

Aus dem Department für Pathobiologie  
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

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

**Stechmücken und andere Dipteren als potentielle Vektoren von  
Krankheitserregern in einer Isolierstation für Pferde**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Petra Kollár

Wien, im Juni 2022

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

Begutachterin: Korbacska-Kutasi, Orsolya, PhD.  
Universitätsklinik für Pferde, Klinische Abteilung Interne Medizin Pferde  
Department für Kleintiere und Pferde  
Veterinärmedizinische Universität Wien

## Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis.....	1
2	Einleitung .....	3
3	Literaturübersicht .....	4
3.1	Dipteren.....	4
3.1.1	Familie Culicidae – Stechmücken .....	4
3.1.2	Familie Psychodidae – Schmetterlingsmücken .....	6
3.1.3	Familie Ceratopogonidae – Gnitzen .....	7
3.2	Brachyceren .....	8
3.2.1	<i>Stomoxys calcitrans</i> – Wadenstecher .....	8
3.2.2	<i>Musca domestica</i> – Große Stubenfliege .....	8
3.2.3	<i>Musca autumnalis</i> – Gesichtsfliege .....	9
3.2.4	Familie Tabanidae – Bremsen .....	9
3.3	Erreger.....	10
3.3.1	Flaviviren.....	10
3.3.1.1	Das West-Nil-Virus .....	11
3.3.1.2	Das Equine Hepacivirus .....	14
3.3.2	Theiler's disease – das Equine Parvovirus .....	15
3.3.3	Druse – <i>Streptococcus equi</i> subspecies <i>equi</i> .....	16
4	Material und Methodik.....	17
4.1	Probensammlung.....	17
4.2	Morphologische Analyse .....	19
4.3	Molekulare Analyse .....	20
4.3.1	DNA-Extraktion .....	20
4.3.2	Kombinierte DNA- und RNA-Extraktion .....	21
4.3.3	COI-Gen und DNA-Barcoding.....	22
4.3.4	PCR.....	23
4.3.5	PCR-Protokoll – LCO/HCO .....	23

4.3.6	PCR-Protokoll – Lepidoptera .....	25
4.3.7	PCR-Protokoll für Flaviviren .....	26
4.3.8	PCR-Protokoll für EqHV .....	28
4.3.9	PCR-Protokoll für EqPV .....	30
4.3.10	PCR Protokoll für <i>S. equi</i> ssp. <i>equi</i> .....	31
4.3.11	Herstellung des Gels und Gelelektrophorese (Barcoding und Flaviviren).....	32
4.3.12	Herstellung des Gels und Gelelektrophorese ( <i>S. equi</i> ssp. <i>equi</i> ).....	32
4.3.13	Sequenzierung .....	33
5	Ergebnisse .....	34
5.1	Morphologische Analyse .....	34
5.2	Barcoding.....	36
5.3	Pathogen-Screening .....	40
5.3.1	WNV.....	40
5.3.2	EqHV .....	41
5.3.3	EqPV.....	41
5.3.4	SEE.....	41
5.4	Klebefallen.....	42
6	Diskussion.....	44
7	Zusammenfassung.....	49
8	Summary .....	50
9	Literaturverzeichnis.....	51
10	Abbildungsverzeichnis.....	56
11	Tabellenverzeichnis.....	57
12	Anhang .....	59
13	Danksagung.....	68

## 1 Abkürzungverzeichnis

°C	Grad Celsius
<i>Ae.</i>	<i>Aedes</i>
<i>An.</i>	<i>Anopheles</i>
bp	Basenpaare
<i>Cq.</i>	<i>Coquillettidia</i>
<i>Cs.</i>	<i>Culiseta</i>
<i>Cx.</i>	<i>Culex</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP's	Desoxyribonukleosidtriphosphat(e)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIAV	Virus der equinen infektiösen Anämie
EqHV	Equines Hepacivirus
EqPV	Equines Parvovirus
g	Erdschwerebeschleunigung/ Gramm
HCV	Humanes Hepatitis-C-Virus
Kont.	Kontamination
l	Liter
min	Minute(n)
mm	Millimeter
n.e.	nicht erfolgreich
NPHV	non-primate Hepacivirus
NTC	no template control
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
qPCR	Real-Time-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	round per minute
RT	Reverse Transkriptase
s.l.	<i>sensu lato</i>
SEE	<i>Streptococcus equi</i> ssp. <i>equi</i>

sek	Sekunde(n)
sog.	sogenannt(e)
ssp.	subspecies
TBE	Tris-Borate-EDTA
UV	ultraviolet
V	Volt
WNV	West-Nil-Virus
ZNS	Zentrales Nervensystem
µl	Mikroliter

## 2 Einleitung

Stechmücken und auch andere Mitglieder der Gruppe der Dipteren spielen als Lästlinge bei Pferden und auch anderen Haustieren eine wichtige Rolle. Noch bedeutender ist aber deren Vektorfunktion, da mehrere Arten als Überträger von diversen Viren, Bakterien, Protozoen und Helminthen, sowie als Parasiten der Haut und anderer Organe bekannt sind (Deplazes et al. 2013). So können sie den Gesundheitszustand sowie die Leistungsfähigkeit von Pferden erheblich beeinträchtigen. Nicht nur im Rahmen der Pferdemedizin ist dies ein wesentliches Thema, sondern auch in der Humanmedizin, da die meisten Pferdekrankheiten mit zoonotischer Relevanz ebenfalls durch Arthropoden übertragen werden (Onmaz et al. 2013).

Zudem gibt es weltweit zunehmende Besorgnis über neu auftretende Infektionskrankheiten, insbesondere durch Arthropoden übertragene Viren (Arboviren), die Menschen und Tiere befallen (Chapman et al. 2017). Der Klimawandel hat sich bereits auf die Übertragung einer Vielzahl von vektorübertragenen Krankheiten in Europa ausgewirkt und wird dies auch in den kommenden Jahrzehnten tun (Semenza und Suk 2018). Auch durch die starke Globalisierung wird die Ausbreitung von diversem Krankheitserreger und -überträger erleichtert (Semenza und Suk 2018).

Auf der Pferdeklinik der Veterinärmedizinischen Universität Wien steht für Patienten mit (potenziell) infektiösen Erkrankungen eine Isolierstation zur Verfügung. Eine Führung solcher Einrichtungen bedarf selbstverständlich hohen Hygienemaßnahmen. Solche Maßnahmen konzentrieren sich in erster Linie auf Personal- und Umgebungshygiene, welche das Infektionsrisiko deutlich senken lässt. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde untersucht ob und in welchem Ausmaß Dipteren in einer solcher Institution als Infektionsquelle fungieren können. Ziel dieser Diplomarbeit ist die Ermittlung welche Arten von Dipteren in der Isolierstation aufzufinden sind, und mittels Untersuchungen auf spezielle, für die Pferdegesundheit relevante, durch Dipteren verbreitete Erreger zu bestätigen. Außerdem sollte auf dieser Isolierstation abgeschätzt werden, ob Dipteren ein bzw. kein bis minimales Risiko als Überträger von Krankheitserregern darstellen.

