

Aus dem Department für Pathobiologie
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Parasitologie
(Leiterin: Univ. Prof. Dr. med. vet. habil. Anja Joachim)

Trypanosomatida und Filarioidea in Rabenvögeln (Corvidae) in Österreich

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

Vorgelegt von
Caroline Pauly

Wien, im Juni 2020

Betreuer: Priv.Doz. Dr. rer. nat. Hans-Peter Fuehrer
Institut für Parasitologie, Department für Pathobiologie,
Veterinärmedizinische Universität Wien

Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Herbert Weissenböck Dipl. ECPHM
Institut für Pathologie, Department für Pathobiologie,
Veterinärmedizinische Universität Wien

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Diplomarbeit sowie in meiner gesamten Studienzeit unterstützt haben.

Ich möchte mich herzlichst bei meinem Betreuer Dr. Hans-Peter Fuehrer bedanken, der mir dieses Thema zur Verfügung gestellt hat. Vielen Dank, dass du dir stets für mich und meine Fragen Zeit genommen hast und mir unterstützend zur Seite standest.

Großer Dank gilt auch Bitu Shahi Barogh für die geduldige Einführung und Unterstützung bei der Arbeit im Labor. Vielen Dank auch an das Institut für Pathologie und an Dr. Josef Harl für die zur Verfügung gestellten Proben und Informationen.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern dafür bedanken, dass ihr mir dieses Studium ermöglicht habt und ihr mir in jeder Lebenslage mit Rat und Tat zur Seite steht. Großer Dank gebührt auch meinen wunderbaren Geschwistern und Großeltern für die immerwährende und bedingungslose Unterstützung. Außerdem geht ein großes Dankeschön an all meine Freunde für die unvergessliche Studienzeit und dafür, dass ihr mich immer wieder motiviert habt. Zuletzt möchte ich mich noch bei Alexis bedanken, der mich auch in schweren Zeiten immer unterstützt und für mich da ist.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Fragestellung	1
1.1	Rabenvögel (Corvidae)	2
1.1.1	Taxonomie	2
1.1.2	Morphologie	2
1.1.3	Verbreitung und Lebensraum	2
1.1.4	Lebensweise	5
1.2	Trypanosomen	6
1.2.1	Taxonomie und Bedeutung	6
1.2.2	Morphologie	7
1.2.3	Übertragung	9
1.2.4	Vogeltrypanosomen	11
1.2.4.1	Pathogenität	12
1.2.4.2	<i>Trypanosoma avium</i>	14
1.2.4.3	<i>Trypanosoma culicavium</i>	16
1.2.4.4	<i>Trypanosoma corvi</i>	16
1.2.4.5	<i>Trypanosoma bennetti</i>	17
1.3	Filarien	18
1.3.1	Allgemeines	18
1.3.2	Lebenszyklus	19
1.3.3	Vogelfilarien	21
1.3.3.1	Pathogenität und klinische Symptome	22
1.3.3.2	Vektoren und Vektorspezifität	23
1.3.3.3	Wirtsspezifität	23
1.3.3.4	Filarien bei Corviden	24
2	Material und Methode	25
2.1	Material	25
2.2	DNA-Extraktion	25
2.3	PCR	27
2.3.1	Prinzip	27
2.3.2	Nested PCR	28
2.3.3	Touchdown PCR	28

2.3.4	PCR zum Nachweis von Trypanosomen	29
2.3.5	PCR zum Nachweis von Filarien	31
2.4	Gelelektrophorese	33
2.5	Sequenzierung	34
2.6	Blutausstriche	34
2.6.1	Färbemethoden	34
2.6.2	Begutachtung	34
2.7	Statistische Methoden	35
3	Ergebnisse	36
3.1	Vögel	36
3.2	Parasiten	38
4	Diskussion	42
5.1	Zusammenfassung	49
5.2	Abstract	50
6	Literaturverzeichnis	51
7	Abbildungsverzeichnis	58
8	Tabellenverzeichnis	59

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
COI	Untereinheit I der Cytochrom-c-Oxidase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat
FIWI	Forschungsinstitut für Wildtierkunde und Ökologie
KLF	Konrad Lorenz Forschungsstelle
L1-L4	Larvenstadium 1 bis 4
PCR	Polymerase Kettenreaktion
RAPD	randomly amplified polymorphic DNA
RNA	Ribonukleinsäure
s. l.	<i>sensu lato</i> = im weiteren Sinn
sp.	Spezies (Singular)
spp.	Spezies (Plural)
s. s.	<i>sensu stricto</i> = im engeren Sinn
SSU rRNA	small subunit ribosomal RNA
TBE	Tris-Borat-EDTA
<i>T.</i>	Gattung <i>Trypanosoma</i>
Tab.	Tabelle
U/min	Umdrehungen pro Minute
Vetmeduni	Veterinärmedizinische Universität Wien

1 Einleitung und Fragestellung

Parasiten der Familie Trypanosomatidae sowie der Überfamilie Filarioidea sind bekannte Erreger schwerwiegender Erkrankungen bei Menschen und ihren Haus- und Nutztieren. Seit den 1880er Jahren wurden in Europa Blutparasiten von Vögeln untersucht (Kučera 1981). Durch die vermutete geringe Pathogenität der aviären Trypanosomen- und Filarienarten und da Wildtiere betroffen sind, wurde diesen allerdings weit weniger Aufmerksamkeit geschenkt als den Arten, die Menschen und andere Säugetiere befallen (Zídková et al. 2012).

Nachdem in ersten Studien über das Vorkommen von Trypanosomen in Stechmücken in Österreich zwei aviäre Trypanosomenarten, *Trypanosoma avium* und *T. culicavium*, nachgewiesen wurden (Schoener et al. 2018), stellte sich die Frage, für welche Vogelarten die untersuchten Stechmücken als Vektoren fungieren. Außerdem wurden aus ornithophilen Stechmücken aus Österreich DNA von unbestimmten filarioiden Helminthen nachgewiesen, bei welchen es sich wahrscheinlich um Vogelfilarien handelt (Übleis et al. 2018).

Für diese Arbeit wurden Blutproben und Blutausstriche von Rabenvögeln (Corvidae) aus Österreich inkludiert, die hinsichtlich ihres Infektionsstatus auf Trypanosomen und Filarien untersucht wurden.

Zu Beginn dieser Arbeit wurden folgende Hypothesen aufgestellt:

- Trypanosomen (z.B. *Trypanosoma corvi*) und nah verwandte Vertreter der Familie Trypanosomatidae können in Österreich in Rabenvögeln nachgewiesen werden.
- Trypanosomatidae, die in Vorstudien in österreichischen Stechmücken nachgewiesen wurde (z.B. *Trypanosoma avium* und *T. culicavium*) parasitieren in Corviden
- Filarien der Familie Onchocercidae parasitieren in Corviden in Österreich

Ziel dieser Arbeit war, mittels molekularbiologischer Analysen von Blutproben, sowie der Begutachtung von Blutausstrichen, Trypanosomen- und Filarieninfektionen bei Rabenvögeln in Österreich nachzuweisen und die in Österreich vorhandenen Spezies dieser Parasiten zu dokumentieren.

Im Folgenden werden die Taxonomie, Verbreitung und Lebensart von Rabenvögeln in Österreich, sowie die Taxonomie, Bedeutung, Morphologie, Übertragung und Pathogenität von Trypanosomen und Filarien, mit besonderem Augenmerk auf aviäre Arten, erörtert.

1.1 Rabenvögel (Corvidae)

1.1.1 Taxonomie

Rabenvögel sind eine Familie mittelgroßer bis großer Singvögel, die der Ordnung der Sperlingsvögel angehören. Die Taxonomie ist in Tab. 1 ersichtlich. Die Familie der Corviden umfasst 24 Gattungen mit etwa 120 Arten, darunter Raben und Krähen (*Corvus* spp.), Bergkrähen (*Pyrrhocorax* spp.), verschiedene Elstern (z.B. *Pica* spp., *Dendrocitta* spp., *Cyanopica* spp.), verschiedene Häher (z.B. *Perisoreus* spp., *Garrulus* spp., *Nucifraga* spp.), Blauraben (*Cyanocorax* spp.) und Kittas (*Urocissa* spp.) (dos Anjos 2009). Raben und Krähen machen von der Familie der Corviden etwa ein Drittel aller Arten aus.

Tab. 1: Taxonomie der Corviden

Klasse	Aves (Vögel)
Ordnung	Passeriformes (Sperlingsvögel)
Unterordnung	Passeri / Oscines (Singvögel)
Überfamilie	Corvoidea
Familie	Corvidae (Rabenvögel)

1.1.2 Morphologie

Rabenvögel variieren in der Größe von 20 bis zu 69 cm, dabei stellen die Kolkraben mit bis zu 2 kg die größte und schwerste Art aller Singvögel dar (dos Anjos 2009). Sie haben einen starken und recht langen Schnabel, kräftige Beine und gefingerte Flügel (Flegg und Hosking 1998). Raben und Krähen haben vorwiegend schwarzes, schwarzgraues, graues oder schwarz-weißes Gefieder, welches oft, außer bei Jungvögeln, metallisch glänzt. Andere Gattungen der Corviden sind dagegen auch auffällig blau, grün, gelb, violett oder braun gefärbt (Haffer und Bauer 1993). Männliche Tiere sind etwas größer als weibliche, sie zeigen aber meist keinen Geschlechtsdimorphismus. Rabenvögel sind gute Flieger, auf dem Boden hüpfen oder laufen sie (Flegg und Hosking 1998).

1.1.3 Verbreitung und Lebensraum

Rabenvögel sind fast weltweit verbreitet, mit Ausnahme der Antarktis und Teilen Südamerikas, und besiedeln verschiedenste Habitate: Wüsten, Tropen, Laub- und

Mischwälder in gemäßigten Zonen, offene Landschaften und Gebirge, mehrere Arten leben auch in Dörfern und Städten (Haffer und Bauer 1993, dos Anjos 2009). Die meisten Arten sind Stand- oder Strichvögel, einige nördliche Arten sind Zug- oder Invasionsvögel (Haffer und Bauer 1993). Die in Europa vorkommenden Arten sind in Tab. 2 aufgelistet, davon sind alle außer den Blauelstern und den Unglückshähern auch in Österreich verbreitet (dos Anjos 2009). Während die Alpenkrähe, Alpendohle und der Tannenhäher vorwiegend in den Bergregionen vorkommen, sind Aaskrähen, Dohlen, Saatkrähen und Elstern weitverbreitet und kommen in lichten Wäldern, Ackerlandschaften, Gärten und oft auch in Städten vor (Flegg und Hosking 1998).

Tab. 2: Taxonomie der in Europa vorkommenden Arten der Rabenvögel

Familie	Gattung	Art / Unterart	
Corvidae (Rabenvögel)	<i>Corvus</i> (Raben und Krähen)	<i>C. corone</i> (Aaskrähe)	<i>C. c. corone</i> (Rabenkrähe)
			<i>C. c. cornix</i> (Nebelkrähe)
		<i>C. monedula</i> (Syn. <i>Coloeus monedula</i> , Dohle)	
		<i>C. frugilegus</i> (Saatkrähe)	
		<i>C. corax</i> (Kolkrabe)	
	<i>Garrulus</i>	<i>G. glandarius</i> (Eichelhäher)	
	<i>Pica</i> (Echte Elstern)	<i>Pica pica</i> (Elster)	
	<i>Pyrrhocorax</i> (Bergkrähen)	<i>P. pyrrhocorax</i> (Alpenkrähe)	
		<i>P. graculus</i> (Alpendohle)	
	<i>Nucifraga</i> (Nussknacker)	<i>N. caryocatactes</i> (Tannenhäher)	
	<i>Perisoreus</i> (Unglückshäher)	<i>P. infaustus</i> (Unglückshäher)	
<i>Cyanopica</i> (Blauelster)	<i>C. cyana</i> (Blauelster)		

Kolkraben wurden zwischen dem 16. und 19. Jahrhundert in West- und Mitteleuropa als angebliche Schädlinge und aufgrund von Aberglauben verfolgt und ausgerottet. Seit Mitte

des 20. Jahrhunderts erholen sich die Bestände wieder und Kolkraben werden nach und nach auch wieder in Städten gesichtet (dos Anjos 2009).

Raben und Krähen stellen die größte Gattung der Familie dar. Die größeren Arten werden Raben, die kleineren Krähen genannt, wobei es sich allerdings nicht um eine taxonomische Einteilung handelt. Beide Namen sind lautmalerischer Natur, die das typische Krächzen nachahmen. Raben und Krähen haben aufgrund ihrer hohen Lern- und Anpassungsfähigkeit die meisten Habitats besiedelt und sind unter den Corviden am weitesten verbreitet (Haffer und Bauer 1993).

Die einheitlich schwarz gefärbten Rabenkrähen und die schwarzgrau gefärbten Nebelkrähen sind zwei Subspezies derselben Art, nämlich der Aaskrähe. Sie stellen 2 Populationsgruppen dar, die sich in ihren Kontaktgebieten in West- und Mitteleuropa mischen. Rabenkrähen kommen in ganz Westeuropa, außer in Irland und im Norden Schottlands vor, Nebelkrähen in Irland, Nordschottland, Dänemark, Skandinavien, Osteuropa und Italien. Die Hybridzone hat in Europa eine Länge über 2100 km, ist seit mehr als 100 Jahren bekannt und hat sich in dieser Zeit kaum verändert. Sie verläuft durch Schottland, in Deutschland etwa entlang der Elbe, durch Tschechien und in einer Breite von bis zu 100 km durch Ostösterreich und schwingt südlich der Alpen nach Westen (Abb. 1). In Wien und in Niederösterreich können also beide Subspezies sowie Hybridformen vorkommen (Haffer und Bauer 1993).

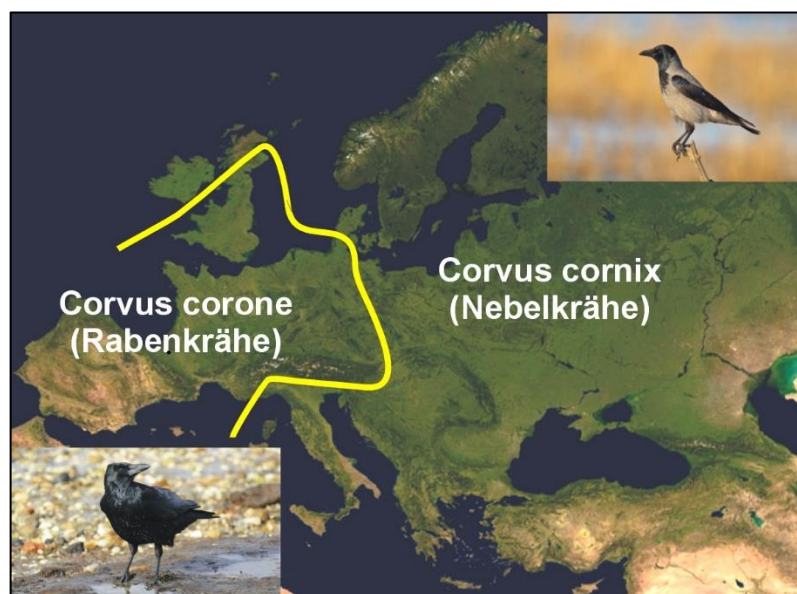


Abb. 1: Karte Europas zur Darstellung der Verbreitung der Rabenkrähen und Nebelkrähen, die gelbe Linie stellt die Hybridzone dar. (Nalagtus,

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Distribution_map_Corvus_corone_and_C._cornix.png, Lizenzhinweis:

<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/legalcode>, Zugriff 1.03.2020)

1.1.4 Lebensweise

Die meisten Arten der Rabenvögel sind Allesfresser und ernähren sich sehr vielseitig. So fressen Aaskrähen etwa Getreide, Beeren, Insekten, Würmer, Schnecken, kleine Wirbeltiere, Vogeleier, Aas und auch menschliche Abfälle, dabei wird die Nahrung meist vom zeitlichen und örtlichen Angebot bestimmt (Haffer und Bauer 1993). Einige Arten fressen aber etwas selektiver, so sind Kolkraben vor allem Fleischfresser, und Alpendohlen vor allem Beeren- und Insektenfresser (Haffer und Bauer 1993). Die meisten Arten legen Vorräte an.

Durch die omnivore Ernährungsweise, sowie die Fähigkeit sich an verschiedenste Habitate anzupassen, sind viele Corviden, vor allem die Raben und Krähen, zu Kulturfolgern geworden und leben erfolgreich in Städten (Haffer und Bauer 1993). Sie haben im Vergleich zu anderen Vögeln überdurchschnittlich hohe kognitive Fähigkeiten und sind sehr neugierig. Sie können sich zum Beispiel Gesichter merken, Werkzeuge zur Nahrungsbeschaffung benutzen, die menschliche Sprache und sogar Rufe von anderen Raubvögeln imitieren, anderen Raubtieren wie etwa Wölfen folgen um an Nahrung zu kommen, anderen Tieren etwas vortäuschen, Löcher graben um aus Käfigen zu entkommen und Nahrungsvorräte anlegen (dos Anjos 2009).

Außerdem sind Corviden sehr soziale Tiere. Sie haben verschiedene Rufe, um miteinander zu kommunizieren. Ihr großes vokales Repertoire ist nötig, da die meisten in lebenslangen monogamen Beziehungen leben und sich so besser mit ihrem Partner abstimmen können (dos Anjos 2009). Je länger die Tiere eine treue Beziehung führen, desto höher wird ihr Bruterfolg (dos Anjos 2009). Sie nisten in offenen oder überdachten Nestern in Bäumen oder an Felswänden, einige sogar in Baumhöhlen oder Erdlöchern (Haffer und Bauer 1993).

Raben und Krähen sind durch ihre außergewöhnliche Intelligenz, den Hang zum Opportunismus und die daraus resultierende Anpassungsfähigkeit sehr erfolgreiche Arten. Weltweit zählen nur zwölf der etwa 120 Arten von Corviden als gefährdet (dos Anjos 2009).

1.2 Trypanosomen

Die Gattung der Trypanosomen wurde das erste Mal 1843 von dem ungarischen Arzt David Gruby als *Trypanosoma sanguinis* im Blut eines Frosches beschrieben (Zídková et al. 2012). Nachdem man die Trypanosomen 40 Jahre lang als harmlos betrachtete, erkannte der britische Tierarzt Griffith Evans sie 1880 als Auslöser der „Surra“ (Deplazes et al. 2013). Seitdem wurden diverse Arten dieser Gattung als relevante Pathogene bei Mensch und bei domestizierten Tieren eingehend studiert. Da aviäre Trypanosomen hingegen meist als apathogen angesehen werden und wirtschaftlich nicht relevant sind, wurden diese weit weniger erforscht (Zídková et al. 2012).

Man geht davon aus, dass alle Trypanosomen von einem einzigen anzestralen Insektenparasiten abstammen und mindestens 100 Millionen Jahre alt sind. Sie haben sich an alle Klassen der Vertebraten sowie an einige Egel und Arthropoden als Vektoren angepasst und sind weltweit verbreitet (Hamilton et al. 2007).

1.2.1 Taxonomie und Bedeutung

Trypanosoma spp. sind parasitäre Protozoen und gehören zu der Klasse der Kinetoplastea, die taxonomische Einordnung ist in Tab. 3 ersichtlich (Deplazes et al. 2013).

