedlung nach der Eiszeit gezogen werden (FILIPI et al. 2015). Phänotypisch unterscheiden sich die Linien jedoch nur in der Ausprägung der molaren Backenzähne (LEDEVIN et al. 2010). In Deutschland ist vor allem die Westliche Linie vertreten. Im Nordosten von Deutschland kann auch die Östliche und die Karpatische Linie gefunden werden (Abbildung 1).

Bei ausreichender Krautschicht besiedeln Rötelmäuse auch urbane Gebiete wie Parks, Gartenanlagen, Neubaugebiete und Industriegebiete. Im Winter kann es zum Eindringen in Häuser kommen (WOLF. 2009). Ein enger Kontakt des Menschen zu Rötelmäusen und deren Exkrementen ist dadurch wahrscheinlich.

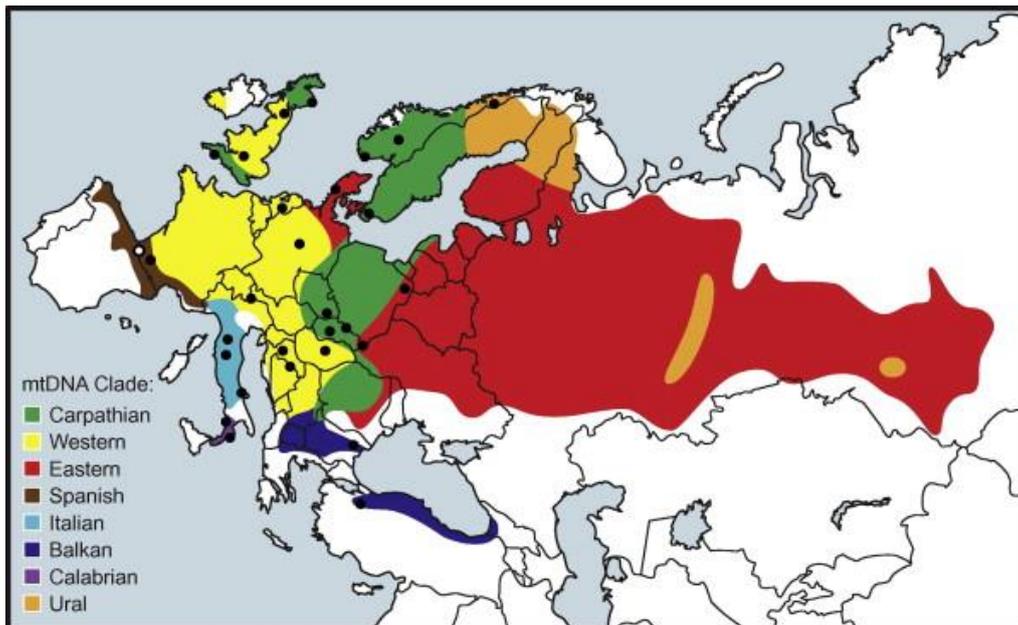


Abbildung 1 Verbreitung der Rötelmaus in Europa und Vorderasien und farblich markiert die Verbreitung der genetischen Linien (mtDNA Clade), Abbildung nach FILIPI et al. (2015)

2.2.3 Populationsdynamik der Rötelmaus

Die Populationsdichte der Rötelmaus unterliegt in Europa starken Schwankungen. Das Überleben von Rötelmäusen ist abhängig von Klima, Vegetation, Nahrungsangebot und Anzahl der Prädatoren. Extreme Wetterereignisse können zu einer erhöhten Mortalität führen, aber auch durch günstige Bedingungen das Nahrungsangebot steigern und die Reproduktion fördern (IMHOLT et al. 2015, JACOB. 2008).

In regelmäßigen Abständen kommt es zu einer Massenvermehrung der Rötelmaus, mit einem Anstieg der Population um bis zu das Fünffache im Vergleich zu Jahren mit niedriger Abundanz (REIL et al. 2018). Die Abundanzschwankungen treten regional unterschiedlich stark ausgeprägt auf und werden in Mitteleuropa alle 2 – 3 Jahre beobachtet (IMHOLT et al. 2017, CLEMENT et al. 2009, BINDER et al. 2020).

In Deutschland ist die Populationsdichte der Rötelmaus stark an das vorhandene Nahrungsangebot geknüpft und weniger von der Anzahl der Prädatoren beeinflusst (REIL et al. 2018). Die Rötelmaus lebt vorwiegend in Wäldern und ernährt sich pflanzlich von Knospen, Samen und Früchten (AULAGNIER et al. 2009, WOLF. 2009). Die in deutschen Wäldern am häufigsten vertretene Laubbaumspezies ist mit 15% die Buche (TI, <https://bwi.info.de>, Abrufdatum: 20.10.2021). In regelmäßigen Abständen kommt es zu einer gesteigerten Samenproduktion der Buche, der sogenannten Buchenmast (IMHOLT et al. 2017). Die Ausprägung der Buchenmast ist regional unterschiedlich stark und abhängig von Klimabedingungen und der Verfügbarkeit von Ressourcen, wie Wasser und Stickstoff (SMAILL et al.

2011, BINDER et al. 2020). Das gesteigerte Nahrungsangebot führt zu einer erhöhten Überlebensrate im Winter und einer vermehrten Reproduktion. Milde Temperaturen im Winter verstärken diesen Effekt zusätzlich und ermöglichen die Fortpflanzung auch im Winter (CLEMENT et al. 2009, IMHOLT et al. 2017). Im darauffolgenden Jahr kann eine überdurchschnittliche Vermehrung der Rötelmaus beobachtet werden. Beispielsweise dokumentierten Reil et al. (2015) im Jahr 2011 eine um 65% erhöhte Buchenmastintensität als im Vorjahr 2010, was zu einer Steigerung der Rötelmausabundanz um das Fünffache im Folgejahr 2012 führte. In den Jahren ohne vorherige Buchenmast, war die Abundanz auf einem niedrigen Niveau (Abbildung 2).

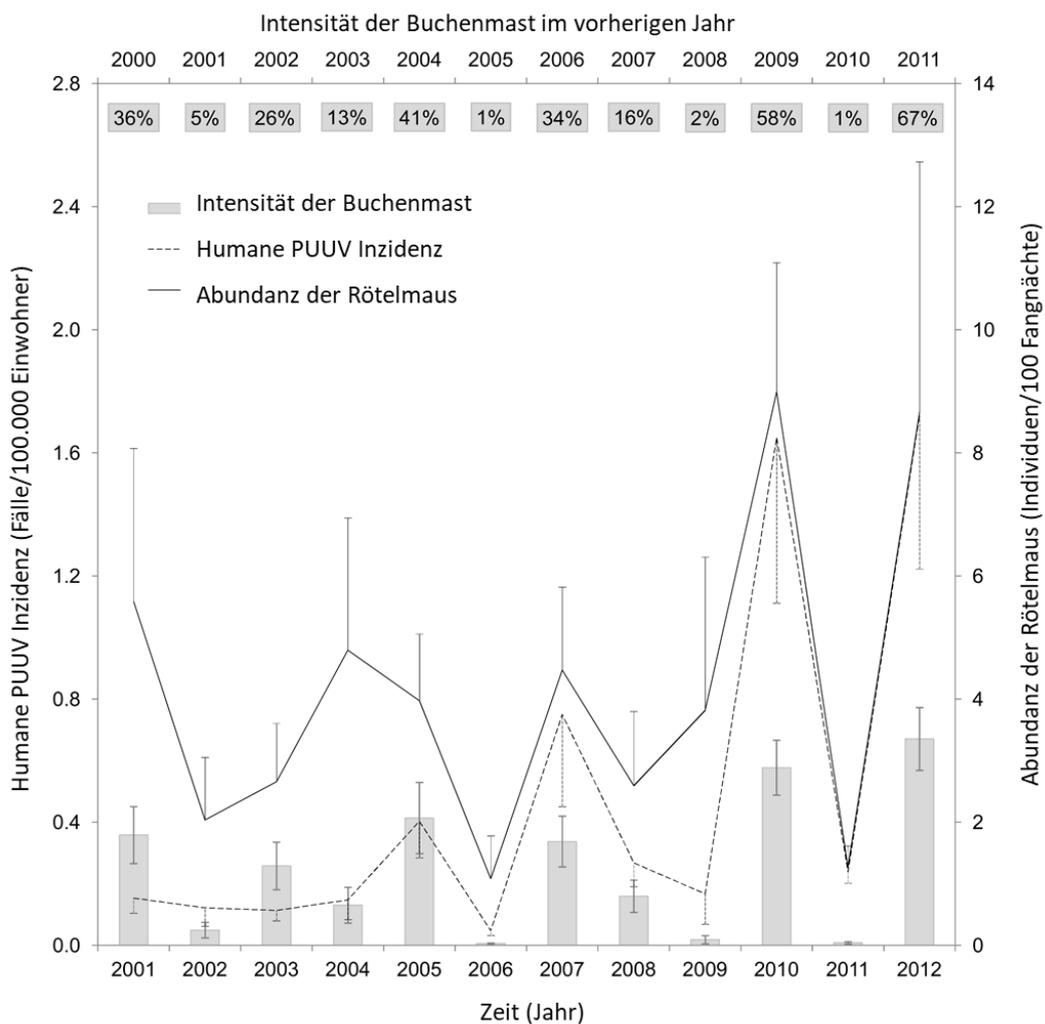


Abbildung 2 Zusammenhang von Buchenmastintensität, Rötelmausabundanz und humaner PUUV Inzidenz, Abbildung modifiziert nach REIL et al. (2015)

In mehreren Studien konnte der Zusammenhang zwischen der Intensität der Buchenmast und der Vermehrung der Rötelmaus statistisch belegt werden (BINDER et al. 2020, REIL et al. 2015, IMHOLT et al. 2017). Eine Vorhersage der Massenvermehrung wird dadurch ermöglicht (REIL et al. 2018). Aufgrund des Klimawandels, und damit einhergehenden mildereren Temperaturen, könnte es in Zukunft häufiger zu Jahren mit Massenvermehrung der Rötelmaus kommen (IMHOLT et al. 2015). Dies ist

problematisch, da das massenhafte Auftreten von Rötelmäusen zu Schäden in der Forstwirtschaft führt. Zusätzlich erhöht sich die Gefahr der Übertragung zoonotischer Erreger auf den Menschen (IMHOLT et al. 2017, REIL et al. 2017). Beispielsweise steigt die Inzidenz humaner Puumala-Orthohantavirus-Fälle mit steigender Rötelmausabundanz (Abbildung 2). Ursache hierfür ist die hohe Durchseuchung der Population, die erhöhte Viruslast und die erhöhte Wahrscheinlichkeit mit dem Menschen in Kontakt zu kommen (REIL et al. 2015, REIL et al. 2017).

2.2.4 Die Rötelmaus als Reservoir und Überträger von Zoonosen

Die Rötelmaus ist empfänglich für eine Vielzahl zoonotischer Erreger und bildet somit eine potentielle Ansteckungsquelle für den Menschen, sowie Haus- und Nutztiere. In mehreren Studien wurden folgende Zoonoseerreger in Rötelmäusen nachgewiesen: Puumala Orthohantavirus (PUUV), Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus (FSMEV), *Borrelia* spp., *Bartonella* spp., *Rickettsia* spp., *Francisella tularensis*, *Campylobacter jejunii*, Cowpoxvirus und Arenavirus (JESKE et al. 2019, GRZYBEK et al. 2019, ECKE et al. 2020, WILLIAMS et al. 2010, BUFFET et al. 2012, GALFSKY et al. 2019, MICHELITSCH et al. 2019, DREWES et al. 2017, BINDER et al. 2020). Das zoonotische Potential von Ljunganvirus und *Hepatozoon* spp. ist nicht abschließend geklärt. Beide Erreger wurden aber ebenfalls bereits in der Rötelmaus nachgewiesen (RIGÓ et al. 2016, FEVOLA et al. 2020).

Leptospiren konnten bereits in mehreren Studien in Rötelmäusen mit einer Prävalenz von 4,1% bis 11,4% dokumentiert werden (FISCHER et al. 2018, MAYER-SCHOLL et al. 2014, OBIEGALA et al. 2016, OBIEGALA et al. 2017, JESKE et al. 2021b). Es wurde beobachtet, dass die Prävalenz je nach Jahr, Jahreszeit und Region schwankt (FISCHER et al. 2018, JESKE et al. 2021b). Der Einfluss der Populationsdichte wurde jedoch nicht betrachtet. Im Gegensatz zur Feldmaus (*Microtus arvalis*), die vor allem mit *L. kirschneri* infiziert ist, wurden in der Rötelmaus sowohl *L. kirschneri*, *L. interrogans* als auch *L. borgpetersenii* nachgewiesen (FISCHER et al. 2018, MAYER-SCHOLL et al. 2014, OBIEGALA et al. 2016).

3 Publikation

Influence of Season, Population and Individual Characteristics on the Prevalence of *Leptospira* spp. in Bank Voles in North-West Germany

Elisabeth Schmidt¹, Anna Obiegala¹, Christian Imholt², Stephan Drewes³, Marion Saathoff⁴, Jona Freise⁴, Martin Runge⁵, Jens Jacob², Anne Mayer-Scholl⁶, Rainer G. Ulrich³ and Martin Pfeffer¹

¹ Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, University of Leipzig, 04109 Leipzig, Germany

² Julius Kühn Institute, Institute for Plant Protection in Horticulture and Forests, Vertebrate Research, 48161 Münster, Germany

³ Friedrich-Loeffler-Institute, Federal Research Institute for Animal Health, Institute of Novel and Emerging Infectious Diseases, 17493 Greifswald-Insel Riems, Germany

⁴ Lower Saxony State Office for Consumer Protection and Food Safety, 26203 Wardenburg, Germany

⁵ Lower Saxony State Office for Consumer Protection and Food Safety, 30173 Hannover, Germany

⁶ German Federal Institute for Risk Assessment, 12277 Berlin, Germany

MDPI, *Biology* **2021**, *10*, 933. <http://doi.org/10.3390/biology1009093>

Stellungnahme zum Eigenanteil an der Publikation

Das Konzept der Studie wurde von Martin Pfeffer und Rainer G. Ulrich als Teilprojekt des Vernetzungsprojekts „Zoonoseerreger-Koinfektionen in Kleinsäugetern“ entwickelt. Die Rötelmausfänge wurden im Rahmen des Projektes „Rodent-borne Pathogens in Public Health“ vom Julius-Kühn-Institut durch Jens Jacob und Christian Imholt, sowie durch das Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) durch Marion Saathoff durchgeführt. Die Sektion der Tiere erfolgte am Friedrich-Löffler-Institut (FLI) durch Stephan Drewes, den Mitarbeitern des FLI und mir. Die labordiagnostische Untersuchung der Nierenproben auf Leptospiren erfolgte durch mich. Die statistische Auswertung erfolgte durch Anna Obiegala und Christian Imholt. Anna Obiegala und Martin Pfeffer unterstützten mich bei der Auswertung der Ergebnisse. Die Literaturrecherche erfolgte durch mich. Das Manuskript wurde unter Anleitung von Martin Pfeffer und Anna Obiegala selbstständig durch mich verfasst und in Zusammenarbeit mit allen Koautoren fertig gestellt. Es wurden keine weiteren als die angegebenen Quellen verwendet.

Article

Influence of Season, Population and Individual Characteristics on the Prevalence of *Leptospira* spp. in Bank Voles in North-West Germany

Elisabeth Schmidt ¹, Anna Obiegala ¹, Christian Imholt ², Stephan Drewes ³ , Marion Saathoff ⁴, Jona Freise ⁴, Martin Runge ⁵, Jens Jacob ² , Anne Mayer-Scholl ⁶, Rainer G. Ulrich ³  and Martin Pfeffer ^{1,*} 

- ¹ Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, University of Leipzig, 04103 Leipzig, Germany; elisabeth.schmidt@vmf.uni-leipzig.de (E.S.); anna.obiegala@vetmed.uni-leipzig.de (A.O.)
 - ² Institute for Plant Protection in Horticulture and Forests, Julius Kühn-Institute (JKI), 48161 Münster, Germany; christian.imholt@julius-kuehn.de (C.I.); jens.jacob@julius-kuehn.de (J.J.)
 - ³ Institute of Novel and Emerging Infectious Diseases, Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Federal Research Institute for Animal Health, 17493 Greifswald-Insel Riems, Germany; stephan.drewes@fli.de (S.D.); rainer.ulrich@fli.de (R.G.U.)
 - ⁴ Lower Saxony State Office for Consumer Protection and Food Safety, 26203 Wardenburg, Germany; marion.saathoff@laves.niedersachsen.de (M.S.); jona.freise@laves.niedersachsen.de (J.F.)
 - ⁵ Lower Saxony State Office for Consumer Protection and Food Safety, 30173 Hannover, Germany; martin.runge@laves.niedersachsen.de
 - ⁶ German Federal Institute for Risk Assessment, 12277 Berlin, Germany; anne.mayer-scholl@bfr.bund.de
- * Correspondence: pfeffer@vetmed.uni-leipzig.de; Tel.: +49-341-9738152



Citation: Schmidt, E.; Obiegala, A.; Imholt, C.; Drewes, S.; Saathoff, M.; Freise, J.; Runge, M.; Jacob, J.; Mayer-Scholl, A.; Ulrich, R.G.; et al. Influence of Season, Population and Individual Characteristics on the Prevalence of *Leptospira* spp. in Bank Voles in North-West Germany. *Biology* **2021**, *10*, 933. <https://doi.org/10.3390/biology10090933>

Academic Editors: Filippo Fratini and Giovanni Cilia

Received: 23 August 2021

Accepted: 15 September 2021

Published: 18 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: Leptospirosis is a worldwide emerging zoonotic disease. Clinical symptoms in humans range from mild flu-like symptoms to severe clinical disease with kidney failure and multiple organ dysfunction. Infections occur after contact with infected animals or through water and soil contaminated by urine of infected animals. Cases are mostly linked to occupational risk groups such as field workers or farmers, but contact with pets and recreational activities like fresh water sports also lead to a higher exposure risk. This study was conducted to evaluate the prevalence and species distribution of *Leptospira* in bank voles in Germany. We analyzed the DNA of 1817 kidney samples and detected a mean prevalence of 7.5% with the following pathogenic *Leptospira* species: *L. interrogans*, *L. kirschneri*, and *L. borgpetersenii*. The individual infection risk in bank voles depended on season, body weight and abundance of bank voles. Even if leptospirosis case numbers in Germany are low, our study shows that pathogenic *Leptospira* spp. are present and a potential source for human infection, which should be recognized by clinicians and veterinarians.

Abstract: Leptospirosis is a worldwide zoonotic disease with more than 1 million human cases annually. Infections are associated with direct contact to infected animals or indirect contact to contaminated water or soil. As not much is known about the prevalence and host specificity of *Leptospira* spp. in bank voles (*Clethrionomys glareolus*), our study aimed to evaluate *Leptospira* spp. prevalence and genospecies distribution as well as the influence of season, host abundance and individual characteristics on the *Leptospira* prevalence. Bank voles, which are abundant and widely distributed in forest habitats, were collected in the years 2018 to 2020 in North-West Germany, covering parts of North Rhine-Westphalia and Lower Saxony. The DNA of 1817 kidney samples was analyzed by real-time PCR targeting the *lipL32* gene. Positive samples were further analyzed by targeting the *secY* gene to determine *Leptospira* genospecies and multilocus sequence typing (MLST) to determine the sequence type (ST). The overall prevalence was 7.5% (95% confidence interval: 6.4–8.9). *Leptospira interrogans* (83.3%), *L. kirschneri* (11.5%) and *L. borgpetersenii* (5.2%) were detected in bank voles. Increasing body weight as a proxy for age increased the individual infection probability. Only in years with high bank vole abundance was this probability significantly higher in males than in females. Even if case numbers of human leptospirosis in Germany are low, our study shows that pathogenic *Leptospira* spp. are present and thus a persisting potential source for human infection.

Keywords: leptospirosis; *Clethrionomys glareolus*; *L. interrogans*; *L. kirschneri*; *L. borgpetersenii*; MLST

1. Introduction

The genus *Leptospira* comprises a large group of spirochetal bacteria, which can be genetically divided into 66 different species or serologically into 24 serogroups with more than 300 serovars [1]. Additionally, *Leptospira* can be assigned to different sequence types (ST) on a genetic base [1,2]. Species of the genus *Leptospira* can also be divided according to their pathogenicity into pathogenic (P) and saprophytic (S) clades and two subclades each (P1, P2, S1, S2). For many species the pathogenicity is not clear yet and they are listed as likely pathogenic [3].

Leptospirosis is a potentially fatal zoonosis with more than 1 million human cases worldwide annually [4]. Highly endemic areas are located in tropical and subtropical regions and are characterized by poor hygiene, heavy rainfall and flooding [5]. Most cases occur in Latin America (35.8%), followed by South Asia (12.9%) [6]. Recent studies show that leptospirosis is also prevalent in highly developed countries with moderate climate [7–13]. The European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) recorded over 1000 confirmed cases in the European Union in the year 2019 [14]. Case numbers in Europe and particularly in Germany are increasing from an incidence of 0.04 per 100,000 inhabitants in 2003 to 0.14 in 2020, with peaks in the years 2014 and 2019 (each ≥ 0.19) [15].

Nearly every mammalian species can either be a main reservoir host or an accidental host for *Leptospira* spp. [16,17]. In main reservoir hosts (e.g., rodents, large and small ruminants, swine, horses, dogs and cats), *Leptospira* spp. persist in the proximal renal tubular epithelium [18]. Mostly without exhibiting clinical symptoms, main reservoir hosts shed *Leptospira* spp. via urine over a long time-period. The transmission is promoted by environmental conditions such as ground moisture and host population size [19–21].