### 3 Literaturübersicht

#### 3.1 Dipteren

Die Ordnung Diptera (Zweiflügler) ist eine der größten und vielfältigsten Ordnungen der Insekten. Die Anzahl der Arten, welche in dieser Ordnung zusammengefasst werden, wird auf etwa 124000 geschätzt (Mullen und Durden 2009). Im Gegensatz zu verschiedenen anderen Insektengruppen haben die Diptera nur ein Paar Flügel, woher auch der Name „Zweiflügler“ herrührt (Deplazes et al. 2013). Das hintere, zweite Flügelpaar ist stark reduziert und zu sog. Schwingkölbchen (Halteren) umgewandelt (Mullen und Durden 2009, Deplazes et al. 2013). Zahlreiche Arten dieser Ordnung sind nicht nur als Lästlinge, sondern auch als Vektoren von Viren, Parasiten und Bakterien veterinärmedizinisch von Bedeutung (Deplazes et al. 2013). Unterteilt werden die Dipteren in folgende zwei Unterordnungen: die Nematocera (Mücken) und die Brachycera (Fliegen) (Deplazes et al. 2013).

Innerhalb beider Unterordnungen werden folgend hauptsächlich jene Familien behandelt, die als Vektoren eine Rolle spielen, und Überträger von den im nächsten Kapitel vorgestellten Erregern sein können. Diese wurden in Tab. 1 zusammengefasst aufgeführt.

**Tabelle 1:** Taxonomie der Dipteren, die in der Literaturübersicht präsentiert werden (Deplazes et al. 2021).

Klasse: Insecta (Insekten, Hexapoda)

Ordnung: Diptera (Zweiflügler)

Unterordnung: Nematocera (Mücken)

Familie: Culicidae (Stechmücken)

Psychodidae (Schmetterlingsmücken)

Ceratopogonidae (Gnitzen)

Unterordnung: Brachycera (Fliegen)

Familie: Muscidae (Echte Fliegen)

Tabanidae (Bremsen)

##### 3.1.1 Familie Culicidae – Stechmücken

Culicidae sind 4–10 mm lange, schlanke, langbeinige Mücken. Weibliche Stechmücken saugen Blut, welches sie für die Eiproduktion benötigen. Sie besitzen einen langen, ungegliederten

Stechrüssel mit stechend-saugenden Mundwerkzeugen welcher gut zum Blutsaugen geeignet ist. Dahingegen sind die Mundwerkzeuge der Männchen zurückgebildet und diese sind keine Blutsauger. Die 15-gliedrigen Antennen der Männchen sind stark gefiedert, wobei die Weibchen nur welche mit kurzen Haaren besitzen, und somit gut vom ersteren zu unterscheiden sind (Deplazes et al. 2021).

Diese Familie ist besonders relevant, da der überwiegende Anteil der Arboviren (Viren, die durch Arthropoden übertragen werden; engl. arthropod borne) von Culiciden übertragen werden (Deplazes et al. 2013). Obwohl etwa drei Viertel aller Stechmückenarten in den Tropen und Subtropen vorkommen, und auch die Arboviren vorwiegend in tropischen Regionen von großer Bedeutung sind, gibt es jedoch auch eine Reihe von Stechmücken, und Arboviren, die im europäischen Raum eine Rolle spielen (Deplazes et al. 2013, Becker et al. 2020).

Die Familie der Stechmücken teilt sich in die zwei Unterfamilien Anophelinae und Culicinae auf. Von weltweit etwa 3500 bekannten Stechmückenarten sind bisher 46 Arten in Österreich nachgewiesen, die den Gattungen *Aedes*, *Anopheles*, *Coquillettidia*, *Culiseta*, *Culex*, *Ochlerotatus* und *Uranotaenia* zugeordnet werden können (Zittra et al. 2014). Diese sind in Tab. 2 aufgelistet.

**Tabelle 2:** In Österreich auffindbaren Stechmückenarten; die mit Stern versehene Arten sind in Österreich auffindbar, aber ursprünglich nicht heimisch (Zittra et al. 2014).

- **Gattung *Anopheles***
  - *An. algeriensis*
  - *An. atroparvus*
  - *An. maculipennis* Komplex
  - *An. messae*
  - *An. plumbeus*
  - *An. hyrcanus*\*
- **Gattung *Aedes***
  - *Ae. cinereus*
  - *Ae. geminus*
- *Ae. rossicus*
- *Ae. vexans*
- *Ae. albopictus*\*
- **Gattung *Coquillettidia***
  - *Cq. richiardii*
- **Gattung *Culex***
  - *Cx. hortensis*
  - *Cx. martinii*
  - *Cx. modestus*
  - *Cx. pipiens* Komplex

- *Cx. territans*
- *Cx. torrentium*
- **Gattung *Culiseta***
  - *Cs. alaskaensis*
  - *Cs. annulata*
  - *Cs. glaphyoptera*
  - *Cs. morsitans*
  - *Cs. subochrea*
  - *Cs. longiareolata\**
- **Gattung *Ochlerotatus***
  - *Oc. annulipes*
  - *Oc. cantans*
  - *Oc. caspius*
  - *Oc. cataphylla*
  - *Oc. communis*
  - *Oc. detritus*
- *Oc. dorsalis*
- *Oc. excrucians*
- *Oc. flavescens*
- *Oc. geniculatus*
- *Oc. hungaricus*
- *Oc. intrudens*
- *Oc. leucomelas*
- *Oc. nigrinus*
- *Oc. pullatus*
- *Oc. punctor*
- *Oc. riparius*
- *Oc. rusticus*
- *Oc. sticticus*
- *Oc. j. japonicus\**
- **Gattung *Uranotaenia***
  - *Ur. unguiculata*