Tab. 3: Taxonomie der Trypanosomen

Reich	Eukaryota, Protozoa	
Stamm	Euglenazoa	
Unterstamm	Kinetoplasta	
Klasse	Kinetoplastea	
Ordnung	Trypanosomatida	
Familie	Trypanosomatidae	
Gattung	<i>Trypanosoma</i>	<i>Leishmania</i>

In der Familie der Trypanosomatidae besitzen die Trypanosomen neben den Leishmanien die größte medizinische Bedeutung. Während es sich bei fast allen Trypanosomen und Leishmanien um heteroxene Parasiten handelt, welche einen Wirtswechsel von diversen blutsaugenden Insekten auf Wirbeltiere durchlaufen (Deplazes et al. 2013), sind viele andere

Gattungen innerhalb der Trypanosomatiden monoxen geblieben und parasitieren vor allem in Insekten (Svobodová et al. 2015). Trypanosomen parasitieren bei Vertebraten extrazellulär, vor allem im Blut und in der Lymphe, während Leishmanien intrazellulär in Makrophagen und Monozyten nachgewiesen werden können (Deplazes et al. 2013).

Die bedeutendsten humanpathogenen Trypanosomen sind *Trypanosoma brucei gambiense* und *T. b. rhodesiense* als Erreger der afrikanischen Schlafkrankheit des Menschen („african trypanosomiasis“) sowie *T. cruzi* als Erreger der Chagas-Krankheit in Lateinamerika („american trypanosomiasis“) (Deplazes et al. 2013).

Zu den bedeutendsten durch Trypanosomen verursachten Krankheiten der Haus- und Nutztiere zählen *T. congolense*, *T. vivax* sowie *T. b. brucei* als Erreger der seuchenhaften „Nagana“ der Haustiere im tropischen Afrika und *T. b. evansi* als Erreger der „Surra“ von Kamelen, Pferden und Hunden in Afrika und Asien. *T. b. equinum* verursacht das „Mal de Caderas“ (Hüftlähme) der Equiden in Südamerika und *T. b. equiperdum* ist der weltweit verbreitete monoxene Erreger der Beschälseuche der Pferde (Deplazes et al. 2013).

Leishmania spp. verursachen bei Menschen, Hunden, Katzen und Nagern verschiedene Leishmaniosen. Sie werden von Sandmücken in den Tropen, Subtropen und in Südeuropa zyklisch-alimentär übertragen (Deplazes et al. 2013). Da bei Vögeln keine Leishmanien bekannt sind, werden sie in dieser Arbeit nicht weiter behandelt.

1.2.2 Morphologie

Trypanosomen sind bewegliche Einzeller, die in bestimmten Stadien eine Geißel besitzen. Eine typische Eigenschaft der Trypanosomatiden ist, dass sie sich während ihrer Entwicklung im Vektor und im Wirt durch einige Formenwandel an die jeweils sehr unterschiedlichen Lebensbedingungen anpassen. So können Trypanosomen im Laufe ihres Lebens in drei morphologisch unterschiedlichen Formen vorliegen: die trypomastigote, epimastigote und amastigote Form (Abb. 2). Als amastigotes Stadium wird die einzige geißellose Form mit einer rundlichen Zelle bezeichnet (*a-* = gr. ohne; *mastix* = gr. Geißel). Die beiden anderen Formen sind spindelförmig und besitzen jeweils eine Geißel, deren Insetionsstelle an der Zelle variiert: Bei der epimastigoten Form inseriert sie in Kernnähe und bei der trypomastigoten Form am Hinterende (Deplazes et al. 2013). In letzterem Stadium wirkt die Zelle bohrerförmig, was namensgebend für die Trypanosomen ist: *trypanon* kommt aus dem Griechischen und bedeutet *Bohrer*, *soma* bedeutet *Körper*. Im Blutplasma des Vertebratenwirtes kommen meistens die trypomastigoten Stadien vor, im

Darm der Vektoren die epimastigoten. In den intrazellulären Teilen des Lebenszyklus liegen die Trypanosomen meistens als amastigote Stadien vor.

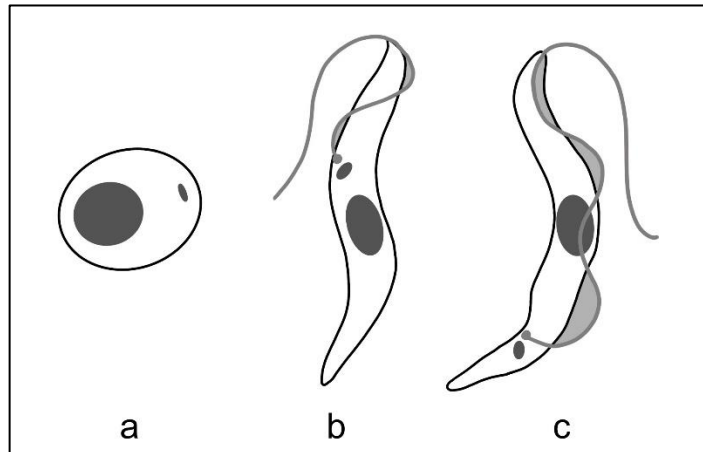


Abb. 2: Schema der Formen der Trypanosomen: **a** amastigot; **b** epimastigot; **c** trypomastigot

Abb. 3 zeigt das Schema eines Trypanosomen in seiner trypomastigoten Form. Der Zellkörper ist spindelförmig, der Zellkern liegt mittig und ein Nukleolus ist manchmal erkennbar. Ein Kinetoplast liegt im hinteren Teil des großen, länglichen, die gesamte Zelle durchziehenden Mitochondriums. Dieser Kinetoplast enthält die dicht gelagerte mitochondriale DNA (Deplazes et al. 2013, Hiepe et al. 2006) und ist das gemeinsame Merkmal aller Kinetoplasten (von *kinein* = griechisch: *bewegen* und *plastos* = gr.: *geformt*). Ebenfalls am Hinterende liegt der Basalapparat mit zwei bis vier Basalkörpern und der Geißeltasche. Die Geißel entspringt an einem dieser Basalkörper und zieht entlang der Zellmembran ans Vorderende der Zelle, welches sie noch als freie Geißel überragt. Durch eine stellenweise Verbindung mit der Zellmembran faltet die Geißel diese bei Bewegung zu einer undulierenden Membran auf (Deplazes et al. 2013). Unter der Membran erstrecken sich als Teil des Zytoskelettes Mikrotubuli durch die ganze Zelle und verleihen ihr damit eine konstante, aber flexible Form (Hiepe et al. 2006).

In einem Giemsa gefärbten Präparat sollte im Lichtmikroskop die undulierende Membran, der Zellkern, der Kinetoplast und die Geißel in jedem Fall erkennbar sein, sowie eventuell ein Nukleolus und einige Granula oder die Basalkörper (Deplazes et al. 2013).

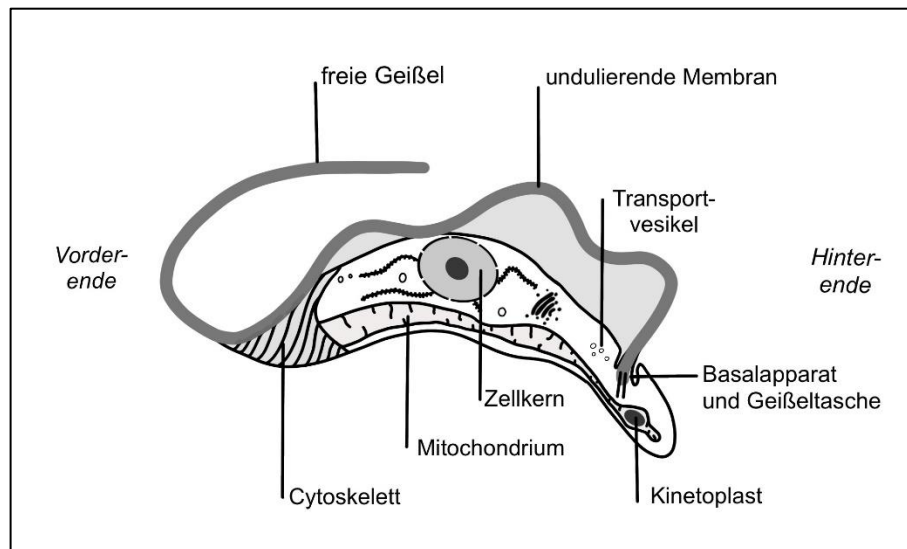


Abb. 3: Schema einer trypomastigoten Form von *Trypanosoma* sp.

Eine Besonderheit der Trypanosomen ist die Fähigkeit zur Immunevasion. Die Zelle ist überall außer im Bereich der Geißeltasche mit einem Mantel aus Oberflächenglykoproteinen bedeckt, welche durch neue ausgewechselt werden können, mit denen der Wirt noch nicht konfrontiert wurde. Durch dieses Prinzip der Antigenvariation können die Trypanosomen der humoralen Immunabwehr entgehen und im Wirt auf längere Dauer persistieren. Der Bereich, in welchem ein Stoffaustausch durch Endo- und Exozytosen stattfinden kann ist somit auf die Geißeltasche beschränkt (Deplazes et al. 2013).

1.2.3 Übertragung

Die meisten Trypanosomen sind heteroxene Parasiten und leben abwechselnd in Insekten, in welchen sie sich im Verdauungstrakt entwickeln und vermehren, und in Vertebraten, in welchen sie zumindest für einen Teil des Lebenszyklus im Blut vorkommen, aber einige auch intrazellulär parasitieren (Hamilton et al. 2007). Beim Wirtswechsel können die Trypanosomen in andere Entwicklungsformen übergehen. Die zur Übertragung prädisponierten, infektiösen Formen werden als metazyklische Formen bezeichnet.

Die Trypanosomen der Säugetiere werden in zwei Sektionen, die Salivaria und die Stercoraria unterteilt (Deplazes et al. 2013): Zu den Salivaria zählen die *T. brucei* – Gruppe und die Erreger der Nagana. Hier entwickeln sich die metazyklischen Formen in den Mundwerkzeugen, Speicheldrüsen oder dem Mitteldarm der Vektoren und werden im Allgemeinen beim Stich der Insekten über den Speichel übertragen. Die Stercoraria

beinhalten neben vielen apathogenen Arten auch *T. cruzi*, entwickeln sich im Hinterdarm der Vektoren und werden kontaminativ aus dem Kot der Insekten über verletzte Haut oder Schleimhaut der Wirte übertragen (Deplazes et al. 2013). Die genaue Lokalisation der metazyklischen Trypanosomen im Darmtrakt des Vektors ist also eng mit dem Transmissionsmodus verbunden und stellt einen Schlüsselpunkt im Lebenszyklus dar (Volf et al. 2004). Phylogenetisch stehen die Vogeltrypanosomen den Stercoraria näher als den Salivaria (Deplazes et al. 2013), deswegen wird im Folgenden der Lebenszyklus von *T. cruzi* erläutert (Abb. 4).

Bei der Blutmahlzeit der Raubwanze am Menschen werden metazyklische Trypomastigote über den Kot der infizierten Wanze durch Kontamination von Hautwunden oder von Schleimhäuten übertragen, wandern ins Blut und dringen in Zellen ein, hauptsächlich Muskelzellen und Neuroglia. In den Zellen wandeln sie sich in Amastigote um und vermehren sich durch Zweiteilung. Anschließend verwandeln sie sich wieder zu Trypomastigoten, gelangen ins Blut und sind für die nächsten Raubwanzen infektiös. Im Verdauungstrakt der Vektoren vermehren sie sich als Epimastigote und werden nach 6 – 7 Tagen wieder als Trypomastigote im Kot ausgeschieden.

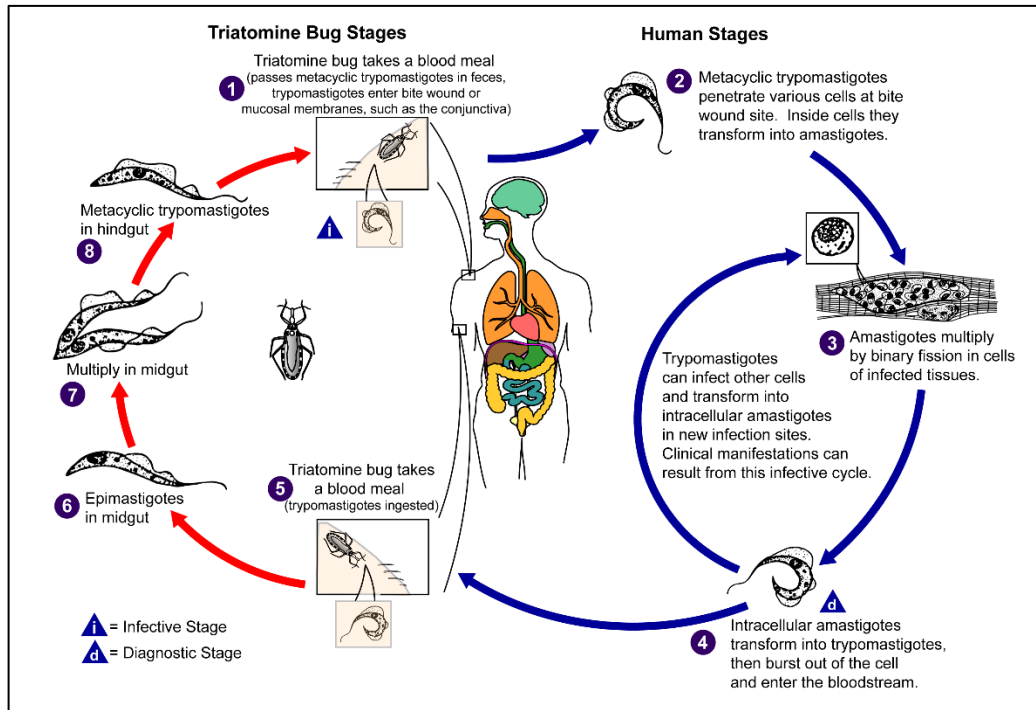


Abb. 4: Lebenszyklus von *Trypanosoma cruzi* (CDC/Alexander J. da Silva, PhD; Melanie Moser, <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=3384>, Zugriff 01.03.2020)

1.2.4 Vogeltrypanosomen

Die ersten Trypanosomen bei Vögeln wurden 1885 von Danilewsky entdeckt und beschrieben.

Etwa ein Fünftel aller beschriebenen Trypanosomen-Arten sind aviäre Trypanosomen. Sie kommen auf allen Kontinenten außer in den Polarregionen vor und parasitieren in vielen verschiedenen Vögeln aus verschiedenen Ordnungen; am häufigsten werden Sing- und Raubvögel befallen, Enten, Gänse und Spatzen nur selten (Apanius 1991, Zídková et al. 2012). Die Prävalenzen variieren je nach Nachweismethode von weniger als 1% bis hin zu mehr als 40%, dabei sind die sensitivsten Methoden die Kultivierung und die PCR (Zídková et al. 2012, Kirkpatrick und Lauer 1985). Sie werden von diversen Zweiflüglern übertragen, nämlich von Kriebelmücken (Simuliidae), Lausfliegen (Hippoboscidae), Stechmücken (Culicidae), Gnitzen (Ceratopogonidae) und Sandmücken (Phlebotominae) (Svobodová und Rádrová 2018).

Es wurden weltweit mehr als hundert Arten aviärer Trypanosomen beschrieben (Apanius 1991, Zídková et al. 2012), dies in der Annahme, dass die Trypanosomen eine ausgeprägte Wirtsspezifität besäßen und somit jeder neu entdeckte Wirt eine neue *Trypanosoma*-Art bedeuten müsste (Nandi und Bennett 1994). Dieses „ein Wirt – eine Spezies“ Paradigma gilt mittlerweile als widerlegt: Mehrere Experimente haben gezeigt, dass es möglich ist Trypanosomen von einer Vogelart auf eine andere, teils sogar aus anderen Familien, zu übertragen (Baker 1956a, c, Bennett 1970, Nandi und Bennett 1994, Votýpka et al. 2004). Oft wurden unbestimmte aviäre Trypanosomen einfach als *T. avium* oder auch als *T. confusum* bezeichnet (Votýpka et al. 2004, Zídková et al. 2012). Da die meisten Berichte weder morphologische noch molekulare Charakterisierungen beinhalteten, werden heutzutage die meisten Arten mittlerweile als *nomina dubia* angesehen (Votýpka et al. 2004). Da es nicht möglich ist, die verschiedenen Arten nur anhand der Morphologie zu unterscheiden, sind molekulargenetische Studien nötig (Votýpka et al. 2012). Allerdings kann die Messung der Kinetoplastenbreite, vor allem von den Kulturformen, als zusätzlicher Parameter zur Unterscheidung herangezogen werden (Lukes und Votýpka 2000, Votýpka et al. 2004, Zídková et al. 2012).

Nach neueren phylogenetischen Untersuchungen des *small subunit* (SSU) rRNA Gens können aviäre Trypanosomen in drei Kladen A, B und C mit 11 separaten Linien eingeteilt werden (Zídková et al. 2012). Mit diesen Ergebnissen stimmten auch die morphometrischen Analysen der Kinetoplastenbreite sowie der Zelllänge der Trypanosomen überein. Es wird davon ausgegangen, dass jede dieser Linien eine eigene Art von aviären Trypanosomen

darstellt. Während in dieser Untersuchung die Gattung der Trypanosomen zwar monophyletisch war, erschienen die aviären Trypanosomen, ähnlich wie die Säugetiertrypanosomen, jedoch polyphyletisch und stellen somit kein eigenes Taxon dar (Zídková et al. 2012). Laut Zídková et al. 2012 setzt sich die Klade A aus *T. bennetti* und 3 weiteren neuen Arten zusammen. Die Klade B beinhaltet die untereinander sehr nah verwandten *T. corvi* und *T. culicavium* sowie 2 weitere neue Linien, von welchen allerdings die Lebenszyklen noch nicht geklärt werden konnte. Die Klade C umfasst *T. avium* und 2 neue Arten, welche wahrscheinlich beide über Ingestion von Stechmücken auf Singvögel übertragen werden.

Obwohl inzwischen angenommen wird, dass aviäre Trypanosomen eine weitaus höhere Vektorspezifität als Wirtsspezifität besitzen, gibt es Beweise, dass *T. avium* von verschiedenen Vektoren übertragen werden kann (Apanius 1991, Zídková et al. 2012, Svobodová et al. 2017, Svobodová und Rádrová 2018). Sie sind also nur zu einem gewissen Grad vektorspezifisch. Hierbei scheint die Lokalisation der Trypanosomen im Verdauungstrakt des Vektors artspezifisch zu sein (Svobodová und Rádrová 2018).

Trypanosomen aus allen 3 Kladen können sowohl Sing- als auch Raubvögel infizieren und eine Vogelart kann von verschiedenen Trypanosomenarten befallen werden (Zídková et al. 2012). Die Wirtsspezifität wird nicht nur von Physiologie und Immunologie der Wirte beeinflusst, sondern auch von der Entwicklungsgeschichte und dem Lebensraum der individuellen Vögel (Zídková et al. 2012). So können sich zum Beispiel Raubvögel an ihrer Beute und insektivore Vögel an aufgefressenen Stechmücken infizieren (Dirie et al. 1990, Votýpka et al. 2012) und die Nesthöhe beeinflusst die Exposition durch verschiedene blutsaugende Insekten (Zídková et al. 2012).

1.2.4.1 Pathogenität

Aviäre Trypanosomen werden wegen der hohen Prävalenz, aber niedriger Parasitämie, sowie durch das Fehlen von klaren klinischen Symptomen weitgehend als apathogen angesehen (Votýpka et al. 2002). Dennoch gibt es Hinweise, dass einige Arten pathogen für ihre Wirte sein könnten.