Infections of accidental hosts with pathogenic *Leptospira* spp. occur after direct contact with infected animals or indirectly through contact with water or soil, which is contaminated by the urine of infected animals. Portals of entry are mucosal membranes of conjunctival, oral or genital surfaces as well as cuts and abrasions [22]. Leptospirosis outbreaks in humans are often connected to flooding and heavy rainfall [5,23–26]. Outdoor activities such as freshwater swimming, canoeing, kayaking and triathlons lead to potential exposure to pathogenic *Leptospira* spp. through contaminated water [27–31]. Due to close contact with soil, natural water sources and farm animals, workers on dairy farms and slaughterhouses, harvesters and veterinarians are also at a higher risk of exposure [24,32–34]. Pet animals, especially rats, are also a potential source of infection [35].

Accidental hosts, e.g., humans, can develop serious clinical outcomes ranging from unspecific, mild flu-like symptoms to severe clinical onset with fever, jaundice and dysfunction of multiple organs [24,36–39]. Overall, 5–6.5% of confirmed leptospirosis cases in humans are fatal [4,6]. Due to the unspecific clinical symptoms, leptospirosis is suspected to be highly underdiagnosed in humans [24,40]. The similarity of leptospirosis symptoms to that of malaria, yellow fever and hantavirus disease makes their differentiation difficult and may cause misdiagnosis, especially in tropical regions [4,36].

Because of their wide distribution and potentially close contact to humans, small mammals play an important role in the transmission of *Leptospira* spp. [24,41–44]. Former studies showed a wide distribution of *Leptospira* spp. in rodents of different genera in Europe. Prevalence ranges from 5.3% in The Netherlands [45], 7.3% in Austria [46], 10.4% in Corsica, France [47], 3.1–12% in Czech Republic [48], 7.9–12% in Spain [49,50] and up to 21.5% in Croatia [51]. In Germany, a mean prevalence of 6% up to 21.3% in rodents of different genera was detected [52–56]. Studies including multiple rodent genera concluded that rodents of the genus *Microtus*, as the main reservoir of *Leptospira*, showed much higher *Leptospira* prevalences (up to over 30%) compared to bank voles (4–11%) [52,57,58]. Further, it is commonly assumed that *Leptospira* species or serovars are adapted to certain host

species, e.g., *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae is often associated with Norway rats (*Rattus norvegicus*) [59] or *L. kirschneri* with field voles (*Microtus agrestis*) and common voles (*Microtus arvalis*) [54]. In contrast, multiple *Leptospira* genomospecies were detected in the bank vole (*Clethrionomys glareolus*), yellow-necked field mouse (*Apodemus flavicollis*) and wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) [58].

The bank vole is widely spread in multiple, but mainly forest habitats in Germany. The population size fluctuates with peaks every two to three years, through bottom-up control of food resources mainly driven by the beech mast of the previous year [60]. The epidemiology of *Leptospira* spp. within bank vole populations is unclear. Our study was conducted to fill this knowledge gap and therefore we aimed to (1) analyze the *Leptospira* spp. prevalence in bank voles at the transect North Rhine-Westphalia and Lower Saxony, Germany; (2) identify *Leptospira* genomospecies and sequence types; and (3) investigate the influence of individual characteristics such as weight and sex as well as season and bank vole abundance on *Leptospira* spp. prevalence in bank voles over three consecutive years.

2. Materials and Methods

2.1. Sample Collection

Bank voles were trapped during 2018–2020 along a transect for Puumala orthohantavirus (PUUV) monitoring within the RoBoPub consortium covering parts of North Rhine-Westphalia and Lower Saxony [61]. The locations in North Rhine-Westphalia (NW1 and NW2) and Lower Saxony (LS3, LS4, LS5, LS6) were chosen because of high human hantavirus incidences and to find the border of the PUUV distribution in bank voles (Figure 1). Live and snap traps were set in small beech forests in North Rhine-Westphalia; carcasses from snap traps and animals that were found dead in live traps were included in this study (Table A1). Collection of bank voles in Lower Saxony was performed exclusively by snap trapping (Figure 1, Table A1).

At each trapping location, 49 or 100 traps were set for three consecutive nights at multiple sites (2–13 sites per location) (Table A1). Trapping success was documented once or twice a day (Table A1).

During dissection, species, weight, and sex were recorded. The obtained kidney tissue samples were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until further investigation.

The relative abundance index was calculated by standardizing the number of trapped bank voles into individuals per 100 trap nights for each trapping session.

2.2. DNA Extraction

For DNA extraction, one kidney of each animal was used. Depending on the size of the kidney, 10 to 180 mg of tissue were mixed with a fourfold amount of phosphate-buffered saline (PBS, at least 160 μL) and placed in a vial with 0.6 g of 1.4 mm-sized zirconium oxide beads (Bertin Technologies SAS, Montigny-le-Bretonneux, France). Samples were homogenized by using Precellys[®] 24 lysis & homogenization (Bertin Technologies SAS, Montigny-le-Bretonneux, France) and two rounds of shaking at 5500 rpm with a 10 s break. In total, a 125 μL -aliquot of each sample was used for further extraction.

DNA extraction was performed using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions.

The quality of the DNA preparations was controlled by measuring with a spectrophotometer (PEQLAB Biotechnologies GmbH, Erlangen, Germany).

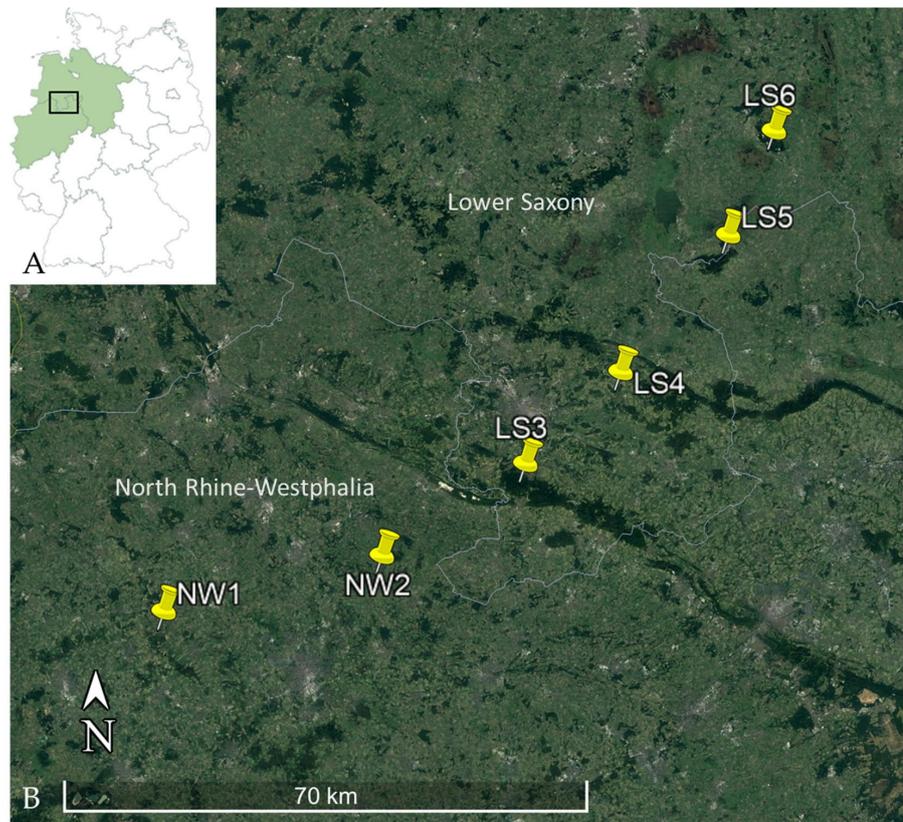


Figure 1. (A) Map of Germany with involved federal states highlighted in green and location of the transect marked by a square, (B) Trapping locations within the transect, NW = North Rhine-Westphalia, LS = Lower Saxony. Image was created by using Google Earth Pro, Map: Google Earth ©2021 Google, Image Landsat/Copernicus ©2021 GeoBasis-DE/BKG.

2.3. PCR Methods and Multilocus Sequence Typing

Initially, all samples were tested by quantitative PCR (qPCR), targeting a fragment of the *lipI32* gene (242 base pairs, bp) (Table A2) encoding an outer membrane lipoprotein. The PCR followed the protocol by Stoddard et al. [62] and was performed using the Qiagen QuantiTect Multiplex no Rox Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and the Agilent Mx3000P qPCR System (Agilent, Santa Clara, CA, USA). The DNA of a laboratory strain of *L. kirschneri* serovar Grippothyphosa was used as a positive control.

Only samples with a sufficient amount of DNA were included in the typing analyses. Based on experiences from prior studies, samples showing a Cycle threshold (Ct) value below 35 in screening qPCR were analyzed by SLST to determine the *Leptospira* species. The DNA concentration of the samples was adjusted to 40–80 ng/μL and the PCR protocol by Victoria et al. [63] detecting the *secY* gene (657 bp) was used (Table A2). We slightly modified the protocol by using the HotStarTaq DNA Mastermix (Qiagen, Hilden, Germany). PCR products were visualized by electrophoresis on 2% agarose gels stained with HDGreen Plus DNA Stain (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Germany). The DNA of a laboratory strain of *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae was used as a positive control.

The PCR products were purified using the Invisorb Fragment CleanUp Kit (Invitek, Berlin, Germany) or Macherey-Nagel Nucleo Spin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Düren, Germany) following the manufacturer's instructions. Sequencing was commercially performed using forward and reverse primers of the performed PCR (Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung, Leipzig, Germany and Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, Germany). Bionumerics (Applied Maths NV, Sint-Martens-Latem, Belgium) was used to assemble the resulting sequences.

Leptospira species were identified by comparing the resulting sequences with reference sequences of 127 *Leptospira* isolates using the online Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). The assignment of genomospecies was confirmed if the percent nucleotide sequence identity was 100%.

MLST was performed for *secY*-positive samples with a Ct value less than 28 in the screening qPCR. The MLST scheme by Boonsilp et al. was used, and detected the following genes: *glmU* (expected size of amplicon: 650 bp), *pntA* (621 bp), *sucA* (640 bp), *tpiA* (639 bp), *pfkB* (588 bp), *mreA* (791 bp), *caIB* (650 bp) (Table A2) [2]. PCR was performed in a volume of 25 μ L per reaction, containing 0.625 unit GoTaq[®] G2 Flexi DNA Polymerase, 1 unit Green GoTaq[®] Flexi Buffer, 1.5 mM MgCl₂ (Promega High-Performance GoTaq[®] G2 DNA Polymerase with Mg-Free Buffer System, Promega, Madison, WI, USA), 200 μ M dNTP (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 5 pmol of each forward and reverse primer and 2 μ L DNA preparation. Amplification was performed according to Boonsilp et al., with slightly modified to 35 cycles of annealing with an annealing temperature of 50 °C. PCR products were visualized by gel electrophoresis on 1.2% agarose gels stained with GelRed[®] Nucleic Acid Gel Stain (Biotium Inc., Fremont, CA, USA) or HDGreen Plus DNA Stain (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Germany). DNA of a laboratory strain of *L. interrogans* serovar icterohaemorrhagiae was used as positive control.

Bionumerics was used to analyze the allelic profile of each gene, using the trimming patterns provided by PubMLST (<https://pubmlst.org>, accessed on 18 August 2020). The sequence type was identified by the combination of allelic profiles using the PubMLST database (<https://pubmlst.org>, accessed on 20 August 2020).

2.4. Statistical Analyses

Confidence intervals (95% CI) for prevalence of *Leptospira* spp. in bank voles were determined by the Clopper and Pearson method with Graph Pad Software (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Independence of compared sample sizes was tested with the two-tailed chi-squared test and a significance level of $\alpha = 0.05$ and Yates correction for comparison of prevalence of *L. interrogans* versus all positive tested samples in *lipI32* qPCR and *L. interrogans* versus all samples tested.

To analyse *Leptospira* spp. prevalence variations within bank vole hosts, we generated generalised linear mixed models (GLMM) using the *lme4* package [64] within the R-software [65]. The infection status of individuals was used as a binary dependent variable (either *Leptospira* spp. positive/negative) giving the GLMM a binomial error structure. In total three separate GLMMs were generated to estimate how (1) seasonality; (2) individual demographics; and (3) direct and delayed host abundance can influence the probability of individual infection. The following independent variables were incorporated: (1) season (categorical; spring, summer, autumn) and year (categorical; 2018, 2019, 2020) as well as the interaction between season and year to estimate seasonality within each year. As the interaction term consisted of two variables with three levels each, we estimated marginal means using the *emmeans* package and compared within-subject contrasts for each year (post-hoc analysis) [66]; (2) Sex (categorical; male/female), weight (continuous; in gram body weight [g]); and (3) Bank vole abundance of the present season (abundance) and abundance of the previous season (delayed abundance). In addition, study site as well as season nested in year were incorporated as random factors to account for the spatially and temporally replicated study design. All analyses were performed in R base version 4 [65].

3. Results

3.1. Collection of Rodents

In total, 1817 bank voles were trapped in the transect during the years 2018 ($n = 263$), 2019 ($n = 1116$) and 2020 ($n = 438$) (Table 1). During dissection, all animals were considered healthy and no macroscopic lesions were documented.

Table 1. *Leptospira* spp. prevalence and genomospecies distribution in bank voles captured in the years 2018 to 2020.

Federal State	Total Number of Bank Voles	Trapping Location (see Figure 1)	Number of <i>Leptospira</i> DNA Positive/Total Number of Bank Voles Tested (<i>lipl32</i> -qPCR) (Percentage, 95% CI)	Number of <i>secY</i> -SLST/MLST Positive Bank Voles *		
				<i>L. interrogans</i> /ST24	<i>L. kirschneri</i> /ST110	<i>L. borgpetersenii</i> /ST197
North Rhine-Westphalia	782	NW1	95/605 (15.7%, 12.9–18.9)	55/15	8/3	2/1
		NW2	12/177 (6.8%, 3.6–11.5)	7/5	1/0	N/A
Lower Saxony	1035	LS3	1/160 (0.6, 0–3.4)	N/A	N/A	N/A
		LS4	26/770 (4.3%, 2.2–4.9)	17/9	2/1	3/2
		LS5	3/45 (6.7%, 1.4–18.3)	1	N/A	N/A
		LS6	0/60 (0%, 0–6%)	N/A	N/A	N/A
total	1817		137/1817 * (7.5%, 95% CI: 6.4–8.9)	80/29	11/4	5/3

NW = North Rhine-Westphalia, LS = Lower Saxony, CI = confidence interval, SLST = single locus sequence typing, MLST = multi locus sequence typing, ST = sequence type, N/A = not available, * Determination of genomospecies and ST was not possible for all samples tested positive in *lipl32*-qPCR.

There were 972 males (53.5%) and 779 females (42.8%). For 66 voles, sex could not be determined due to poor sample condition; these samples were excluded from further statistical analyses regarding the influence of sex on the individual infection probability.

3.2. *Leptospira* Prevalence, Genomospecies and ST Determination

Overall, 137 samples out of 1817 were *Leptospira* spp. positive in the *lipl32* qPCR (7.5%, 95% CI: 6.4–8.9). Detection of *Leptospira* genomospecies by *secY*-SLST was possible for 96 samples (Table 1) (GenBank accession numbers: MZ678532–MZ678627).

L. interrogans (83.3%, 95% CI: 74.4–90.2) was the most frequently detected *Leptospira* genomospecies out of all samples tested for *Leptospira* spp. DNA ($\chi^2 = 42.466$, $df = 1$, $p < 0.0001$) and out of all samples tested positive in *lipl32* qPCR ($\chi^2 = 63.642$, $df = 1$, $p < 0.0001$). The genomospecies *L. kirschneri* (11.5%, 95%CI: 5.9–19.6) and *L. borgpetersenii* (5.2%, 95% CI: 1.7–11.7) were less often detected.

MLST was possible for 36 samples and *L. interrogans* ST24 ($n = 29$), *L. kirschneri* ST110 ($n = 4$) and *L. borgpetersenii* ST197 ($n = 3$) (Table 1) were identified. Sequence types are related to certain serogroups and serovars as follows: ST24 is related to serogroup Australis serovar Bratislava, Jalna, Lora, Muenchen; ST110 is related to serogroup Grippotyphosa serovar Grippotyphosa, Vanderhoedeni, Valbuzzi; and ST197 is related to serogroup Sejroe [67].

3.3. Influence of Seasonality, Body Weight, Sex and Abundance on the Probability of Infection

Overall, there were clear interannual differences with 2019 showing a significantly higher infection probability compared to 2018 and 2020 (Table 2). Different seasonal patterns were observed between the years (Table 2, Figure 2). In the year 2018, the individual infection probability was significantly higher in spring compared to summer but not autumn. The highest individual infection probability was documented in autumn 2019, which was significantly higher compared to summer 2019 ($p < 0.001$) and spring 2019 ($p < 0.001$) (Table 2). There were no significant differences between the seasons in 2020, though infection probability was highest in spring.

Table 2. Results of generalized linear mixed modelling with binomial error distribution showing the influence of season, year and their interaction on the individual infection probability.

Factor	Estimate	Std. Error	z-Value	p-Value
Intercept	−3.676	0.783	−4.696	<0.001
Season [spring]	1.454	0.823	1.767	0.077
Season [summer]	0.032	0.857	0.037	0.971
Year [2019]	2.054	0.757	2.712	0.007
Year [2020]	0.225	0.909	0.248	0.804
Year:season	Estimate	Std. Error	z-ratio	p-value
Year 2018				
Autumn v. spring	−1.454	0.823	−1.767	0.181
Autumn v. summer	−0.032	0.857	−0.037	0.999
Spring v. summer	1.423	0.567	2.511	0.032
Year 2019				
Autumn v. spring	2.087	0.364	5.732	<0.001
Autumn v. summer	1.868	0.285	6.554	<0.001
Spring v. summer	−0.219	0.400	−0.546	0.848
Year 2020				
Autumn v. spring	−0.649	0.691	−0.939	0.616
Autumn v. summer	0.473	0.643	0.735	0.743
Spring v. summer	1.122	0.582	1.928	0.131
Random effects	Variance	Std.Dev.		
Site	1.460	1.208		
Year	0.000	0.000		
Season:year	0.000	0.000		

For categorical factors the reference categories are: Season—autumn, Year—2018. For the interaction term Year:season the results of a post-hoc (Tukey) analysis on the estimated marginal means are presented to highlight seasonal differences within each year. Bold values represent significant factors. Std. Error = Standard Error; Std.Dev. = Standard Deviation, v. = versus, z-value/ratio = Wald statistics.

The predicted probability of infection was positively correlated with body weight in the years 2019 ($p = 0.045$) and 2020 ($p < 0.001$). The correlation was not significant in the year 2018 ($p = 0.071$) (Figure 3A, Table 3).

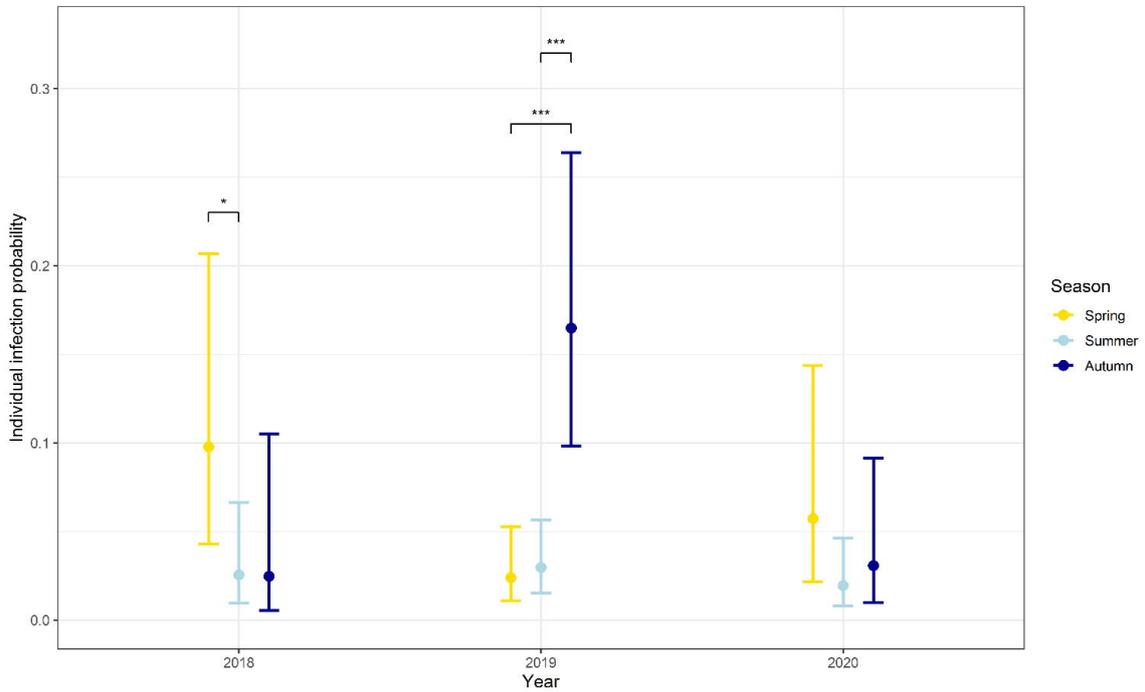


Figure 2. Potential influence of season on the individual infection probability in the years 2018 to 2020. Results are based on *lip132*-qPCR-positive animals, significant differences between seasons are highlighted by stars: * = significant ($p < 0.05$), *** = highly significant ($p < 0.001$).