### 3.1.2 Familie Psychodidae – Schmetterlingsmücken

Schmetterlingsmücken (im Englischen auch „moth flies“ oder „drain flies“ genannt) sind etwa 2–5 mm große, einschließlich der Flügel stark behaarte, langbeinige Mücken (Zittra et al. 2020a, Deplazes et al. 2021). Diese Insekten sind hauptsächlich in Regionen mit tropischem, subtropischem und gemäßigttem Klima verbreitet, einige Vertreter sind aber mittlerweile in allen Klimazonen zu finden (Mullen und Durden 2009). Sie umfasst etwa 3000 verschiedene Arten, welche in sechs Unterfamilien eingeteilt werden. Zwei dieser Unterfamilien beinhaltet blutsaugende Arten, die anderen vier hingegen keine Blutsauger (Mullen und Durden 2009). Aus medizinischer Sicht ist in erster Linie die Unterfamilie Phlebotominae (Sandmücken) hervorzuheben (Deplazes et al. 2021). Sandmücken sind höchstens 5 mm lange, dicht behaarte blutsaugende Mücken, die meistens bräunlich bis gelblich gefärbt sind und lange, schlanke 12–16-gliedrige Antennen besitzen (Mullen und Durden 2009, Machtinger et al. 2022). Sie sind durch deren schmerzhaftige Stiche nicht nur für Mensch und Tier belästigend, sondern können

ebenfalls als Vektoren von *Leishmania* spp. fungieren (Deplazes et al. 2021, Machtinger et al. 2022).

Von den Unterfamilien der nicht blutsaugender Arten sind die Psychodinae, innerhalb davon die Gattungen *Psychoda* und *Clogmia* nennenswert, da sie im Gesundheitswesen eine Rolle spielen (Mullen und Durden 2009). Bestimmte Arten dieser Gattungen sind häufige Schädlinge in Gebäuden, wo sie sich oft in den Abwasserkanälen und in den Kläranlagen aufhalten und können sogar Myiasis (Fliegenmadenkrankheit) beim Menschen verursachen (Mullen und Durden 2009, Zittra et al. 2020a).

### **3.1.3 Familie Ceratopogonidae – Gnitzen**

Die sog. Gnitzen, werden im Englischen auch „biting midges“ genannt. Die Familie umfasst mehr als 5400 beschriebene Arten, die in 125 Gattungen unterteilt sind. Nur Weibchen von vier Gattungen sind obligatorisch blutsaugend: *Austroconops*, *Lasiohelea*, *Leptoconops* und *Culicoides*. Sie spielen nicht nur als Lästlinge eine Rolle, sondern sind auch als Überträger von Krankheitserregern von medizinischer und veterinärmedizinischer Bedeutung. Die aus veterinärmedizinischer Sicht wichtigste Gattung sind die *Culicoides*. Sie sind als Überträger einer Reihe von bedeutenden Viren wie das Virus der Afrikanischen Pferdepest, das Blauzungen-Virus, und Schmollenberg-Virus bekannt. Die Anwesenheit all dieser Krankheiten ist stark mit der Verbreitung ihrer Vektoren verbunden (Zittra et al. 2020b). Diese weltweit verbreitete Gattung umfasst 1365 Arten, von welchen 129 in Europa, und davon 36 in Österreich dokumentiert wurden (Zittra et al. 2020b). *Culicoides* haben eine Körperlänge von etwa 1–2,5 mm und zählen somit zu den kleinsten blutsaugenden Insekten (Mullen und Durden 2009, Deplazes et al. 2021). Der Thorax ist buckelartig aufgewölbt und die Flügel sind mit charakteristischen Flecken versehen, die durch die verschieden dichte Behaarung zustande kommen, und welche auch für die Identifizierung hilfreich sein können (Deplazes et al. 2021, Machtinger et al. 2022).

Abgesehen von der Vektorfunktion sind *Culicoides* in der Pferdemedizin auch aus einem weiteren Grund relevant, da sie die Verursacher vom sog. Sommerexzem bei Pferden sind (Deplazes et al. 2021).

## 3.2 Brachyceren

### 3.2.1 *Stomoxys calcitrans* – Wadenstecher

Innerhalb der Brachyceren (Fliegen) wird in dieser Arbeit hauptsächlich die Gattung *Stomoxys* (Stechfliegen) in der Familie der Muscidae diskutiert. Diese umfasst 18 beschriebene Arten. Sie sind obligatorisch blutsaugende Insekten, und einige Arten gelten in vielen Teilen der Welt als bedeutende wirtschaftliche Schädlinge von Nutztieren und anderen Säugetieren (Baldacchino et al. 2013). Die meisten Arten der Gattung *Stomoxys* sind in Afrika zu finden, aber *Stomoxys calcitrans* ist mittlerweile weltweit verbreitet (Showler und Osbrink 2015).

Diese mittelgroße Fliege, auch Wadenstecher oder auf Englisch „stable fly“ genannt, hat einen etwa 4 bis 7 mm langen, grau bzw. teilweise grün-gelblich schimmernden Körper. Sie besitzt vier schwarze Streifen auf der Brust, charakteristische schwarze Flecken auf dem Bauch und verfügt über einen schlanken, nach vorne stehenden Stechrüssel (Deplazes et al. 2013, Showler und Osbrink 2015).

*Stomoxys*-Fliegen sind mechanische Überträger von Krankheitserregern, die im Blut und in der Haut ihrer tierischen Wirte vorhanden sind. Die mechanische Übertragung von Krankheitserregern, wird als wichtiger „indirekter Effekt“ von blutsaugenden Insekten angesehen. Dieses scheint entweder durch Kontamination von den Stechrüsseln oder durch Aufstoßen von Inhalten des Verdauungstrakts zu erfolgen. Experimentelle Studien haben gezeigt, dass *Stomoxys*-Fliegen einen Teil einer früheren Blutmahlzeit in ihrer Speicheldrüse verwahren und während der nachfolgenden Blutmahlzeit wieder aufstoßen können. Dies könnte ebenfalls ein wichtiger Weg zur Übertragung von Krankheitserregern sein, da in der Speicheldrüse der Fliegen ein für die Erreger „angenehmes“ Klima herrscht. Da hier noch kein Kontakt zu den Verdauungssäften besteht, ist es nicht auszuschließen, dass somit auch eine verzögerte Erregerübertragung durch *Stomoxys* möglich wäre (Baldacchino et al. 2013).

Es wird diskutiert, dass zahlreiche Viren mechanisch durch *Stomoxys* spp. übertragen werden können - wie unter anderem das West-Nil-Virus (Baldacchino et al. 2013).

### 3.2.2 *Musca domestica* – Große Stubenfliege

Eine der wichtigsten Arten innerhalb der Gattung *Musca* ist die große Stubenfliege (*Musca domestica*). Global gesehen ist sie von allen Insekten am weitesten verbreitet. Sie kommt von der Arktis bis zu den Tropen vor und ist dort weit verbreitet, wo Menschen und ihre Tiere

präsent sind. Diese 3 bis 8 mm lange Fliege besitzt leckend-saugende Mundwerkzeuge und hat vier dunkle Streifen auf dem Thorax (Machtinger et al. 2022).