Molyneux konnte bei experimentell mit *T. bouffardi* infizierten Kanarienvögeln eine fokale Myokarditis und eine Vergrößerung der Milz mit lymphoide Hyperplasie und Kongestion nachweisen (Molyneux et al. 1983). Ähnliche Veränderungen konnten auch bei Säugetieren, welche mit Trypanosomen der Salivaria-Sektion infiziert waren, beobachtet werden (Molyneux et al. 1983).

Tarello stellte fest, dass mit *T. avium* infizierte Jagdfalken (*Falco peregrinus* und *Falco cherrug*) aus Kuwait klinische Symptome zeigten, diese waren etwa Appetitlosigkeit, Gewichtsverlust, Unfähigkeit hoch zu fliegen, Lethargie, Schwäche, Dyspnoe und sogar Tod (Tarello 2005). Zum ersten Mal wurden mit *T. avium* infizierte Vögel mit dem für die Behandlung der Surra in Kamelen zugelassenen trypanoziden Medikament Melarsomin behandelt. Dies führte bei allen der zehn behandelten Tiere innerhalb von sieben Tagen nach Ende der Behandlung zu einer kompletten klinischen Genesung und dem Verschwinden von Trypomastigoten aus dem peripheren Blut (Tarello 2005).

Der Grund zur Annahme, dass aviäre Trypanosomen apathogen seien, ist wahrscheinlich der Mangel an Untersuchungen in diese Richtung. Die meisten Studien behandeln vor allem morphologische und epidemiologische Gegebenheiten und werden an Wildvögeln durchgeführt, welche nur für die Probennahmen eingefangen und anschließend wieder freigelassen werden, ohne den Verlauf des klinischen Zustands der Tiere festzustellen (Tarello 2005). In jagdlich geführten domestizierten Falken können pathogene Effekte besser untersucht werden. Es wird angenommen, dass die Pathogenität der aviären Trypanosomen von der Stärke der Parasitämie abhängig ist (Tarello 2005). Bei den meisten Vögeln bleibt die Parasitämie generell niedrig, da sich aviäre Trypanosomen im Gegensatz zu denen bei Menschen kaum in den Vögeln multiplizieren, sondern vorwiegend in den Vektoren (Valkiūnas et al. 2004). Die Parasiten können allerdings jahrelang in den infizierten Organen persistieren und Stress sowie eine verlängerte Photoperiode können nach einer latenten Phase der Infektion wieder zu einer Parasitämie führen (Valkiūnas et al. 2004).

Die Präpatenzzeit beträgt, zumindest für *T. corvi*, nur 18-24h (Svobodová et al. 2014). Die Zeitdauer bis zur Entwicklung metazyklischer Formen in den Vektoren ist temperaturabhängig, bei 24°C dauert es etwa fünf Tage, bei niedrigeren Temperaturen länger (Svobodová et al. 2014).

1.2.4.2 Trypanosoma avium

T. avium ist die erste Trypanosomenart, die bei Vögeln beschrieben wurde. Seitdem wurden fälschlicherweise viele verschiedene aviäre Trypanosomen in Europa, Asien und Nordamerika als *T. avium* betitelt, oft mit nur inadäquaten Beschreibungen und Illustrationen (Votýpka et al. 2004). Im Folgenden wird auf *T. avium sensu stricto* (s.s.) im Sinne Zídková et al. 2012 eingegangen. Hier umfasst die Klade C laut der SSU rRNA Analyse *T. avium* selbst, 2 neue Linien und ein paar nicht zu einer Linie zuordenbare Isolate. Diese 3 Linien stellen *T. avium sensu lato* (s.l.) dar. Alle *T. avium* s.s. Isolate waren in der SSU rRNA Analyse vollkommen ident, allerdings stellten sie in der *randomly amplified polymorphic DNA* (RAPD) Analyse zwei verschiedene Linien dar und hatten auch unterschiedlich breite Kinetoplasten (Zídková et al. 2012). Deswegen wird vermutet, dass die *T. avium* Linie mehr genetische Variabilität zeigen würde, wenn man andere Gene mit einer höheren Variabilität als die des SSU rRNA Gens untersuchen würde (Zídková et al. 2012).

Als natürliche Vektoren von *T. avium* gelten ornithophile Kriebelmücken (*Simulium* spp.), bei welchen die metazyklischen Parasiten im Ileum und in der rektalen Ampulle Pfropfen und Rosetten bilden (Votýpka et al. 2002, Votýpka und Svobodová 2004, Svobodová et al. 2015). Diese Lokalisation der Parasiten legt eine Infektion der Vögel über Kontamination und/oder über Ingestion nahe. Experimentell konnten aus dem Hinterdarm von natürlich infizierten Kriebelmücken (*Eusimulium latipes*) gewonnene Trypanosomen sowohl durch Ingestion dieser als auch über die Kontamination der Wirtskonjunktiva auf Kanarienvögel übertragen werden (Votýpka und Svobodová 2004). Die Parasiten konnten noch nach 10 Monaten im peripheren Blut der Vögel nachgewiesen werden (Votýpka und Svobodová 2004).

Sandmücken (Phlebotominae) gelten seit langem als bekannte Überträger von *Leishmania* spp. und haben nach neuesten Ergebnissen auch das Potential als Vektoren für *T. avium* zu fungieren. Dies basiert einerseits auf den Funden von natürlich infizierten *Lutzomyia caballeroi* und andererseits auf experimentellen Infektionen: Es konnten Sandmücken artifiziell mit *T. avium* infiziert werden und die aus ihnen isolierten Parasiten waren wiederum für Kanarienvögel infektiös, sowohl über Ingestion als auch über Kontamination der Konjunktiven (Svobodová und Rádrová 2018).

Außerdem konnte auch eine hohe Empfänglichkeit von Gnitzen (*Culicoides nubeculosus*) für *T. avium* Infektionen sowie die artifizielle Übertragung durch perorale Inokulation auf Kanarienvögel bewiesen werden (Svobodová et al. 2017). Allerdings werden sie nicht als natürliche Vektoren angenommen, da noch keine natürlich mit *T. avium* infizierten Gnitzen gefunden wurden.

Obwohl auch in einer Lausfliege (*Ornithomyia avicularia*) *T. avium* isoliert wurde, werden diese als Vektoren ausgeschlossen. Lausfliegen saugen mehrmals täglich Blut und scheiden es im Gegensatz zu den Mücken nicht sofort aus, was zu einem guten Kulturmedium für Trypanosomen im Darm führt. Es wird angenommen, dass die isolierten *T. avium* lediglich temporär im Darmtrakt lebten, die Defäkation nicht sicher überleben würden und auch nicht infektiös wären (Zídková et al. 2012).

Sowohl in den Kriebelmücken als auch in den Sandmücken und Gnitzen wurden die metazyklischen *T. avium* vor allem im Hinterdarm und in der rektalen Ampulle gefunden (Votýpka und Svobodová 2004, Svobodová et al. 2017, Svobodová und Rádrová 2018). Dies legt eine artspezifische Lokalisation von Trypanosomen im Darm der Insekten nahe. Außerdem scheint die Morphologie und Größe der infektiösen Formen der Trypanosomen in den verschiedenen Vektoren gleich zu sein (Svobodová et al. 2017, Svobodová und Rádrová 2018).

In der Natur findet die kontaminative Übertragung von *T. avium* durch Sandmücken und durch Kriebelmücken auf die Vogelwirte aller Wahrscheinlichkeit nach über die sogenannte Prediurese statt: Einige blutsaugenden Mücken scheiden während der Blutaufnahme am Wirt Flüssigkeit aus dem Anus, genannt Urin, aus, um Proteine der Blutmahlzeit im Darm zu konzentrieren. Diese Flüssigkeit kann die infektiösen Stadien von Trypanosomatiden aus dem Hinterdarm der Insekten enthalten. Nachdem auch beobachtet wurde, dass Mücken bei Vögeln oft um die Augenpartie herum Blut saugen, kann der Parasiten-enthaltende Urin zu einer Kontamination über die Konjunktiven führen (Sádlová et al. 1998, Votýpka und Svobodová 2004, Svobodová und Rádrová 2018).

Die Übertragung über Ingestion der Vektoren ist bei kleinen Vogelarten wahrscheinlicher als bei größeren Arten, da die kleinen ein ausgeprägteres anti-ektoparasitäres Verhalten zeigen und demnach mehr Mücken fangen und fressen, als die größeren Vögel (Votýpka und Svobodová 2004).

T. avium ist nicht sehr wirtsspezifisch, sondern in der Lage viele Vogelarten aus verschiedenen Ordnungen zu infizieren, als natürliche Wirte gelten Eulen, Raubvögel und Sperlingsvögel (Votýpka et al. 2004, Zídková et al. 2012).

1.2.4.3 Trypanosoma culicavium

T. culicavium ist eine neue Trypanosomen-Art, welche erst 2012 entdeckt und benannt wurde (Votýpka et al. 2012). Phylogenetisch steht diese Art *T. corvi* am nächsten und gehört zu derselben Klade (Zídková et al. 2012). Es handelt sich hierbei um die erste Trypanosomen-Art, bei welcher Stechmücken der Gattung *Culex* als Vektoren bewiesen werden konnten (Votýpka et al. 2012). Da sich die metazyklischen Trypanosomen an der *Valvula cardiaca* zwischen Vorder- und Mitteldarm der Insekten pfropfartig anheften, zu degenerativen Veränderungen dieser führen und sie blockieren, wurde zuvor angenommen, dass es bei der Blutaufnahme der Insekten zu einer Regurgitation der Trypanosomen kommt und diese somit inokulativ auf die Vogelwirte übertragen werden (Volf et al. 2004). Allerdings konnten durch Stiche von infizierten Mücken keine experimentelle Infektion von Kanarienvögel erreicht werden, sondern ausschließlich durch Ingestion der infizierten Stechmücken (Votýpka et al. 2012). Bisher wurden alle als *T. culicavium* identifizierten Trypanosomen nur aus Stechmücken der Gattung *Culex* und aus insektivoren Sperlingsvögel isoliert (Svobodová und Rádrová 2018).

Obwohl man bei Gnitzen eine hohe Empfänglichkeit für *T. avium* und *T. bennetti* festgestellt hat, konnten sie nicht mit *T. culicavium* infiziert werden (Svobodová et al. 2017). Dies zeigt, dass unterschiedliche Trypanosomen-Arten eine unterschiedlich starke Fähigkeit besitzen alternative Vektoren zu entwickeln und unterschiedlich stark vektorspezifisch sind (Svobodová et al. 2017).

Somit werden als natürliche Hauptwirte von *T. culicavium* insektenfressende Sperlingsvögel und als Haupttransmissionsweg die Ingestion von infizierten Insekten angenommen (Votýpka et al. 2012).

1.2.4.4 Trypanosoma corvi

T. corvi wurde ursprünglich 1908 aus einer Glanzkrähe (*Corvus splendens*) in Indien isoliert und beschrieben, von diesem Wirt rührt auch der Name (Votýpka et al. 2004). Lange Zeit wurden alle großen Trypanosomen, die man bei Corviden und Turdiden der alten Welt fand als *T. corvi* bezeichnet, wobei mittlerweile klar ist, dass Corviden auch mit Trypanosomen der *T. avium* – Klade infiziert sein können (Dusek und Forrester 2002, Votýpka et al. 2004, Zídková et al. 2012). Als natürliche Wirte von *T. corvi* gelten sowohl Singvögel als auch Raubvögel (Votýpka et al. 2004, Zídková et al. 2012).

Schon in frühen Studien wurden Lausfliegen (*Ornithomyia avicularia*) als Vektor identifiziert (Baker 1956b, Mungomba et al. 1989), dies wurde durch molekulargenetische Analysen

sowie Messungen der Kinetoplastenbreite bestätigt (Votýpka et al. 2004, Zídková et al. 2012). Epimastigote entwickeln und vermehren sich im Mitteldarm der Lausfliegen, während die metazyklischen Trypomastigoten schließlich im Hinterdarm lokalisiert sind (Baker 1956b, Mungomba et al. 1989, Svobodová et al. 2015). Die Vögel infizieren sich beim Putzen des Federkleides über Ingestion der Lausfliegen (Baker 1956b, Votýpka et al. 2004).

1.2.4.5 *Trypanosoma bennetti*

T. bennetti wurde ursprünglich 1986 in einem Buntfalken (*Falco sparverius*) in den USA isoliert und durch morphologische Beschreibung von Kulturformen sowie durch biochemische Charakterisierung als eine eigene Art anerkannt (Svobodová et al. 2017). In der Folge konnte *T. bennetti* auch in Mitteleuropa aus Nestlingen von Raubvögeln und aus ganzjährig ansässigen Sperlingsvögeln isoliert werden (Zídková et al. 2012). Dies bestätigt neben der weiten Verteilung auch die in Mitteleuropa lokale Übertragung von *T. bennetti*.

Erst kürzlich gelang es in Tschechien ornithophile Gnitzen (*Culicoides* spp.) als Vektoren von *T. bennetti* und einiger Linien der *T. bennetti* - Klade (Klade A im Sinne Zídková et al. 2012) zu identifizieren (Svobodová et al. 2017). Dieses Ergebnis basiert einerseits auf den Funden natürlich infizierter *Culicoides* spp. mit Trypanosomen aus der *T. bennetti* – Gruppe und andererseits auf der hohen artifiziellen Empfänglichkeit von *Cu. nubeculosus* für Infektionen mit *T. bennetti* (Svobodová et al. 2017). Der genaue Übertragungsweg von den Gnitzen auf die Vogelwirte konnte allerdings noch nicht vollständig bewiesen werden. Da die infektiösen Stadien den Mitteldarm des Vektors besiedeln, ist eine inokulative Transmission über den Stich des Vektors unwahrscheinlich. Obwohl experimentell keine Infektion eines Kanarienvogels durch eine perorale oder konjunktivale Beimpfung mit infektiösen Stadien von *T. bennetti* erreicht werden konnte, sondern nur durch subkutane Injektionen, scheint als natürlicher Transmissionsweg eine Ingestion der Vektoren wahrscheinlicher (Svobodová et al. 2017).

Stechmücken der Gattungen *Culex* und *Aedes* sowie Sandmücken können als Vektoren ausgeschlossen werden, da diese experimentell nicht mit *T. bennetti* infiziert werden konnten (Svobodová et al. 2017, Svobodová und Rádrová 2018).

1.3 Filarien

1.3.1 Allgemeines

Filarien sind fadenförmige Nematoden, die der Überfamilie der Filarioidea angehören. Diese besteht aus der Familie der Filariidae sowie der Familie der Onchocercidae. Die genaue taxonomische Einteilung der Filarien ist in Tab. 4 ersichtlich (Deplazes et al. 2013).

Tab. 4: Taxonomie der Filarien

Reich	Eukaryota, Metazoa	
Stamm	Nematoda (Fadenwürmer)	
Klasse	Secernentea	
Ordnung	Spirurida (Rollschwänze)	
Überfamilie	Filarioidea (Filarien)	
Familie	Filariidae	Onchocercidae
Gattungen (Beispiele)	<i>Parafilaria</i> , <i>Stephanofilaria</i> , ...	<i>Wuchereria</i> , <i>Brugia</i> , <i>Loa</i> , <i>Onchocerca</i> , <i>Dirofilaria</i> , ...

Die endoparasitisch lebenden Filarien sind weltweit verbreitet und kommen bei allen Klassen der Wirbeltiere außer Fischen vor (Anderson 2000, Deplazes et al. 2013). Die Länge der adulten Filarien variiert von wenigen Millimetern bis hin zu mehr als 80 cm, wobei Weibchen meistens größer sind als Männchen (Deplazes et al. 2013). Sie parasitieren je nach Art in den Körperhöhlen, im Blutkreislauf, im Lymphsystem oder in Binde- oder Sehngewebe, aber niemals im Darm (Deplazes et al. 2013, Lucius et al. 2018). Filarien wurden bereits in allen Organsystemen sowie in den meisten Geweben gefunden, dabei hat jede Art eine bevorzugte hochspezifische Lokalisation (Anderson 2000).

Während die Familie der Filariidae vor allem veterinärmedizinische Bedeutung bei Rindern und Equiden als Erreger der Parafilariose, des Sommerblutens oder von Sommerwunden hat, befallen Onchocercidae sowohl Menschen als auch andere Säugetiere, Vögel, Reptilien und Amphibien (Lucius et al. 2018, Deplazes et al. 2013). Humane Filarieninfektionen in den Tropen und Subtropen gehören zu den wichtigsten Krankheiten weltweit (Lucius et al. 2018). Sehr bedeutsam sind *Wuchereria bancrofti* und *Brugia* als Erreger der lymphatischen Filariose mit der Folge der Elefantiasis. Vor allem in Afrika verbreitet, führt *Onchocerca*

volvolus zur Flussblindheit und *Loa loa* zur Kalabarschwellung. In Europa sind *Dirofilaria immitis* sowie *Dirofilaria repens* als Erreger der kardiovaskulären bzw. kutanen Dirofilariose der Hunde von besonderer veterinärmedizinischer Bedeutung (Lucius et al. 2018).

Eine Besonderheit der Onchocerciden ist, dass fast alle intrazelluläre Bakterien der Gattung *Wolbachia* als Endosymbionten enthalten (Deplazes et al. 2013). Diese haben in der Bekämpfung der Filariosen eine therapeutische Bedeutung: Durch die Abhängigkeit der adulten Filarien von den Bakterien wirken Antibiotika der Gruppe der Doxozykline adultizid (Deplazes et al. 2013, Lucius et al. 2018).

1.3.2 Lebenszyklus

Filarien sind wie andere Nematoden zweigeschlechtlich und je nach Art vivipar oder ovovivipar, d.h. nach der Verpaarung scheiden die adulten Weibchen L1-Larven oder larvenhaltige Eier aus (Deplazes et al. 2013). Die L1-Larven werden als Mikrofilarien bezeichnet und bei allen Arten von hämatophagen Arthropoden als Vektoren aufgenommen (Anderson 2000). Bei den beiden Familien der Filarien unterscheidet sich bloß der Weg bis zur Aufnahme durch die Vektoren.

Die adulten Vertreter der Filariidae bilden Knoten in der Unterhaut ihrer Wirte und scheiden dort Eier oder Larven aus. Diese Knoten brechen auf und locken blutsaugende oder -leckende Arthropoden, vor allem Fliegen, an, welche die L1-Larven aufnehmen (Anderson 2000, Deplazes et al. 2013).

Die adulten Onchocerciden hingegen parasitieren in den verschiedensten Organen und Geweben ihrer Wirte und die ausgeschiedenen Mikrofilarien wandern ins Blut, in die Lymphe oder in die Haut. Diese sind damit im Gegensatz zu den Filariidae-Larven im Wirtskörper weit entfernt von ihrem Ursprungsort. Blutsaugende Arthropoden, welche die Haut der Wirte selbstständig durchstechen oder beschädigen, nehmen die Mikrofilarien anschließend auf (Anderson 2000).