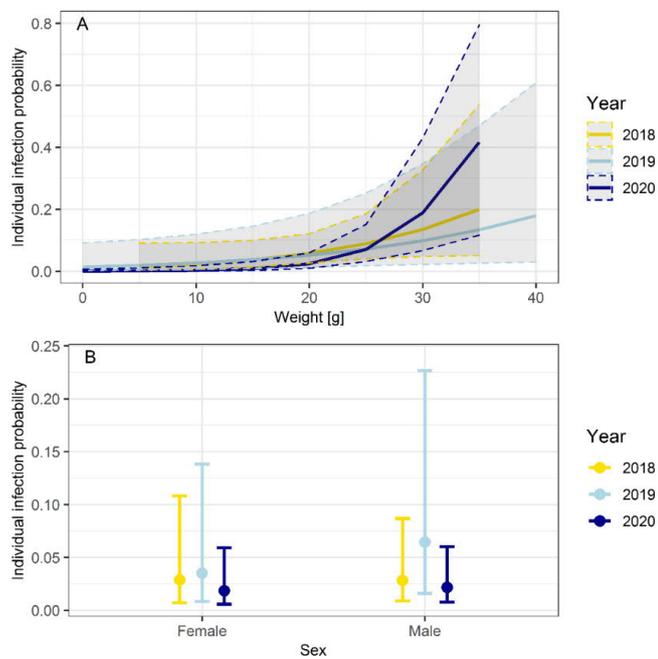


Figure 3. Potential influence of (A) body weight and (B) sex on individual infection probability. Results are based on *lip132*-qPCR-positive animals. Only animals with sex determination ($n = 1751$) were analyzed for influence of sex on the individual infection probability.

Table 3. Results of generalized linear mixed modelling with binomial error distribution showing the impact of demographic factors on individual infection probability for each year.

Factor	Estimate	Std. Error	z-Value	p-Value
Year 2018				
Intercept	−4.746	1.277	−3.717	<0.001
Sex [m]	0.150	0.518	0.289	0.773
Weight	0.093	0.052	1.808	0.071
Random effects	Variance	Std.Dev.		
Site	0.709	0.842		
Season	0.137	0.370		
Year 2019				
Intercept	−4.639	1.039	−4.466	<0.001
Sex [m]	0.637	0.262	2.433	0.015
Weight	0.069	0.035	2.001	0.045
Random effects	Variance	Std.Dev.		
Site	1.614	1.271		
Season	1.323	1.150		
Year 2020				
Intercept	−8.284	1.680	−4.931	<0.001
Sex [m]	0.161	0.535	0.301	0.764
Weight	0.224	0.065	3.441	<0.001
Random effects	Variance	Std.Dev.		
Site	1.525	1.235		
Season	0.000	0.000		

For categorical factors the reference categories are: Sex—female. Bold values represent significant factors. Std. Error = Standard Error; Std.Dev = Standard Deviation, z value/ratio = Wald statistics.

Sex had no influence on the individual probability of infection in 2018 ($p = 0.773$) and 2020 ($p = 0.764$). In contrast, male bank voles were more often *Leptospira* spp.-positive than female bank voles in the year 2019 ($p = 0.015$) (Figure 3B, Table 3).

There was no statistical effect of the abundance on infection probability of bank voles in the years 2018 and 2020. In summer 2019, there was a positive relationship between the individual probability of infection and abundance in the previous season (spring 2019; delayed abundance) ($p = 0.038$) and a negative relationship with increasing abundance of the present season ($p = 0.042$) (abundance) (Figure 4B, Table 4). In the following autumn (2019), the direction of this relationship switched. The infection probability was significantly negatively-related to increased abundances in the previous season ($p = 0.004$) and positively related to abundances in the present season ($p = 0.005$) (Figure 4C, Table 4).

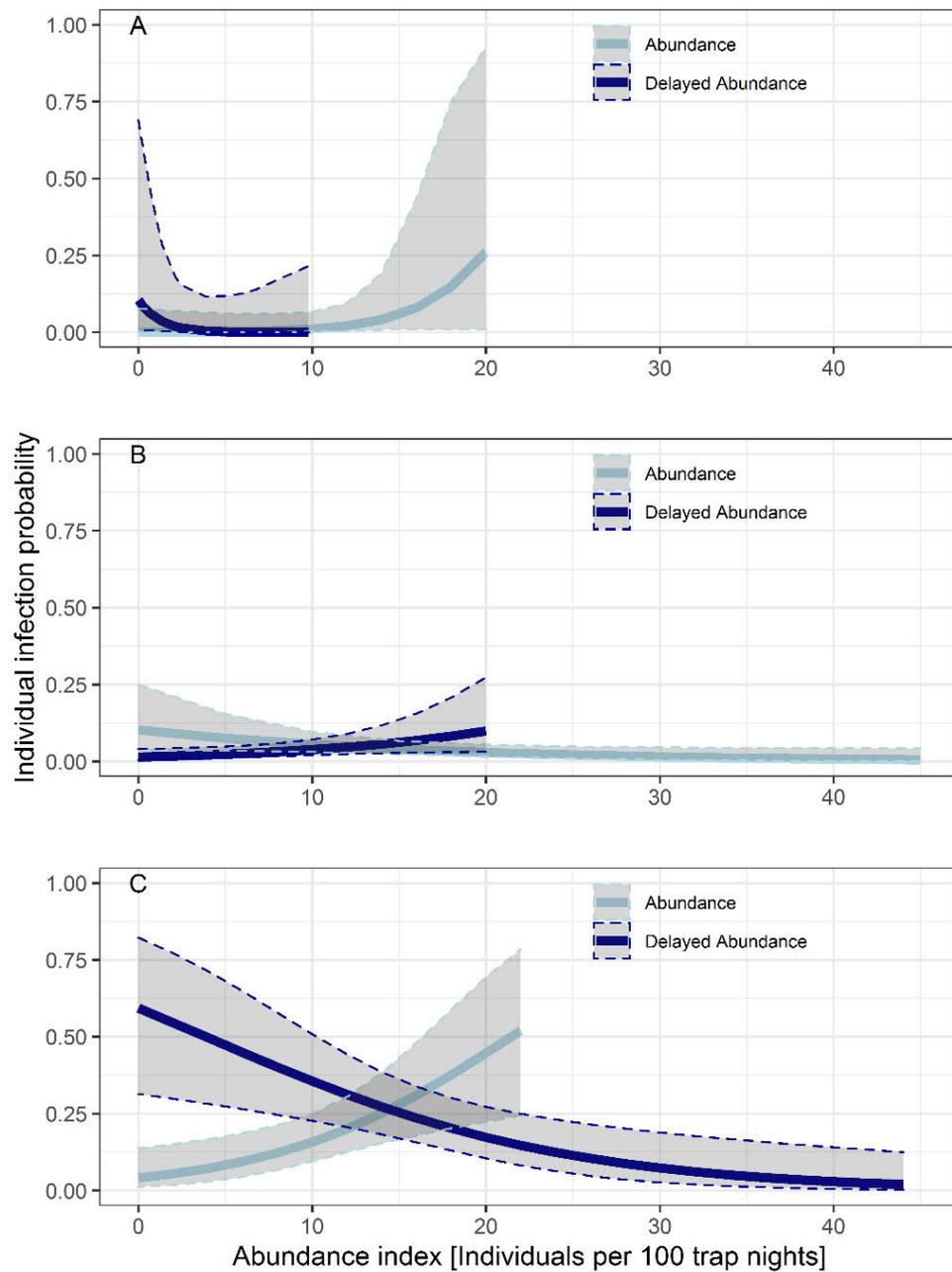


Figure 4. Potential influence of abundance and delayed abundance in (A) spring, (B) summer and (C) autumn in the year 2019 on individual infection probability (Abundance = bank vole abundance of the present season, Delayed Abundance = bank vole abundance of the previous season). Results are based on *lip132*-qPCR-positive animals. (Years 2018 and 2020 are not shown, because no significant influences were documented).

Table 4. Results of generalized linear mixed modelling with binomial error distribution showing the impact of abundance and delayed abundance on individual infection probability for the year 2019.

Factor	Estimate	Std. Error	z-Value	p-Value
Spring 2019				
Intercept	−5.519	1.714	−3.220	0.001
Delayed abundance	−0.850	0.553	−1.538	0.124
Abundance	0.352	0.219	1.605	0.109
Random effects	Variance	Std.Dev.		
Site	2.802	1.674		
Summer 2019				
Intercept	−2.845	0.602	−4.727	0.000
Delayed abundance	0.102	0.049	2.078	0.038
Abundance	−0.068	0.033	−2.030	0.042
Random effects	Variance	Std.Dev.		
Site	0.398	0.631		
Autumn 2019				
Intercept	−1.284	0.576	−2.230	0.026
Delayed abundance	−0.097	0.034	−2.865	0.004
Abundance	0.147	0.052	2.802	0.005
Random effects	Variance	Std.Dev.		
Site	0.611	0.782		

Abundance = Bank vole abundance of the present season, Delayed abundance = abundance of the previous season. Bold values represent significant factors. Std. Error = Standard Error; Std.Dev = Standard Deviation, z value/ratio = Wald statistics.

4. Discussion

Our study detected a mean *Leptospira* spp. prevalence of 7.5% (95% CI: 6.4–8.9), with a range of 0% (LS6) to 15.7% (NW1) in bank voles from North-West Germany in the years 2018 to 2020 (Table 1). Results of previous studies in Germany showed mean prevalence values of 4.1% (95% CI: 2.8–5.9) up to 11.4% (95% CI: 8.7–14.6%) in bank voles [52,57], which is similar to our results

However, there are obvious regional differences. Lower values were found in studies investigating the *Leptospira* prevalence in South and East Germany. Here, a prevalence of 0% up to 13% was detected in bank voles, depending on the site and year [53,57]. Another study, which captured different small mammal species at multiple locations throughout Germany in the years 2002 to 2010, detected a mean prevalence of 6% (66/1016) in bank voles [54].

A similar mean prevalence (7.8%) in bank voles was detected across four locations in Germany in the years 2010 to 2014 [58]. One trapping site of the former study in North Rhine-Westphalia is in close geographical proximity to NW1 of our study, and here the authors found a slightly higher prevalence (20.4%, 95% CI: 16.1–25.2) [58] compared to our study (15.7%, 95% CI: 12.9–18.9). A higher mean prevalence in bank voles was also detected in a study in central Germany (11.4%) [52] and the Czech Republic (12%) [48]. The lower mean prevalence in our study might be explained by the extreme drought in the years 2018 to 2020 [68], which gave *Leptospira* a less favorable environment in which to survive [69,70]. On the other hand, it needs to be taken in account that the highest prevalence in our study was documented in 2019, also a year affected by drought (Figure 2), which is most probably due to high bank vole abundance. Further studies need to be done to predict the influence of drought on the *Leptospira* prevalence in bank voles. The absence of *Leptospira* spp. at location LS6 might be due to geographical differences, which inhibited the spread

of *Leptospira* spp. in this region. However, the number of collected bank voles ($n = 60$) was rather small.

Data of the genomospecies distribution in bank voles in Europe are rare. Former studies in Germany showed that bank voles can be infected by different *Leptospira* species, with *L. kirschneri* being the most common [52,58]. Our study confirms this observation, but interestingly the most common *Leptospira* genomospecies in bank voles of our study was *L. interrogans*, followed by *L. kirschneri* and *L. borgpetersenii*. These results suggest that bank voles are susceptible to at least three *Leptospira* genomospecies.

In former studies of bank voles, *L. interrogans* was represented by ST24, *L. kirschneri* by ST110 and ST117 and *L. borgpetersenii* by ST197 and ST146 in Germany [53,58]. The findings of our study are in line with these results, except for ST117 and ST146, which were not identified in our study. Certain STs and related serogroups can be associated with a specific host, for example the ST17 serogroup Icterohaemorrhagiae with Norway rats [59]. We did not observe a host specificity of serogroups and STs for bank voles in our study, as the STs detected in our study were also found in other small mammal species: ST24 was found in the yellow-necked field mouse, the wood mouse, and the Eurasian beaver (*Castor fiber*); ST110 in the yellow-necked field mouse, common vole, field vole and the common shrew (*Sorex araneus*); and ST197 in the common shrew and crowned shrew (*S. coronatus*) [53,58,71]. Studies from Europe and Asia also show a high ST diversity among different genera of small mammals [72–75]. Serogroups detected in our study were detected worldwide in different host species, e.g., serogroup Australis in swine, goats, cats and dogs [76–79]; serogroup Grippotyphosa in cattle, sheep, wild boars, dogs and horses [16,80–83]; and serogroup Sejroe in cattle [84,85].

Habitat seems to have an important influence on the distribution of different *Leptospira* genomospecies and STs. In previous studies, common voles and field voles, which have their main habitat in grassland, were primarily infected by *L. kirschneri* ST110 [54,58]. In contrast, bank voles, wood mice and yellow-necked field mice, mostly found in forests, were susceptible to *L. kirschneri* ST110, *L. interrogans* ST24, *L. borgpetersenii* ST197, and ST146 [58], which is in line with results of our study.

The STs in our study can be associated with various *Leptospira* serovars. ST24 is associated with serovars Bratislava, Muenchen, Lora and Jalna and ST110 with serovars Grippotyphosa, Vanderhoedenii and Valbuzzi [67]. The ST 197 is related to serogroup Sejroe, but no designated serovar is documented for ST197 [67], as it contains a non-standard length allele (*caiB51*) [2]. Awareness in a public health context should be raised to the pathogenic serogroups Australis, Grippotyphosa and Sejroe and related serovars Bratislava and Grippotyphosa, which can cause severe clinical symptoms in humans and reduced productivity in livestock [8,16]. The finding of serogroups, which are pathogenic for multiple species, underlies the importance of bank voles as reservoirs for *Leptospira* spp. and sources of infection for humans and livestock.

Individual and population-based factors are known to influence *Leptospira* spp. prevalence in rodents. Age is a significant driver of *Leptospira* prevalence in different rodent reservoirs, because the persisting infection with *Leptospira* spp. increases the probability of infection with the increasing age of the host [86–89]. Our study confirms this observation for bank voles. Taking body weight as a proxy for age, we showed that with increasing body weight, and therefore increasing age, the probability of infection was positively correlated (Figure 3A, Table 3). This effect was more or less consistent of the study period. Although it was not formally significant in 2018 ($p = 0.071$), it was significant in the years 2019 ($p = 0.045$) and 2020 ($p < 0.001$) (Table 3).

The influence of sex on the individual infection probability depended on the collection year. No difference between male and female bank voles was observed in the years 2018 and 2020. In contrast, male bank voles showed a significantly higher prevalence than female bank voles in the year 2019 ($p = 0.015$) (Table 3). This result suggests that sex only had an influence in years with high bank vole abundance. Higher abundance and reproduction causes an increase in male aggressive behavior and contact to multiple sexual

partners during the breeding season [90,91], which increases the risk of direct or indirect contact to *Leptospira* spp. However, our results are in line with previous studies, which yielded mixed results as some found no effect of sex [45,47] and others did [92,93].

Overall, effects of body weight (age) were more consistent compared to sex in terms of individual infection probability for *Leptospira* spp. in bank voles. These results are in line with conclusions of former studies [20,58], and has led to the assumption that weight is a good indicator to predict the individual probability of infection with *Leptospira* spp. in bank voles. However, that weight depends on individual developmental circumstances regarding food resources, environmental influences and seasonal fluctuation, and can only be taken as a proxy for age [94,95].

In previous studies, *Leptospira* prevalence increased in common vole and field vole populations over the course of the year with a high prevalence in autumn [52,58]. However, our bank vole study yielded mixed results in terms of seasonality, with annual differences. Seasonal patterns could be detected in the years 2018 and 2020 when the *Leptospira* spp. prevalence was low in summer and high in spring and autumn (Figure 2). An explanation might be the seasonal differences in the composition of the bank vole population. In spring, the population consisted mainly of adult rodents. These overwintering adults, which were persistently infected from the previous season, may have transmitted *Leptospira* spp. to the following spring population and caused high prevalences in spring. During the breeding season in summer, uninfected juveniles entered the population, which lead to lower prevalences in summer. This “juvenile dilution effect” was also described for PUUV infections in bank voles [96]. Additionally, maternal antibodies transmitted from infected females to their offspring might lead to lower prevalences [97]. In autumn, at the end of the breeding season, adults that dominated [98] were more likely to be infected (Figure 3A, Table 3). Furthermore, seasonal weather conditions can have an impact on *Leptospira* prevalence. The survival of *Leptospira* spp. outside the host is dependent on humidity and water availability, temperature and pH [21]. In summer, higher temperatures and dry conditions may have led to decreased indirect transmission and therefore a lower risk of infection compared to spring and autumn.

In contrast to the described seasonal patterns in the years 2018 and 2020, a different course was documented in the year 2019, when prevalence increased throughout the year, with the highest prevalence in autumn (23.0%, 95% CI: 18.3–28.3). The prevalence in autumn 2019 was the highest documented in the three years of our study (Figure 2, Table 2). This might have been due to high bank vole abundance in 2019, which was caused by the beech mast in the year 2018 [99]. This result was also reflected in high PUUV prevalence in bank voles in North-West Germany in the year 2019 [99]. High bank vole abundance should have promoted high *Leptospira* prevalence in autumn 2019. In summer, the prevalence increased in regions which already showed a high abundance in spring. However, even more significant was the influence of abundance in autumn 2019, as the prevalence increased at all locations with high abundance at the present season ($p = 0.005$) (Table 4). As population density rose, direct transmission was promoted, because of more aggressive encounters between conspecifics for food, territory and mates [90,91]. Additionally, more leptospire were potentially shed into the environment via the urine of persistently infected bank voles that frequently mark their home range by shedding urine [91], which can promote indirect transmission through contact with contaminated water and soil.

The influence of abundance to the infection probability differed between season and year. No statistical effect could be documented in the years 2018 and 2020. This result led to the assumption that abundance has an effect on the individual infection probability for *Leptospira* spp. in bank voles, but only during certain seasons and years with high abundance and intense reproduction.

5. Conclusions

Our study showed that *Leptospira* spp. are widely spread in bank voles in North-West Germany. The individual infection probability of bank voles was influenced by season, body weight, and year.

This is relevant for public health, as the three detected *Leptospira* species were classified as pathogenic [3], and the detected STs were related to pathogenic serovars. People working in agriculture and forestry are at a particularly higher risk because of their close contact to small mammals, natural water sources and soil.

The human incidence in Germany was low (0.06–0.2 per 100,000 inhabitants) in the years 2010 to 2020, but leptospirosis should be on the differential diagnosis list of every clinician and veterinarian. Incidence may rise due to increasing popularity of outdoor activities, which lead to a higher risk of exposure in the human population. Furthermore, climate change might be an additional influencing factor as it will lead to more extreme weather events in moderate climate zones, like drought, storm, heavy rainfalls and flooding [100], as recently seen in Germany in the summer of 2021.

Author Contributions: Conceptualization, M.P., J.J., R.G.U., J.F. and M.R.; methodology, E.S., A.O. and A.M.-S.; validation, E.S., A.O. and M.P.; formal analysis, C.I. and A.O.; investigation, E.S.; resources, R.G.U., S.D., J.J., M.S. and M.P.; data curation, E.S.; writing—original draft preparation, E.S.; writing—review and editing, A.O., R.G.U., S.D., J.J., C.I., A.M.-S., M.S. and M.P.; visualization, E.S. and C.I.; supervision, M.P.; project administration, M.P. and R.G.U.; funding acquisition, M.P., R.G.U., J.J., M.R., M.S. and A.M.-S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the German Federal Ministry of Education and Research within the Research Network of Zoonotic Infectious Diseases, grant number 01KI1903A and 01KI1903B to M.P. and R.G.U. and grant number 01KI1721A and 01KI2004A to R.G.U., 01KI1721E and 01KI2004E to J.J., 01KI1721H to M.R. and M.S., 01KI1721B to A.M.-S.

Institutional Review Board Statement: All procedures involving animals were conducted according to relevant legislation and by permission of the federal authorities. Permits for snap trapping were approved by Kreis Coesfeld (Abteilung 70-Umwelt/Natur- und Bodenschutz; Untere Naturschutzbehörde) (protocol code: 70.2.2.27-2018/0006, date of approval: 9 May 2018) and Kreis Warendorf (Amt für Planung und Naturschutz; Untere Landschaftsbehörde) (protocol code: 613904, date of approval: 13 August 2018; protocol code: 613901, date of approval: 13 February 2020). Permits for live trapping were approved by Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (protocol code: 81-02.04.2018.A150, date of approval: 9 April 2018).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in the article.

Acknowledgments: We want to thank the working group RoBoPub (Rodent-Borne-Pathogens-and-Public-Health) for providing the samples for this study. We gratefully acknowledge the German Federal Institute for Risk Assessment, Berlin for technical support, implementation of MLST and for providing sequence data of 127 *Leptospira* reference strains. Many thanks go to Dana Rüster and Cornelia Göllner for excellent technical support in the laboratory and Maja Haut, Dörte Kaufmann, Sina Nippert, Stefan Fischer, René Ryll, Elisa Heuser, Kathrin Jeske, Maysaa Dafalla, Patrick Slowikowski, Paul Pieper, Jana Hey, Anastasia Tavakina, Kim Usko, Maximilian Rüttermann, Christine Jelinek, Georgina Bredel, Vanessa Schulze, Florian Binder, Elias Bendl, Diana A. Below, Hendrik Ennen, Maya Braun, Felicitas Bujnoch, Yusuff Scholer, Orestis Kazazidis, Teresa Budde, Mechthild Budde, Martha Göbel, Philipp Harpering, Florian Hüls, Christin Hesse, Britta Oltmann, Helmut Jacobs, and Sönke Röhrs for their help during sampling and/or dissection. We acknowledge support from Leipzig University for Open Access Publishing.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Appendix A

Table A1. Details of rodent trapping in transect North-Rhine Westphalia and Lower Saxony, Germany in the years 2018 to 2020.