Erwachsene Stubenfliegen kommen in Innen- und Außenbereichen vor. Sie sind opportunistische Fresser, die sich von einer Vielzahl von Nahrungsquellen ernähren, wie Pferdemist und Körpersekreten, Speiseresten, Pflanzennektar und anderen organischen Materialien. Sie saugen zwar kein Blut, trotzdem können sie mechanische Überträger diverser Krankheitserreger sein (Machtinger et al. 2022).

### 3.2.3 *Musca autumnalis* – Gesichtsflye

Diese Fliegenart gehört genauso wie die große Stubenfliege (*Musca domestica*) zur Gattung *Musca*. Wie der Name schon verrät, ist sie hauptsächlich im Kopfbereich der Tiere, insbesondere in der Umgebung der Augen und Nüstern zu finden. Dort ernährt sie sich von den Sekreten der Tiere. Dies führt zur erheblichen Belästigung der Tiere. Diese mittelgroße Fliege, ist der großen Stubenfliege in der Morphologie sehr ähnlich. Sie besitzt ebenfalls leckend-saugende Mundwerkzeuge, und ist etwas größer und dunkler als eine Stubenfliege. Sie kann ebenfalls als mechanischer Überträger von Pathogenen dienen (Machtinger et al. 2022).

### 3.2.4 Familie Tabanidae – Bremsen

Bremsen (im Englischen auch „horse-flies“ genannt) sind kräftig gebaute, 6–25 mm lange Fliegen mit einem breiten Kopf und außerordentlich großen, bunt schillernden Augen (Deplazes et al. 2013, Machtinger et al. 2022). Es sind etwa 4400 Arten innerhalb dieser Familie bekannt, von denen mehr als 170 in Europa vorkommen (Dörge et al. 2020). Aus pferdemedizinischer Sicht sind vor allem die Gattungen *Tabanus*, *Haematopota* und *Chrysops* hervorzuheben (Onmaz et al. 2013).

Weibliche Bremsen sind blutsaugend. Sie besitzen große, messerblattartige Mundwerkzeuge, welche zum Schneiden, Stechen, Raspeln und Saugen geeignet sind (Deplazes et al. 2013). Die tiefen Stiche gehen mit beträchtlichem Schmerz und ausgeprägten Hautläsionen einher und können somit bei Weidetieren zu erheblicher Belästigung führen (Deplazes et al. 2013, Dörge et al. 2020). Darüber hinaus können sie auch als Überträger diverser Krankheitserreger - beispielsweise das Virus der equinen infektiösen Anämie (EIAV) - dienen (Dörge et al. 2020).

### 3.3 Erreger

Zur Veranschaulichung, was für ein breites Spektrum an Pathogenen durch Dipteren übertragbar sind, wurden in Tab. 3 multiple Dipteren-Familien, und mehrere durch denen übertragbare Krankheitserreger aufgelistet.

**Tabelle 3:** Übersicht über diverse Dipteren und durch denen übertragbare Krankheitserreger (Mehlhorn 2008, Deplazes et al. 2013, Onmaz et al. 2013, Chapman et al. 2017, Dörge et al. 2020, Zittra et al. 2020b).

<b>Vektor (Familie/Genus)</b>	<b>Krankheitserreger</b>
<b>Culicidae</b>	West-Nil-Virus (WNV), Japanische Enzephalitis-Virus, Eastern-Equine-Enzephalitis-Virus (EEEV), Western-Equine-Enzephalitis-Virus (WEEV), Usutu-Virus (USUV), <i>Francisella tularensis</i>
<b>Ceratopogonidae</b>	
<i>Culicoides</i>	Afrikanische Pferdepest, <i>Onchocerca</i> spp.
<b>Tabanidae</b>	Virus der equinen infektiösen Anämie (EIAV), <i>Trypanosoma</i> spp., <i>Anaplasma phagocytophilum</i> , <i>Bacillus anthracis</i> , <i>Francisella tularensis</i>
<b>Muscidae</b>	<i>Habronema</i> spp.
<i>Stomoxys</i> spp.	Virus der equinen infektiösen Anämie (EIAV), <i>Habronema</i> spp., <i>Trypanosoma</i> spp.
<b>Psychodidae</b>	
Phlebotominae	<i>Leishmania</i> spp.

In der Literaturübersicht wird des Weiteren nur auf jene Erreger detailliert eingegangen, deren Nachweis im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde:

#### 3.3.1 Flaviviren

Die Familie der Flaviviridae gehört zu den behüllten Einzelstrang-RNA-Viren (Selbitz et al. 2015). Diese Virusfamilie ist sowohl veterinär-, als auch humanmedizinisch bedeutsam, da es einige der gefährlichsten Arboviren der Welt beinhaltet, wie z.B. das Gelbfieber-Virus, das Dengue-Virus, das Japanische Enzephalitis-Virus, das West-Nil-Virus und das Hepatitis-C-Virus (Becker et al. 2020). Die Familie beinhaltet 3 Gattungen, welche (inklusive relevante Spezies) in Tab. 4 aufgeführt wurden.

**Tabelle 4:** Genera und relevante Spezies der Virusfamilie Flaviviridae (Selbitz et al. 2015, Badenhorst et al. 2019, Roesch et al. 2019).

<b>Genus</b>	<b>Spezies</b>
<b>Pestivirus</b>	Virus der bovinen Diarrhö (BVDV)
	Virus der Klassischen Schweinepest (KSP)
<b>Flavivirus</b>	Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus (FSME)
	West-Nil-Virus (WNV)
	Japanisches Enzephalitis-Virus
	Gelbfieber-Virus
	Dengue-Virus
	Usutu-Virus (USUV)
<b>Hepacivirus</b>	Hepatitis-C-Virus
	Equines Hepacivirus (EqHV)

### 3.3.1.1 Das West-Nil-Virus

Das West-Nil-Virus (WNV) wurde erstmals im Jahr 1937 in Uganda isoliert, und ist mittlerweile das weltweit am weitesten verbreitete Arbovirus und die häufigste Ursache für eine arbovirale Enzephalitis (David und Abraham 2016, Ciota 2017).