Bei beiden Familien entwickeln sich die L1-Larven in den Zwischenwirten über zwei Häutungen zu infektiösen L3-Larven und wandern zum Kopf und zu den Mundwerkzeugen der Arthropoden (Anderson 2000). Hier brechen sie bei der nächsten Blutmahlzeit aus und wandern auf die Haut der Endwirte. Ist die Umwelt ausreichend feucht, überleben die Larven und wandern durch Wunden oder durch den von den Vektoren produzierten Stichkanal in die Haut der Endwirte ein (Anderson 2000). Die Länge der infektiösen Larven variiert von 0,5 mm bis hin zu 5 mm (Anderson 2000). Im Endwirt wandern die L3-Larven zu ihren jeweiligen Ansiedlungsstellen und entwickeln sich über das Stadium der L4-Larven zu Adulten

(Deplazes et al. 2013). Wie genau sie diese hochspezifischen, finalen Ansiedlungsorte im Körper der Endwirte finden, konnte noch nicht geklärt werden (Anderson 2000).

Abb. 5 zeigt den Lebenszyklus der Onchocercidae anhand des Beispiels von *Wuchereria bancrofti*.

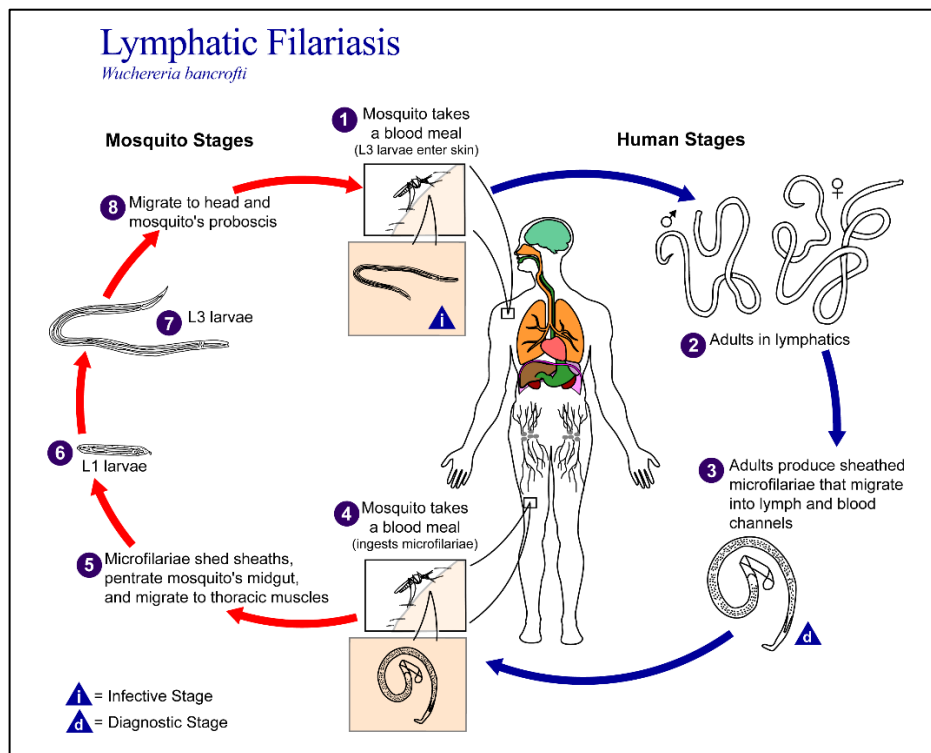


Abb. 5: Lebenszyklus von *Wuchereria bancrofti* (CDC/Alexander J. da Silva, PhD; Melanie Moser, <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=3425>, Zugriff 16.04.2020)

Die Zeitdauer von der Aufnahme der Mikrofilarien bis zur Entstehung der L3-Larven in den Arthropoden ist temperaturabhängig. Unter 14°C entwickeln sich zum Beispiel *Dirofilaria immitis* Larven nicht in Culiciden, bei 18°C dauert die Entwicklung 29 Tage und bei 20°C 8 Tage (Deplazes et al 2013).

1.3.3 Vogelfilarien

Bei Vögeln sind etwa 160 verschiedene Filarienarten aus 16 Gattungen bekannt, welche alle zu der Familie der Onchocercidae gehören (Bartlett 2008). Eine Übersicht ist in Tab. 5 ersichtlich. Die Gattung *Pelecitus* ist die einzige, welche Arten enthält die sowohl Vögel als auch Nichtvogelwirte befallen (Bartlett 2008).

Tab. 5: Übersicht über die 16 Gattungen aviärer Filarien nach Unterfamilie, in Klammern die Anzahl validierter Arten in der jeweiligen Gattung (Bartlett 2008)

Unterfamilie	Gattungen (Anzahl Arten)
Dirofilarinae	<i>Pelecitus</i> (16)
Onchocercinae	<i>Struthiofilaria</i> (1)
Splendidofilarinae	<i>Paronchocerca</i> (17), <i>Pseudlemdana</i> (1), <i>Striatofilaria</i> (1), <i>Aproctella</i> (7), <i>Cardiofilaria</i> (14), <i>Andersonfilaria</i> (2), <i>Chandlerella</i> (26), <i>Splendidofilaria</i> (31), <i>Desseffilaria</i> (2)
Lemdaninae	<i>Lemdana</i> (9), <i>Aproctiana</i> (1), <i>Sarconema</i> (2), <i>Eulimdana</i> (16), <i>Eufilaria</i> (14)

Adulte aviäre Filarien sind schlanke, weiße Nematoden mit einer durchschnittlichen Länge von 1 – 5 cm (Bartlett 2008). Im Allgemeinen wandern aviäre Mikrofilarien entweder ins Blut oder besiedeln die Haut. Allerdings wurden auch okkulte Infektionen nachgewiesen, bei welchen adulte Weibchen Mikrofilarien produzieren, die weder ins Blut noch in die Haut wandern, sondern am Ort des Entstehens vom Immunsystem des Wirtes besiegt werden (Bartlett und Anderson 1981, Bartlett 2008). Ein Großteil des Wissens um die Häufigkeit von Filarieninfektionen bei Vögeln basiert auf zufälligen Funden von Mikrofilarien in Blutaussstrichen im Rahmen anderer Studien (Bartlett 2008). Der Nachweis von adulten Filarien gestaltet sich aufgrund der zahlreichen möglichen Lokalisationen im Vogelkörper schwierig, und da nur in wenigen Studien Hautbiopsien entnommen wurden ist auch noch wenig über die Häufigkeit von Mikrofilarien, welche in die Haut wandern gewusst (Bartlett 2008).

Die Präpatenzzeit der Vogelfilarien ist je nach Art sehr unterschiedlich. Bei Arten, deren Mikrofilarien ins Blut wandern beträgt sie zwischen 21 Tagen und drei Monaten (Bartlett 2008). Bei Arten, deren Mikrofilarien die Haut besiedeln, konnte die Präpatenzzeit noch nicht

genau bestimmt werden, scheint aber eine lange Dauer zu haben. Bei *Pelecitus fulicaeatrae* zum Beispiel, welches im amerikanischen Blässhuhn parasitiert, sind zwar Mikrofilarien 210-265 Tage *post infectionem* in der Nähe der adulten Weibchen nachweisbar, aber noch nicht in der Haut (Bartlett und Anderson 1989, Bartlett 2008).

Eine Besonderheit bei einigen aviären Filarienarten ist, im Gegensatz zu allen anderen Filarien, die frühzeitige Alterung des Reproduktionstraktes (*reproductive senescence*) und die Kurzlebigkeit der Adulten (*ephemerality*) (Bartlett 2008). Adulte *Eulimdana* spp. parasitieren bei Vögeln der Ordnung Charadriiformes (Regenpfeiferartige) im Subkutangewebe des Kopfs und Nacken, produzieren langlebige Mikrofilarien, sterben kurze Zeit später und werden vom Wirt resorbiert, welcher eine bleibende Immunität gegenüber Adulten ausbildet (Anderson und Bartlett 1994). Adulte *Pelecitus fulicaeatrae* parasitieren im amerikanischen Blässhuhn im Gewebe nahe der Fesselgelenke und produzieren ebenfalls für eine kurze Zeit langlebige Mikrofilarien. Danach stellen sie ihre Reproduktion ein und persistieren weiterhin an ihrem Ansiedlungsort (Anderson und Bartlett 1994).

Bei beiden wandern die Mikrofilarien in die Haut und bleiben dort für die Lebensdauer des Wirtes für ihre Vektoren, die Federlinge, verfügbar (Anderson und Bartlett 1994). Wahrscheinlich hat sich diese Besonderheit entwickelt, um die Anzahl der Mikrofilarien in der Haut zu reduzieren. Federlinge sind permanente Parasiten und könnten sonst bei kontinuierlicher Ingestion von zu vielen Mikrofilarien sterben, bevor sie die Filarien auf den Vogelnachwuchs übertragen können (Anderson und Bartlett 1994).

1.3.3.1 Pathogenität und klinische Symptome

Die meisten aviären Filarien sind, im Gegensatz zu den Filarien bei Säugern, nicht pathogen für ihre Wirte und führen allenfalls bei einzelnen Individuen einzelner Vogelarten zu subklinischen Infektionen (Bartlett 2008). Bei schwerem Befall wurden bisher artabhängig und bei einzelnen Tieren Gewichtsverlust, vermindertes Allgemeinbefinden, Endothelschäden, Federverlust, Stenosen von Gefäßen, Thrombosen, Myokardschäden, geschwollene Gelenke in Verbindung mit Lahmheiten, sowie Tortikollis und progressive Ataxie beschrieben (Deplazes et al. 2013, Bartlett 2008).

In den meisten Fällen ist eine Behandlung kontraindiziert, da das Absterben der Adulten Entzündungen und Läsionen mit schlimmeren Konsequenzen als die eigentliche Infektion hervorrufen könnte (Bartlett 2008).

1.3.3.2 Vektoren und Vektorspezifität

Die Vektoren sind lediglich bei 18 der etwa 160 Arten aviärer Filarien bekannt (Bartlett 2008). Dabei handelt es sich um verschiedene Arten von Federlingen (Mallophagen) der Unterordnungen Ischnocera und Amblycera, sowie um Mücken der Familien der Stechmücken (Culicidae), Kriebelmücken (Simuliidae) und Gnitzen (Ceratopogonidae) (Bartlett 2008).

Die Gattungen der Filarien sind nicht vektorspezifisch, eine Gattung kann von Insekten aus verschiedenen Familien und Ordnungen übertragen werden (Bartlett 2008).

Auf Artniveau scheint die Vektorspezifität der Filarien höher zu sein: Filarienarten, welche Dipteren als Vektoren nutzen, sind für eine Vektorfamilie spezifisch, können innerhalb dieser aber von mehreren verschiedenen Arten aus einer Vektorgattung übertragen werden (Bartlett 2008). Die Filarienarten, welche Federlinge als Vektoren benutzen, sind innerhalb der beiden Unterordnungen Ischnocera und Amblycera allerdings wieder weniger vektorspezifisch: einige können von Federlingen beider Unterordnungen übertragen werden (Bartlett 2008).

1.3.3.3 Wirtsspezifität

Vogelfilarien sind im Gegensatz zu Filarien bei Säugern kaum wirtsspezifisch (Deplazes et al. 2013). Die Wirtsspezifität der Filarien hängt unter anderem von der ihrer Vektoren ab: Diejenigen Filarienarten, die von wirtsspezifischen Federlingen übertragen werden, weisen eine höhere Wirtsspezifität auf als jene, deren Vektoren auch nicht wirtsspezifisch sind, wie etwa blutsaugende Mücken (Bartlett 2008). Nicht-wirtsspezifische Filarienarten können in den verschiedenen Vogelarten einer Vogelmgemeinschaft jeweils sporadisch, okkult oder häufig vorkommen (Bartlett 2008).

Einzelne Vögel können gleichzeitig mit mehreren verschiedenen Filarienarten infiziert sein. Wenn die Adulten sehr verschiedene Körperstellen besiedeln, sind sogar gleichzeitige Infektionen mit Filarien aus denselben Gattungen möglich, dies ist etwa bei *Chandlerella* und *Splendidofilaria* nachgewiesen (Bartlett 2008).

1.3.3.4 Filarien bei Corviden

Bei Corviden konnten weltweit bisher Filarieninfektionen der Gattungen *Pelecitus*, *Paronchocerca*, *Pseudlemdana*, *Cardiofilaria*, *Chandlerella*, *Splendidofilaria*, und *Eufilaria* nachgewiesen werden (Bartlett 2008).

Meldungen von Filarien bei Corviden aus Europa sind etwas spärlich zu finden. In Niederösterreich wurden 1958 bei Eichelhähern Adulte von *Eufilaria delicata* im Halsbindegewebe, insbesondere im perioesophagealen Gewebe, in Verbindung mit zahlreichen Mikrofilarien im Blut nachgewiesen (Supperer 1958). Von derselben Art wurden Adulte und Mikrofilarien außerdem in Saatkrähen in Moldawien gefunden (Haas et al. 2011).

In Nordamerika gibt es mehr Nachweise von Filarien bei Rabenvögeln: *Chandlerella chitwoodae* wurde bei Amerikanerkrähen (*Corvus brachyrhynchos*) sowie bei Blauhähern (*Cyanocitta cristata*) nachgewiesen, *Eufilaria longicaudata* in Krähen, Blauhähern und Hudsonelstern (*Pica hudsonia*), *Chandlerella quiscali* in Amerikanerkrähen und in Blauhähern, sowie *Splendidofilaria caperata*, *Cardiofilaria pavlovskyi* und *Splendidofilaria wehri* bei Amerikanerkrähen (Bartlett und Anderson 1980). Davon sind *Chandlerella chitwoodae*, *S. caperata* und *E. longicaudata* enzootisch in der amerikanischen Krähenpopulation. *Chandlerella chitwoodae* und *Eufilaria longicaudata* produzierten in den Amerikanerkrähen in jedem Fall eine Mikrofilariämie und können sich also als häufige Parasiten in der Krähenpopulation erhalten (Bartlett und Anderson 1980). Bei Infektionen mit *Splendidofilaria caperata* wurden allerdings weder Mikrofilarien im Blut noch in der Haut gefunden, diese häufige okkulte Infektion kann sich also nicht in einer reinen Krähenpopulation erhalten (Bartlett und Anderson 1980). Infektionen mit *Chandlerella quiscali*, *Cardiofilaria pavlovskyi* und *Splendidofilaria wehri* wurden zwar mit einer einhergehenden Mikrofilariämie, aber in geringer Zahl festgestellt. Diese sind wahrscheinlich häufige Parasiten anderer Vogelarten, die denselben Lebensraum bewohnen und ähnliche Vektoren zur Übertragung benutzen (Bartlett und Anderson 1980).

Aviäre Filarien parasitieren also in verschiedenen Vogelarten, die denselben Lebensraum teilen und dabei sind einige Vogelarten einer Gemeinschaft wichtiger für die Erhaltung bestimmter Filarienarten als andere. Aviäre Filarien kommen also eher in Vogelmenschen als in bestimmten Wirtsarten vor (Bartlett und Anderson 1980).

2 Material und Methode

2.1 Material

Bereits extrahierte DNA-Proben wurden vom Projekt „FWF-Malaria und andere Hämosporidiosen bei Wildvögeln“ vom Institut für Pathologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien zur Verfügung gestellt.

Von insgesamt 162 Vögeln wurden 160 DNA-Proben und 125 Blutausstriche analysiert.

Von den Blutausstrichen kamen 82 von der Vogelklinik der Veterinärmedizinischen Universität Wien (Vetmeduni) und 43 von der Konrad Lorenz Forschungsstelle (KLF) in Grünau.

Die 157 Proben, die zur DNA-Gewinnung benutzt wurden, waren folgende:

- 141 getrocknete Blutstropfen auf Filterpapier:
 - o 90 von der Vogelklinik der Vetmeduni Wien,
 - o 8 von der Veterinärmedizinischen Universität Sarajevo, BA.
 - o 43 von den Blutausstrichen vom KLF in Grünau. Diese wurden von bereits ausgestrichenem Blut mittels einer Pufferlösung wieder gelöst und auf ein Filterpapier gebracht.
- 16 Lebergewebe-Proben vom Institut für Pathologie und dem Forschungsinstitut für Wildtierkunde und Ökologie (FIWI) der Vetmeduni Wien

Außerdem wurden drei vom Institut für Virologie bereits extrahierte DNA-Proben aus Gehirn analysiert.

Alle Blutproben waren von lebenden Tieren, alle Gewebeproben von verstorbenen Tieren.

2.2 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion wurde von den Mitarbeitern des Instituts für Pathologie durchgeführt. Zur DNA-Extraktion wurde mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Venlo, Niederlande) gearbeitet. Dabei wurde laut dem Herstellerprotokoll zur Isolierung vollständiger DNA aus Gewebeproben von Tieren vorgegangen.

Die auf einem Filterpapier getrockneten Blutstropfen wurden zu etwa 0,5 x 1 cm großen Stücken zurechtgeschnitten und in 2 ml Tubes gelegt. Die bei –80 °C gefrorenen Lebergewebe-Proben wurden bei Raumtemperatur nur leicht aufgetaut und jeweils etwa 5 mg von der Oberfläche abgeschabt. Diese wurden ebenfalls in 2 ml Tubes verbracht. Der erste Schritt bestand bei allen Proben aus einer enzymatischen Auflösung der Zellen. Dafür

wurde den Proben ein spezieller Lyse-Puffer sowie Proteinase K hinzugefügt. Anschließend wurden sie für ca. zwei Stunden in einem Thermomixer bei 56°C inkubiert. Danach wurde dem Lysat Ethanol und eine an chaotropen Salzen reiche Pufferlösung hinzugefügt und das ganze Gemisch in die DNeasy Mini Spin Columns pipettiert. Anschließend wurden die Proben in einer Mikrozentrifuge bei Raumtemperatur für eine Minute bei 8.000 Umdrehungen pro Minute (U/min) zentrifugiert. Durch die Zentrifugation binden die Nukleinsäuren selektiv an die Silica-basierte Membran, während Kontaminanten und Enzyminhibitoren die Membran passieren.

In zwei Waschschrritten wurden je 500 µl Waschpuffer in die Mini Spin Columns pipettiert und diese zentrifugiert, das erste Mal eine Minute bei 8.000 U/min, das zweite Mal drei Minuten bei 14.000 U/min.

Im letzten Schritt wurde die DNA aus der Membran ausgewaschen und in Puffer gelöst. Dafür wurden 100 µl Puffer direkt auf die Membran pipettiert, eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und die Mini Spin Columns wurden wieder eine Minute bei 8.000 U/min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde ein zweites Mal durchgeführt, aber diesmal wurden die Proben bei 13.000 U/min zentrifugiert. Zur späteren PCR wurden die Eluate aus dem zweiten Schritt benutzt.

Die nun gelöste DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei – 20 °C aufbewahrt.



Abb. 6: Prinzip der DNA-Extraktion mittels DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Venlo, Niederlande), modifiziert. (<https://www.qiagen.com/us/shop/sample-technologies/dna/genomic-dna/dneasy-blood-and-tissue-kit/#productdetails>, Zugriff 12.04.2019)

2.3 PCR

2.3.1 Prinzip

1993 erhielt Kary Mullis den Nobelpreis für Chemie für die Erfindung der Polymerase-Kettenreaktion oder Polymerase Chain Reaction (PCR). Diese erlaubt es, ein zuvor festgelegtes, spezifisches DNA-Segment exponentiell zu vervielfältigen und zählt heute zu den wichtigsten Methoden der Molekularbiologie. Um eine PCR durchzuführen, braucht man zwei spezifisch designte Oligonukleotide, Primer genannt, welche an zuvor bestimmte DNA-Sequenzen binden und die Startpunkte festlegen. Für jeden der beiden Einzelstränge wird jeweils ein unterschiedlicher Primer benutzt, diese werden auch „forward und reverse primer“ genannt.