Federal State	North Rhine-Westphalia		Lower Saxony
Trapping location (Number of trapping sites per location)	NW1 (13 trapping sites)		LS3 (3 trapping sites)
	NW2 (3 trapping sites)		LS4 (6 trapping sites)
			LS5 (2 trapping sites)
			LS6 (2 trapping sites)
Trapping frequency	Three times yearly in spring (March to Mai), summer (July, August) and autumn (October to November)		Three times yearly in spring (April), summer (July) and autumn (October)
Type of trap	Ugglan multiple capture live traps (Grahnbab [®] , Gnosjö, Sweden)	Metal snap traps (Deufa, Neuburg, Germany)	Metal snap traps (Deufa, Neuburg, Germany)
Traps per night and trapping site/Number of nights/Control frequency	49 traps/ 3 nights/ Checked twice a day	49 traps/ 3 nights/ Checked once a day	100 traps/ 3 nights/ Checked once a day
Bait	apple, rodent pellets, rolled oats, peanut curls	peanut butter with rolled oats	peanut butter with rolled oats
Additional information	Rodents captured alive were sampled and released, only rodents found dead were used in this study		
Publication	Trapping according to [101]	Trapping according to [99]	Trapping according to [99]

Table A2. Gene loci, primer sequences and probe used for qPCR [62], SLST [63] and MLST [2].

Locus	Primer/BREAKProbe	Sequence (5' to 3')
<i>lipI32</i>	lipI32-F lipI32-R probe	AAG CAT TAC CGC TTG TGG TG GAA CTC CCA TTT CAG CGA TT 6FAM-AA AGC CAG GAC AAG CGC CG BHQ1
<i>secY</i>	secY-F secY-R	GAA TTT CTC TTT TGA TCT TCG GAG TTA GAG CTC AAA TCT AAG
<i>glmU</i>	glmU-F glmU-R	AGG ATA AGG TCG CTG TGG TA AGT TTT TTT CCG GAG TTT CT
<i>pntA</i>	pntA-F pntA-R	TAG GAA ARA TGA AAC CRG GAA C AAG AAG CAA GAT CCA CAA YTA C
<i>sucA</i>	sucA-F sucA-R	TCA TTC CAC TTY TAG ATA CGA T TCT TTT TTG AAT TTT TGA CG
<i>tpiA</i>	tpiA-F tpiA-R	TTG CAG GAA ACT GGA AAA TGA AT GTT TTA CRG AAC CHC CGT AGA GAA T
<i>pfkB</i>	pfkB-F pfkB-R	CGG AGA GTT TTA TAA RAA GGA CAT AGA ACA CCC GCC GCA AAA CAA T
<i>mreA</i>	mreA-F mreA-R	GGC TCG CTC TYG ACG GAA A TCC RTA ACT CAT AAA MGA CAA AGG
<i>caiB</i>	caiB-F caiB-R	CAA CTT GCG GAY ATA GGA GGA G ATT ATG TTC CCC GTG AYT CG

F = forward primer, R = reverse primer.

References

- Caimi, K.; Ruybal, P. *Leptospira* spp., a genus in the stage of diversity and genomic data expansion. *Infect. Genet. Evol.* **2020**, *81*, 104241. [CrossRef]
- Boonsilp, S.; Thaipadungpanit, J.; Amornchai, P.; Wuthiekanun, V.; Bailey, M.S.; Holden, M.T.G.; Zhang, C.; Jiang, X.; Koizumi, N.; Taylor, K.; et al. A single multilocus sequence typing (MLST) scheme for seven pathogenic *Leptospira* species. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2013**, *7*, e1954. [CrossRef] [PubMed]
- Picardeau, M. *Leptospira* and leptospirosis. *Methods Mol. Biol.* **2020**, *2134*, 271–275. [CrossRef] [PubMed]
- Costa, F.; Hagan, J.E.; Calcagno, J.; Kane, M.; Torgerson, P.; Martinez-Silveira, M.S.; Stein, C.; Abela-Ridder, B.; Ko, A.I. Global morbidity and mortality of leptospirosis: A systematic review. *PLOS Negl. Trop. Dis.* **2015**, *9*, e0003898. [CrossRef]
- Lau, C.L.; Smythe, L.D.; Craig, S.B.; Weinstein, P. Climate change, flooding, urbanisation and leptospirosis: Fuelling the fire? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2010**, *104*, 631–638. [CrossRef] [PubMed]
- Munoz-Zanzi, C.; Groene, E.; Morawski, B.M.; Bonner, K.; Costa, F.; Bertherat, E.; Schneider, M.C. A systematic literature review of leptospirosis outbreaks worldwide, 1970–2012. *Rev. Panam. Salud Públ.* **2020**, *44*, e78. [CrossRef]
- Aviat, F.; Blanchard, B.; Michel, V.; Blanchet, B.; Branger, C.; Hars, J.; Mansotte, F.; Brasme, L.; de Champs, C.; Bolut, P.; et al. *Leptospira* exposure in the human environment in France: A survey in feral rodents and in fresh water. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2009**, *32*, 463–476. [CrossRef]
- Desai, S.; Van Treeck, U.; Lierz, M.; Espelage, W.; Zota, L.; Sarbu, A.; Czerwinski, M.; Sackowska-Todys, M.; Avdicová, M.; Reetz, J.; et al. Resurgence of field fever in a temperate country: An epidemic of leptospirosis among seasonal strawberry harvesters in Germany in 2007. *Clin. Infect. Dis.* **2009**, *48*, 691–697. [CrossRef]
- Habus, J.; Persic, Z.; Spicic, S.; Vince, S.; Stritof, Z.; Milas, Z.; Cvetnic, Z.; Perharic, M.; Turk, N. New trends in human and animal leptospirosis in Croatia, 2009–2014. *Acta Trop.* **2017**, *168*, 1–8. [CrossRef] [PubMed]
- Vieira, M.L.; Gama-Simões, M.J.; Collares-Pereira, M. Human leptospirosis in Portugal: A retrospective study of eighteen years. *Int. J. Infect. Dis.* **2006**, *10*, 378–386. [CrossRef] [PubMed]
- Garvey, P.; Connell, J.; O’Flanagan, D.; McKeown, P. Leptospirosis in Ireland: Annual incidence and exposures associated with infection. *Epidemiol. Infect.* **2014**, *142*, 847–855. [CrossRef]
- Dupouey, J.; Faucher, B.; Edouard, S.; Richet, H.; Kodjo, A.; Drancourt, M.; Davoust, B. Human leptospirosis: An emerging risk in Europe? *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2014**, *37*, 77–83. [CrossRef] [PubMed]
- Van Alphen, L.B.; Kunøe, A.L.; Ceper, T.; Kähler, J.; Kjølse, C.; Ethelberg, S.; Krogh, K.A. Trends in human leptospirosis in Denmark, 1980 to 2012. *Eurosurveillance* **2015**, *20*, 21019. [CrossRef] [PubMed]
- European Centre for Disease Prevention and Control. Available online: <https://www.ecdc.europa.eu/en> (accessed on 11 March 2021).
- Robert Koch-Institut. SurvStat@RKI 2.0. Available online: <https://survstat.rki.de> (accessed on 1 March 2021).
- Ellis, W.A. Animal leptospirosis. In *Leptospira and Leptospirosis*, 1st ed.; Adler, B., Ed.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2015; pp. 99–137. ISBN 009783662523995.
- Collings, D.F. *Leptospira interrogans* infection in domestic and wild animals in Fiji. *N. Z. Vet. J.* **1984**, *32*, 21–24. [CrossRef] [PubMed]
- Sterling, C.R.; Thiermann, A.B. Urban rats as chronic carriers of leptospirosis: An ultrastructural investigation. *Vet. Pathol.* **1981**, *18*, 628–637. [CrossRef] [PubMed]
- Davis, S.; Calvet, E.; Leirs, H. Fluctuating rodent populations and risk to humans from rodent-borne zoonoses. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2005**, *5*, 305–314. [CrossRef]
- Perez, J.; Brescia, F.; Becam, J.; Mauron, C.; Goarant, C. Rodent abundance dynamics and leptospirosis carriage in an area of hyper-endemicity in New Caledonia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2011**, *5*, e1361. [CrossRef]
- Bierque, E.; Thibeaux, R.; Girault, D.; Soupé-Gilbert, M.-E.; Goarant, C. A systematic review of *Leptospira* in water and soil environments. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0227055. [CrossRef] [PubMed]
- Haake, D.A.; Levett, P.N. Leptospirosis in humans. In *Leptospira and Leptospirosis*, 1st ed.; Adler, B., Ed.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2015; pp. 65–88. ISBN 009783662523995.
- Dadon, Y.; Haas, E.J.; Kaliner, E.; Anis, E.; Singer, S.R.; Atiya-Nasagi, Y.; Cohen-Dar, M.; Avramovich, E.; King, R.; Sued, O.; et al. Outbreak of human leptospirosis linked to contaminated water bodies in Northern Israel, June to August 2018. *Eurosurveillance* **2018**, *23*, 1800486. [CrossRef]
- Bharti, A.R.; Nally, J.E.; Ricaldi, J.N.; Matthias, M.A.; Diaz, M.M.; Lovett, M.A.; Levett, P.N.; Gilman, R.H.; Willig, M.R.; Gotuzzo, E.; et al. Leptospirosis: A zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect. Dis.* **2003**, *3*, 757–771. [CrossRef]
- Dechet, A.M.; Parsons, M.; Rambaran, M.; Mohamed-Rambaran, P.; Florendo-Cumbermack, A.; Persaud, S.; Baboolal, S.; Ari, M.D.; Shadomy, S.V.; Zaki, S.R.; et al. Leptospirosis outbreak following severe flooding: A rapid assessment and mass prophylaxis campaign; Guyana, January–February 2005. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e39672. [CrossRef]
- Gaynor, K.; Katz, A.R.; Park, S.Y.; Nakata, M.; Clark, T.A.; Effler, P.V. Leptospirosis on Oahu: An outbreak associated with flooding of a university campus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2007**, *76*, 882–885. [CrossRef] [PubMed]
- Brockmann, S.; Piechotowski, I.; Bock-Hensley, O.; Winter, C.; Oehme, R.; Zimmermann, S.; Hartelt, K.; Luge, E.; Nöckler, K.; Schneider, T.; et al. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants in Germany, 2006. *BMC Infect. Dis.* **2010**, *10*, 91. [CrossRef] [PubMed]

28. Lau, C.L.; Townell, N.; Stephenson, E.; Van den Berg, D.; Craig, S.B. Leptospirosis: An important zoonosis acquired through work, play and travel. *Aust. J. Gen. Pract.* **2018**, *47*, 105–110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Radl, C.; Müller, M.; Revilla-Fernandez, S.; Karner-Zuser, S.; De Martin, A.; Schauer, U.; Karner, F.; Stanek, G.; Balcke, P.; Hallas, A.; et al. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants in Langau, Austria, 2010. *Wien. Klin. Wochenschr.* **2011**, *123*, 751–755. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Guillois, Y.; Bourhy, P.; Ayral, F.; Pivette, M.; Decors, A.; Grau, J.H.A.; Champenois, B.; Malhère, C.; Combes, B.; Richomme, C.; et al. An outbreak of leptospirosis among kayakers in Brittany, North-West France, 2016. *Eurosurveillance* **2018**, *23*. [[CrossRef](#)]
31. Morgan, J.; Bornstein, S.L.; Karpati, A.M.; Bruce, M.; Bolin, C.A.; Austin, C.C.; Woods, C.W.; Lingappa, J.; Langkop, C.; Davis, B.; et al. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. *Clin. Infect. Dis.* **2002**, *34*, 1593–1599. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Jansen, A.; Schöneberg, L.; Frank, C.; Alpers, K.; Schneider, T.; Stark, K. Leptospirosis in Germany, 1962–2003. *Emerg. Infect. Dis.* **2005**, *11*, 1048–1054. [[CrossRef](#)]
33. Narkkul, U.; Thaipadungpanit, J.; Srisawat, N.; Rudge, J.W.; Thongdee, M.; Pawarana, R.; Pan-Ngum, W. Human, animal, water source interactions and leptospirosis in Thailand. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 3215. [[CrossRef](#)]
34. Meny, P.; Menéndez, C.; Ashfield, N.; Quintero, J.; Rios, C.; Iglesias, T.; Schelotto, F.; Varela, G. Seroprevalence of leptospirosis in human groups at risk due to environmental, labor or social conditions. *Rev. Argent. Microbiol.* **2019**, *51*, 324–333. [[CrossRef](#)]
35. Mori, M.; Bourhy, P.; Le Guyader, M.; Van Esbroeck, M.; Djelouadi, Z.; Septfons, A.; Kodjo, A.; Picardeau, M. Pet rodents as possible risk for leptospirosis, Belgium and France, 2009 to 2016. *Eurosurveillance* **2017**, *22*, 30553. [[CrossRef](#)]
36. Karpagam, K.B.; Ganesh, B. Leptospirosis: A neglected tropical zoonotic infection of public health importance—An updated review. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2020**, *39*, 835–846. [[CrossRef](#)]
37. Yang, H.-Y.; Yen, T.-H.; Lin, C.-Y.; Chen, Y.-C.; Pan, M.-J.; Lee, C.-H.; Yu, C.-C.; Wu, M.-S.; Wu, S.-S.; Weng, C.-H.; et al. Early identification of leptospirosis as an ignored cause of multiple organ dysfunction syndrome. *Shock* **2012**, *38*, 24–29. [[CrossRef](#)]
38. Maier, A.; Kaeser, R.; Thimme, R.; Boettler, T. Acute pancreatitis and vasoplegic shock associated with leptospirosis—A case report and review of the literature. *BMC Infect. Dis.* **2019**, *19*, 395. [[CrossRef](#)]
39. Fernandez, P.S.; Kodjo, A.; Medkour, H.; Laidoudi, Y.; Dubourg, G.; Eldin, C.; Parola, P.; Davoust, B.; Lagier, J.-C. Autochthonous human and animal leptospirosis, Marseille, France. *IDCases* **2020**, *21*, e00899. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Ellis, T.; Imrie, A.; Katz, A.R.; Effler, P.V. Underrecognition of leptospirosis during a dengue fever outbreak in Hawaii, 2001–2002. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2008**, *8*, 541–547. [[CrossRef](#)]
41. Briskin, E.A.; Casanovas-Massana, A.; Ryff, K.R.; Morales-Estrada, S.; Hamond, C.; Perez-Rodriguez, N.M.; Benavidez, K.M.; Weinberger, D.M.; Castro-Arellano, I.; Wunder, E.A.; et al. Seroprevalence, Risk Factors, and Rodent Reservoirs of Leptospirosis in an Urban Community of Puerto Rico, 2015. *J. Infect. Dis.* **2019**, *220*, 1489–1497. [[CrossRef](#)]
42. Thiermann, A.B. The Norway rat as a selective chronic carrier of *Leptospira icterohaemorrhagiae*. *J. Wildl. Dis.* **1981**, *17*, 39–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Koizumi, N.; Muto, M.; Tanikawa, T.; Mizutani, H.; Soh-mura, Y.; Hayashi, E.; Akao, N.; Hoshino, M.; Kawabata, H.; Watanabe, H. Human leptospirosis cases and the prevalence of rats harbouring *Leptospira interrogans* in urban areas of Tokyo, Japan. *J. Med. Microbiol.* **2009**, *58*, 1227–1230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Holt, J.; Davis, S.; Leirs, H. A model of Leptospirosis infection in an African rodent to determine risk to humans: Seasonal fluctuations and the impact of rodent control. *Acta Trop.* **2006**, *99*, 218–225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Krijger, I.M.; Ahmed, A.A.A.; Goris, M.G.A.; Cornelissen, J.B.W.J.; Koerkamp, P.W.G.G.; Meerburg, B.G. Wild rodents and insectivores as carriers of pathogenic *Leptospira* and *Toxoplasma gondii* in The Netherlands. *Vet. Med. Sci.* **2020**, *6*, 623–630. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Schmidt, S.; Essbauer, S.S.; Mayer-Scholl, A.; Poppert, S.; Schmidt-Chanasit, J.; Klempa, B.; Henning, K.; Schares, G.; Groschup, M.H.; Spitzenberger, F.; et al. Multiple infections of rodents with zoonotic pathogens in Austria. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2014**, *14*, 467–475. [[CrossRef](#)]
47. Izquierdo-Rodríguez, E.; Fernández-Álvarez, Á.; Martín-Carrillo, N.; Marchand, B.; Feliu, C.; Miquel, J.; Foronda, P.; Quilichini, Y. Pathogenic *Leptospira* species in rodents from Corsica (France). *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0233776. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Balázsová, A.; Nosková, E.; Široký, P.; Durrant, C.; Baláž, V. Diversity and dynamics of zoonotic pathogens within a local community of small mammals. *Biologia* **2021**, *76*. [[CrossRef](#)]
49. Millán, J.; Cevidanes, A.; Chirife, A.D.; Candela, M.G.; León-Vizcaino, L. Risk factors of *Leptospira* infection in Mediterranean periurban micromammals. *Zoonoses Public Health* **2018**, *65*, e79–e85. [[CrossRef](#)]
50. Jeske, K.; Emirhar, D.; García, J.T.; González-Barrio, D.; Olea, P.P.; Fons, F.R.; Schulz, J.; Mayer-Scholl, A.; Heckel, G.; Ulrich, R.G.; et al. Frequent *Leptospira* spp. detection, but absence of *Tula orthohantavirus* in *Microtus voles*, Northwestern Spain. *J. Wildl. Dis.* **2021**, *57*. [[CrossRef](#)]
51. Tadin, A.; Tokarz, R.; Markotić, A.; Margaletić, J.; Turk, N.; Habuš, J.; Svoboda, P.; Vucelja, M.; Desai, A.; Jain, K.; et al. Molecular survey of zoonotic agents in rodents and other small mammals in Croatia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2016**, *94*, 466–473. [[CrossRef](#)]
52. Jeske, K.; Jacob, J.; Drewes, S.; Pfeffer, M.; Heckel, G.; Ulrich, R.G.; Imholt, C. Hantavirus-*Leptospira* coinfections in small mammals from central Germany. *Epidemiol. Infect.* **2021**, *149*, 1–25. [[CrossRef](#)]