Das WNV kommt in erster Linie bei Vögeln, Pferden und Menschen vor, konnte aber auch bei einer Reihe von anderen Wirbeltieren (wie Hunden, Nagern, und auch Fledermäusen) nachgewiesen werden (Becker et al. 2020). Infektionen beim Menschen sind überwiegend subklinisch. Sollte es jedoch zur klinischen Manifestation kommen, handelt es sich in den meisten Fällen um grippeähnliche Symptome wie Fieber, Gliederschmerzen, allgemeine Schwäche und Magen-Darm-Beschwerden. Weniger als 1 % der infizierten Personen entwickeln neurologische Symptome (Saiz et al. 2021).

Ähnlich zu humanen Infektionen bleiben auch Großteil der infizierten Pferde asymptomatisch. Die klinisch erkrankten Pferde (etwa 20 % der infizierten) zeigen jedoch zumeist schwerwiegendere Symptome als der Mensch (Saiz et al. 2021). Neben Fieber zeigen sie häufig ZNS-Symptome wie Ataxie, Muskelzittern, Parese oder Paralyse, Bewusstseinstörung, Hyperästhesie, und Kopfnervenausfälle. Bei progredientem Verlauf kann es bis zum Festliegen kommen. Die Symptome sind Folge der viral ausgelösten Schäden im zentralen Nervensystem (Brehm et al. 2017). Die Rekonvaleszenzphase kann bis zu mehreren Monaten dauern und etwa

10–20 % der neurologisch erkrankten Pferde weisen verbleibende neurologische Defizite auf (Brehm et al. 2017, Saiz et al. 2021).

Das West-Nil-Virus wurde in Österreich seit 2008 bei mehreren Arten, einschließlich Greifvögeln, Menschen und Stechmücken, nachgewiesen und gemeldet. Der erste Fall einer neuroinvasiven West-Nil-Erkrankung beim Pferd wurde im Jahr 2016 auf der Pferdeklinik der Veterinärmedizinischen Universität diagnostiziert. Von den elf bestätigten neuroinvasiven Fällen, die zwischen 2016 und März 2021 an der Universitätsklinik für Pferde behandelt wurden, stellten sich zwei im Jahr 2016, drei im Jahr 2017, zwei im Jahr 2018, drei im Jahr 2019 und einer im Jahr 2020 vor (de Heus et al. 2021). Im Jahr 2021 wurden in Österreich keine, in an Österreich angrenzende Länder, insgesamt 19 equine Ausbrüche registriert. Davon 16 Fälle in nord-östlichen Regionen Deutschlands, und drei in Ungarn (<https://www.ecdc.europa.eu/en/west-nile-fever/surveillance-and-disease-data/disease-data-ecdc> 2022). Dies zeigt auch, dass die Prävalenz von Arboviren von Jahr zu Jahr stark variieren kann, und von einer Reihe verschiedener Faktoren abhängt (de Heus et al. 2021).

Die Virusübertragung erfolgt durch Stechmücken, die von infizierten Vögeln das Virus mittels Stich auf Säugetiere (oder auch auf Menschen) übertragen können. Dabei stellen Vögel das Hauptreservoir des Virus da (Brehm et al. 2017). Sie zeigen normalerweise keine klinischen Symptome, weisen aber eine lang andauernde Virämie mit hohen Virusspiegeln im Blut auf, und so können sie zur Weiterverbreitung des Virus beitragen (Brehm et al. 2017, Saiz et al. 2021). Dahingegen sind Menschen, Pferde und andere Säugetiere sog. Fehlwirte (Dead-End Hosts), und spielen in der Weiterverbreitung des Virus keine Rolle (Selbitz et al. 2015, Brehm et al. 2017).

Laborversuche konnten zeigen, dass das Virus (den Winter) in überwinternden *Culex*-Weibchen überleben kann. So kann es nicht ausgeschlossen werden, dass auch eine transovarielle Übertragung des Virus nicht nur möglich ist, sondern für den Fortbestand des Zyklus von Relevanz ist (Becker et al. 2020). Aus diesem Grund können auch Larven und männliche Stechmücken auf das Vorhandensein von WNV untersucht werden.

Eine Vielzahl an Stechmückenarten können als Vektoren fungieren, insgesamt wurde WNV schon in über 150 Mückenarten aus mindestens 11 verschiedenen Gattungen nachgewiesen (Saiz et al. 2021). Es ist jedoch wichtig zu erwähnen, dass der Nachweis allein nicht die Vektorfunktion bestätigen lässt. Vor allem der Gattung *Culex* wird die größte Bedeutung als Vektor von WNV zugeteilt (Colpitts et al. 2012). Innerhalb der Gattung spielen in Europa vor allem die Arten *Cx. pipiens* s.l., *Cx. perexiguus*, und *Cx. modestus* eine wichtige Rolle (Engler et al. 2013). Aber auch Spezies der Gattung *Aedes*, wie *Ae. albopictus*, *Ae. atropalpus* und *Ae. japonicus* sind laut Laborexperimenten potente Überträger (Becker et al. 2020). In Europa wurden bis jetzt aus den Arten *Cx. pipiens* s.l., *Cx. modestus*, *An. maculipennis* s.l., *Oc. cantans*, *Oc. caspius*, *Ae. vexans*, und *Cs. annulata* Virusisolate gewonnen (Becker et al. 2020). In Tab. 5 sind die Stechmückengattungen aufgelistet, in denen schon WNV nachgewiesen wurde. Tab. 6 zeigt die Arten, in denen eine experimentelle Transmission nachweisbar war.

**Tabelle 5:** Stechmückengattungen, in dem das WNV nachgewiesen worden ist (Saiz et al. 2021).

- |                         |                      |
|-------------------------|----------------------|
| • <i>Culex</i>          | • <i>Mansonia</i>    |
| • <i>Ochlerotatus</i>   | • <i>Mimomyia</i>    |
| • <i>Aedes</i>          | • <i>Psorophora</i>  |
| • <i>Anopheles</i>      | • <i>Culiseta</i>    |
| • <i>Coquillettidia</i> | • <i>Uranoteania</i> |
| • <i>Aedeomya</i>       |                      |

**Tabelle 6:** Experimentelle Transmission nachgewiesen (Becker et al. 2020, Kampen et al. 2020).

- |                            |                                  |
|----------------------------|----------------------------------|
| ▪ <i>Aedes albopictus</i>  | ▪ <i>Aedes vexans</i>            |
| ▪ <i>Ae. atropalpus</i>    | ▪ <i>Anopheles plumbeus</i>      |
| ▪ <i>Aedes caspius</i>     | ▪ <i>Culex modestus</i>          |
| ▪ <i>Aedes detritus</i>    | ▪ <i>Culex pipiens</i> s.l.      |
| ▪ <i>Aedes dorsalis</i>    | ▪ <i>Culex theileri</i>          |
| ▪ <i>Aedes geniculatus</i> | ▪ <i>Culex torrentium</i>        |
| ▪ <i>Aedes japonicus</i>   | ▪ <i>Uranotaenia unguiculata</i> |
| ▪ <i>Aedes punctator</i>   |                                  |

### 3.3.1.2 Das Equine Hepacivirus

Das Equine Hepacivirus (EqHV), auch Nonprimate-Hepacivirus (NPHV) genannt ist eine von 14 Spezies, die zur Gattung *Hepacivirus* gehören und damit ebenfalls ein Mitglied der Familie der Flaviviridae (Badenhorst et al. 2019). Das im Jahr 2011 entdeckte EqHV stellt die engste, bei Equiden vorkommende Verwandte vom humanen Hepatitis-C-Virus (HCV) dar (Scheel et al. 2015, Badenhorst et al. 2019). Der weltweit verbreitete Erreger wurde in den letzten Jahren mit Hepatitiden bei Pferden in Verbindung gebracht (Badenhorst et al. 2019).