Vor der PCR stellt man einen Mastermix zusammen, den man danach in einer bestimmten Menge mit der zu vervielfältigenden, in Puffer eluierten DNA mischt. Dieser enthält in jeweils genau ausgerechneten Mengen die 2 spezifischen Primer, eine hitzestabile Polymerase (TaqPolymerase), Nukleotide (dNTP) als Bausteine der DNA-Synthese, eine Pufferlösung und Wasser.

Bei der PCR handelt sich um einen zyklischen Prozess, der mit einer initialen Denaturierung der DNA beginnt. Durch Erhitzung auf 94–96 °C werden die Doppelstränge der vorhandenen DNA in ihre zwei Einzelstränge getrennt. Danach besteht ein Zyklus aus je 3 Schritten: Denaturierung, Annealing und Elongation. Beim Annealing lagern sich die Primer durch Abkühlung auf 40–65 °C an die Einzelstränge an. Bei der Elongation benutzt die Polymerase die Primer als Startpunkt und lagert komplementär zur Matrize neue Nukleotide an das 3' Ende des neu entstehenden Stranges an. Diese Ergänzung des Einzelstranges zu einem Doppelstrang geschieht meist bei 72°C. Ein Zyklus wird meistens etwa 30-mal wiederholt. Danach wird mit einem Schritt der finalen Elongation abgeschlossen (van Pelt-Verkuil et al. 2008, Kaufmann 1996).

Für alle PCRs dieser Arbeit wurde ein Eppendorf Mastercycler® Pro (Eppendorf AG, Hamburg) verwendet. Für jeden Mastermix wurden die GoTaq® DNA Polymerase und der Green GoTaq® Reaction Buffer der Firma Promega (Fitchburg, USA) verwendet. Jeder Mastermix wurde in einer Sterilbank hergestellt. Es wurden bei jedem Versuch eine Positiv- und Negativprobe mit durchgeführt.

2.3.2 Nested PCR

Eine Nested PCR oder verschachtelte PCR ist eine Variation der konventionellen PCR, die aus zwei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen mit zwei verschiedenen Primerpaaren besteht. Sie wird benutzt, wenn nur sehr geringe Mengen an zu amplifizierender DNA relativ zur Gesamt-DNA in der Probe vorhanden sind.

Nach der ersten PCR (Nest 1) wird eine kleine Menge des Produktes hiervon als Matrize mit einem Mastermix vermischt, der neue „verschachtelte“ Primer enthält. Diese binden in der zweiten PCR (Nest 2) an spezifische Sequenzbereiche innerhalb dieser Matrize und es entstehen kürzere spezifische DNA-Fragmente.

Bei der ersten PCR können neben den gewünschten DNA-Sequenzen auch unerwünschte Sequenzbereiche infolge unspezifischer Bindung der Primer entstehen (Busch 2010). Durch die zweite PCR wird eine Erhöhung der Konzentration der spezifischen Produkte erreicht, da nur die spezifischen Nest 1 Produkte die komplementären Primersequenzen enthalten und nur diese vervielfältigt werden (van Pelt-Verkuil et al. 2008).

Diese Art der PCR erhöht also sowohl die Spezifität als auch die Sensitivität der DNA-Amplifikation gegenüber der konventionellen PCR (van Pelt-Verkuil et al. 2008).

2.3.3 Touchdown PCR

Eine Methode, die Amplifizierung unspezifischer DNA-Sequenzen zu vermeiden, ist die Touchdown PCR. Da man davon ausgeht, dass die Bindungen der Primer an die nicht gewünschten, weniger spezifischen Sequenzen weniger stabil sind als die spezifischen, erreicht man eine Verminderung der unspezifischen Produkte indem man mit einer höheren Annealing Temperatur anfängt als normalerweise. Diese wird anschließend über eine bestimmte Anzahl an Zyklen um 0,5 – 1°C pro Zyklus verringert, bis man bei der „touchdown“ Temperatur ankommt, bei welcher alle restlichen Zyklen ausgeführt werden. Während diesen Zyklen können die Primer trotzdem wieder an weniger spezifische Sequenzen binden, allerdings entsteht eine weitaus geringere Menge an unspezifischen Produkte als bei der konventionellen PCR entstehen würde (Don et al. 1991).

2.3.4 PCR zum Nachweis von Trypanosomen

Zum Nachweis von Trypanosomatida wurden zwei verschiedene nested PCRs durchgeführt. Die benutzten Primer binden an das 18S-Gen der Trypanosomen.

Das Nest 1 war bei beiden ident und wurde mit den S762/763 Primern erstellt (Hamer et al. 2013).

Das erste Nest 2 wurde mit den TRnSSU Primern erstellt, die erwartete Produktgröße lag bei etwa 2.000 Basenpaaren (bp).

Nur bei den in dieser Reaktion oder in der Beurteilung der Blutaussstriche als positiv oder potenziell positiv auf Trypanosomatida beurteilten Proben wurde eine PCR des Nest 1 Produktes mit S755/S823 Nest 2 Primern durchgeführt (Hamer et al. 2013). Die erwartete Produktgröße lag bei 326 bp.

Außerdem wurde bei diesen potenziell positiven Proben auch eine Beimpfung durchgeführt, d.h. das Nest 2 (TRnSSU) wurde ein zweites Mal durchgeführt, diesmal wurden allerdings die Nest 2 (TRnSSU) Produkte anstatt der Nest 1 Produkte dem Mastermix hinzugefügt.

Nest 1

Im Nest 1 wurden folgende Primer benutzt:

Forward Primer: S762F: 5' - GACTTTTGCTTCCTCTA(A/T)TG - 3'

Reverse Primer: S763R: 5' - CATATGCTTGTTC AAGGAC - 3'

Erstes Nest 2

Im ersten Nest 2, mit dem alle Proben untersucht wurden, wurden folgende Primer benutzt:

Forward Primer: TRnSSU-F2: 5' - GARTCTGCGCATGGCTCATTACATCAGA- 3'

Reverse Primer: TRnSSU-R2: 5' - CRCAGTTTGATGAGCTGCGCCT - 3'

Zweites Nest 2

Im zweiten Nest 2, mit dem lediglich die zuvor als positiv oder als potenziell positiv beurteilten Proben untersucht wurden, wurden folgende Primer benutzt:

Forward Primer: S755: 5' - CATATGCTTGTTC AAGGAC - 3'

Reverse Primer: S823: 5' - CGAAYA AACTGCYCTATCAGC - 3'

Die Mastermixe für die PCRs wurden wie in Tab. 6 ersichtlich hergestellt. Dabei wurden im Nest 1 als DNA-Template die eluierten DNA-Isolate und als Positivkontrolle eine Probe, die DNA von *Theileria theileri cervi* enthält, benutzt. In den Nest 2 Reaktionen wurde als DNA-

Template ein Mikroliter des Produktes der Nest 1 PCR benutzt. Bei der durchgeführten Beimpfung mit den TRnSSU Primern wurde das vorherige Nest 2 Produkt als DNA-Template verwendet.

Die PCR des Nest 1 sowie die PCR des ersten Nest 2 wurden nach der Temperaturkurve in Tab. 7 durchgeführt, die PCR des zweiten Nest 2 wurde laut der Temperaturkurve in Tab. 8 durchgeführt.

Tab. 6: Pipettierschema der PCR zum Nachweis von Trypanosomen

Reagenz	Konzentration	Menge	
		Nest 1 und erstes Nest 2	Zweites Nest 2
H ₂ O		14,750 µl	14,750 µl
Green Reaction Buffer		5 µl	5 µl
dNTPs	25 mM	0,125 µl	0,2 µl
GoTaq Polymerase	5 u/µl	0,125 µl	0,2 µl
Forward Primer	10 pmol/µl	2 µl	2 µl
Reverse Primer	10 pmol/µl	2 µl	2 µl
DNA-Template		1 µl	1 µl
Gesamt		25 µl	25,15 µl

Tab. 7: Temperaturkurve des Nest 1 und erstem Nest 2 zum Nachweis von Trypanosomen

94 °C	5 min		Initiale Denaturierung
94 °C	1 min		Denaturierung
64 °C	1,5 min	30 x	Annealing
72 °C	1,5 min		Elongation
72 °C	5 min		Finale Elongation
15°C			Lagerung

Tab. 8: Temperaturkurve des zweiten Nest 2 zum Nachweis von Trypanosomen

96 °C	3 min		Initiale Denaturierung
94 °C	0,5 min		Denaturierung
58 °C	1 min	35 x	Annealing
72 °C	0,5 min		Elongation
72 °C	7 min		Finale Elongation
15°C			Lagerung

2.3.5 PCR zum Nachweis von Filarien

Zum Nachweis von Filarien wurden 2 verschiedene PCRs mit 2 verschiedenen Primerpaaren ausgeführt, eine konventionelle und eine Touchdown PCR (nach Hamer et al. 2013).

18S PCR

Bei dieser PCR wurden Primer benutzt, welche an das 18s rRNA Gen der Filarien binden und das Produkt eine erwartete Größe von 580 bp hat.

Die Primer waren folgende:

Forward Primer: ChandFO: 5' - GAGACCGTTCTCTTTGAGGCC - 3'

Reverse Primer: ChandRO: 5' - GTCAAGGCGTANNTTTACCGCCGA - 3'

Der Mastermix wurde nach Tab. 9 erstellt und es wurde je ein Mikroliter der DNA-Probe hinzugegeben. Die PCR wurde nach der Temperaturkurve aus Tab. 10 durchgeführt.

Tab. 9: Pipettierschema der PCR zum Nachweis von Filarien

Reagenz	Konzentration	Menge
H ₂ O		14,375 µl
Green Reaction Buffer		5 µl
dNTPs	25 mM	0,2 µl
GoTaq Polymerase	5 u/µl	0,2 µl
Forward Primer	10 pmol/µl	2 µl
Reverse Primer	10 pmol/µl	2 µl
DNA-Template		1 µl
Gesamt		24,775 µl

Tab. 10: Temperaturkurve zum Nachweis von Filarien mittels ChandFO/-RO Primern

94 °C	2 min		Initiale Denaturierung
94 °C	0,5 min		Denaturierung
57 °C	0,5 min	39 x	Annealing
72 °C	2 min		Elongation
72 °C	7 min		Finale Elongation
15°C			Lagerung

COI PCR

Die Primer, die in dieser PCR benutzt wurden, binden an das mitochondriale Gen für die Untereinheit I der Cytochrom-c-Oxidase (COI) von Filarien. Die erwartete Produktgröße betrug 688 bp. Diese PCR wurde als touchdown PCR durchgeführt.

Die Primer waren folgende:

Forward Primer: COLint-F: 5' - TGATTGGTGGTTTTGGTAA - 3'

Reverse Primer: COLint-R: 5' - ATAAGTACGAGTATCAATATC - 3'

Zu dem in Tab. 11 ersichtlichem Mastermix wurden je zwei Mikroliter der DNA-Probe hinzugegeben. In der Temperaturkurve in Tab. 12 wird ersichtlich, dass es sich hier um eine touchdown PCR handelt, da die Temperatur in der Annealing Phase in den ersten acht Zyklen schrittweise um 0,5 °C verringert wird.

Tab. 11: Pipettierschema der PCR zum Nachweis von Filarien

Reagenz	Konzentration	Menge
H ₂ O		15,67 µl
Green Reaction Buffer		5 µl
dNTPs	25 mM	0,2 µl
GoTaq Polymerase	5 u/µl	0,125 µl
Forward Primer	50 pmol/µl	1 µl
Reverse Primer	50 pmol/µl	1 µl
DNA-Template		2 µl
Gesamt		24,995 µl

Tab. 12: Temperaturkurve der touchdown PCR zum Nachweis von Filarien

94 °C	2 min		Initiale Denaturierung
94 °C	45 s		Denaturierung
51 °C jeden Zyklus um 0,5°C verringert	45 s	8 x	Annealing
72 °C	1,5 min		Elongation
94 °C	45 s		Denaturierung
45 °C	45 s	25 x	Annealing
72 °C	1,5 min		Elongation
72 °C	7 min		Finale Elongation
15°C			Lagerung

2.4 Gelelektrophorese

Um die Ergebnisse der PCR auswerten zu können, wurden Gelelektrophoresen durchgeführt. Dabei pipettiert man die PCR-Produkte in kleine Kammern in Agarosegelen, welche in ionischen Pufferlösung liegen, und schließt das Ganze an ein elektrisches Gleichstromfeld an. Das elektrische Feld induziert eine Wanderung der negativ geladenen DNA-Fragmente durch das Gel in Richtung der positiv geladenen Anode. Dadurch, dass kleinere Moleküle schneller weiterwandern als größere Moleküle trennen sich die DNA-Fragmente nach ihrer Größe auf. DNA-Fragmente der gleichen Größe, also mit gleich vielen Basenpaaren, sammeln sich und werden als Bande sichtbar. Durch Verwendung einer kommerziell erhältlichen DNA-Leiter, kann man die Größe der DNA-Stränge ungefähr bestimmen.

Um die Gele herzustellen wurden je 1,8 g Agarose mit 35 ml MQ Wasser und 100 ml TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE Puffer) vermischt und in der Mikrowelle 20 Minuten bis zum Kochen erhitzt. Danach wurde das Gemisch auf etwa 40°C abkühlen gelassen, je 4,2 µl Midori Green Advance (Nippon Genetics Europe, Binsfeld, Deutschland) hinzugefügt und gut geschwenkt. Das Midori Green ist ein nicht-karzinogener DNA-Farbstoff, welcher die entstehenden DNA-Banden bei Betrachtung unter UV-Licht fluoreszierend sichtbar macht und damit eine Alternative zu dem traditionell häufig verwendeten Ethidiumbromid. Das noch flüssige Gel wurde anschließend in geeignete Gelkammern gegossen, welche mit je drei Probenfächerkammern à 20 oder 25 Kammern vorbereitet wurden. Nach dem Aushärten wurden die Kämmen entfernt, die Gele in Folie luftdicht verpackt und bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt. Ein Leiternmix wurde mit je 9 µl Wasser, 3 µl Loading Dye und 3 µl DNA Leiter pro Tasche hergestellt. Für die TRnSSU Trypanosomen PCR wurde eine 1000 bp Leiter (Premix von Promega, Fitchburg, USA) verwendet, für die S755/S823 Trypanosomen PCR sowie für die Filarien PCRs eine kleinere 100 bp Leiter (Premix von Promega). Die Gele wurden in die passenden Elektrophorese-Kammern gelegt und diese mit TBE Puffer soweit gefüllt, dass die Gele davon bedeckt waren. Anschließend wurden von jedem PCR-Produkt 5 µl in eine Tasche pipettiert. Es wurde in eine Tasche pro Reihe 15 µl Leiternmix gefüllt und in je eine Tasche pro Gel 5 µl der Positiv Probe und 5 µl der Negativ Probe. Die größeren Gele wurden bei 100 V für 55 Minuten laufen gelassen und die kleineren bei 120 V für 45 Minuten. Die Gele wurden danach aus den Kammern herausgenommen und in einem UV-Lichtscanner (ChemiBIS genXpress®, DNR Bio-Imaging

Systems Ltd, Israel) beurteilt und mit der GelCapture Software Version 5.0 (DNR Bio-Imaging Systems Ltd) eingescannt.

2.5 Sequenzierung

Die in der Gelelektrophorese als positiv beurteilten Proben wurden zur Sequenzierung zu LGC Genomics (Berlin, Deutschland) geschickt. Die bestimmten Sequenzen wurden mit Einträgen in Gen-Datenbanken verglichen: Die Trypanosomen mit BLAST und die Filarien mit BLAST und BOLD.

2.6 Blutausstriche

2.6.1 Färbemethoden

Für diese Arbeit wurden insgesamt 125 Blutausstriche analysiert, davon kamen 82 von der Vogelklinik der Veterinärmedizinischen Universität. Hier erfolgte die Blutentnahme nach Möglichkeit an der *Vena ulnaris*. Es wurde je ein kleiner Blutstropfen auf einem Objektträger ausgestrichen und während 5–15 Sekunden schnell lufttrocknen gelassen. Die Ausstriche wurden immer am selben Tag für eine Minute in einer Methanollösung fixiert und anschließend an der Luft getrocknet. Danach wurden sie für eine Stunde in einer 10-prozentigen Arbeitslösung einer kommerziell erhältlichen Giemsa-Stammlösung bei einem pH von 7,0–7,2 und bei Raumtemperatur gefärbt. Abschließend wurden die Präparate mit Wasser abgespült und luftgetrocknet.

Die 43 weiteren Blutausstriche wurden am KLF in Grünau hergestellt und luftgetrocknet. Diese wurden erst an der Uni fixiert und mit dem Hemacolor® Schnellfärbeset für Hämatologie (Merck, Darmstadt, Deutschland) gefärbt. Dabei wurden die Ausstriche fünfmal für eine Sekunde in eine methanolhaltige Fixierlösung, fünfmal in eine Eosinlösung und zehnmal in eine Thiazinlösung getaucht, anschließend mit Leitungswasser vorsichtig abgespült und an der Luft trocknen gelassen. Das Ergebnis dieser Färbung entspricht der Pappenheim-Färbung.

2.6.2 Begutachtung

Alle Blutausstriche wurden in einem Mikroskop der Marke Nikon (Tokio, Japan) analysiert. Zuerst wurde das gesamte Präparat mit einer 40-fachen Vergrößerung durchmustert und auf Mikrofilarien untersucht. Anschließend wurden auf der Suche nach Trypanosomen bei 400-facher Vergrößerung jeweils mindestens 200 Gesichtsfelder in der Fahne durchmustert.

2.7 Statistische Methoden

Die statistischen Methoden bestehen in prozentuellen Berechnungen und Verwendung von Excel-Tabellen.

3 Ergebnisse

3.1 Vögel

Insgesamt wurden von 162 Vögeln aus der Familie der Corviden 160 DNA-Proben und 125 Blutausstriche auf das Vorhandensein von Trypanosomen und Mikrofilarien untersucht. Die Gattung der Raben und Krähen stellte dabei mit 149 Tieren (92,0 %) den größten Teil dar. Die restlichen Proben waren von zehn Eichelhähern (6,2 %), von zwei Elstern (1,2 %) und von einer Alpenkrähe (0,6 %). Die Alpendohle und der Tannenhäher sind die einzigen beiden Arten aller in Österreich heimischen Corviden von welchen keine Probe zur Verfügung stand (Tab. 13).

Tab. 13: Untersuchte Vogelarten mit absoluter Anzahl.

Gattung	Art	Gesamtanzahl
<i>Corvus</i>	<i>Corvus</i> sp.	13
	<i>C. corone</i> (Aaskrähe)	28
	<i>C. corone cornix</i> (Nebelkrähe)	41
	<i>C. corone corone</i> (Rabenkrähe)	12
	<i>C. corax</i> (Kolkrabe)	49
	<i>C. monedula</i> (Dohle)	3
	<i>C. frugilegus</i> (Saatkrähe)	3
<i>Garrulus</i>	<i>G. glandarius</i> (Eichelhäher)	10
<i>Pica</i>	<i>Pica pica</i> (Elster)	2
<i>Pyrrhocorax</i>	<i>P. pyrrhocorax</i> (Alpenkrähe)	1
Total		162

Die Hälfte aller Proben stammte von Aaskrähen (50,0 %). Davon waren 41 Nebelkrähen (25,3 %), 12 Rabenkrähen (7,4 %) und 28 nicht weiter nach Subspezies bestimmte

Aaskrähen (17,3 %). 49 Proben stammten von Kolkkraben (30,2 %), 3 von Dohlen und 3 von Saatkrähen (je 1,9 %). Weiters wurden 13 Tiere nur als *Corvus sp.* bestimmt (8,0 %) (Abb. 7).