53. Obiegala, A.; Woll, D.; Karnath, C.; Silaghi, C.; Schex, S.; Eßbauer, S.; Pfeffer, M. Prevalence and genotype allocation of pathogenic *Leptospira* species in small mammals from various habitat types in Germany. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, e0004501. [CrossRef]
54. Mayer-Scholl, A.; Hammerl, J.A.; Schmidt, S.; Ulrich, R.G.; Pfeffer, M.; Woll, D.; Scholz, H.C.; Thomas, A.; Nöckler, K. *Leptospira* spp. in rodents and shrews in Germany. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2014**, *11*, 7562–7574. [CrossRef]
55. Heuser, E.; Fischer, S.; Ryll, R.; Mayer-Scholl, A.; Hoffmann, D.; Spahr, C.; Imholt, C.; Alfa, D.M.; Fröhlich, A.; Lüscho, D.; et al. Survey for zoonotic pathogens in Norway rat populations from Europe. *Pest Manag. Sci.* **2017**, *73*, 341–348. [CrossRef]
56. Kocianová, E.; Kozuch, O.; Bakoss, P.; Reháček, J.; Kováčová, E. The prevalence of small terrestrial mammals infected with tick-borne encephalitis virus and leptospirae in the foothills of the Bavarian forest, Germany. *Appl. Parasitol.* **1993**, *34*, 283–290.
57. Obiegala, A.; Albrecht, C.; Dafalla, M.; Drewes, S.; Oltersdorf, C.; Turni, H.; Imholt, C.; Jacob, J.; Wagner-Wiening, C.; Ulrich, R.G.; et al. *Leptospira* spp. in small mammals from areas with low and high human hantavirus incidences in south-west Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2017**, *17*, 312–318. [CrossRef]
58. Fischer, S.; Mayer-Scholl, A.; Imholt, C.; Spierling, N.G.; Heuser, E.; Schmidt, S.; Reil, D.; Rosenfeld, U.M.; Jacob, J.; Nöckler, K.; et al. *Leptospira* genospecies and sequence type prevalence in small mammal populations in Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2018**, *18*, 188–199. [CrossRef]
59. Boey, K.; Shiokawa, K.; Rajeev, S. *Leptospira* infection in rats: A literature review of global prevalence and distribution. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2019**, *13*, e0007499. [CrossRef] [PubMed]
60. Piechotowski, I.; Brockmann, S.O.; Schwarz, C.; Winter, C.H.; Ranft, U.; Pfaff, G. Emergence of hantavirus in South Germany: Rodents, climate and human infections. *Parasitol. Res.* **2008**, *103*, 131–137. [CrossRef]
61. Nationale Forschungsplattform für Zoonosen. RoBoPub. Available online: <https://zoonosen.net/en/forschungsnetz/verbundnachwuchsgruppen/robopub> (accessed on 3 May 2021).
62. Stoddard, R.A.; Gee, J.E.; Wilkins, P.P.; McCaustland, K.; Hoffmaster, A.R. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the *LipL32* gene. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2009**, *64*, 247–255. [CrossRef] [PubMed]
63. Victoria, B.; Ahmed, A.; Zuermer, R.L.; Ahmed, N.; Bulach, D.M.; Quinteiro, J.; Hartskeerl, R.A. Conservation of the *S10-spc-α* locus within otherwise highly plastic genomes provides phylogenetic insight into the genus *Leptospira*. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e2752. [CrossRef] [PubMed]
64. Bates, D.; Mächler, M.; Bolker, B.; Walker, S. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *J. Stat. Softw.* **2015**, *67*, 1–48. [CrossRef]
65. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2020.
66. Lenth, R.V. Estimated marginal means, aka least-squares means. *R Package Version* **2018**, *1*, 3.
67. University of Oxford. PubMLST. Available online: <https://pubmlst.org/> (accessed on 27 April 2021).
68. Helmholtz Zentrum für Umweltforschung. Dürremonitor Deutschland: Dürre 1952–2020 (jährlich). Available online: <https://www.ufz.de/index.php?de=47252> (accessed on 14 June 2021).
69. Karaseva, E.V.; Chernukha, Y.G.; Piskunova, L.A. Results of studying the time of survival of pathogenic leptospira under natural conditions. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol* **1973**, *17*, 339–345.
70. Nau, L.H.; Obiegala, A.; Król, N.; Mayer-Scholl, A.; Pfeffer, M. Survival time of *Leptospira kirschneri* serovar Grippotyphosa under different environmental conditions. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0236007. [CrossRef]
71. Woll, D.; Karnath, C.; Pfeffer, M.; Allgöwer, R. Genetic characterization of *Leptospira* spp. from beavers found dead in south-west Germany. *Vet. Microbiol.* **2012**, *158*, 232–234. [CrossRef]
72. Ferreira, A.S.; Ahmed, A.; Rocha, T.; Vieira, M.L.; Paiva-Cardoso, M.D.N.; Mesquita, J.R.; Van der Linden, H.; Goris, M.; Thompson, G.; Hartskeerl, R.A.; et al. Genetic diversity of pathogenic leptospirae from wild, domestic and captive host species in Portugal. *Transbound. Emerg. Dis.* **2020**, *67*, 852–864. [CrossRef]
73. Piredda, I.; Ponti, M.N.; Palmas, B.; Noworol, M.; Pedditzi, A.; Rebechesu, L.; Chisu, V. Molecular typing of pathogenic *Leptospira* species isolated from wild mammal reservoirs in Sardinia. *Animals* **2021**, *11*, 1109. [CrossRef]
74. Azhari, N.N.; Ramli, S.N.A.; Joseph, N.; Philip, N.; Mustapha, N.F.; Ishak, S.N.; Mohd-Taib, F.S.; Nor, S.M.; Yusof, M.A.; Sah, S.A.M.; et al. Molecular characterization of pathogenic *Leptospira* spp. in small mammals captured from the human leptospirosis suspected areas of Selangor state, Malaysia. *Acta Trop.* **2018**, *188*, 68–77. [CrossRef] [PubMed]
75. Zhang, C.; Xu, J.; Zhang, T.; Qiu, H.; Li, Z.; Zhang, E.; Li, S.; Chang, Y.-F.; Guo, X.; Jiang, X.; et al. Genetic characteristics of pathogenic *Leptospira* in wild small animals and livestock in Jiangxi Province, China, 2002–2015. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2019**, *13*, e0007513. [CrossRef] [PubMed]
76. Balboni, A.; Zamagni, S.; Bertasio, C.; Boniotti, M.B.; Troia, R.; Battilani, M.; Dondi, F. Identification of serogroups Australis and Icterohaemorrhagiae in two dogs with a severe form of acute leptospirosis in Italy. *Pathogens* **2020**, *9*, 351. [CrossRef] [PubMed]
77. Moreno, L.Z.; Kremer, F.S.; Jaeger, L.H.; Loureiro, A.P.; Miraglia, F.; Eslabao, M.R.; Dellagostin, O.A.; Lilenbaum, W.; Moreno, A.M. Genomic characterization and comparative analysis of *Leptospira interrogans* serogroup Australis isolated from swine. *Pathog. Dis.* **2017**, *75*, ftx119. [CrossRef]
78. Czopowicz, M.; Kaba, J.; Smith, L.; Szalus-Jordanow, O.; Nowicki, M.; Witkowski, L.; Frymus, T. *Leptospiral* antibodies in the breeding goat population of Poland. *Vet. Rec.* **2011**, *169*, 230. [CrossRef] [PubMed]
79. Weis, S.; Rettinger, A.; Bergmann, M.; Llewellyn, J.R.; Pantchev, N.; Straubinger, R.K.; Hartmann, K. Detection of *Leptospira* DNA in urine and presence of specific antibodies in outdoor cats in Germany. *J. Feline Med. Surg.* **2017**, *19*, 470–476. [CrossRef] [PubMed]

80. Jaeger, L.H.; Moreno, L.Z.; Kremer, F.S.; Dellagostin, O.A.; Moreno, A.M.; Lilenbaum, W. Genomic characterization and comparative analysis of *Leptospira kirschneri* serogroup Grippotyphosa UC5/2011, a strain isolated after mare abortion: Implications for genital animal leptospirosis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2019**, *64*, 7–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Geisen, V.; Stengel, C.; Brem, S.; Müller, W.; Greene, C.; Hartmann, K. Canine leptospirosis infections—Clinical signs and outcome with different suspected *Leptospira* serogroups (42 cases). *J. Small Anim. Pract.* **2007**, *48*, 324–328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Hamond, C.; Martins, G.; Bremont, S.; Medeiros, M.A.; Bourhy, P.; Lilenbaum, W. Molecular characterization and serology of *Leptospira kirschneri* (Serogroup Grippotyphosa) isolated from urine of a mare post-abortion in Brazil. *Zoonoses Public Health* **2016**, *63*, 191–195. [[CrossRef](#)]
83. Cilia, G.; Bertelloni, F.; Piredda, I.; Ponti, M.N.; Turchi, B.; Cantile, C.; Parisi, F.; Pinzauti, P.; Armani, A.; Palmas, B.; et al. Presence of pathogenic *Leptospira* spp. in the reproductive system and fetuses of wild boars (*Sus scrofa*) in Italy. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2020**, *14*, e0008982. [[CrossRef](#)]
84. Grippi, F.; Giudice, E.; Di Pietro, S.; Sciacca, C.; Santangelo, F.; Galluzzo, P.; Barreca, S.; Guercio, A. *Leptospira interrogans* serogroup Sejroe serovar Hardjo in aborting cows: Two herd cases in Sicily (Italy). *J. Vet. Res.* **2020**, *64*, 73–78. [[CrossRef](#)]
85. Pinna, M.H.; Martins, G.; Loureiro, A.P.; Lilenbaum, W. Detection of bovine carriers of *Leptospira* by serological, bacteriological, and molecular tools. *Trop. Anim. Health Prod.* **2018**, *50*, 883–888. [[CrossRef](#)]
86. Ivanova, S.; Herbreteau, V.; Blasdel, K.; Chaval, Y.; Buchy, P.; Guillard, B.; Morand, S. *Leptospira* and rodents in Cambodia: Environmental determinants of infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2012**, *86*, 1032–1038. [[CrossRef](#)]
87. Krøjgaard, L.H.; Villumsen, S.; Markussen, M.D.K.; Jensen, J.S.; Leirs, H.; Heiberg, A.-C. High prevalence of *Leptospira* spp. in sewer rats (*Rattus norvegicus*). *Epidemiol. Infect.* **2009**, *137*, 1586–1592. [[CrossRef](#)]
88. Himswoorth, C.G.; Bidulka, J.; Parsons, K.L.; Feng, A.Y.T.; Tang, P.; Jardine, C.M.; Kerr, T.; Mak, S.; Robinson, J.; Patrick, D.M. Ecology of *Leptospira interrogans* in Norway rats (*Rattus norvegicus*) in an inner-city neighborhood of Vancouver, Canada. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2013**, *7*, e2270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Vanasco, N.B.; Sequeira, M.D.; Sequeira, G.; Tarabla, H.D. Associations between leptospiral infection and seropositivity in rodents and environmental characteristics in Argentina. *Prev. Vet. Med.* **2003**, *60*, 227–235. [[CrossRef](#)]
90. Marchlewska-Koj, A.; Kolodziej, B.; Filimowska, A. Aggressive behavior of adult bank voles (*Clethrionomys glareolus*) towards conspecifics. *Aggr. Behav.* **1989**, *15*, 381–387. [[CrossRef](#)]
91. Tamarin, R.H.; Ostfeld, R.S.; Pugh, S.R.; Bujalska, G. *Social Systems and Population Cycles in Voles*; Springer: Basel, Switzerland, 1990; ISBN 009783764324377.
92. Gomes, C.K.; Guedes, M.; Potula, H.-H.; Dellagostin, O.A.; Gomes-Solecki, M. Sex matters: Male hamsters are more susceptible to lethal infection with lower doses of pathogenic *Leptospira* than female hamsters. *Infect. Immun.* **2018**, *86*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Krijger, I.M.; Ahmed, A.A.A.; Goris, M.G.A.; Koerkamp, P.W.G.G.; Meerburg, B.G. Prevalence of *Leptospira* infection in rodents from Bangladesh. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2019**, *16*, 2113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Morris, P. A review of mammalian age determination methods. *Mammal Rev.* **1972**, *2*, 69–104. [[CrossRef](#)]
95. Mazurkiewicz, M. Density and weight structure of populations of the bank vole in open and enclosed areas. *Acta Theriol.* **1972**, *17*, 455–465. [[CrossRef](#)]
96. Mills, J.N.; Ksiazek, T.G.; Peters, C.J.; Childs, J.E. Long-term studies of hantavirus reservoir populations in the southwestern United States: A synthesis. *Emerg. Infect. Dis.* **1999**, *5*, 135–142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Birnbaum, S.; Shenberg, E.; Torten, M. The influence of maternal antibodies on the epidemiology of leptospiral carrier state in mice. *Am. J. Epidemiol.* **1972**, *96*, 313–317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Korslund, L.; Steen, H. Small rodent winter survival: Snow conditions limit access to food resources. *J. Anim. Ecol.* **2006**, *75*, 156–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Binder, F.; Drewes, S.; Imholt, C.; Saathoff, M.; Below, D.A.; Bendl, E.; Conraths, F.J.; Tenhaken, P.; Mylius, M.; Brockmann, S.; et al. Heterogeneous *Puumala orthohantavirus* situation in endemic regions in Germany in summer 2019. *Transbound. Emerg. Dis.* **2020**, *67*, 502–509. [[CrossRef](#)]
100. McMichael, A.J.; Woodruff, R.E.; Hales, S. Climate change and human health: Present and future risks. *Lancet* **2006**, *367*, 859–869. [[CrossRef](#)]
101. Reil, D.; Rosenfeld, U.M.; Imholt, C.; Schmidt, S.; Ulrich, R.G.; Eccard, J.A.; Jacob, J. *Puumala hantavirus* infections in bank vole populations: Host and virus dynamics in Central Europe. *BMC Ecol.* **2017**, *17*, 9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4 Diskussion und Schlussfolgerung

In der durchgeführten Studie konnten, über einen Zeitraum von 3 aufeinanderfolgenden Jahren, Rötelmäuse in Nordwest-Deutschland untersucht werden. Das untersuchte Gebiet erstreckte sich entlang eines festgelegten Transekts über Teile von Nordrhein-Westfalen und Niedersachsen. An sechs Lokalisationen wurden die Fänge im Frühjahr, Sommer und Herbst mit Schlag- und Lebendfallen an bis zu 13 Fangorten pro Lokalisation durchgeführt. Alle Lokalisationen befanden sich in Buchenwäldern. Die regelmäßige Durchführung der Fänge unter ähnlichen Bedingungen ermöglichte einen aussagekräftigen Vergleich zwischen den Fangjahren und Jahreszeiten. Vergleiche zu anderen Habitaten als dem Buchenwald waren jedoch nicht möglich.

Das untersuchte Gebiet wurde aufgrund hoher humaner Hantavirus-Infektionen von der Arbeitsgruppe „Rodent-borne Pathogens and Public Health“ ausgewählt. Ziel der Arbeitsgruppe war die Untersuchung des Puumala Orthohantavirus (PUUV). Da die Rötelmaus das Reservoir von PUUV ist, wurden ausschließlich gefangene Rötelmäuse einer Sektion unterzogen und konnten dieser Studie hier zur Verfügung gestellt werden.

Es ist bekannt, dass die Rötelmauspopulation je nach Nahrungsangebot schwankt. In Europa kommt es alle zwei bis drei Jahre zu einer Massenvermehrung mit anschließender Reduktion der Population (IMHOLT et al. 2017). In der durchgeführten Studie konnte dieses Phänomen eindrücklich beobachtet werden. Im Jahr 2018 wurde eine intensive Fruchtbildung der Buchen in Nordrhein-Westfalen und Niedersachsen beobachtet (BINDER et al. 2020, MULNV. 2018, NW-FWA. 2018). Das gesteigerte Nahrungsangebot und der milde Winter 2018, mit durchschnittlich 4°C in Nordrhein-Westfalen und Niedersachsen (DWD. 2019), boten gute Voraussetzungen für eine erhöhte Überlebensrate und gesteigerte Reproduktion der Rötelmaus. Die daraus folgende Massenvermehrung spiegelte sich im Jahr 2019 wider. In diesem Jahr wurde die höchste Anzahl an gefangenen Tieren dokumentiert (n=1116). Im Vergleich zum Vorjahr 2018 (n=263) hatte sich die Anzahl fast verfünffacht und im darauffolgendem Jahr 2020 hatte sich die Anzahl gefangener Tiere mehr als halbiert (n=438). Diese Beobachtung stimmt mit dem Ergebnis einer vorangegangenen Studie überein. Die Autoren kamen ebenfalls zu dem Schluss, dass 2019 eine Massenvermehrung der Rötelmaus in Nordwest-Deutschland auftrat (BINDER et al. 2020). Weiterhin stellten Binder et al. (2020) fest, dass im selben Jahr die Buchenmast in Thüringen deutlich geringer ausgeprägt war und es nicht zu einer Massenvermehrung der Rötelmaus kam. Die Massenvermehrung der Rötelmaus ist somit ein regional begrenztes Geschehen und stark abhängig von der Intensität der Buchenmast (BINDER et al. 2020).

Im Verzeichnis der „Roten Liste“ wird die Rötelmaus als ungefährdete und sehr häufig auftretende Art aufgeführt (MEINIG et al. 2020). Durch ihr zahlreiches Auftreten können sie Pflanzen und Bäume im forstwirtschaftlichen Betrieb schädigen (IMHOLT et al. 2017, NW-FVA. 2007). Wie in Kapitel 2.3.4

gezeigt, sind Rötelmäuse zudem Reservoir und Überträger einer Vielzahl von pathogenen Erregern, zum Beispiel PUUV, FSMEV, Borrelien und Bartonellen (BINDER et al. 2020, MICHELITSCH et al. 2019, GALFSKY et al. 2019). Die Verbreitung von PUUV in Rötelmäusen ist besonders gut untersucht. Es konnte beobachtet werden, dass es in Jahren mit Massenvermehrung der Rötelmaus zu einem Anstieg der humanen Hantavirus-Fälle kam. Als Ursache wurde die gestiegene Durchseuchung und höhere Viruslast der Tiere, sowie die erhöhte Wahrscheinlichkeit des Kontakts zum Menschen genannt (REIL et al. 2015, REIL et al. 2017). Basierend auf dieser Beobachtung und der Kopplung der Massenvermehrung an die Buchenmast, war es möglich ein Vorhersagemodel für humane Hantavirus-Fälle zu entwickeln (REIL et al. 2018).

Ein weiterer, in Rötelmäusen verbreiteter, zoonotischer Erreger sind *Leptospira* spp. (FISCHER et al. 2018). Das Bakterium kann schwere klinische Verläufe bei Menschen, Nutz- und Haustieren auslösen (KARPAGAM und GANESH. 2020, ELLIS. 2015). Die humane Leptospirose ist vor allem in tropischen Ländern endemisch und ist häufig mit Reiseaktivitäten in diese Länder verbunden (RKI. 2019). Der Anteil an in Deutschland erworbener Infektionen mit *Leptospira* spp. steigt aber seit 2019 an. Im Jahr 2020 wurden 83% der gemeldeten humanen Leptospirosefälle in Deutschland erworben (RKI. 2021). Dies lässt auf eine weite Verbreitung des Erregers auch in Deutschland schließen.

Menschen, Nutz- und Haustiere infizieren sich durch direkten Kontakt mit Urin von infizierten Tieren und orale Aufnahme oder indirekt durch Kontakt zu kontaminiertem Wasser oder Schlamm. Eine horizontale Übertragung ist ebenfalls möglich (KARPAGAM und GANESH. 2020, ELLIS. 2015). Kleinsäuger spielen eine wichtige Rolle im Übertragungszyklus von Leptospiren, da sie persistent infiziert sind und somit lebenslang Leptospiren in die Umwelt ausscheiden können (BHARTI et al. 2003). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die Infektion von Menschen mit *Leptospira* spp. in direktem Zusammenhang mit dem Kontakt zu infizierten Kleinsäugetieren oder deren Urin steht (DESAI et al. 2009, HOLT et al. 2006, SANCHEZ FERNANDEZ et al. 2020, KOIZUMI et al. 2009, MASUZAWA et al. 2006).

In Europa wurde in mehreren Studien gezeigt, dass die Rötelmaus Wirt von *Leptospira* spp. ist (FISCHER et al. 2018, JESKE et al. 2021b, MAYER-SCHOLL et al. 2014, OBIEGALA et al. 2017, BALÁŽOVÁ et al. 2021, SCHMIDT et al. 2014, TADIN et al. 2016). Bisher ist jedoch nur wenig bekannt über den Einfluss von Saison, Populationsdichte und individueller Faktoren (Gewicht, Geschlecht) auf die Prävalenz von *Leptospira* spp. in Rötelmäusen.

In dieser Studie wurden über 1800 Rötelmäuse auf *Leptospira* spp. untersucht. Es wurde eine Gesamtprävalenz von 7,5% (95% KI: 6,4 – 8,9), mit Schwankungen je nach Standort und Saison von 0% bis 23%, ermittelt. Vorangegangene Studien zeigten eine ähnliche *Leptospira*-spp.-Prävalenz von 4,1% bis 12 % in Rötelmäusen (FISCHER et al. 2018, JESKE et al. 2021b, MAYER-SCHOLL et al. 2014, OBIEGALA et al. 2016, BALÁŽOVÁ et al. 2021). Regional gab es jedoch starke Unterschiede. In einer

deutschlandweit durchgeführten Studie, die Kleinsäuger verschiedener Spezies an unterschiedlichen Standorten untersuchte, wurde eine geringfügig geringere Gesamtprävalenz von 6% in Rötelmäusen ermittelt (MAYER-SCHOLL et al. 2014). In zwei weiteren Studien, die in Baden-Württemberg, Bayern und Thüringen durchgeführt wurden, wurden ebenfalls niedrigere Gesamtprävalenzen von 4,1% bis 5,3% in Rötelmäusen nachgewiesen (OBIEGALA et al. 2017, OBIEGALA et al. 2016). Eine ähnliche Gesamtprävalenz von 7,8% wurde in einer Studie ermittelt, die an vier Standorten in Deutschland von 2010 bis 2014 Kleinsäuger auf Leptospiren untersuchte (FISCHER et al. 2018). Interessanterweise war ein Standort der vorherigen Studie in Nordrhein-Westfalen in enger räumlicher Nähe zu Fangort NW1 der durchgeführten Studie und zeigte eine höhere Prävalenz (20,4%) in Rötelmäusen als NW1 (15,7%) (FISCHER et al. 2018). Höhere Prävalenzen von *Leptospira* spp. in Rötelmäusen wurden ebenfalls in einer Studie in Thüringen (11,4%) und in der Tschechischen Republik (12%) dokumentiert (JESKE et al. 2021b, BALÁŽOVÁ et al. 2021).

Ursache für die unterschiedlichen Prävalenzen können unter anderem klimatische und geografische Bedingungen sein, die je nach Standort variierten. Das Überleben von *Leptospira* spp. ist außerhalb des Wirtes abhängig von direkter Verdünnung des ausgeschiedenen Urins in Wasser oder Boden. Trockenheit und hohe Temperaturen reduzieren die Überlebensdauer stark (BIERQUE et al. 2020). In einer vorrangegangenen Studie wurde gezeigt, dass sich die Überlebenszeit von Leptospiren bei hohen Temperaturen (37°C) signifikant verkürzt im Vergleich zu niedrigen Temperaturen (15°C). Nach vollständiger Trocknung war eine Rekultivierung nicht mehr möglich (NAU et al. 2020). Die extreme Dürre in Deutschland in den Jahren 2018 bis 2020, mit Bodentrockenheit und hohen Temperaturen (DWD, <https://cdc.dwd.de/portal/>, Abrufdatum: 31.05.2021), bot schlechte Voraussetzungen für das Überleben von *Leptospira* spp. in der Umwelt. Der Infektionszyklus von Leptospiren, bestehend aus Ausscheidung in die Umwelt und Bildung von Infektionsquellen in Wasser oder feuchtem Boden (KARPAGAM und GANESH. 2020), war durch die Dürre unterbrochen. Das Risiko der Rötelmaus sich indirekt, durch Kontakt der mukosalen Schleimhäute zu kontaminiertem Wasser oder Schlamm, mit *Leptospira* spp. anzustecken war reduziert. Dies führte zu einer geringeren Gesamtprävalenz in der Rötelmauspopulation. Die direkte Übertragung von Leptospiren war durch die Dürre vermutlich weniger stark beeinflusst, wodurch sich die Persistenz von *Leptospira* spp. in der Rötelmauspopulation während der Dürre erklären lässt. Die völlige Abwesenheit von *Leptospira* spp. an Standort LS6 ist möglicherweise durch natürliche Barrieren zu erklären. Der Eintrag des Erregers durch infizierte Artgenossen in die Rötelmauspopulation von LS6 könnte durch die angrenzende Bundesstraße 239 verhindert worden sein. Auch klimatische und geografische Unterschiede könnten eine Rolle spielen. Exakte Daten zu Bodenfeuchte und Wetter lagen für die Standorte dieser Studie nicht vor. Ein direkter Vergleich von Trockenheit, Bodenfeuchte und Temperatur war dadurch nicht möglich. Zukünftige Studien sollten Umweltproben in ihr Studiendesign einbeziehen, um exakte Daten über den Einfluss

von Wetter und Umweltbedingungen auf die Ausbreitung von *Leptospira* spp. in Rötelmäusen zu erhalten.