Im Gegensatz zu einer HCV-Infektion beim Menschen, führt eine EqHV-Infektion eines Pferdes in den meisten Fällen zu einer deutlich mildereren Erkrankung, welche als eine subklinische Hepatitis mit vorübergehendem, leichtem Anstieg leberspezifischer Enzyme im Blut einhergeht (Badenhorst et al. 2019, Tegtmeyer et al. 2019).

Studien bestätigen die weltweite Verbreitung des Keims. Das Virus wurde in Pferdepopulationen unter anderem in den USA, Brasilien, Südafrika, Neuseeland, Korea, Japan, China, Schottland, Frankreich sowie in Österreichs Nachbarländern Italien, Deutschland und Ungarn nachgewiesen (Badenhorst et al. 2019). Laut den neuesten Studien kann EqHV in Österreich eine Prävalenz von 4,15 % aufweisen (Badenhorst et al. 2019).

Obwohl das Virus weltweit verbreitet ist, sind natürliche Übertragungswege noch weitgehend unerforscht (Badenhorst et al. 2019). Eine vertikale Übertragung wurde bis jetzt nur bei einem einzigen Fall beschrieben (Gather et al. 2016). Da aber EqHV in mehreren Regionen hohe Prävalenzen aufweist, ist davon auszugehen, dass die vertikale Übertragung nicht der einzige Übertragungsweg ist. Es ist bekannt, dass HCV über dem venerischen Weg übertragbar ist. Die geschlechtliche Übertragung von EqHV konnte jedoch bislang nicht bestätigt werden. Allerdings ist eine experimentelle Übertragung von EqHV durch infiziertes Blut und Blutprodukte nachgewiesen worden (Badenhorst et al. 2019). Viele bekannte Flaviviren werden horizontal zwischen blutsaugenden Arthropoden und Wirtstieren übertragen, wie auch oben beschrieben. Die Übertragung von EqHV durch Stechmücken konnte jedoch bis jetzt nicht bestätigt werden (Badenhorst et al. 2019). In der Studie von Badenhorst et al. 2019 wurden 5338 Stechmücken (gefangen in ganz Österreich und dem Nordosten Italiens) auf das Vorhandensein von EqHV-RNA getestet. Es wurde kein Hinweis auf virale Nukleinsäure

gefunden. Somit ist es unwahrscheinlich, dass Stechmücken als Überträger von EqHV eine Rolle spielen.

### 3.3.2 Theiler's disease – das Equine Parvovirus

Die sog. Theiler's disease oder auch Equine Serum Hepatitis genannt ist eine schwere, oft lebensbedrohliche Lebererkrankung von Pferden (Divers et al. 2018). Sir Arnold Theiler beschrieb diese Krankheit erstmals 1918 in Südafrika, als etwa 2 % der Pferde nach der Verabreichung von Antiserum von genesenen Pferden eine akute Lebernekrose und ein fulminantes Leberversagen entwickelten (Ramsauer et al. 2021). Seitdem wurden akute Pferdehepatitiden weltweit nach Behandlung mit einer Vielzahl biologischer Produkte equinen Ursprungs beschrieben, wie Tetanus- und Botulinum-Antitoxin, Antiserum gegen *Streptococcus equi*, und Blutplasma. Die Erkrankung wurde auch bei Pferden berichtet, die keine biologischen Produkte erhalten hatten, und bei Pferden, die mit Fällen von akuter Hepatitis in Kontakt gekommen sind (Ramsauer et al. 2021).

Das Equine Parvovirus (EqPV) wurde erstmals im Jahr 2018 in einem letalen Fall von Theiler's disease beschrieben, der auf die Verabreichung eines biologischen Produkts equinen Ursprungs folgte (Ramsauer et al. 2021). Seit der Entdeckung wurde EqPV mit Ausnahme eines einzigen Falles in allen kürzlich gemeldeten Fällen von Theiler's disease nachgewiesen. Ähnlich zur EqHV wurde es aber auch häufig bei leichten oder subklinischen Hepatitiden ermittelt (Ramsauer et al. 2021). Die Studie von Tomlinson et al. 2020 konnte auch mit Beweisen unterstützen, dass EqPV der Auslöser von Hepatitis bei Pferden sein kann und die wahrscheinliche Ursache der Theiler's disease ist.

EqPV gehört zu der Familie der Parvoviridae, und gehört somit zu den Einzelstrang-DNA-Viren (Selbitz et al. 2015). Es hat eine weltweite Verbreitung (Ramsauer et al. 2021). In der Studie von Badenhorst et al. 2022 wurde ein EqPV-DNA-Prävalenz von 8,9 % unter klinisch gesunden Pferden festgestellt.

Die diversen Übertragungswege von EqPV sind noch nicht ausgiebig erforscht worden. Tomlinson et al. 2020 demonstrierte, dass die Ausscheidung von EqPV über nasale und orale Sekrete, sowie über den Kot möglich sei, wohingegen die vertikale Übertragung nicht bestätigt werden konnte. Da der Erreger wie oben erwähnt sich mit diversen Blutprodukten übertragen

lässt, lässt sich die Hypothese stellen, dass eine mechanische Übertragung durch Stechfliegen ebenfalls möglich sei. Tomlinson et al. 2020 versuchte diese Aussage zu unterstützen, indem sie Bremsen von der Unterfamilie Tabanidae untersuchten, die sich von EqPV-positiven Pferden ernährten. Obwohl die Übertragung des Keims auf neue Individuen sich nicht eindeutig beweisen lies, konnte der Erreger in einigen der Bremsen nachgewiesen werden, nachdem sie EqPV-positive Pferde gestochen hatten. So konnte die Übertragung von EqPV durch Stechfliegen nicht ausgeschlossen werden.