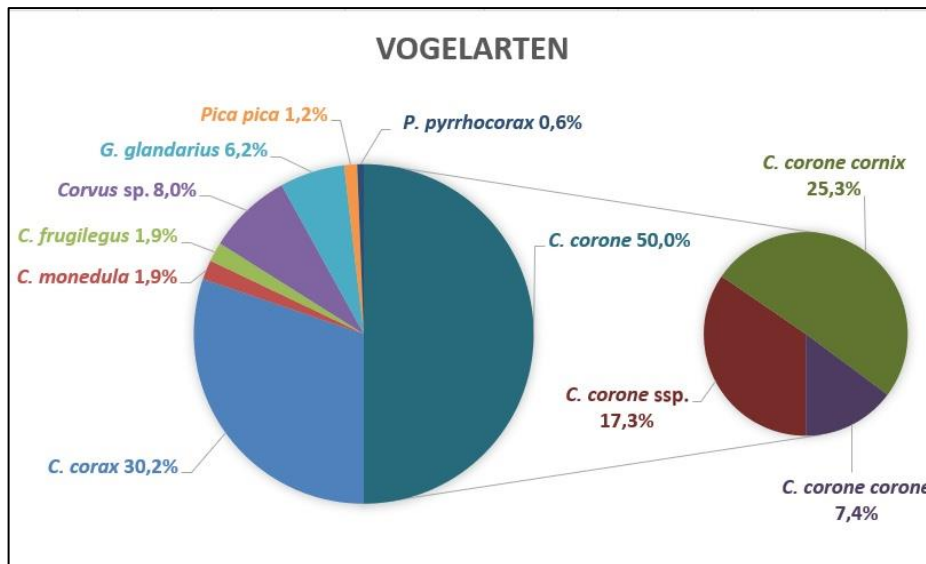


Abb. 7: Relative Anteile der untersuchten Vogelarten.

Die Proben, die für diese Arbeit zur Verfügung gestellt wurden, wurden in einem weiten und ungleichmäßig verteiltem Zeitraum gesammelt. Mit 72 Proben stammen die meisten aus dem Jahr 2017, mit 40 Proben am zweitmeisten aus dem Jahr 2014 und mit 22 am drittmeisten aus dem Jahr 2018. In den Jahren dazwischen waren es nie mehr als 10 Proben (Tab. 14).

Tab. 14: Zeitraum der Probennahmen.

Probenherkunft/ Jahr	2003	2004	2010	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
KLF					40	3				
FIWI			4	1		1	2	5	2	1
Institut Virologie	2	1								
Vetmed Vogelklinik							8		63	21
Sarajewo Vetmed								1	7	
Total	2	1	4	1	40	4	10	6	72	22

3.2 Parasiten

Von den insgesamt 162 untersuchten Vögeln konnte einer positiv auf Trypanosomen und einer positiv auf Mikrofilarien getestet werden, dies entspricht einer Prävalenz von jeweils 0,6 % (Tab. 15).

Tab. 15: Positiv getestete Vögel mit Angabe der Vogel- und Parasitenart.

Sample ID	Vogelart	Blutausstrich	PCR + Gelelektrophorese	Sequenzierung
14	<i>Corvus corone corone</i> (Rabenkrähe)	<i>Trypanosoma</i> sp.	TRnSSu Beimpfung und S755/S823 positiv	<i>T. avium</i>
52	<i>Corvus corone</i> (Aaskrähe)	kein Ausstrich zur Verfügung	COI positiv	unknown filaroid helminth

Eine vom Blutstropfen auf Filterpapier gewonnene DNA-Probe (Sample ID 14) zeigte nach der nested PCR mit den TRnSSu Primern in der Gelelektrophorese eine für den Nachweis von Trypanosomatida charakteristische, aber schwache, Bande auf der Höhe von 2000 bp sowie nach der nested PCR mit den S755/823 Primern eine Bande auf der Höhe von 326 bp. Diese Probe wurde zur Sequenzierung eingeschickt und als *T. avium* bestimmt. In dem Blutausstrich desselben Tieres konnte eine trypomastigote Form eines Trypanosomen gefunden und fotografiert werden (Abb. 8). Bei dem positiven Tier handelte es sich um eine Rabenkrähe, welche 2017 in der Vogelklinik der Veterinärmedizinischen Universität Wien beprobt wurde.

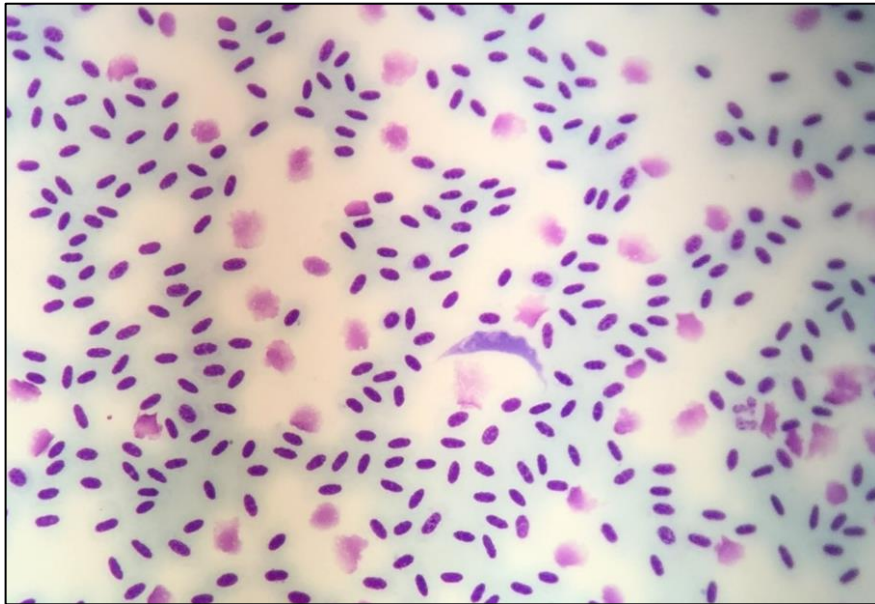


Abb. 8: Trypomastigote aus dem Blutausstrich mit der Sample ID 14. 400-fache Vergrößerung. Giemsa-Färbung.

Bei einer aus Lebergewebe isolierten DNA-Probe (Sample ID 52) konnte in der Gelelektrophorese nach der touchdown COI PCR eine Bande auf der Höhe von 688 bp festgestellt werden. Die DNA-Sequenz wurde als Onchocercidae bestimmt. Dieselbe DNA-Probe war in der konventionellen 18S PCR negativ. Zu dieser Probe einer Aaskröhe vom FIWI aus dem Jahr 2010 gab es keinen Blutausstrich.

Berücksichtigt man die verschiedenen Jahre, aus welchen die Proben stammen, kann man im Jahr 2017 eine Trypanosomen-Prävalenz von 1,4 % sowie im Jahr 2010 eine Filarien-Prävalenz von 25 % berechnen.

Berücksichtigt man nur die Proben der Aaskrähen erhält man in dieser Gruppe eine jeweilige Prävalenz von 1,2 % und in allen anderen Arten eine Prävalenz von 0 %.

Die phylogenetische Einordnung der isolierten Sequenzen ist in den Abbildungen 9 und 10 dargestellt.

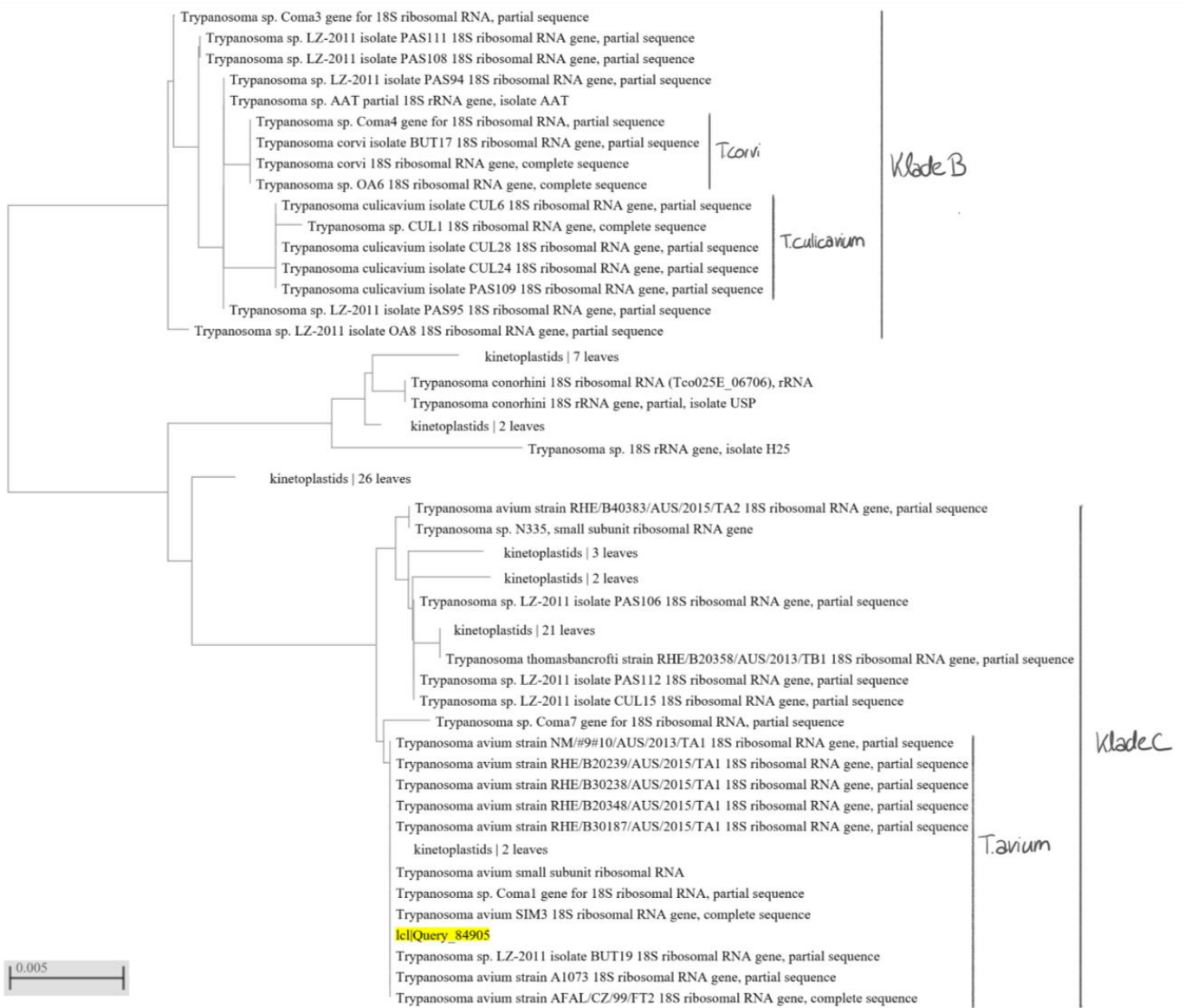


Abb. 9: Phylogenetischer Baum mit der aus der Sample ID 14 (gelb markierten) isolierten DNA-Sequenz (erstellt am 27.06.2019)

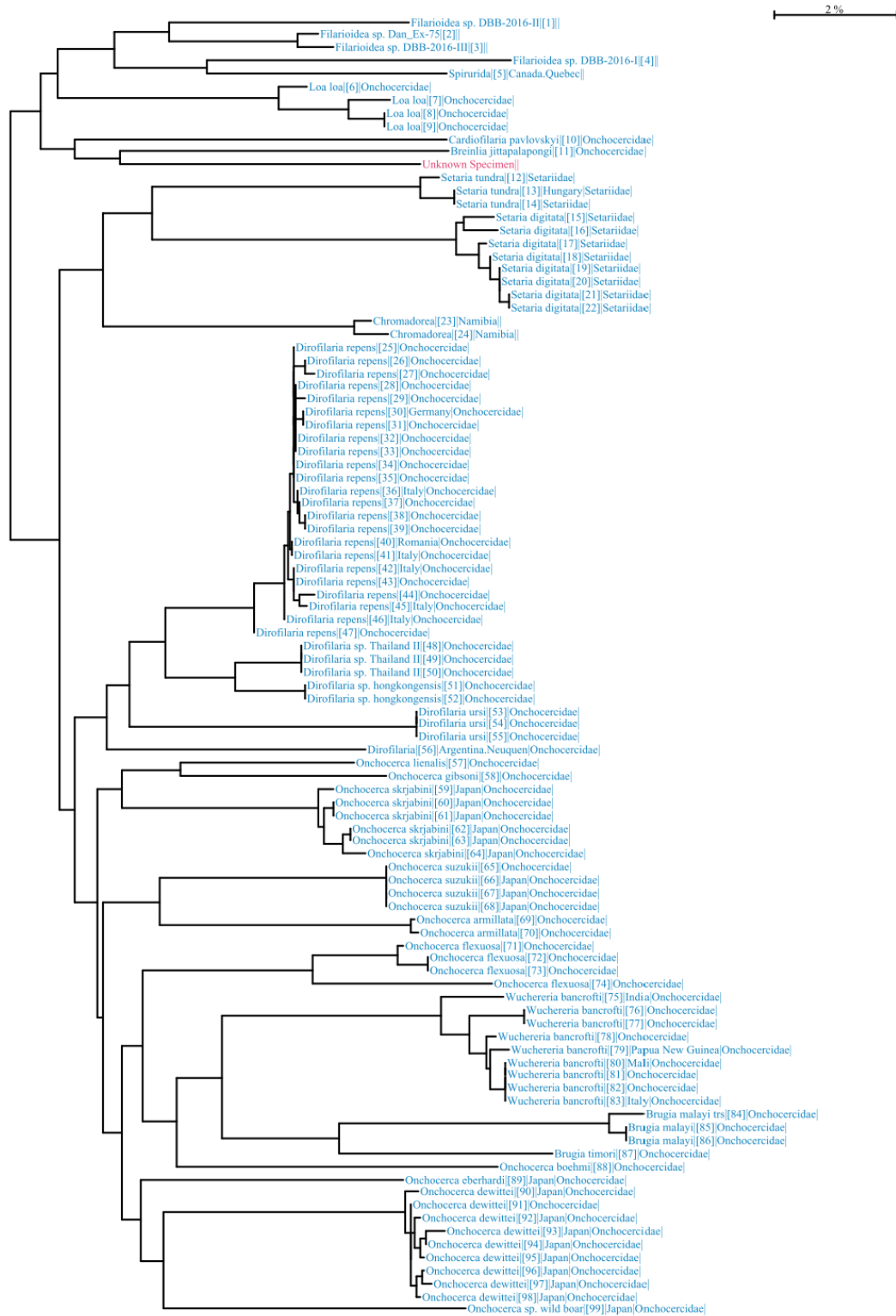


Abb. 10: Phylogenetischer Baum mit der aus der Sample ID 52 (rot markiert) isolierten DNA-Sequenz (erstellt am 27.06.2019)

4 Diskussion

In vorangegangenen Studien wurden aus Stechmücken (*Culex* spp.) in Österreich *T. avium* und *T. culicavium*, sowie unbestimmte aviäre Filarien isoliert (Schoener et al. 2018, 2019, Übleis et al. 2018). Dies liefert Grund zur Annahme, dass diese Parasiten in der österreichischen Vogelpopulation zu finden sind. Das Ziel dieser Diplomarbeit war es, Trypanosomen- und Filarieninfektionen mittels molekularbiologischer Analysen und der Begutachtung von Blutaussstrichen bei Rabenvögeln in Österreich nachzuweisen, sowie die gefundenen Parasiten auf Artniveau zu bestimmen.

Von den 162 untersuchten Rabenvögeln konnte bei einer Rabenkrähe (*Corvus corone corone*) eine Trypanosomeninfektion nachgewiesen werden. Durch den Vergleich mit Sequenzen in Datenbanken konnte die gewonnene Sequenz mit 100%iger Sequenzidentität als *T. avium sensu stricto* bestimmt werden. Dies ist veranschaulicht in dem mittels BLAST erstellten phylogenetischen Baum (Abb. 9). Das obere Drittel des Baumes stellt die Klade B als *T. corvi* und *T. culicavium* Gruppe im Sinne Zídková et al. 2012 dar, die untere Hälfte stellt die Klade C als *T. avium* Gruppe dar, mit *T. avium* s.s. im unteren Viertel. In dem Blutaussstrich dieser in der PCR positiv getesteten Rabenkrähe wurde nach eingehender Begutachtung eine einzige Trypomastigote gefunden. Dies spricht für eine sehr geringe Parasitämie zum Zeitpunkt der Blutabnahme.

Die aus dem Blut einer Aaskrähe (*Corvus corone*) isolierte Mikrofilarien-DNA konnte nach der Sequenzierung und dem Vergleich mit anderen Sequenzen aus Datenbanken nicht eindeutig zu einer zuvor definierten Art zugeordnet werden. Eine BLAST Suche lieferte die höchste Sequenzidentität (90,76% - 91,5%) mit unbestimmten, wahrscheinlich aviären, Filarien aus Stechmücken (*Culex pipiens*) aus Spanien (von Bravo-Barriga et al. 2016). Der mittels BOLD erstellte phylogenetische Baum (Abb. 10) deutet allerdings nicht auf eine enge Beziehung mit diesen hin (Abb. 10: Nummer 1 – 4), sondern auf eine gemeinsame Abstammung mit *Breinlia jittapalaponji* (Sequenzidentität 90,59%), einem Parasiten der asiatischen Hausratte in Laos (Veciana et al. 2015), sowie mit *Cardiofilaria pavlovskyi* (Sequenzidentität 89,33%), einer aviären Filarie, deren Vorkommen in verschiedenen Vogelarten bereits in Spanien, Frankreich, Deutschland, Polen und Lettland nachgewiesen wurde (Czajka et al. 2012). Die Nummer 5 im Baum stellt ebenfalls eine nicht auf Artniveau

identifizierte aviäre Filarie dar, isoliert aus einem Sägekauz aus Kanada (Bravo-Barriga et al. 2016).