Neben dem Klima scheint auch die Wirtsspezies eine Rolle bei Prävalenz und Speziesverteilung von *Leptospira* spp. zu spielen. Theoretisch kann jedes Säugetier Träger von Leptospiren sein (ELLIS. 2015). Es hat sich jedoch gezeigt, dass einzelne Serovare regional oder in der Population von bestimmten Tieren zirkulieren. Zum Beispiel ist in Europa das Serovar Hardjo in Rindern, Serovar Pomona in Schweinen und das Serovar Icterohaemorrhagiae in der Wanderratte verbreitet (ELLIS. 2015, HEUSER et al. 2017, STRUTZBERG-MINDER und KREIENBROCK. 2011). Es wird allgemein angenommen, dass Kleinsäuger Hauptwirt von Leptospiren sind. Sie zeigen kaum klinische Veränderungen und scheiden den Erreger nach Infektion lebenslang aus (BHARTI et al. 2003). Aber auch in der Kleinsäugerpopulation gibt es Unterschiede zwischen den Gattungen. Es stellt sich die Frage, ob die Rötelmaus der Hauptwirt für eine bestimmte Leptospirenspezies oder ein bestimmtes Leptospirenserovar ist.

In früheren Studien wurde eine unterschiedliche Verteilung von Leptospiren in Kleinsäufern in Deutschland festgestellt. In Feldmäusen, die ihr Habitat auf Feldern und Grünland haben, wurden *Leptospira* spp. Prävalenzen von bis zu über 30% dokumentiert. Die Prävalenz bei Feldmäusen war signifikant höher als bei Kleinsäufern, die ihr Habitat im Wald haben (JESKE et al. 2021b, FISCHER et al. 2018). Neben höheren Prävalenzen wurde auch eine andere Verteilung der Leptospirenspezies festgestellt. In Feldmäusen wurde fast ausschließlich *L. kirschneri* ST110 nachgewiesen (FISCHER et al. 2018, JESKE et al. 2021b, MAYER-SCHOLL et al. 2014). Es wird davon ausgegangen, dass die Feldmaus der Hauptwirt von *L. kirschneri* ist (FISCHER et al. 2018, MAYER-SCHOLL et al. 2014). Im Gegensatz dazu wurden in Mäusen, die ihr Habitat vornehmlich in Wäldern haben (Waldmaus, Gelbhalsmaus, Rötelmaus) (HAUER et al. 2009), Infektionen mit *L. interrogans* ST24, *L. kirschneri* ST110 und ST117 und *L. borgpetersenii* ST197 und ST146 nachgewiesen (FISCHER et al. 2018, JESKE et al. 2021b, OBIEGALA et al. 2016).

Diese Beobachtung konnte in der durchgeführten Studie bestätigt werden. In den untersuchten Rötelmäusen wurden sowohl *L. interrogans* ST24, *L. kirschneri* ST110, als auch *L. borgpetersenii* ST197 nachgewiesen. Die Spezies *L. interrogans* wurde als häufigste Art bei den real-time PCR-positiven Proben identifiziert ($p < 0,0001$). Dieses Ergebnis unterscheidet sich von früheren Studien, in denen Rötelmäuse häufiger mit *L. kirschneri*, als mit *L. interrogans* infiziert waren (MAYER-SCHOLL et al. 2014, JESKE et al. 2021b, OBIEGALA et al. 2016). Es lässt sich schlussfolgern, dass in der Rötelmauspopulation mehrere Leptospirenspezies zirkulieren. Die Rötelmaus ist nicht Hauptwirt einer bestimmten Spezies oder eines Sequenztypes. Die gefundenen Leptospirenspezies und Sequenztypen wurden ebenfalls in einer Vielzahl anderer Kleinsäuger nachgewiesen: ST24 in Gelbhalsmaus, Waldmaus und dem Eurasischen Bieher (*Castor fiber*), ST110 in Gelbhalsmaus, Feldmaus und Waldspitzmaus (*Sorex*

araneus) und ST197 in Waldspitzmaus und Schabrackenspitzmaus (*Sorex coronatus*) (FISCHER et al. 2018, OBIEGALA et al. 2016, WOLL et al. 2012).

Die drei nachgewiesenen Leptospirenspezies kommen weltweit vor und sind als pathogen einzustufen (CAIMI und RUYBAL. 2020). Auf Grundlage der nachgewiesenen ST lassen sich zusätzlich verschiedene Serogruppen und Serovare zuordnen.

Leptospira interrogans ST24 wird der Serogruppe Australis Serovar Bratislava, Jalna, Lora und Muenchen zugeordnet (PubMLST, <https://pubmlst.org>, Abrufdatum: 27.04.2021) In Polen konnte die Serogruppe Australis in Ziegen nachgewiesen werden. Die untersuchten Tiere zeigten zum Zeitpunkt der Untersuchung keine klinischen Veränderungen. In den Betrieben wurden jedoch Aborte dokumentiert, die möglicherweise auf die *Leptospira*-Infektion zurückzuführen waren (CZOPOWICZ et al. 2011). Schweine zeigen bei Infektion mit der Serogruppe Australis Serovar Bratislava eine reduzierte Fruchtbarkeit und Aborte. Durch eine lange Persistenz des Erregers kann es unbemerkt zur Durchseuchung des Betriebes kommen, wodurch vor allem wirtschaftliche Verluste entstehen (HAMOND et al. 2015, ELLIS et al. 1986). In Italien konnte auch in Wildschweinen *L. interrogans* Serovar Bratislava nachgewiesen werden (CILIA et al. 2020). Hunde erkranken nach Infektion mit Leptospiren der Serogruppe Australis schwer. Zum Krankheitsbild gehören Nierenversagen, systemische Entzündung und Organversagen (BALBONI et al. 2020). In Katzen wurde ebenfalls die Serovar Bratislava festgestellt. Im Gegensatz zum Hund zeigen Katzen jedoch keine klinischen Veränderungen (WEIS et al. 2017).

Leptospira kirschneri ST110 gehört zur Serogruppe Grippotyphosa, Serovar Grippotyphosa, Vanderhoedeni, Valbuzzi (PubMLST, <https://pubmlst.org>, Abrufdatum: 27.04.2021). Die Serogruppe Grippotyphosa kann bei Schafen vereinzelt schwere klinische Verläufe mit Hämaturie, Ikterus und Tod führen (ELLIS. 2015). Bei Pferden führt die Infektion mit dem Serovar Grippotyphosa zu schweren Krankheitsverläufen mit Fieber, Ikterus, Nierenversagen, Aborten und Geburt lebensschwacher Fohlen. Die Infektion mit Leptospiren wird weiterhin als Ursache der Equinen Rezidivierenden Uveitis diskutiert (DIVERS et al. 2019, HAMOND et al. 2016). Hunde können nach Infektion mit dem Serovar Grippotyphosa ebenfalls schwere klinische Veränderungen, wie Lethargie, Gewichtsverlust, Ikterus, Dehydratation und rot-braunen Urin ausbilden (GEISEN et al. 2007). Die Serogruppe Grippothyphosa kann auch beim Menschen zur Erkrankung führen. Im Jahr 2007 infizierten sich 13 Erdbeerpflücker in Deutschland mit Leptospiren der Serogruppe Grippotyphosa. Die Patienten litten an Kopfschmerzen, Gliederschmerzen, gastrointestinalen Symptomen, respiratorischen Symptomen, Konjunktivitis, Ikterus und Nierenversagen. Ansteckungsursache war der Kontakt zu mit Nagerurin-kontaminiertem Wasser (DESAI et al. 2009).

Die Leptospirenspezies *L. borgpetersenii* mit dem ST197 wird der Serogruppe Sejroe zugeordnet (PubMLST, <https://pubmlst.org>, Abrufdatum: 27.04.2021). Vor allem Rinder sind für diese Serogruppe

empfindlich. Die bovine Leptospirose ist verantwortlich für reduzierte Fruchtbarkeit und verringerte Milchleistung. Die Tiere sind persistent infiziert und verbreiten die Leptospiren in der Umwelt, somit stellen sie eine Infektionsquelle für andere Tiere und den Menschen dar (PINNA et al. 2018, ELLIS. 2015).

Die Vielzahl unterschiedlicher Serogruppen und Serovare, die in der vorliegenden Studie in der Rötelmaus gefunden wurden, sind für ein breites Spektrum von Wirten pathogen. Schwere klinische Verläufe bei Menschen und Tieren, sowie wirtschaftliche Verluste sind möglich. Dies unterstreicht die große Bedeutung der Rötelmaus als Überträger von *Leptospira* spp. und die potentielle Gefahr für den Menschen.

Ein weiteres Ziel der durchgeführten Studie war die Untersuchung des Einflusses von individuellen Faktoren, der Saison und der Populationsdichte auf die Prävalenz von *Leptospira* spp. in Rötelmäusen. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass mit zunehmendem Alter von Kleinsäugetieren die Infektionswahrscheinlichkeit steigt (FISCHER et al. 2018, MAYER-SCHOLL et al. 2014, IVANOVA et al. 2012, KRØJGAARD et al. 2009, HIMSWORTH et al. 2013). Diese Beobachtung konnte für Rötelmäuse bestätigt werden. In allen drei untersuchten Jahren nahm die individuelle Infektionswahrscheinlichkeit mit steigendem Körpergewicht zu. Der Zusammenhang stellte sich am deutlichsten im Jahr 2020 ($p < 0,001$) dar und weniger deutlich in den Jahren 2019 ($p = 0,045$) und 2018 ($p = 0,071$). Ursache für die geringere Infektionswahrscheinlichkeit in Jungtieren waren möglicherweise maternale Antikörper, die von den infizierten Muttertieren auf den Nachwuchs übertragen wurden (BIRNBAUM et al. 1972). Mit zunehmendem Alter und Beginn der Geschlechtsreife, kam es zu vermehrtem Kontakt zur Umwelt (TAMARIN et al. 1990, MARCHLEWSKA-KOJ et al. 1989). Die indirekte Ansteckung durch Kontakt zu mit Leptospiren kontaminiertem Wasser oder Schlamm war erhöht. Zusätzlich wurde durch engen Kontakt zu Artgenossen bei Revierkämpfen und während der Paarung (TAMARIN et al. 1990) die direkte Übertragung verstärkt. Ein weiterer Grund für die höhere Prävalenz in älteren Tieren ist die lebenslange Persistenz von Leptospiren im Nierenepithel (BHARTI et al. 2003). Bei der Betrachtung des Alters muss berücksichtigt werden, dass das Körpergewicht kein optimales Mittel zur exakten Bestimmung des individuellen Alters eines Tieres ist. Je nach Nahrungsangebot und Jahreszeit kann das Gewicht unabhängig vom Alter schwanken (MORRIS. 1972). Die Tiere können mit Hilfe des Gewichts jedoch in Altersgruppen eingeteilt werden und eine Vergleichbarkeit innerhalb einer Population ist möglich (BAJER et al. 2002).

Neben dem Gewicht hatte auch das Geschlecht Einfluss auf die Prävalenz von *Leptospira* spp. in Rötelmäusen, jedoch nur in Jahren mit erhöhter Reproduktion. Im Jahr 2019 waren männliche Rötelmäuse signifikant häufiger mit Leptospiren infiziert als weibliche ($p = 0,015$). Die bereits beschriebene Massenvermehrung 2019 führte zu einer erhöhten Abundanz. Mit steigendem Populationsdruck können vermehrt aggressiven Auseinandersetzungen zwischen Artgenossen

beobachtet werden. Zusätzlich kommt es zu vermehrten Kontakt mit unterschiedlichen Sexualpartnern (TAMARIN et al. 1990, MARCHLEWSKA-KOJ et al. 1989). Die Wahrscheinlichkeit, direkt oder indirekt mit *Leptospiren* in Kontakt zu kommen, war somit erhöht. Im Unterschied dazu wurden in den Jahren ohne Massenvermehrung (2018 und 2020) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern festgestellt. In früheren Studien wurden unterschiedliche Ergebnisse zum Einfluss des Geschlechtes dokumentiert. In einer Studie in Deutschland waren männliche Rötelmäuse signifikant häufiger mit *Leptospiren* infiziert als weibliche (FISCHER et al. 2018). Auch in anderen Studien wurden Unterschiede zwischen den Geschlechtern bei Ratten und experimentell infizierten Hamstern dokumentiert (GOMES et al. 2018, KRIJGER et al. 2019). Andere Studien in Europa zeigten jedoch keinen Einfluss des Geschlechtes auf die Prävalenz in Kleinsäufern verschiedener Spezies (IZQUIERDO-RODRÍGUEZ et al. 2020, KRIJGER et al. 2020, HEUSER et al. 2017). Der Einfluss des Geschlechts auf die Infektionswahrscheinlichkeit konnte in dieser Studie nicht abschließend geklärt werden.

Eine saisonale Abhängigkeit der *Leptospira* spp.-Prävalenz in Kleinsäufern konnte bereits in mehreren Studien dokumentiert werden. Die untersuchten Kleinsäuger zeigten eine steigende Prävalenz im Jahresverlauf, mit der höchsten Prävalenz im Herbst (FISCHER et al. 2018, JESKE et al. 2021b).

In der durchgeführten Studie wurden unterschiedliche saisonale Verläufe in den drei untersuchten Jahren festgestellt. In den Jahren 2018 und 2020 wurden die höchsten Prävalenzen im Frühjahr und die niedrigsten Prävalenzen im Sommer verzeichnet.

Ursache hierfür war die Zusammensetzung der Rötelmauspopulation. Im Frühjahr bestand die Population vermehrt aus überwinterten adulten Tieren. Diese persistent infizierten Tiere trugen den Erreger in die nächste Generation. Mit Beginn der Fortpflanzungsphase erfolgte eine Verschiebung der Population zu vermehrt jungen Tieren, die eine geringere Infektionswahrscheinlichkeit hatten als adulte Tiere. Dieser „juvenile dilution effect“ wurde ebenfalls bei PUUV-Infektionen in Rötelmäusen beschrieben (MILLS et al. 1999, REIL et al. 2017). Im Herbst stieg das Durchschnittsalter der Tiere wieder, da nur adulte Individuen überwintern können (KORSLUND und STEEN. 2006, REIL et al. 2017). Wie bereits dargestellt haben ältere Tiere eine höhere Wahrscheinlichkeit mit *Leptospiren* infiziert zu sein, wodurch die Prävalenz zum Jahresende hin stieg. Zusätzlich wurde die geringe Prävalenz im Sommer durch die extreme Dürre im Sommer 2018 und 2020 verstärkt. Die Überlebensfähigkeit von *Leptospiren* in der Umwelt war reduziert und dadurch die indirekte Ansteckungswahrscheinlichkeit verringert. Ein Zusammenhang zwischen Rötelmaus-Abundanz und *Leptospiren*-Prävalenz konnte in den Jahren 2018 und 2020 nicht festgestellt werden.

Ein anderer Verlauf stellt sich im Jahr 2019 dar. Die Prävalenz war am niedrigsten im Frühling und erreichte den höchsten Wert im Herbst. Ursache hierfür war eine erhöhte Rötelmausabundanz, ausgelöst durch die Buchenmast im Jahr 2018 (BINDER et al. 2020). Die statistische Auswertung hat

gezeigt, dass im Sommer 2019 die Abundanz noch einen geringen Einfluss auf die Prävalenz hatte ($p=0,042$). Die Prävalenz stieg leicht auf Flächen, auf denen bereits im Frühjahr die Rötelmauspopulation hoch war ($p=0,038$). Im Herbst 2019 nahm die Prävalenz in allen Gebieten mit steigender Abundanz zu ($p=0,005$).

Eine erhöhte Abundanz führte zu engerem Kontakt zwischen Individuen und erhöhter Konkurrenz um Nahrung, Sexualpartner und Lebensraum (MARCHLEWSKA-KOJ et al. 1989, TAMARIN et al. 1990). Die direkte Übertragung von *Leptospira* spp. zwischen den Artgenossen war dadurch erhöht. Weiterhin kam es zu einer vermehrten Ausscheidung von Leptospiren in die Umwelt, da Rötelmäuse ihr Revier durch Urin markieren (TAMARIN et al. 1990). Die Wahrscheinlichkeit einer indirekten Ansteckung war somit zusätzlich erhöht.

Der Zusammenhang von Abundanz und Prävalenz konnte ebenfalls für die PUUV-Prävalenz in Rötelmäusen beschrieben werden. Mit ansteigender Abundanz, aufgrund der Buchenmast, kam es zu einem signifikanten Anstieg der PUUV-Prävalenz innerhalb der Rötelmauspopulation (BINDER et al. 2020). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Abundanz ebenfalls Einfluss auf das individuelle Infektionsrisiko von Rötelmäusen mit Leptospiren hatte. Dies traf jedoch nur auf Jahre mit erhöhter Reproduktion zu. In den Jahren ohne Massenvermehrung 2018 und 2020 konnte kein statistischer Zusammenhang zwischen der Abundanz und der *Leptospira*-Prävalenz in Rötelmäusen festgestellt werden. Ein statistischer Schwellenwert ab dem die Abundanz Einfluss auf das Infektionsgeschehen von *Leptospira* spp. in Rötelmäusen zeigt, konnte in dieser Studie leider nicht berechnet werden. Weitere Studien sind notwendig um den Einfluss der Abundanz in der Epidemiologie von *Leptospira* spp. abschließend zu klären.

Trotz der moderaten bis hohen Prävalenzen von Leptospiren in Rötelmäusen in der untersuchten Region in Nordwest-Deutschland, waren die dokumentierten humanen Fallzahlen in den entsprechenden Landkreisen auf einem niedrigen Niveau (Inzidenz=0,09/100.000 Einwohner (RKI, SurvStat@RKI 2.0, <https://survstat.rki.de>, Abrufdatum: 27.08.2021). Aufgrund der teilweise unspezifischen klinischen Präsentation und einem geringen Bewusstsein für die Erkrankung, ist Leptospirose eine häufig unterdiagnostizierte Krankheit. Es ist davon auszugehen, dass die tatsächlichen Fallzahlen höher sind (BROCKMANN et al. 2016). Mögliche Infektionsquellen für den Menschen sind der direkte Kontakt zu infizierten Rötelmäusen oder der indirekte Kontakt zu mit Rötelmausurin kontaminiertem Wasser oder Schlamm. Ärzte und Tierärzte sollten die Leptospirose als mögliche Differentialdiagnose bei fieberhaften Erkrankungen auch in Deutschland in Betracht ziehen. Ein Anstieg der humanen Fallzahlen ist zu befürchten, da der Klimawandel zu vermehrten Starkregen und Überflutungen führen kann (MCMICHAEL et al. 2006). Die Flutkatastrophe in Teilen Nordrhein-Westfalens und Rheinland-Pfalz im Sommer 2021 hat dies eindrücklich gezeigt. Auch die zunehmende Beliebtheit von Outdoor-Aktivitäten kann zu einer steigenden Infektionsgefahr in der

Bevölkerung führen. Andererseits kann es im Rahmen des Klimawandels auch vermehrt zu Dürren kommen (MCMICHAEL et al. 2006). Das Überleben von *Leptospira* spp. in der Umwelt würde dadurch stark reduziert werden und möglicherweise zu einem geringeren Ansteckungsrisiko führen. Die Verbreitung von Leptospiren in Rötelmäusen, aber auch anderen Nagetieren, die als Reservoir für Leptospiren dienen, sollte weiterhin beobachtet werden. Wie in dieser Studie gezeigt, kann der Erreger auch bei Dürre in der Rötelmauspopulation persistieren und eine potentielle Infektionsquelle für den Menschen bilden.

5 Zusammenfassung

Verfasser Elisabeth Schmidt

Titel Untersuchung zu den Einflüssen von Saison, Populationsdichte und individuellen Faktoren auf die Prävalenz der Leptospiren in Rötelmäusen in Nordwest-Deutschland

Institut Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen

Eingereicht im Dezember 2021

46 Seiten, 2 Abbildung, 2 Tabellen, 1 Publikation, 132 Quellen

Schlüsselwörter: Leptospirose, *Clethrionomys glareolus*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. borgpetersenii*, Sequenztyp (ST), Europa

Einleitung

Leptospirose ist eine weltweit vorkommende, zoonotische Erkrankung. Ausbrüche humaner Leptospirose sind meist mit niedrigen Hygienestandards und extremen Wetterereignissen, wie Starkregen und Überschwemmungen, assoziiert. Endemische Gebiete befinden sich in Lateinamerika und Asien, aber auch in Gebieten mit moderatem Klima und hohen Hygienestandards treten Erkrankungen auf. Das Hauptreservoir von Leptospiren sind Kleinsäuger. Diese sind persistent infiziert und scheiden das Bakterium in die Umwelt aus. Menschen infizieren sich durch direkten Kontakt zu Urin von infizierten Tieren oder indirekt durch Kontakt zu kontaminiertem Wasser oder Schlamm.

Ziele der Untersuchungen

Bisher gibt es nur wenige Studien zum Vorkommen von Leptospiren in Rötelmäusen in Deutschland. Derzeit ist unklar, wie die Infektionswahrscheinlichkeit durch individuelle Faktoren und die Populationsdichte beeinflusst wird. Ziel der Studie war es deshalb die Verbreitung und die Vielfalt von Leptospiren in Rötelmäuse zu untersuchen. Es wurde der Einfluss von individuellen Faktoren, wie Gewicht und Geschlecht, sowie Jahreszeit und Populationsdichte auf die Prävalenz untersucht.