### 3.3.3 Druse – *Streptococcus equi subspecies equi*

Druse (engl.: strangles) wurde das erste Mal im Jahr 1251 durch Jordanus Rufus beschrieben und ist mittlerweile die weltweit am häufigsten diagnostizierte Infektionskrankheit des Pferdes (Waller und Robinson 2013, Boyle et al. 2018). Sie wird vor allem durch Fieber, Entzündung der oberen Atemwege und die Vereiterung der Lymphknoten des Kopfes und des Halses mit Neigung zur Abszedierung gekennzeichnet (Waller und Robinson 2013, Selbitz et al. 2015). Druse-Ausbrüche können mit erheblichen Kosten (sowohl aus gesundheitlicher, als auch wirtschaftlicher Sicht) einhergehen (Waller und Robinson 2013). Die Erkrankung wird durch das Bakterium *Streptococcus equi* ssp. *equi* verursacht (Waller et al. 2011). Dieser grampositive Keim gehört in die Lancefield-Gruppe C, ist an Equiden adaptiert, und hochgradig kontagiös (Waller et al. 2011, Selbitz et al. 2015).

Die Übertragung von *S. equi* ssp. *equi* kann einerseits direkt erfolgen (Reed et al. 2018). Darunter sind Pferd-zu-Pferd Kontakte im Rahmen des normalen sozialen Verhaltens zu verstehen. Andererseits kann der Keim auch indirekt übertragen werden, wie z.B. über kontaminierte Futtertröge, Zaumzeug, oder jegliche andere Gegenstände, die mit bakterienbeladenen Sekreten eines infizierten Pferdes in Kontakt gekommen sind (Reed et al. 2018). Jedoch sind in der Verbreitung dieses Keims äußerlich gesund erscheinende Tiere von noch größerer Bedeutung. Nach klinischer Ausheilung kann die Ausscheidung noch weitere vier bis sechs Wochen andauern (Reed et al. 2018). Durch solche symptomlose, aber den Keim ausscheidende Tiere kann die Erkrankung in neue Bestände eingeschleppt werden. Alternativ können manche Pferde aufgrund einer persistierenden Infektion zu sog. „Carrier“ werden, indem sie den Keim über einen längeren Zeitraum in Form von eingedicktem Eiter in den Luftsäcken

aufweisen und diesen intermittierend ausscheiden (Boyle et al. 2018, Reed et al. 2018). Im Jahr 2020 wurden in einem Pferdebestand zum Zeitpunkt eines bestätigten Druse-Ausbruchs Fliegen gefangen, auf welchen *S. equi* sp. *equi* nachgewiesen werden konnte. Es ist also nicht auszuschließen, dass diverse Dipteren wie Fliegen ebenfalls einen potenziellen Übertragungsweg für diese Erkrankung darstellen (Pusterla et al. 2020).

## **4 Material und Methodik**

### **4.1 Probensammlung**

Auf der Isolierstation der Pferdeklunik der Veterinärmedizinischen Universität Wien stehen insgesamt fünf Boxen zur Verfügung. Alle Boxen sind ident aufgebaut: Vor der eigentlichen Box befindet sich ein Vorraum, der jeweils zum Gang und zur Box mit einer Tür getrennt ist. Alle Boxen sind von einem gemeinsamen Gang zu erreichen. Für die Patienten sind die Boxen von außen „zugänglich“. Diese für Pferde auch leicht passierbaren Türen (in Abb. 1 als dicke schwarze Linien dargestellt) bestehen aus zwei Anteilen: zum einen aus einem gitterartigen Metall-Tor, welches das Pferd zwar hindert aus der Box zu kommen, jedoch zur Außenwelt hin sonst offen ist. Zum anderen gibt es eine zusätzliche Tür, welche die Box von der Außenwelt komplett abschließt. Diese zwei sind unabhängig voneinander zu betätigen. Zur Isolierstation gehört ebenfalls ein Untersuchungsraum. Dieser befindet sich unmittelbar nebenan, im direkt gegenüberliegenden Gebäude. Dieser besteht aus einem tatsächlichen Untersuchungsraum und einer dazugehörigen Apotheke. Diese zwei Räume sind durch eine durchgehend offene Tür miteinander verbunden. Die gerade beschriebenen Räume sind in Abb. 1 schematisch dargestellt.

Das Sammeln der Dipteren wurde im Zeitraum vom 22.06.2021 bis zum 29.10.2021 durchgeführt. Dazu wurden einerseits „BG-Sentinel 2“ Mückenfallen von der Firma Biogents® (nachfolgend als BG-Sentinel Fallen bezeichnet), andererseits „Power Fliegenfänger“ von der Firma VANDAL® (nachfolgend als „Klebefallen“ bezeichnet) benutzt. Die BG-Sentinel Mückenfalle ist im Wesentlichen ein zusammenklappbarer Behälter mit einem weißen Deckel, dessen Öffnung mit Löchern bedeckt ist. Der Durchmesser beträgt 36 cm, die Höhe 40 cm. In der Mitte des Deckels wird mithilfe eines elektrischen Ventilators durch ein schwarzes Fangrohr Luft in die Falle gesogen. So werden die anfliegenden Insekten in einen Fangbeutel

gezogen. Die Luft verlässt dann die Falle durch die Löcher des Deckels und erzeugt aufsteigende Strömungen, welche den von einem menschlichen Wirt erzeugten Konvektionsströmen ähneln (<https://www.bg-sentinel.com> 2022). Die Zugabe von CO<sub>2</sub>, welches als Lockstoff dient, ermöglicht es ein breites Spektrum von blutsaugenden Arten anzulocken und zu fangen (Biogents AG 2017).

Die „Power Fliegenfänger“ sind etwa 8 cm breite und 80 cm lange abrollbare Klebestreifen, welche mittels einer Schlaufe an einem Ende aufzuhängen sind.

Im gemeinsamen Gang der Isolierboxen und im sich nebenan befindenden Behandlungsraum wurde jeweils eine BG-Sentinel Falle aufgestellt. Die CO<sub>2</sub>-Zufuhr wurde durch 20 Liter große medizinische CO<sub>2</sub>-Flaschen sichergestellt. Diese wurden mit einem druckreduzierenden Manometer versehen, welches eine optimale CO<sub>2</sub>-Emission ermöglichte (Druckrate 0,5 l pro Tag).