In einer umfassenden Studie über die evolutionären Beziehungen der Familie der Onchocerciden wurden sieben verschiedene Genloki von 48 Arten sequenziert und analysiert (Lefoulon et al. 2015). Sie beschreibt unter anderem eine monophyletische Klade (ONC 5) die folgende Arten der Unterfamilien Onchocercinae, Splendidofilariinae und Dirofilariinae enthält: *Breinlia jittapalapongi*, *Cardiofilaria pavlovskyi*, zwei weitere aviäre Filarien *Aproctella alessandroi* und *Pelecitus fulicaeatrae*, Parasiten von Menschen und anderen Säugetieren wie *Wuchereria bancrofti*, *Loa loa*, *Mansonella* spp. und *Brugia* spp., sowie Parasiten von Reptilien (Lefoulon et al. 2015). Nach dem erstellten phylogenetischen Baum ist die in dieser Arbeit erhaltene Sequenz ebenfalls dieser Klade zuzuordnen (Abb. 10: Nummern 1-11 inkl. Probe). Die Autoren stellen unter anderem aufgrund dieser aus drei Unterfamilien gemischten Klade die Validität der aktuell angenommenen acht Unterfamilien der Onchocerciden in Frage (Lefoulon et al. 2015). Weiterhin ist die auch in dieser Arbeit genutzte Analyse des COI Gens zwar für die Differenzierung von Arten geeignet, aber reicht allein nicht um phylogenetische Hypothesen auf höheren taxonomischen Ebenen abzuleiten (Lefoulon et al. 2015). Nachdem allerdings erst für wenige der über 90 Gattungen von Onchocerciden und sehr wenige der 160 aviären Arten DNA-Sequenzen in online Datenbanken veröffentlicht wurden (Czajka et al. 2012), ist die Artbestimmung anhand rein molekularer Methoden nur eingeschränkt möglich. Damit diese Methodik effektiv genutzt werden kann, müssen zuerst zukünftige Studien die klassischen morphologischen sowie molekularbiologischen Analysen kombinieren. Es ist zu bedauern, dass in dieser Arbeit kein zur positiven DNA-Probe der Sample ID 52 zugehöriger Blutausstrich zur Verfügung stand, dieser hätte anhand einer morphologischen Evaluierung eventueller Mikrofilarien mögliche weitere Hinweise zur Artbestimmung liefern können. Um eine gesicherte Artdiagnose anhand morphologischer Eigenschaften zu erhalten, müssen allerdings die adulten Filarien untersucht werden, die Begutachtung von Mikrofilarien kann nur Hinweise auf die Gattung geben (Bartlett 2008). Die Isolation von Adulten ist jedoch nur bei *post mortem* Untersuchungen möglich, und aufgrund der zahlreichen möglichen Lokalisationen innerhalb des Wirtskörpers gestaltet sich die Suche nach diesen oft schwierig (Bartlett 2008).

Die zu Anfang der Arbeit aufgestellten Hypothesen konnten teilweise bestätigt werden. Es wurde bewiesen, dass *T. avium* sowie eine unbekannte Art von filarioiden Helminthen in Österreich in Rabenvögeln parasitieren. Eine Infektion mit *T. culicavium* oder *T. corvi* konnte

allerdings nicht nachgewiesen werden. Die Prävalenz beider Parasiten betrug 0,6% bei 162 getesteten Corviden, allerdings schmälert der große und ungleichmäßig verteilte Zeitraum in welchem die Proben gesammelt wurden die Aussagekraft der errechneten Prävalenz. Die einzige *T. avium* Infektion wurde bei einer Probe aus dem Jahr 2017 nachgewiesen, die Filarieninfektion bei einer Probe aus dem Jahr 2010.

Die Prävalenz von Trypanosomen in den verschiedenen Vektoren in vorherigen Studien in Ostösterreich sowie in dem Nachbarland Tschechien waren vergleichsweise höher: in Österreich wurden aus Stechmücken (*Culex* spp.) *T. avium* mit einer Prävalenz von 0,2% und *T. culicavium* mit einer Prävalenz von 4,1% isoliert (Schoener et al. 2018). In Tschechien variierte die durchschnittliche Prävalenz von aviären Trypanosomen aus ornithophilen Stechmücken (*Culex* spp.), Kriebelmücken (*Simulium* spp.) und Lausfliegen (*Ornithomyia avicularia*) von 4% bis 8%, erreichte aber 60% in *Simulium vernum* (Svobodová et al. 2015); und in Gnitzen (*Culicoides* spp.) wurde *T. bennetti* s.l. mit einer Prävalenz von 0,3% nachgewiesen (Svobodová et al. 2017). Die Prävalenz von Trypanosomen in Mäusebussarden und Sperbern in Tschechien variierte in verschiedenen Jahren und Wirten von 1,9% bis zu 87,2% (Svobodová et al. 2014), und bei Halsbandschnäppern, insektivoren Singvögeln, wurde eine Prävalenz von 37,5% (n=56) festgestellt (Votýpka et al. 2012). Nachdem Insekten keine weiten Distanzen zurücklegen und fast alle der elf Trypanosomen Linien (im Sinne Zídková et al. 2012) entweder in Dipteren, in Standvogelarten oder in Nestlingen von Zugvögeln in Tschechien nachgewiesen wurden, geht man dort von einer endemischen Verbreitung und lokaler Übertragung fast aller Trypanosomenarten aus (Zídková et al. 2012, Svobodová et al. 2017). Durch die klimatisch ähnlichen Bedingungen in Österreich und der Nähe zu Tschechien hätte man ähnlich hohe Prävalenzen in Österreich erwarten können.

Eine mögliche Erklärung für die überraschend niedrige Prävalenz dieser Studie könnte sein, dass Rabenvögel im Vergleich zu anderen Vogelarten aufgrund ihrer Lebensweise allgemein seltener infiziert sein könnten. Die meisten Trypanosomenarten werden über Ingestion von infizierten Insekten auf die Vögel übertragen. Corviden fressen zwar auch Insekten, aber diese machen nur einen kleinen Teil der Ernährung aus. Eventuell könnte man bei anderen Vogelarten, etwa kleineren Singvögeln, die sich hauptsächlich von Insekten ernähren, auch in Österreich eine höhere Prävalenz feststellen als bei Rabenvögeln. Durch die omnivore Ernährungsweise der Corviden kann sich die mit *T. avium* infizierte Rabenkrähe der vorliegenden Studie sowohl durch die Ingestion einer infizierten Mücke als auch durch das Auffressen eines infizierten Singvogels angesteckt haben.

Allerdings sind zumindest aus Nordamerika bei Rabenvögeln ebenfalls hohe Prävalenzen berichtet: In Florida wurden bei der Begutachtung von Blutausstrichen 11,9% Amerikanerkrähen (n=42) und 22% Fischkrähen (n=46) als positiv befunden (Dusek und Forrester 2002) und mittels Zentrifugation von Mikrohämatokritröhrchen wurden in Ontario 53% von 121 überwinternden Amerikanerkrähen als positiv beurteilt (Woo und Bartlett 1982). Außerdem wurde ebenfalls bei Rabenvögeln aus dem subsaharischen Afrika eine höhere Infektionsrate von 19% (n=21) festgestellt (Sehgal et al. 2001).

Eine andere Erklärung für die niedrige Prävalenz könnte die Nachweismethode mittels Blutproben darstellen: Während bei einer Studie in Colorado von 677 Vögeln aus 139 Arten lediglich bei 4,3% eine Parasitämie nachweisbar war, wurden bei der Knochenmarkuntersuchung bei 49,3%, also bei etwa zehnmal so vielen, Trypanosomen gefunden (Stabler et al. 1966). Nur bei vier Vögeln wurde eine Parasitämie bei gleichzeitiger negativer Knochenmarksprobe festgestellt (Stabler et al. 1966). Von 195 Vögeln aus der Familie der Corviden wurden bei 63% Trypanosomen nachgewiesen (Stabler et al. 1966). Liegt eine Parasitämie vor, gilt das PCR-Screening von Blutproben als eine sehr sensitive und spezifische Methode, die Sensitivität ist dabei höher als bei der Begutachtung von Blutausstrichen (Sehgal et al. 2001). Bei der Begutachtung von 193 Giemsa-gefärbten Blutausstrichen von Vögeln aus dem afrikanischen Regenwald für 20-50 Minuten wurden 22% als positiv beurteilt, bei der PCR hingegen fielen 31% positiv aus (Sehgal et al. 2001). In dieser Arbeit wurde die PCR zum Nachweis von Trypanosomen mit den gleichen Primern wie bei Sehgal et al. 2001, aber mit etwas abweichendem Temperaturprofil durchgeführt und die Blutausstriche wurden für etwa 15 Minuten begutachtet. Die untere Detektionsschwelle der PCR wurde auf 14-25 Trypanosomen pro Probe geschätzt (Sehgal et al. 2001). Wurde die Parasitämie als sehr gering eingeschätzt, wurde diese bei acht Wiederholungen derselben Probe nur in knapp 50% von der PCR detektiert (Sehgal et al. 2001). Diese Erkenntnisse könnten bedeuten, dass die tatsächliche Infektionsrate bei den untersuchten österreichischen Tieren weit höher liegen könnte. Möglicherweise haben einige der beprobten Vögel eine lebenslanglich im Knochenmark und in den Organen persistierende Infektion ohne oder mit nur sehr geringer Parasitämie. In dem Fall der sehr geringen Parasitämie könnten mehrfache Wiederholungen der PCR oder sogar der DNA-Extraktion womöglich weitere Tiere als positiv detektieren. Ebenfalls könnte man eventuell noch weitere Infektionen finden, würde man die Blutausstriche längere Zeit begutachten, die Methode der Mikrohämatokritröhrchen anwenden oder Blutkulturen anlegen. Um die tatsächliche Infektionsrate, einschließlich latente Infektionen, am besten einschätzen zu können, wäre die

Untersuchung von Knochenmarksbiospien ratsam, allerdings ist diese Methode mit einem erheblichen Mehraufwand verbunden und bei lebenden Vögeln nicht durchführbar.

Weiterhin ist das Vorliegen einer Parasitämie wahrscheinlich ein saisonales Phänomen: In Kuwait wurden in einer einjährigen Studie lediglich in den Monaten August bis Januar Parasitämien nachgewiesen (Tarello 2005), und auch Baker fand eine erhöhte Prävalenz bei denjenigen Vögeln, deren Blut im Sommer kultiviert wurde (Baker 1956a). Die zuvor beschriebenen, teils sehr hohen Prävalenzen bei verschiedenen Vogelarten in Tschechien wurden ebenfalls in den Frühlings- und Sommermonaten untersucht (Votýpka et al. 2012, Svobodová et al. 2014). In österreichischen Stechmücken wurden ebenfalls ein saisonales Vorkommen von Trypanosomen bewiesen: *T. avium* wurde am meisten im späten Frühling und im Frühsommer detektiert und *T. culicaviium* vor allem im Spätsommer, mit einem Peak im August (Schoener et al. 2018). Die Proben, die für die vorliegende Arbeit genutzt wurden, wurden allerdings über mehrere Jahre zu verschiedenen Jahreszeiten gesammelt. Die Prävalenz könnte also höher sein, würde man ausschließlich im Sommer Blutproben entnehmen.

Die Prävalenz ist sehr vom Lebensraum der Vögel und der Anzahl an in der Umgebung vorhandenen infizierten Vektoren abhängig. Bei Menschen und anderen Säugetieren wurde gezeigt, dass die Prävalenz der Trypanosomen direkt proportional zur Dichte der Vektorpopulation ist und sich mit der saisonalen Regenmenge und der Temperatur verändert (Sehgal et al. 2001). Stechmücken, die in Wäldern gefangen wurden, waren öfter infiziert als solche, die in Schilfgebieten gefangen wurden (Svobodová et al. 2015). Die meisten positiven Vögel in Colorado stammten ebenso aus Wäldern oder aus zumindest bebuschten Gebieten (Stabler et al. 1966). Bei Mäusebussarden und Sperbern die in unterschiedlichen Jahren in den gleichen Gebieten beprobt wurden, wurden in den unterschiedlichen Jahren teils sehr unterschiedliche Prävalenzen festgestellt (Svobodová et al. 2014). Vergleicht man Prävalenzen aus unterschiedlichen Jahren, muss man dementsprechend diese zufällige Varianz der Jahre beachten (Svobodová et al. 2014). Ebenso variierten die Prävalenzen innerhalb der gleichen Wirtsspezies erheblich zwischen den verschiedenen Standorten der beprobten Vögel, dies nicht nur bei weit entfernten Standorten, sondern auch bei verschiedenen Nestern in derselben Gegend (Svobodová et al. 2014). Dementsprechend hat die genaue Nestposition und die Höhe des Nestes einen großen Einfluss auf die Infektionsrate bei Nestlingen, da diese die Exposition zu verschiedenen Vektoren beeinflusst. (Zídková et al. 2012, Svobodová et al. 2014). Die Wahrscheinlichkeit einer Infektion wird also

stark von lebensgeschichtlichen Faktoren des einzelnen Vogels bestimmt und die Prävalenzen variieren auch innerhalb derselben Gebiete.

Durch die hohe Sensitivität der benutzten PCR-Methode kann man dennoch davon ausgehen, dass die Anzahl an Corviden in Österreich mit tatsächlich vorliegender Parasitämie nicht sehr hoch ist. Da die Pathogenität der Trypanosomen von der Stärke der Parasitämie abhängig ist, bedeutet dies auch, dass die Anzahl an klinisch erkrankten Rabenvögeln in Österreich niedrig ist.

Eine Mikrofilariämie wurde bei den untersuchten Rabenvögeln ebenfalls mit einer niedrigen Prävalenz von 0,6 % detektiert. In Tschechien wurden im Blut von 1100 untersuchten Sperlingsvögeln vergleichbare Prävalenzen von 0,4 - 2,5 % festgestellt (Haas et al. 2011). In Florida wurden bei 4 % der Fischkrähen (n = 46) und 19 % der Amerikanerkrähen (n = 42) unbestimmte Mikrofilarien auf Blutaussstrichen gefunden (Dusek und Forrester 2002). In Ontario, Kanada, wurden bei Amerikanerkrähen weit höhere Prävalenzen festgestellt, diese wurden allerdings getötet und auf adulte Filarien im ganzen Körper sowie auf Mikrofilarien im Lungenblut untersucht (Bartlett und Anderson 1980). Dabei wurde etwa *Chandlerella chitwoodae* mit einer Prävalenz von 65,0 % (n=269), *Splendidofilaria caperata* mit einer Prävalenz von 21 % (n=341) und *Eufilaria longicaudata* in 15,5 % (n=110) nachgewiesen. *Chandlerella quisquali* (1,9%), *Cardiofilaria pavlovskyi* (0,4 %) und *Splendidofilaria wehri* (0,3 %) wurden in weit niedrigerer Prävalenz festgestellt. In Hudsonelstern in Colorado wurden außerdem *S. caperata* in 41 % (n = 124) und *E. longicaudata* in 59 % (n = 142) nachgewiesen (Bartlett und Anderson 1980). Filarieninfektionen scheinen bei Rabenvögeln also sehr häufig zu sein. Nachdem im Nachbarland Tschechien allerdings ähnlich niedrige Prävalenzen wie in der vorliegenden Arbeit festgestellt wurden, ist es möglich, dass die Prävalenz an Filarien bei Rabenvögeln in Österreich tatsächlich niedriger ist als in Nordamerika. Andererseits könnte ein Grund für die vergleichsweise niedrige festgestellte Prävalenz die Tageszeit der Blutentnahmen darstellen: Bei vielen Filarienarten ist bereits seit langer Zeit bekannt, dass das Vorkommen von Mikrofilarien im peripheren Blut einem circadianen Rhythmus unterliegt, welcher von der aktiven Tageszeit der Vektoren abhängig ist (Hawking 1975). Bei den meisten Filarienarten gelangen die Mikrofilarien nachts in das periphere Blut und akkumulieren tagsüber in den tiefen Gefäßen in der Lunge (Hawking 1975, Hamer et al. 2013). Diese Periodik konnte auch bei aviären Filarien, welche in Wanderdrosseln parasitieren, bewiesen werden: Während in den tagsüber genommenen Blutproben lediglich 1,4 % (n = 70) eine Mikrofilariämie aufwiesen, wurden in den nächtlichen

Proben bei 11,1 % (n = 63) eine solche festgestellt (Hamer et al. 2013). Dieser Effekt konnte in derselben Studie bei Spatzen allerdings nicht festgestellt werden, dies lag möglicherweise an der geringeren Stichprobengröße dieser Gruppe (Hamer et al. 2013). Nachdem die Proben in der vorliegenden Arbeit wahrscheinlich alle tagsüber entnommen wurden, wäre eine Vergleichsstudie mit Probennahmen in der Nacht interessant und würde möglicherweise eine höhere Prävalenz enthüllen.

Außerdem variiert die Prävalenz von Mikrofilarien, ähnlich wie zuvor bei den Trypanosomen beschrieben, ohne klar erkennbaren Grund in derselben Region von Jahr zu Jahr (Hamer et al. 2013). Es ist anzunehmen, dass die Vektorverteilung und die Brutgewohnheiten der Vögel dabei eine wichtige Rolle spielen (Hamer et al. 2013).

Aller Wahrscheinlichkeit nach sind aviäre Filarien auch in Europa weit verbreitet. Ähnlich wie auch in Österreich wurde in Deutschland bei der Untersuchung von Stechmücken DNA von unbestimmbaren aviären Filarien gefunden (Czajka et al. 2012). Um die Arten dieser endemischen aviären Filarien bestimmen zu können, sind *post mortem* Untersuchungen von Vögeln zur Extraktion von adulten Filarien mit anschließender morphologischer Bestimmung und DNA-Sequenzierung nötig. Außerdem wäre neben der Untersuchung von Blutaussstrichen auch die Untersuchung von Hautbiopsien interessant, da bei einigen Filarienarten die Mikrofilarien eher in die Haut als in das Blut wandern (Bartlett 2008).

Schlussfolgernd kann man sagen, dass sowohl Filarien als auch Trypanosomen in Österreich in Rabenvögeln parasitieren. Nicht nur in Österreich, sondern in ganz Europa sind weitere Studien über diese Parasiten nötig. Da weder aviäre Trypanosomen noch Filarien eine hohe Wirtsspezifität besitzen, wären Untersuchungen zur Prävalenz bei Vogelmgemeinschaften, die denselben Lebensraum teilen, an Stelle der Untersuchung einzelner Vogelarten oder -familien über einen großen geografischen Bereich, sinnvoll. Untersuchungen im Frühling und Sommer sowie Blutentnahmen in der Nacht könnten höhere Prävalenzen aufzeigen.

5.1 Zusammenfassung

Trypanosomen- sowie Filarieninfektionen verursachen bei Menschen und anderen Säugetieren schwerwiegende Krankheiten, werden bei Vögeln aber als apathogene Parasiten angesehen. In Österreich wurden zuvor in Stechmückenscreenings DNA von aviären Trypanosomen und von aviären Filarien nachgewiesen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Trypanosomen- und Filarieninfektionen mittels molekularbiologischer Analysen und der Begutachtung von Blutaussstrichen bei Rabenvögeln in Österreich nachzuweisen, sowie die gefundenen Parasiten auf Artniveau zu bestimmen.

Dafür wurden von insgesamt 162 Rabenvögeln 160 DNA-Proben und 125 Blutaussstriche, die in einem Zeitraum von 15 Jahren gesammelt wurden, analysiert. Zum Nachweis von Trypanosomen-DNA wurden nested PCRs mit TRnSSU-Primern und S755/S823-Primern durchgeführt und zum Nachweis von Filarien-DNA wurden ChandFO Primer in der klassischen PCR sowie COI-Primer zur touchdown PCR benutzt. Die in der anschließenden Gelelektrophorese als positiv beurteilten Proben wurden sequenziert. Von den Ergebnissen wurden phylogenetische Bäume erstellt. Die Blutaussstriche wurden in Giemsa oder in der Pappenheimfärbung angefärbt und begutachtet.

Bei einem Vogel wurde eine Trypanosomeninfektion in der PCR sowie im Blutaussstrich festgestellt. Bei einem weiteren Vogel, bei welchem kein Blutaussstrich zur Verfügung stand, wurde mittels PCR eine Filarieninfektion bestätigt. Dies stellt jeweils eine im Vergleich mit anderen Ländern niedrige Prävalenz von 0,6% dar. Bei der Trypanosomeninfektion handelte es sich um eine Infektion mit *T. avium*, die Filarien-DNA konnte allerdings keiner Art zugeordnet werden.