Tiere, Material und Methoden

Für die Studie wurden Rötelmäuse in einem zusammenhängenden Gebiet, das Teile von Nordrhein-Westfalen und Niedersachsen einbezieht, in den Jahren 2018 bis 2020 gefangen und seziiert. Aus den Nierenproben dieser Tiere wurde DNA extrahiert und mittels einer quantitativen real-time PCR untersucht, die das partielle *lip132* Gen detektiert. Im Anschluss wurden positive Proben mittels einer Single-Locus-Sequenztypisierung auf die Leptospirenspezies untersucht. Um den Sequenztyp zu analysieren, wurde zusätzlich eine Multi-Locus-Sequenztypisierung durchgeführt. Die Konfidenzintervalle (95% KI), für die Prävalenz von Leptospiren in der Rötelmaus, wurden mit der Methode nach Clopper und Pearson in GraphPad-Software errechnet. Die Häufigkeit einzelner Leptospirenspezies wurde mittels Chi-Quadrat Test verglichen. Der Einfluss individueller Charakteristika der Rötelmäuse, sowie Jahreszeit und Abundanz wurde in einem linear gemischten Model mit Hilfe des *lme4* Pakets in R-Software berechnet.

Ergebnisse

In der Studie konnten insgesamt 1817 Rötelmäuse, an 2 Standorten in Nordrhein-Westfalen und 4 Standorten in Niedersachsen, in den Jahren 2018 (n=263), 2019 (n=1116) und 2020 (n=438) gefangen werden. Die meisten Rötelmäuse wurden im Jahr 2019 dokumentiert. Ursache hierfür war die Buchenmast 2018, die zu einer Massenvermehrung der Rötelmaus im Jahr 2019 führte.

Es konnte eine Gesamtprävalenz für Leptospiren von 7,5% (95% KI: 6,4 – 8,9) ermittelt werden. Folgende Leptospirenspezies und Sequenztypen wurden detektiert: *L. interrogans* ST24, *L. kirschneri* ST110 und *L. borgpetersenii* ST197. Die am häufigsten nachgewiesene Leptospirenspezies war *L. interrogans* ($\chi^2=42,466$, $df=1$, $p<0,0001$).

Mit steigendem Gewicht nahm die individuelle Infektionswahrscheinlichkeit zu. Der Einfluss der Jahreszeit stellte sich im untersuchten Zeitraum unterschiedlich dar. In den Jahren ohne Massenvermehrung (2018 und 2020) wurden die höchsten Prävalenzen im Frühjahr festgestellt. Im Gegensatz dazu stieg im Jahr mit Massenvermehrung (2019) die Prävalenz im Jahresverlauf und erreichte den höchsten Wert im Herbst 2019 (23%). Die Abundanz und das Geschlecht zeigten nur im Jahr 2019 einen Einfluss auf die Infektionswahrscheinlichkeit. Ein Schwellenwert, ab dem die Abundanz Einfluss auf die Prävalenz zeigt, konnte in dieser Studie nicht berechnet werden.

Schlussfolgerungen

Insgesamt konnte eine moderate Prävalenz von Leptospiren mit 7,5% ermittelt werden. Die Prävalenz war abhängig von Standort, Jahr und Saison und erreichte den höchsten Wert im Herbst 2019 (23%). Die nachgewiesenen Leptospirenspezies können schwere Krankheitsverläufe bei Menschen und Tieren auslösen. Auch wenn die humanen Fallzahlen in Deutschland gering sind, hat diese Studie gezeigt, dass Leptospiren in der Rötelmauspopulation zirkulieren. Ein Anstieg humaner Leptospirosefälle ist zu befürchten, da es ausgelöst durch den Klimawandel vermehrt zu extremen Wetterereignissen, wie Starkregen oder Überschwemmungen, kommen kann.

6 Summary

Author Elisabeth Schmidt

Title Investigation of the influence of season, population density and individual factors on the prevalence of leptospires in bank voles in North-West Germany.

Institute Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health

Submitted in December 2021

46 pages, 2 figure, 2 tables, 1 publication, 132 references

Key words: Leptospirosis, *Clethrionomys glareolus*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. borgpetersenii*, MLST, Europe

Introduction

Leptospirosis is a worldwide emerging zoonotic disease. Outbreaks of human leptospirosis are usually associated with low hygiene standards and extreme weather events, such as heavy rainfall and flooding. Endemic areas are located in Latin America, and Asia, but the disease also occurs in areas with moderate climate and high hygiene standards. The main reservoir of *Leptospira* spp. are small mammals. These are persistently infected and excrete the bacterium into the environment. Humans become infected through direct contact to urine of infected animals or indirectly through contact to contaminated water or soil.

Aims of the study

To date, there have been few studies on the occurrence of leptospires in bank voles in Germany. Currently, it is unclear how the probability of infection is influenced by individual factors and population density. Therefore, the aim of this study was to investigate the distribution and diversity of *Leptospira* spp. in bank voles. The influence of individual factors, such as weight and sex, as well as season and population density on the prevalence was investigated.

Animals, material and methods

For this study, bank voles were trapped in a transect covering parts of North Rhine-Westphalia and Lower Saxony in the years 2018 to 2020. After necropsy, DNA was extracted from kidney samples and analyzed by quantitative real-time PCR targeting the partial *lip132* gene. Further, samples with a positive result were analyzed by Single locus sequence typing to detect the *Leptospira* species. Multi locus sequence typing was performed, to analyze the sequence type. Confidence intervals (95% CI) for prevalence of *Leptospira* spp. in bank voles were determined by the Clopper and Pearson method with GraphPad-software. Independence of compared sample sizes was tested with the two-tailed chi-squared test. To analyze the *Leptospira* spp. prevalence variations within bank vole hosts, we generated a generalized linear mixed model using the *lme4* package within the R-software.

Results

In the study, a total of 1817 bank voles were captured at 2 sites in North Rhine-Westphalia and 4 sites

in Lower Saxony in the years 2018 (n=263), 2019 (n=1116), and 2020 (n=438). The highest number of bank voles were documented in 2019. This was caused by beech mast in 2018 which led to an increased reproduction of bank voles in 2019.

An overall prevalence for leptospires of 7.5% (95% CI: 6.4 - 8.9) was determined and the following leptospiral species and sequence types were detected: *L. interrogans* ST24, *L. kirschneri* ST110, and *L. borgpetersenii* ST197. The most frequently detected leptospiral species was *L. interrogans* ($\chi^2=42.466$, df=1, $p<0.0001$).

The individual probability of infection increased with increasing body weight. The influence of season on the individual infection probability presented differently in the study period. In the years with low reproduction (2018 and 2020), the highest prevalences were observed in spring. In contrast to that, in the year with high reproduction (2019), the prevalences increased during the year and reached the highest value in autumn 2019 (23%). Abundance and sex had only an impact on the infection probability in 2019. A threshold value at which the abundance showed an influence on the prevalence, could not be calculated in this study.

Conclusions

Overall, a moderate *Leptospira* spp. prevalence of 7.5% was found. Prevalence was dependent on location, year, and season, reaching the highest value in fall 2019 (23%). The detected *Leptospira* species can cause severe disease in humans and animals. Although human case numbers in Germany are low, this study has shown that leptospires circulate in the bank vole population. An increase in human cases of leptospirosis is to be feared, since extreme weather events, such as heavy rain or flooding, may occur more frequently as a result of climate change.

7 Referenzen

7.1 Literaturverzeichnis

Adler B. History of Leptospirosis and *Leptospira*. In: Adler B, Hrsg. *Leptospira* and Leptospirosis. 1. Aufl. Berlin: Springer-Verlag; 2015. p. 1–9.

Adler B, Murphy AM, Locarnini SA, Faine S. Detection of specific anti-leptospiral immunoglobulins M and G in human serum by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol.* 1980; 11(5): 452–7.

Ahmed N, Devi SM, de los Á Valverde, M, Vijayachari P, Machang'u RS, Ellis WA et al. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2006; 5(28). doi: 10.1186/1476-0711-5-28.

Atxaerandio R, Aduriz G, Ziluaga I, Esteban JI, Maranda L, Mainar-Jaime RC. Serological evidence of *Leptospira interrogans* serovar Bratislava infection and its association with abortions in cattle in northern Spain. *Vet Rec.* 2005; 156(12): 376–80. doi: 10.1136/vr.156.12.376.

Aulagnier S, Haffner P, Mitchell-Jones T, Moutou F, Zima J, Roth O et al. Die Säugetiere Europas, Nordafrikas und Vorderasiens: Der Bestimmungsführer. Bern: Haupt; 2009. p. 194

Aviat F, Blanchard B, Michel V, Blanchet B, Branger C, Hars J et al. *Leptospira* exposure in the human environment in France: A survey in feral rodents and in fresh water. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2009; 32(6): 463–76. doi: 10.1016/j.cimid.2008.05.004.

Bajer A, Bednarska M, Pawełczyk A, Behnke JM, Gilbert FS, Sinski E. Prevalence and abundance of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* spp. in wild rural rodents from the Mazury Lake District region of Poland. *Parasitology.* 2002; 125(Pt 1): 21–34. doi: 10.1017/s0031182002001865.

Balážová A, Nosková E, Široký P, Durrant C, Baláž V. Diversity and dynamics of zoonotic pathogens within a local community of small mammals. *Biologia.* 2021. doi: 10.1007/s11756-021-00797-8.

Balboni A, Zamagni S, Bertasio C, Boniotti MB, Troia R, Battilani M et al. Identification of Serogroups Australis and Icterohaemorrhagiae in Two Dogs with a Severe Form of Acute Leptospirosis in Italy. *Pathogens.* 2020; 9(5). doi: 10.3390/pathogens9050351.

Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis.* 2003; 3(12): 757–71. doi: 10.1016/S1473-3099(03)00830-2.

Bierque E, Thibeaux R, Girault D, Soupé-Gilbert M-E, Goarant C. A systematic review of *Leptospira* in water and soil environments. PLoS One. 2020; 15(1): e0227055. doi: 10.1371/journal.pone.0227055.

Binder F, Drewes S, Imholt C, Saathoff M, Below DA, Bendl E et al. Heterogeneous Puumala orthohantavirus situation in endemic regions in Germany in summer 2019. Transbound Emerg Dis. 2020; 67(2): 502–9. doi: 10.1111/tbed.13408.

Birnbaum S, Shenberg E, Torten M. The influence of maternal antibodies on the epidemiology of leptospiral carrier state in mice. Am J Epidemiol. 1972; 4: 313–7. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a121461.

Boey K, Shiokawa K, Rajeev S. *Leptospira* infection in rats: A literature review of global prevalence and distribution. PLoS Negl Trop Dis. 2019; 13(8): e0007499. doi: 10.1371/journal.pntd.0007499.

Bolin CA, Cassells JA, Hill HT, Frantz JC, Nielsen JN. Reproductive Failure Associated with *Leptospira interrogans* Serovar Bratislava Infection of Swine. J Vet Diagn Invest. 1991; 3(2): 152–4. doi: 10.1177/104063879100300209.

Boonsilp S, Thaipadungpanit J, Amornchai P, Wuthiekanun V, Bailey MS, Holden MTG et al. A Single Multilocus Sequence Typing (MLST) Scheme for Seven Pathogenic *Leptospira* Species. PLoS Negl Trop Dis. 2013; 7(1): e1954. doi: 10.1371/journal.pntd.0001954.

Brockmann S, Piechotowski I, Bock-Hensley O, Winter C, Oehme R, Zimmermann S et al. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants in Germany, 2006. BMC Infect Dis. 2010; 10: 91. doi: 10.1186/1471-2334-10-91.

Brockmann SO, Ulrich L, Piechotowski I, Wagner-Wiening C, Nöckler K, Mayer-Scholl A et al. Risk factors for human *Leptospira* seropositivity in South Germany. SpringerPlus. 2016; 5(1): 1796. doi: 10.1186/s40064-016-3483-8.

Buffet J-P, Marsot M, Vaumourin E, Gasqui P, Masségli S, Marcheteau E et al. Co-infection of *Borrelia afzelii* and *Bartonella* spp. in bank voles from a suburban forest. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2012; 35(6): 583–9. doi: 10.1016/j.cimid.2012.07.002.

Caimi K, Ruybal P. *Leptospira* spp., a genus in the stage of diversity and genomic data expansion. Infect Genet Evol. 2020; 81: 104241. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104241.

Cameron CE. Leptospiral Structure, Physiology, and Metabolism. In: Adler B, Hrsg. *Leptospira* and Leptospirosis. 1. Aufl. Berlin: Springer-Verlag; 2015. p. 21–41.

Charon NW, Goldstein SF. Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: the spirochetes. *Annu Rev Genet.* 2002; 36: 47–73. doi: 10.1146/annurev.genet.36.041602.134359.

Cibulski S, Wollanke B. Testing wild small mammals and water samples for pathogen leptospires using real-time PCR. *PHK.* 2016; 32(6): 634–40. doi: 10.21836/PEM20160608.

Cilia G, Bertelloni F, Piredda I, Ponti MN, Turchi B, Cantile C et al. Presence of pathogenic *Leptospira* spp. in the reproductive system and fetuses of wild boars (*Sus scrofa*) in Italy. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020; 14(12): e0008982. doi: 10.1371/journal.pntd.0008982.

Clement J, Vercauteren J, Verstraeten WW, Ducoffre G, Barrios JM, Vandamme A-M et al. Relating increasing hantavirus incidences to the changing climate: the mast connection. *Int J Health Geogr.* 2009; 8(1). doi: 10.1186/1476-072X-8-1.

Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015; 9(9): e0003898. doi: 10.1371/journal.pntd.0003898.

Czopowicz M, Kaba J, Smith L, Szalus-Jordanow O, Nowicki M, Witkowski L et al. Leptospiral antibodies in the breeding goat population of Poland. *Vet Rec.* 2011; 169(9): 230-4. doi: 10.1136/vr.d4403.

Desai S, van Treeck U, Lierz M, Espelage W, Zota L, Sarbu A et al. Resurgence of field fever in a temperate country: an epidemic of leptospirosis among seasonal strawberry harvesters in Germany in 2007. *Clin Infect Dis.* 2009; 48(6): 691–7. doi: 10.1086/597036.

Deutscher Wetterdienst (DWD). CDC - Climate Data Center (zitiert vom 31.05.2021), <<https://cdc.dwd.de/portal/>>.

Deutscher Wetterdienst (DWD). Deutschlandwetter im Winter 2018/19. Pressemitteilung. Offenbach 27.02.2019, <https://www.dwd.de/DE/presse/pressemitteilungen/DE/2019/20190227_deutschlandwetter_februar_news.html>.

Divers TJ, Chang Y-F, Irby NL, Smith JL, Carter CN. Leptospirosis: An important infectious disease in North American horses. *Equine Vet J.* 2019; 51(3): 287–92. doi: 10.1111/evj.13069.

Drewes S, Ali HS, Saxenhofer M, Rosenfeld UM, Binder F, Cuyper F et al. Host-Associated Absence of Human Puumala Virus Infections in Northern and Eastern Germany. *Emerging Infect Dis.* 2017; 23(1): 83–6. doi: 10.3201/eid2301.160224.

Ecke F, Johansson A, Forsman M, Khalil H, Magnusson M, Hörnfeldt B. Selective Predation by Owls on Infected Bank Voles (*Myodes glareolus*) as a Possible Sentinel of Tularemia Outbreaks. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2020; 20(8): 630–2. doi: 10.1089/vbz.2020.2617.

Ellis T, Imrie A, Katz AR, Effler PV. Underrecognition of leptospirosis during a dengue fever outbreak in Hawaii, 2001-2002. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2008; 8(4): 541–7. doi: 10.1089/vbz.2007.0241.

Ellis WA. Animal leptospirosis. In: Adler B, Hrsg. *Leptospira* and Leptospirosis. 1. Aufl. Berlin: Springer-Verlag; 2015. p. 99–137.

Ellis WA, McParland PJ, Bryson DG, Cassells JA. Prevalence of *Leptospira* infection in aborted pigs in Northern Ireland. *Vet Rec.* 1986; 118(3): 63–5. doi: 10.1136/vr.118.3.63.

Fevola C, Rossi C, Rosso F, Girardi M, Rosà R, Manica M et al. Geographical Distribution of Ljungan Virus in Small Mammals in Europe. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2020; 20(9): 692–702. doi: 10.1089/vbz.2019.2542.

Fiecek B, Chmielewski T, Sadkowska-Todys M, Czerwiński M, Zalewska G, Roguska U et al. An outbreak of leptospirosis imported from Germany to Poland. *Adv Clin Exp Med.* 2017; 26(3): 415–9. doi: 10.17219/acem/62022.

Filipi K, Marková S, Searle JB, Kotlík P. Mitogenomic phylogenetics of the bank vole *Clethrionomys glareolus*, a model system for studying end-glacial colonization of Europe. *Mol Phylogent Evol.* 2015; 82 (Part A): 245–57. doi: 10.1016/j.ympev.2014.10.016.

Fischer S, Mayer-Scholl A, Imholt C, Spierling NG, Heuser E, Schmidt S et al. *Leptospira* Genomespecies and Sequence Type Prevalence in Small Mammal Populations in Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2018; 18(4): 188–99. doi: 10.1089/vbz.2017.2140.

Galfsky D, Król N, Pfeffer M, Obiegala A. Long-term trends of tick-borne pathogens in regard to small mammal and tick populations from Saxony, Germany. *Parasites Vectors.* 2019; 12(1):131. doi: 10.1186/s13071-019-3382-2.

Geisen V, Stengel C, Brem S, Müller W, Greene C, Hartmann K. Canine leptospirosis infections - clinical signs and outcome with different suspected *Leptospira* serogroups (42 cases). *J Small Anim Pract.* 2007; 48(6): 324–8. doi: 10.1111/j.1748-5827.2007.00324.x.

Gomes CK, Guedes M, Potula H-H, Dellagostin OA, Gomes-Solecki M. Sex Matters: Male Hamsters Are More Susceptible to Lethal Infection with Lower Doses of Pathogenic *Leptospira* than Female Hamsters. *Infect Immun.* 2018; 86(10). doi: 10.1128/IAI.00369-18.

- Gravekamp C, van de Kemp H, Franzen M, Carrington D, Schoone GJ, van Eys GJ et al. Detection of seven species of pathogenic leptospire by PCR using two sets of primers. *J Gen Microbiol.* 1993; 139(8): 1691–700. doi: 10.1099/00221287-139-8-1691.
- Grzybek M, Sironen T, Mäki S, Tofikacz K, Alsarraf M, Strachecka A et al. Zoonotic Virus Seroprevalence among Bank Voles, Poland, 2002-2010. *Emerg Infect Dis.* 2019; 25(8): 1607–9. doi: 10.3201/eid2508.190217.
- Haake DA, Levett PN. Leptospirosis in Humans. In: Adler B, Hrsg. *Leptospira* and Leptospirosis. 1. Aufl. Berlin: Springer-Verlag; 2015. p. 65–88.
- Hamond C, Martins G, Bremont S, Medeiros MA, Bourhy P, Lilenbaum W. Molecular Characterization and Serology of *Leptospira kirschneri* (Serogroup Grippotyphosa) Isolated from Urine of a Mare Post-Abortion in Brazil. *Zoonoses Public Health.* 2016; 63(3): 191–5. doi: 10.1111/zph.12224.
- Hamond C, Martins G, Loureiro AP, Bremont S, Medeiros MA, Bourhy P et al. First isolation and characterization of *Leptospira interrogans* serogroup Australis from swine in Brazil. *Pesq Vet Bras.* 2015; 35(1): 6–8. doi: 10.1590/S0100-736X2015000100002.
- Hauer S, Ansorge H, Zöphel U, Hertweck K. Atlas der Säugetiere Sachsens. Dresden: Zentraler Broschürenverband der Sächsischen Staatsregierung; 2009. (Naturschutz und Landschaftspflege): 218-22.
- Heuser E, Fischer S, Ryll R, Mayer-Scholl A, Hoffmann D, Spahr C et al. Survey for zoonotic pathogens in Norway rat populations from Europe. *Pest Manag Sci.* 2017; 73(2): 341–8. doi: 10.1002/ps.4339.
- Himsworth CG, Bidulka J, Parsons KL, Feng AYT, Tang P, Jardine CM et al. Ecology of *Leptospira interrogans* in Norway rats (*Rattus norvegicus*) in an inner-city neighborhood of Vancouver, Canada. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7(6): e2270. doi: 10.1371/journal.pntd.0002270.
- Holt J, Davis S, Leirs H. A model of Leptospirosis infection in an African rodent to determine risk to humans: Seasonal fluctuations and the impact of rodent control. *Acta Trop.* 2006; 99(3): 218–25. doi: 10.1016/j.actatropica.2006.08.003.
- Hutterer R, Maier W: 3.2.6.3.5 Rodentia, Nagetiere. In: Westheide W, Rieger G, Hrsg. *Spezielle Zoologie: Teil 2: Wirbel- oder Schädeltiere.* 2. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2010. p. 542–52.

Imholt C, Reil D, Eccard JA, Jacob D, Hempelmann N, Jacob J. Quantifying the past and future impact of climate on outbreak patterns of bank voles (*Myodes glareolus*). *Pest Manag Sci*. 2015; 71(2): 166–72. doi: 10.1002/ps.3838.

Imholt C, Reil D, Plašil P, Rödiger K, Jacob J. Long-term population patterns of rodents and associated damage in German forestry. *Pest Manag Sci*. 2017; 73(2): 332–40. doi: 10.1002/ps.4325.

Inada R, Ido Y, Hoki R, KANEKO R, Ito H. The etiology, mode of infection, and specific therapy of Weil's disease (*Spirochaetosis icterohaemorrhagica*). *J Exp Med*. 1915; 23: 377–402.

Ivanova S, Herbreteau V, Blasdel K, Chaval Y, Buchy P, Guillard B et al. *Leptospira* and rodents in Cambodia: environmental determinants of infection. *Am J Trop Med Hyg*. 2012; 86(6): 1032–8. doi: 10.4269/ajtmh.2012.11-0349.