Diese Ergebnisse bestätigen das Vorhandensein von Trypanosomen- und Filarieninfektionen bei Rabenvögeln in Österreich. Die geringe Prävalenz der Trypanosomen basiert möglicherweise auf der Nachweisteknik aus dem peripheren Blut, da Vögel oft nur eine sehr geringe Parasitämie bei gleichzeitiger lebenslanger Persistenz in inneren Organen zeigen. Zukünftige Studien bei anderen österreichischen Vogelarten, die sich hauptsächlich von Insekten ernähren, könnten aufgrund der Übertragung über die Ingestion der Vektoren eine erheblich höhere Prävalenz aufzeigen. Durch die circadiane Rhythmik von Mikrofilarien im Blut könnten nächtliche Probenahmen eine höhere Prävalenz enthüllen. Zur Artbestimmung der Filarien sind Extraktionen von Adulten bei *post mortem* Untersuchungen nötig.

5.2 Abstract

Trypanosome and filarioid helminth infections cause serious diseases in humans and other mammals but are considered as apathogenic in birds. In Austria DNA of avian trypanosomes and filarioid helminths has previously been detected in mosquito screenings. The aim of the present work was to detect trypanosome and filarioid infections in corvids in Austria and to determine the parasites to species level, using molecular techniques and blood smear analyses.

160 DNA samples and 125 blood smears of a total of 162 corvids, collected over a period of 15 years, have been analysed. To detect trypanosome DNA, nested PCRs were carried out using TRnSSU and S755/823 primers and to detect filarioid DNA, ChandFO and COI Primers were used. The samples assessed as positive in the subsequent gel electrophoresis were sequenced. Phylogenetic trees were created from the results. The blood smears were stained in Giemsa or in Pappenheim stain and analysed.

In one bird a trypanosome infection was detected in the PCR and in the blood smear. In another bird, for which no blood smear was available, a filarioid infection was confirmed by PCR. These results represent a low prevalence of 0.6% of each parasite, which is a low prevalence in comparison with studies in other countries. The trypanosome infection was an infection with *T. avium*, whereas the filarioid infection could not be assigned to any species.

These results confirm the presence of trypanosome and filarioid infections in corvids in Austria. The low prevalence of the trypanosome infections may be based on the detection technique from the peripheral blood, since birds usually show only low levels of parasitaemia with lifelong persistence of trypanosomes in inner organs. Future studies in different bird species in Austria that mainly feed on insects may reveal a higher prevalence due to the transmission via ingestion of the vectors. Due to the circadian rhythm of microfilariae in the blood, blood samples collected at night could reveal a higher prevalence. To determine the species of avian filarioids present in Europe, extractions of adult filarioids in *postmortem* examinations of birds are necessary.

6 Literaturverzeichnis

Anderson RC, Bartlett CM. 1994. Ephemerality and reproductive senescence in avian filarioids. *Parasitology Today*, 10: 33–35.

Anderson RC. 2000. Nematode parasites of vertebrates. Their development and transmission. Second ed. Wallingford Oxon UK, New York NY: CABI Pub, 650.

Apanius V. 1991. Avian trypanosomes as models of hemoflagellate evolution. *Parasitology Today*, 7 (4): 87–90.

Baker JR. 1956a. Studies on *Trypanosoma avium* Danilewsky 1885. I. Incidence in some birds of Hertfordshire. *Parasitology*, 46: 308–320. DOI 10.1017/s0031182000026524.

Baker JR. 1956b. Studies on *Trypanosoma avium* Danilewsky 1885. II. Transmission by *Ornithomyia avicularia* L. *Parasitology*, 46: 321–334. DOI 10.1017/s0031182000026536.

Baker JR. 1956c. Studies on *Trypanosoma avium* Danilewsky 1885. III. Life cycle in vertebrate and invertebrate hosts. *Parasitology*, 46: 335–352.
DOI 10.1017/s0031182000026548.

Bartlett CM. 2008. Filarioid nematodes. In: Atkinson CT, Thomas NJ, Hunter DB, Hrsg. *Parasitic diseases of wild birds*. Ames Iowa: Wiley-Blackwell, 439–462.

Bartlett CM, Anderson RC. 1980. Filarioid nematodes (Filarioidea: Onchocercidae) of *Corvus brachyrhynchos brachyrhynchos* Brehm in southern Ontario, Canada and a consideration of the epizootiology of avian filariasis. *Systematic Parasitology*, 2: 77–102.

Bartlett CM, Anderson RC. 1981. Occult filariasis in crows (*Corvus brachyrhynchos brachyrhynchos* Brehm) infected with *Splendidofilaria caperata* Hibler, 1964 (Nematoda: Filarioidea). *Journal of Wildlife Diseases*, 17 (1): 69–77.

Bartlett CM, Anderson RC. 1989. Mallophagan vectors and the avian filarioids: new subspecies of *Pelecitus fulicaeatrae* (Nematoda: Filarioidea) in sympatric north american

hosts, with development, epizootiology, and pathogenesis of the parasite in *Fulica americana* (Aves). *Canadian Journal of Zoology*, 67: 2821–2833.

Bennett GF. 1970. Development of trypanosomes of the *T. avium* complex in the invertebrate host. *Canadian Journal of Zoology*, 48: 945–957.

Bravo-Barriga D, Parreira R, Almeida APG, Calado M, Blanco-Ciudad J, Serrano-Aguilera FJ, Pérez-Martín JE, Sánchez-Peinado J, Pinto J, Reina D, Frontera E. 2016. *Culex pipiens* as a potential vector for transmission of *Dirofilaria immitis* and other unclassified Filarioidea in southwest Spain. *Veterinary Parasitology*, 223: 173–180.

DOI 10.1016/j.vetpar.2016.04.030.

Busch U. 2010. Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik. Grundlegende Methoden und Anwendungen. Berlin, New York: Springer, 317.

Czajka C, Becker N, Poppert S, Jöst H, Schmidt-Chanasit J, Krüger A. 2012. Molecular detection of *Setaria tundra* (Nematoda: Filarioidea) and an unidentified filarial species in mosquitoes in Germany. *Parasites & Vectors*, 5 (14).

<http://www.parasitesandvectors.com/content/5/1/14>.

Deplazes P, Eckert J, von Samson-Himmelstjerna G, Zahner H. 2013. Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. Dritte, überarb. Aufl. Stuttgart: Enke, 639.

Dirie MF, Ashford RW, Mungomba LM, Molyneux DH, Green EE. 1990. Avian trypanosomes in *Simulium* and sparrowhawks (*Accipiter nisus*). *Parasitology Today*, 101: 243–247.

Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Mattick JS. 1991. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research*, 19 (14): 4008.

dos Anjos L. 2009. Family Corvidae (Crows). In: del Hoyo J, Elliott A, Christie DA, Hrsg. Handbook of the birds of the world. Vol. 14. Bush-shrikes to old world sparrows. Barcelona: Lynx Editions, 494–640.

Dusek RJ, Forrester DJ. 2002. Blood parasites of american crows (*Corvus brachyrhynchos*) and fish crows (*Corvus ossifragus*) in Florida, USA. *Comparative Parasitology*, 69 (1): 92–96.

Flegg J, Hosking D. 1998. *Vögel Europas*. Köln: Könemann, 256.

Haas M, Baruš V, Benedikt V, Literák I. 2011. Microfilariae in birds in the Czech Republic, including a note on adult nematodes *Eufilaria delicata* in a song thrush *Turdus philomelos*. *Parasitology Research*, 109 (3): 645–655. DOI 10.1007/s00436-011-2297-4.

Haffer J, Bauer K. 1993. Corvidae - Rabenvögel. In: Glutz von Blotzheim UN, Hrsg. *Handbuch der Vögel Mitteleuropas*. Band 13. Passeriformes (4. Teil). Wiesbaden: AULA-Verlag, 1375–2022.

Hamer GL, Anderson TK, Berry GE, Makohon-Moore AP, Crafton JC, Brawn JD, Dolinski AC, Krebs BL, Ruiz MO, Muzzall PM, Goldberg TL, Walker ED. 2013. Prevalence of filarioid nematodes and trypanosomes in american robins and house sparrows, Chicago USA. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 2: 42–49. DOI 10.1016/j.ijppaw.2012.11.005.

Hamilton PB, Gibson WC, Stevens JR. 2007. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44 (1): 15–25. DOI 10.1016/j.ympev.2007.03.023.

Hawking F. 1975. Circadian and other rhythms of parasites. *Advances in Parasitology*, 13: 123–182. DOI 10.1016/S0065-308X(08)60320-6.

Hiepe T, Lucius R, Gottstein B, Hrsg. 2006. *Allgemeine Parasitologie*. Mit den Grundzügen der Immunbiologie, Diagnostik und Bekämpfung. Erste. Aufl. Stuttgart: Parey, 477.

Kaufmann J. 1996. *Parasitic infections of domestic animals. A diagnostic manual*. Basel: Springer Basel AG, 423.

Kirkpatrick CE, Lauer DM. 1985. Hematozoa of raptors from southern New Jersey and adjacent areas. *Journal of Wildlife Diseases*, 21 (1): 1–6. DOI 10.7589/0090-3558-21.1.1.

Kučera J. 1981. Blood parasites of birds in Central Europe. 1. Survey of literature. The Incidence in domestic birds and general remarks to the incidence in wild birds. *Folia Parasitologica (Praha)*, 28: 13–22.

Lefoulon E, Bain O, Bourret J, Junker K, Guerrero R, Cañizales I, Kuzmin Y, Satoto TBT, Cardenas-Callirgos JM, Souza Lima S de, Raccurt C, Mutafchiev Y, Gavotte L, Martin C. 2015. Shaking the tree: Multi-locus sequence typing usurps current onchocercid (filarial nematode) phylogeny. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9 (11): e0004233. DOI 10.1371/journal.pntd.0004233.

Lucius R, Loos-Frank B, Lane RP. 2018. *Biologie von Parasiten*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 558.

Lukes J, Votýpka J. 2000. *Trypanosoma avium*: novel features of the kinetoplast structure. *Experimental Parasitology*, 96 (3): 178–181. DOI 10.1006/expr.2000.4559.

Molyneux DH, Cooper JE, Smith WJ. 1983. Studies on the pathology of an avian trypanosome (*T. bouffardi*) infection in experimentally infected canaries. *Parasitology*, 87: 49–54.

Mungomba LM, Molyneux DH, Wallbanks KR. 1989. Host-parasite relationship of *Trypanosoma corvi* in *Ornithomyia avicularia*. *Parasitology Research*, 75: 167–174.

Nandi N, Bennett GF. 1994. Re-description of *Trypanosoma corvi* Stephens and Christophers, 1908 Emend. Baker, 1976 and Remarks on the Trypanosomes of the Avian Family Corvidae. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 89: 145–151.

Sádlová J, Reishig J, Volf P. 1998. Prediuresis in female *Phlebotomus* sandflies (Diptera: Psychodidae). *European Journal of Entomology*, 95: 643–647.

Schoener E, Uebleis SS, Cuk C, Nawratil M, Obwaller AG, Zechmeister T, Lebl K, Rádrová J, Zitra C, Votýpka J, Fuehrer H-P. 2018. Trypanosomatid parasites in austrian mosquitoes. PLOS one, 13 (4): e0196052. DOI 10.1371/journal.pone.0196052.

Schoener ER, Harl J, Himmel T, Fagner K, Weissenböck H, Fuehrer H-P. 2019. Protozoan parasites in *Culex pipiens* mosquitoes in Vienna. Parasitology Research, 118 (4): 1261–1269. DOI 10.1007/s00436-019-06219-8.

Sehgal RNM, Jones HI, Smith TB. 2001. Host specificity and incidence of *Trypanosoma* in some African rainforest birds: a molecular approach. Molecular Ecology, 10: 2319–2327.

Stabler RM, Holt PA, Kitzmiller NJ. 1966. *Trypanosoma avium* in the blood and bone marrow from 677 colorado birds. The Journal of Parasitology, 56 (6): 1141–1144.

Supperer R. 1958. Zwei neue Filarien (s. l.), *Eufilaria delicata* spec. nov. und *Ornithofilaria böhmi* spec. nov. aus der Misteldrossel, *Turdus viscivorus*. Z. f. Parasitenkunde, 18 (312–319).

Svobodová M, Volf P, Votýpka J. 2015. Trypanosomatids in ornithophilic bloodsucking Diptera. Medical and Veterinary Entomology, 29 (4): 444–447. DOI 10.1111/mve.12130.

Svobodová M, Dolnik OV, Čepička I, Rádrová J. 2017. Biting midges (Ceratopogonidae) as vectors of avian trypanosomes. Parasites & Vectors, 10 (1): 224. DOI 10.1186/s13071-017-2158-9.

Svobodová M, Rádrová J. 2018. Phlebotomine Sandflies - Potential Vectors of Avian Trypanosomes. Acta Protozoologica, 57 (1). DOI 10.4467/16890027AP.18.005.8399.

Svobodová M, Weidinger K, Peške L, Volf P, Votýpka J, Voříšek P. 2015. Trypanosomes and haemosporidia in the buzzard (*Buteo buteo*) and sparrowhawk (*Accipiter nisus*): factors affecting the prevalence of parasites. Parasitology Research, 114 (2): 551–560. DOI 10.1007/s00436-014-4217-x.

Tarello W. 2005. *Trypanosoma avium* incidence, pathogenicity and response to melarsomine in falcons from Kuwait. *Parasite* (Paris, France), 12 (1): 85–87.

DOI 10.1051/parasite/2005121085.

Übleis SS, Cuk C, Nawratil M, Butter J, Schoener E, Obwaller AG, Zechmeister T, Duscher GG, Rubel F, Lebl K, Zित्रा C, Fuehrer H-P. 2018. Xenomonitoring of mosquitoes (Diptera: Culicidae) for the presence of filarioid helminths in eastern Austria. *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology*, 2018: 9754695. DOI 10.1155/2018/9754695.

Valkiūnas G, Bairlein F, Iezhova TA, Dolnik OV. 2004. Factors affecting the relapse of *Haemoproteus belopolnyi* infections and the parasitaemia of *Trypanosoma* spp. in a naturally infected European songbird, the blackcap, *Sylvia atricapilla*. *Parasitology Research*, 93 (3): 218–222. DOI 10.1007/s00436-004-1071-2.

van Pelt-Verkuil E, van Belkum A, Hays JP. 2008. Technical aspects and principles of PCR amplification. Dordrecht, London: Springer, 342.

Veciana M, Bain O, Morand S, Chaisiri K, Douangboupha B, Miquel J, Ribas A. 2015. *Breinlia* (*Breinlia*) *jittapalapongi* n. sp. (Nematoda: Filarioidea) from the Asian house rat *Rattus tanezumi* Temminck in Lao PDR. *Systematic Parasitology*, 90 (3): 237–245. DOI 10.1007/s11230-014-9544-x.

Volf P, Hajmova M, Sadlova J, Votýpka J. 2004. Blocked stomodeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. *International Journal for Parasitology*, 34 (11): 1221–1227. DOI 10.1016/j.ijpara.2004.07.010.

Votýpka J, Oborník M, Volf P, Svobodová M, Lukes J. 2002. *Trypanosoma avium* of raptors (Falconiformes): phylogeny and identification of vectors. *Parasitology*, 125 (Pt 3): 253–263. DOI 10.1017/s0031182002002093.

Votýpka J, Svobodová M. 2004. *Trypanosoma avium*: experimental transmission from black flies to canaries. *Parasitology Research*, 92 (2): 147–151. DOI 10.1007/s00436-003-1034-z.

Votýpka J, Lukeš J, Oborník M. 2004. Phylogenetic relationship of *Trypanosoma corvi* with other avian trypanosomes. *Acta Protozoologica*, 43: 225–231.

Votýpka J, Szabová J, Rádová J, Zídková L, Svobodová M. 2012. *Trypanosoma culicavium* sp. nov., an avian trypanosome transmitted by *Culex* mosquitoes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62 (Pt 3): 745–754. DOI 10.1099/ijs.0.032110-0.

Woo PTK, Bartlett CM. 1982. *Trypanosoma ontarioensis* n. sp. and *T. paddae* from *Corvus brachyrhynchos brachyrhynchos* in Ontario, Canada, with notes on the biology of *T. ontarioensis* n. sp. *Canadian Journal of Zoology*, 60: 2107–2115.

Zídková L, Cepicka I, Szabová J, Svobodová M. 2012. Biodiversity of avian trypanosomes. *Infection, Genetics and Evolution*, 12 (1): 102–112. DOI 10.1016/j.meegid.2011.10.022.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Karte Europas zur Darstellung der Verbreitung der Rabenkrähen und Nebelkrähen, die gelbe Linie stellt die Hybridzone dar. (Nalagtus, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Distribution_map_Corvus_corone_and_C._corvix.png , Lizenzhinweis: https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/legalcode , Zugriff 1.03.2020).....	4
Abb. 2: Schema der Formen der Trypanosomen: a amastigot; b epimastigot; c trypomastigot	8
Abb. 3: Schema einer trypomastigoten Form von <i>Trypanosoma</i> sp.	9
Abb. 4: Lebenszyklus von <i>Trypanosoma cruzi</i> (CDC/Alexander J. da Silva, PhD; Melanie Moser, https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=3384 , Zugriff 01.03.2020)	10
Abb. 5: Lebenszyklus von <i>Wuchereria bancrofti</i> (CDC/Alexander J. da Silva, PhD; Melanie Moser, https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=3425 , Zugriff 16.04.2020)	20
Abb. 6: Prinzip der DNA-Extraktion mittels DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Venlo, Niederlande), modifiziert. (https://www.qiagen.com/us/shop/sample-technologies/dna/genomic-dna/dneasy-blood-and-tissue-kit/#productdetails , Zugriff 12.04.2019).....	26
Abb. 7: Relative Anteile der untersuchten Vogelarten.	37
Abb. 8: Trypomastigote aus dem Blutaussstrich mit der Sample ID 14. 400-fache Vergrößerung. Giemsa-Färbung.	39
Abb. 9: Phylogenetischer Baum mit der aus der Sample ID 14 (gelb markierten) isolierten DNA-Sequenz (erstellt am 27.06.2019)	40
Abb. 10: Phylogenetischer Baum mit der aus der Sample ID 52 (rot markiert) isolierten DNA-Sequenz (erstellt am 27.06.2019).....	41

8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Taxonomie der Corviden	2
Tab. 2: Taxonomie der in Europa vorkommenden Arten der Rabenvögel	3
Tab. 3: Taxonomie der Trypanosomen	6
Tab. 4: Taxonomie der Filarien	18
Tab. 5: Übersicht über die 16 Gattungen aviärer Filarien nach Unterfamilie, in Klammern die Anzahl validierter Arten in der jeweiligen Gattung (Bartlett 2008).....	21
Tab. 6: Pipettierschema der PCR zum Nachweis von Trypanosomen.....	30
Tab. 7: Temperaturkurve des Nest 1 und erstem Nest 2 zum Nachweis von Trypanosomen	30
Tab. 8: Temperaturkurve des zweiten Nest 2 zum Nachweis von Trypanosomen	30
Tab. 9: Pipettierschema der PCR zum Nachweis von Filarien	31
Tab. 10: Temperaturkurve zum Nachweis von Filarien mittels ChandFO/-RO Primern	31
Tab. 11: Pipettierschema der PCR zum Nachweis von Filarien	32
Tab. 12: Temperaturkurve der touchdown PCR zum Nachweis von Filarien.....	32
Tab. 13: Untersuchte Vogelarten mit absoluter Anzahl.....	36
Tab. 14: Zeitraum der Probennahmen.	37
Tab. 15: Positiv getestete Vögel mit Angabe der Vogel- und Parasitenart.....	38