Izquierdo-Rodríguez E, Fernández-Álvarez Á, Martín-Carrillo N, Marchand B, Feliu C, Miquel J et al. Pathogenic *Leptospira* species in rodents from Corsica (France). *PLoS One*. 2020; 15(6): e0233776. doi: 10.1371/journal.pone.0233776.

Jacob J. Response of small rodents to manipulations of vegetation height in agro-ecosystems. *Integr Zool*. 2008; 3(1): 3–10. doi: 10.1111/j.1749-4877.2008.00078.x.

Jeske K, Emirhar D, García JT, González-Barrío D., Olea PP, Fons FR et al. Frequent *Leptospira* spp. detection, but absence of Tula orthohantavirus in *Microtus* voles, Northwestern Spain. *J Wildl Dis*. 2021a; 57(4): 733-742. doi: 10.7589/JWD-D-20-00109.

Jeske K, Jacob J, Drewes S, Pfeffer M, Heckel G, Ulrich RG et al. Hantavirus - *Leptospira* coinfections in small mammals from central Germany. *Epidemiol Infect*. 2021b; 149: e97. doi: 10.1017/S0950268821000443.

Jeske K, Weber S, Pfaff F, Imholt C, Jacob J, Beer M et al. Molecular Detection and Characterization of the First Cowpox Virus Isolate Derived from a Bank Vole. *Viruses*. 2019; 11(11):1075. doi: 10.3390/v11111075.

Karpagam KB, Ganesh B. Leptospirosis: a neglected tropical zoonotic infection of public health importance-an updated review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020; 39(5): 835–46. doi: 10.1007/s10096-019-03797-4.

Kocianová E, Kozuch O, Bakoss P, Reháček J, Kováčová E. The prevalence of small terrestrial mammals infected with tick-borne encephalitis virus and leptospira in the foothills of the Bavarian forest, Germany. *Applied Parasitology*. 1993; 34: 283–90.

- Koizumi N, Muto M, Tanikawa T, Mizutani H, Sohmura Y, Hayashi E et al. Human leptospirosis cases and the prevalence of rats harbouring *Leptospira interrogans* in urban areas of Tokyo, Japan. *J Med Microbiol*. 2009; 58(9): 1227–30. doi: 10.1099/jmm.0.011528-0.
- Korslund L, Steen H. Small rodent winter survival: snow conditions limit access to food resources. *J Anim Ecol*. 2006; 75(1): 156–66. doi: 10.1111/j.1365-2656.2005.01031.x.
- Krijger IM, Ahmed AAA, Goris MGA, Cornelissen JBWJ, Groot Koerkamp PWG, Meerburg BG. Wild rodents and insectivores as carriers of pathogenic *Leptospira* and *Toxoplasma gondii* in The Netherlands. *Vet Med Sci*. 2020; 6(3): 623–30. doi: 10.1002/vms3.255.
- Krijger IM, Ahmed AAA, Goris MGA, Groot Koerkamp PWG, Meerburg BG. Prevalence of *Leptospira* Infection in Rodents from Bangladesh. *Int J Environ Res Public Health*. 2019; 16(12):2113. doi: 10.3390/ijerph16122113.
- Krøjgaard LH, Villumsen S, Markussen MDK, Jensen JS, Leirs H, Heiberg A-C. High prevalence of *Leptospira* spp. in sewer rats (*Rattus norvegicus*). *Epidemiol Infect*. 2009; 137(11): 1586–92. doi: 10.1017/S0950268809002647.
- Lau CL, Townell N, Stephenson E, van den Berg D, Craig SB. Leptospirosis: An important zoonosis acquired through work, play and travel. *Aust J Gen Pract*. 2018; 47(3): 105–10. doi: 10.31128/AFP-07-17-4286.
- Ledevin R, Michaux JR, Deffontaine V, Henttonen H, Renaud S. Evolutionary history of the bank vole *Myodes glareolus*: a morphometric perspective. *Biol J Linn Soc Lond*. 2010; 100(3): 681–94. doi: 10.1111/j.1095-8312.2010.01445.x.
- Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*. 2001; 14(2): 296–326. doi: 10.1128/CMR.14.2.296-326.2001.
- Lilenbaum W, Martins G. Leptospirosis in cattle: a challenging scenario for the understanding of the epidemiology. *Transbound Emerg Dis*. 2014; 61 Suppl 1: 63–8. doi: 10.1111/tbed.12233.
- Marchlewska-Koj A, Kolodziej B, Filimowska A. Aggressive behavior of adult bank voles (*Clethrionomus glareolus*) towards conspecifics. *Aggr Behav*. 1989; 15(5): 381–7.
- Martins G, Penna B, Hamond C, Leite RC-K, Silva A, Ferreira A et al. Leptospirosis as the most frequent infectious disease impairing productivity in small ruminants in Rio de Janeiro, Brazil. *Trop Anim Health Prod*. 2012; 44(4): 773–7. doi: 10.1007/s11250-011-9964-4.

Masuzawa T, Okamoto Y, Une Y, Takeuchi T, Tsukagoshi K, Koizumi N et al. Leptospirosis in Squirrels Imported from United States to Japan. *Emerging Infect Dis.* 2006; 12(7): 1153–5. doi: 10.3201/eid1207.060370.

Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt(NW-FVA), Mäuse in forstlichen Verjüngungen: Arten – Schäden – Prognose - Bekämpfung. 2007 (zitiert vom 10.10.2021): 2, <https://www.nw-fva.de/fileadmin/user_upload/Abteilung/Waldschutz/Praxis-Informationen/Praxis-Information-Maeuse.pdf>.

Mayer-Scholl A, Hammerl JA, Schmidt S, Ulrich RG, Pfeffer M, Woll D et al. *Leptospira* spp. in rodents and shrews in Germany. *Int J Environ Res Public Health.* 2014; 11(8): 7562–74. doi: 10.3390/ijerph110807562.

McMichael AJ, Woodruff RE, Hales S. Climate change and human health: present and future risks. *Lancet.* 2006; 367(9513): 859–69. doi: 10.1016/S0140-6736(06)68079-3.

Meinig H, Boye P, Dähne M, Hutterer R, Lang J. Rote Liste und Gesamtartenliste der Säugetiere (Mammalia) Deutschlands - Naturschutz und Biologische Vielfalt. 2020, 170 (2): 26.

Michelitsch A, Wernike K, Klaus C, Dobler G, Beer M. Exploring the Reservoir Hosts of Tick-Borne Encephalitis Virus. *Viruses.* 2019; 11(7):669. doi: 10.3390/v11070669.

Millán J, Cevidanes A, Chirife AD, Candela MG, León-Vizcaíno L. Risk factors of *Leptospira* infection in Mediterranean periurban micromammals. *Zoonoses Public Health.* 2018; 65(1): 79-85. doi: 10.1111/zph.12411.

Mills JN, Ksiazek TG, Peters CJ, Childs JE. Long-term studies of hantavirus reservoir populations in the southwestern United States: a synthesis. *Emerging Infect Dis.* 1999; 5(1): 135–42. doi: 10.3201/eid0501.990116.

Mori M, Bourhy P, Le Guyader M, van Esbroeck M, Djelouadji Z, Septfons A et al. Pet rodents as possible risk for leptospirosis, Belgium and France, 2009 to 2016. *Euro Surveill.* 2017; 22(43): 16-00792. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.43.16-00792.

Morris P. A review of mammalian age determination methods. *Mammal Rev.* 1972; 2(3): 69–104.

Ministerium für Umwelt, Landwirtschaft, Natur- und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen (MULNV). Waldzustandsbericht 2018: Bericht über den ökologischen Zustand des Waldes in NRW. 2018 (zitiert vom 08.11.2021):19, <www.wald-und-holz.nrw.de/wald-in-nrw/waldzustand>.

Munoz-Zanzi C, Groene E, Morawski BM, Bonner K, Costa F, Bertherat E et al. A systematic literature review of leptospirosis outbreaks worldwide, 1970–2012. *Rev Panam Salud Publica*. 2020; 44: e78. doi: 10.26633/RPSP.2020.78.

Nau LH, Obiegala A, Król N, Mayer-Scholl A, Pfeffer M. Survival time of *Leptospira kirschneri* serovar Grippotyphosa under different environmental conditions. *PLoS One*. 2020; 15(7): e0236007. doi: 10.1371/journal.pone.0236007.

Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt (NW-FVA). Waldzustandsbericht 2018. 2018 (zitiert vom 08.11.2021): 12, <www.ml.niedersachsen.de>.

Obiegala A, Albrecht C, Dafalla M, Drewes S, Oltersdorf C, Turni H et al. *Leptospira* spp. in Small Mammals from Areas with Low and High Human Hantavirus Incidences in South-West Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2017; 17(5): 312–8. doi: 10.1089/vbz.2016.2036.

Obiegala A, Woll D, Karnath C, Silaghi C, Schex S, Eßbauer S et al. Prevalence and Genotype Allocation of Pathogenic *Leptospira* Species in Small Mammals from Various Habitat Types in Germany. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(3): e0004501. doi: 10.1371/journal.pntd.0004501.

Picardeau M. *Leptospira* and Leptospirosis. *Methods Mol. Biol*. 2020; 2134: 271–5. doi: 10.1007/978-1-0716-0459-5_24.

Pinna MH, Martins G, Loureiro AP, Lilenbaum W. Detection of bovine carriers of *Leptospira* by serological, bacteriological, and molecular tools. *Trop Anim Health Prod*. 2018; 4(50): 883–8. doi: 10.1007/s11250-018-1512-z.

Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, Hartigan P, Fanning S, FitzPatrick ES. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. 2nd ed. Hoboken: John Wiley & Sons; 2011. p. 354–9.

Reil D, Imholt C, Eccard JA, Jacob J. Beech Fructification and Bank Vole Population Dynamics-- Combined Analyses of Promoters of Human Puumala Virus Infections in Germany. *PLoS One*. 2015; 10(7): e0134124. doi: 10.1371/journal.pone.0134124.

Reil D, Jacob J, Imholt C, Ulrich R. Regionalspezifisches Vorhersagesystem für das Vorkommen gesundheitsgefährdender Nagetiere als Anpassung an den Klimawandel. Dessau-Roßlau; 2018. (zitiert vom 08.11.2021):24, ISSN 1862-4359 <https://www.openagrar.de/receive/zimport_mods_00001535, ISSN 1862-4359>.

Reil D, Rosenfeld UM, Imholt C, Schmidt S, Ulrich RG, Eccard JA et al. Puumala hantavirus infections in bank vole populations: host and virus dynamics in Central Europe. *BMC Ecol.* 2017; 17(9). doi: 10.1186/s12898-017-0118-z.

Rigó K, Majoros G, Szekeres S, Molnár I, Jablonszky M, Majláthová V et al. Identification of *Hepatozoon erhardovae* Krampitz, 1964 from bank voles (*Myodes glareolus*) and fleas in Southern Hungary. *Parasitol Res.* 2016; 115(6): 2409–13. doi: 10.1007/s00436-016-4992-7.

Robert Koch Institut (RKI) 2015a. Leptospirose: RKI-Ratgeber (zitiert vom 01.10.2020), <https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Leptospirose.html>.

Robert Koch-Institut (RKI) 2015b. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch für 2014. (zitiert vom 18.08.2021): 144-6, <https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch_2014.pdf?__blob=publicationFile>.

Robert Koch-Institut (RKI). SurvStat@RKI 2.0 (zitiert vom 27.08.2021), <<https://survstat.rki.de/>>.

Robert Koch-Institut (RKI). SurvStat@RKI 2.0 (zitiert vom 07.12.2021), <<https://survstat.rki.de/>>.

Robert Koch-Institut (RKI) 2019. Infektionsepidemiologische Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2018. (zitiert vom 18.08.2021): 160-2, <https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch_2018.pdf?__blob=publicationFile>.

Robert Koch-Institut (RKI) 2020. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2019. (zitiert vom 18.08.2021): 163-5, <https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch_2019.pdf?__blob=publicationFile>.

Robert Koch-Institut (RKI) 2021. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2020. (zitiert vom 10.10.2021): 138-9, <https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch_2020.pdf?__blob=publicationFile>.

Runge M, Keyserlingk M von, Braune S, Becker D, Plenge-Bönig A, Freise JF et al. Distribution of rodenticide resistance and zoonotic pathogens in Norway rats in Lower Saxony and Hamburg, Germany. *Pest Manag Sci.* 2013; 69(3): 403–8. doi: 10.1002/ps.3369.

Ryan EG, Leonard N, O’Grady L, Doherty ML, More SJ, Ryan EG et al. Herd-level risk factors associated with *Leptospira* Hardjo seroprevalence in Beef/Suckler herds in the Republic of Ireland. *Ir Vet J.* 2012; 65(6). doi: 10.1186/2046-0481-65-6.

Sanchez Fernandez P, Kodjo A, Medkour H, Laidoudi Y, Dubourg G, Eldin C et al. Autochthonous human and animal leptospirosis, Marseille, France. *IDCases*. 2020; 21: e00899. doi: 10.1016/j.idcr.2020.e00899.

Schmidt S, Essbauer SS, Mayer-Scholl A, Poppert S, Schmidt-Chanasit J, Klempa B et al. Multiple infections of rodents with zoonotic pathogens in Austria. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2014; 14(7): 467–75. doi: 10.1089/vbz.2013.1504.

Schuller S, Francey T, Hartmann K, Hugonnard M, Kohn B, Nally JE et al. European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. *J Small Anim Pract*. 2015; 56(3): 159–79. doi: 10.1111/jsap.12328.

Sejvar J, Bancroft E, Winthrop K, Bettinger J, Bajani M, Bragg S et al. Leptospirosis in "Eco-Challenge" athletes, Malaysian Borneo, 2000. *Emerging Infect Dis*. 2003; 9(6): 702–7. doi: 10.3201/eid0906.020751.

Slack AT, Symonds ML, Dohnt MF, Smythe LD. Identification of pathogenic *Leptospira* species by conventional or real-time PCR and sequencing of the DNA gyrase subunit B encoding gene. *BMC Microbiol*. 2006; 6(95). doi: 10.1186/1471-2180-6-95.

Smaill SJ, Clinton PW, Allen RB, Davis MR. Climate cues and resources interact to determine seed production by a masting species. *J. Ecol*. 2011; 99(3): 870–7. doi: 10.1111/j.1365-2745.2011.01803.x.

Sterling CR, Thiermann AB. Urban rats as chronic carriers of leptospirosis: an ultrastructural investigation. *Vet Pathol*. 1981; 18(5): 628–37. doi: 10.1177/030098588101800508.

Stern EJ, Galloway R, Shadomy SV, Wannemuehler K, Atrubin D, Blackmore C et al. Outbreak of leptospirosis among Adventure Race participants in Florida, 2005. *Clin Infect Dis*. 2010; 50(6): 843-9. doi: 10.1086/650578.

Stimson AM. Note on an organism found in yellow-fever tissue. *Pub Health Rep (Washington)*. 1907; 22: 541.

Stoddard RA, Gee JE, Wilkins PP, McCaustland K, Hoffmaster AR. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the *LipL32* gene. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009; 64(3): 247–55. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2009.03.014.

Straubinger R. Gattung *Leptospira*. In: Selbitz H-J, Truyen U, Valentin-Weigand P, Hrsg. *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. 10., aktualisierte Auflage. Stuttgart: Enke Verlag; 2015. p. 146–50.

Strutzberg-Minder K, Kreienbrock L. Leptospireninfektionen beim Schwein: Epidemiologie, Diagnostik und weltweites Vorkommen *Leptospire infections in pigs: epidemiology, diagnostics and worldwide occurrence*. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 2011; 124(9-10): 345–59. doi: 10.2376/0005-9366-124-345.

Tadin A, Tokarz R, Markotić A, Margaletić J, Turk N, Habuš J et al. Molecular Survey of Zoonotic Agents in Rodents and Other Small Mammals in Croatia. *Am J Trop Med Hyg*. 2016; 94(2): 466–73. doi: 10.4269/ajtmh.15-0517.

Tamarin RH, Ostfeld RS, Pugh SR, Bujalska G. *Social systems and population cycles in voles*. Basel: Springer Basel AG; 1990.

Thiermann AB. The Norway rat as a selective chronic carrier of *Leptospira icterohaemorrhagiae*. *J Wildl Dis*. 1981; 17(1): 39–43. doi: 10.7589/0090-3558-17.1.39.

Thünen-Institut (TI), Dritte Bundeswaldinventur - Ergebnisdatenbank, (zitiert vom 20.10.2021), <<https://bwi.info>>.

Public database for molecular typing and microbial genome diversity (PubMLST) (zitiert vom 27.04.2021), <<https://pubmlst.org/>>.

Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten in der Fassung der Bekanntmachung vom 11. Februar 2011 (BGBl. I S. 252), die zuletzt durch Artikel 1 der Verordnung vom 8. Juli 2020 (BGBl. I S. 1604) geändert worden ist: TKrMeldpflV.

Victoria B, Ahmed A, Zuerner RL, Ahmed N, Bulach DM, Quinteiro J et al. Conservation of the *S10-spc- α* Locus within Otherwise Highly Plastic Genomes Provides Phylogenetic Insight into the Genus *Leptospira*. *PLoS One*. 2008; 3(7): e2752. doi: 10.1371/journal.pone.0002752.

Weis S, Rettinger A, Bergmann M, Llewellyn JR, Pantchev N, Straubinger RK et al. Detection of *Leptospira* DNA in urine and presence of specific antibodies in outdoor cats in Germany. *J Feline Med Surg*. 2017; 19(4): 470–6. doi: 10.1177/1098612X16634389.

Weltgesundheitsorganisation (WHO). *Human leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control*. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Geneva, 2003, <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/42667>>.

Williams NJ, Jones TR, Leatherbarrow HJ, Birtles RJ, Lahuerta-Marin A, Bennett M et al. Isolation of a novel *Campylobacter jejuni* clone associated with the bank vole, *Myodes glareolus*. *Appl Environ Microbiol*. 2010; 76(21): 7318–21. doi: 10.1128/AEM.00511-10.

Wolf R. Rötelmaus: *Clethrionomys glareolus* (Schreber 1780). In: Hauer S, Ansorge H, Zöphel U, Hertweck K, Hrsg. Atlas der Säugetiere Sachsens. Dresden: Zentraler Broschürenverband der Sächsischen Staatsregierung; 2009. p. 220–2.

Woll D, Karnath C, Pfeffer M, Allgöwer R. Genetic characterization of *Leptospira* spp. from beavers found dead in south-west Germany. *Vet Microbiol.* 2012; 158(1-2): 232–4. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.02.022.

Žele-Vengušt D, Lindtner-Knific R, Mlakar-Hrženjak N, Jerina K, Vengušt G. Exposure of Free-Ranging Wild Animals to Zoonotic *Leptospira interrogans* Sensu Stricto in Slovenia. *Animals.* 2021; 11(9): 2722. doi: 10.3390/ani11092722.

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Verbreitung der Rötelmaus in Europa und Vorderasien und farblich markiert die Verbreitung der genetischen Linien (mtDNA Clade), Abbildung nach FILIPI et al. (2015)	11
Abbildung 2 Zusammenhang von Buchenmastintensität, Rötelmausabundanz und humaner PUUV Inzidenz, Abbildung modifiziert nach REIL et al. (2015)	12

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 <i>Leptospira</i> Serovare und assoziierte Haupt- und Nebenwirte	5
Tabelle 2 Klinisches Erscheinungsbild der Leptospirose in Nutz- und Haustieren	8

8 Danksagung

Mein herzlicher Dank geht an meinen Doktorvater Martin Pfeffer und meine Betreuerin Anna Obiegala. Vielen Dank für die intensive Zusammenarbeit, die viele Geduld, das häufige Korrekturlesen und den Ehrgeiz mit dem ihr mich zwei Jahre lang unterstützt habt. Ohne euch würde ich immer noch über der Publikation verzweifeln und die Doktorarbeit wäre noch lange nicht fertig!

Meine Arbeit war nur durch die Zusammenarbeit vieler Institute im Vernetzungsprojekt „Zoonoseerreger Koinfektionen in Kleinsäugetern“ möglich. Vielen Dank an Jens Jacob, Christian Imholt, Marion Saathoff und allen Helfern des Julius-Kühn-Institut und LAVES, die im Rahmen von RoBoPub die Rötelmausfänge durchgeführt haben. Die Sektion der über 1800 Tieren erfolgte am FLI. Vielen Dank an Rainer G. Ulrich, Stephan Drewes, Sina Nippert und allen Sektionshelfern für die Bereitstellung und Zusendung der Nierenproben!

Vielen Dank an alle Koautoren meiner Publikation für die vielen guten Ideen und das kritische Korrekturlesen.

Ein besonderer Dank geht auch an Anne Mayer-Scholl, Martin Richter und Cornelia Göllner vom Bundesinstitut für Risikobewertung in Berlin. Ich hatte sehr viel Spaß in den zwei Wochen in Berlin und habe unglaublich viel gelernt. Ohne eure Hilfe hätte ich nie so schnell die MLST für alle Proben durchführen können.

Eine Doktorarbeit geht nicht ohne Statistik. Vielen Dank Anna Obiegala und Christian Imholt, dass ihr euch immer wieder durch meine Daten gearbeitet habt und eine so tolle Statistik erstellt habt!

Die Laborarbeit in Leipzig hat mir immer sehr viel Freude bereitet. Dafür möchte ich mich ganz besonders bei Dana Rüter und Anna Obiegala für die ständige Hilfe, die vielen Erklärungen und die Geduld bedanken!

Vielen Dank an meinen lieben Freund Felix Köpcke für das intensive und wiederholte Korrekturlesen von Rechtschreibung und Grammatik!

Ohne die tollen Mitarbeiter und die fleißigen Mitdoktoranden am Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen wären zwei Jahre Doktorarbeit ganz schön langweilig geworden! Vielen Dank für die tolle Zeit!