Es wurde jeweils eine Klebefalle in alle Isolierboxen, sowie eine in den Untersuchungsraum aufgehängt. Dafür wurden die in den Boxen befindlichen Infusionskräne benutzt, welche aus dem Vorraum aus zu bedienen waren. So war die Klebefalle zur Entfernung von Fliegen oder zum Tausch leicht zugänglich, indem dafür der Kran einfach heruntergefahren wurde. Gleichzeitig konnte man in der Zwischenzeit die Fallen in einer sicheren Höhe verwahren, welche für die Patienten mit Sicherheit nicht zu erreichen war. Die Platzierung der verschiedenen Fallen ist in Abb. 1 nochmal veranschaulicht.

Die Fallen wurden etwa im wöchentlichen Rhythmus (6–9 Tage) kontrolliert und entleert (Insgesamt 17 x innerhalb des genannten Zeitraums). Einerseits wurden jedes Mal die Fangbeutel in den BG-Sentinel Fallen ausgetauscht. Sie wurden unmittelbar nach Entfernung vom Fangrohr geschlossen und in Plastikbehälter gelegt. Anschließend wurde wieder ein neuer Fangbeutel installiert. Zusätzlich wurde durch das Ablesen des Manometers auch die CO<sub>2</sub>-Zufuhr kontrolliert. Bei Leerlaufen einer Flasche konnte man dies am Druckabfall erkennen. In so einem Fall wurden die Flasche durch eine neue ersetzt. Die Plastikbehälter mit den beinhalteten Fangbeuteln wurden auf -20 °C eingefroren, anschließend wurde jeder Fang in Röhrchen umgefüllt und bis zur Untersuchung weiterhin auf -20 °C aufbewahrt.

Andererseits wurden im Rahmen derselben Kontrollen von den Klebefallen die Fliegen mittels Pinzette entnommen und jeweils einzeln in Röhrchen verbracht. Diese wurden bis zur Untersuchung ebenfalls auf -20 °C gelagert.



**Abbildung 1:** Skizze von der Isolierstation und dem dazugehörigen Untersuchungsraum, Platzierung der verschiedenen Fallen; roter Kreis = BG-Sentinel Fallen, blaues Kreuz = originale Platzierung der Klebefallen, grünes Kreuz = Position der Klebefallen nach Umhängen.

## 4.2 Morphologische Analyse

Die morphologische Analyse erfolgte mit einem Nikon<sup>®</sup> SMZ1270 Stereomikroskop. Jeder Fang wurde in eine Petrischale entleert und die gefangenen Insekten wurden mittels Stereomikroskop gemustert. Ebenfalls wurden im Rahmen dieser Untersuchung mithilfe des Computerprogrammes „NIS Elements D“ Fotos von jedem Insekt aus verschiedenen Richtungen angefertigt. Anschließend wurden die Insekten jeweils in Eppendorf Tubes überführt, wobei innerhalb eines Fanges morphologisch idente Insekten in ein gemeinsames Gefäß sortiert wurden. Die Tubes wurden mit I001 beginnend fortlaufend nummeriert. Die Eppendorf Tubes wurden bis zur DNA-Extraktion auf -80 °C gelagert.

Mit den Klebefallen gefangenen Exemplaren wurde analog vorgegangen. Die Fliegen wurden einzeln mittels Stereomikroskop betrachtet und abfotografiert. Nachfolgend wurden sie einzeln in Eppendorf Tubes verbracht und auf -80 °C runtergekühlt.

Anhand dieser Untersuchung wurde eine vorläufige Liste erstellt, welche der gefangenen Insekten tatsächlich Vektoren darstellen.

### 4.3 Molekulare Analyse

#### 4.3.1 DNA-Extraktion

Für die DNA-Extraktion wurde das DNeasy® Blood & Tissue Kit von Qiagen verwendet. Zunächst wurde zu den Insekten in die Eppendorf Tubes jeweils ein Ceramic Bead (Precelly Ceramic Kit®) mit 2,8 mm Durchmesser hinzugegeben. Anschließend wurden mithilfe des Tissue Lyser II von der Firma QIAGEN® die Tubes drei Minuten lang auf hoher Geschwindigkeit geschüttelt, um hiermit das Gewebe zu homogenisieren. Daraufhin wurden in jedes Eppendorf Tube 20 µl Proteinkinase K pipettiert, der Inhalt mittels Vortexer gründlich durchmischt und über Nacht alle Tubes in einem Thermomixer® bei 56 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Tubes für 15 Sekunden gevortext und anschließend kurz abzentrifugiert. Nachfolgend wurden jeweils 200 µl Buffer AL und 200 µl 99%iges Ethanol dazu pipettiert und danach gut mittels Vortexer durchmischt. Anschließend wurde der gesamte Inhalt (bis auf die Ceramic Beads) der einzelnen Eppendorf Tubes jeweils in ein Filtergefäß, sog. DNeasy® Minispin column umgefüllt, welches selbst in ein 2 ml Collection Tube platziert worden ist.

Nachdem all die Gefäße bei 6010 g eine Minute lang zentrifugiert wurden, wurden die Collection Tubes mit der sich darin ansammelnden Flüssigkeit verworfen. Die Filtergefäße wurden mit neuen Collection Tubes versehen. Anschließend wurden in jedes Filtergefäß jeweils 500 µl Buffer AW1 pipettiert, und erneut bei 6010 g eine Minute lang zentrifugiert. Die Collection Tubes mit der durchgefilterten Flüssigkeit wurden wiederum entsorgt, die Filtergefäße in neue Collection Tubes gesteckt und jeweils mit 500 µl Buffer AW2 versehen. Daraufhin wurden die Gefäße bei 18407 g drei Minuten lang zentrifugiert. Die Collection Tubes wurden erneut samt Flüssigkeitsinhalt verworfen.

Im Anschluss wurden neue Eppendorf Tubes mit der jeweiligen Probennummer und zusätzlich mit dem Buchstaben „A“ beschriftet. Die Filtergefäße wurden in diese Eppendorf Tubes gesteckt, es wurden jeweils 100 µl Buffer AE hinzu pipettiert, und nach einer Inkubationszeit von eine Minute bei 6010 g für eine Minute zentrifugiert. Danach wurden die Filtergefäße entfernt und die Eppendorf Tubes verschlossen. Nachfolgend wurden die Filtergefäße in neue Eppendorf Tubes umgesteckt, welche zuvor mit der jeweiligen Probennummer und einem „B“ versehen worden sind. Erneut wurden jeweils 100 µl Buffer AE in die Filtergefäße pipettiert,

und nach der einminütigen Inkubationszeit bei den schon beschriebenen Einstellungen zentrifugiert. Am Ende wurden die Filtergefäße entsorgt und die Eppendorf Tubes verschlossen. Bis zur Durchführung der PCR-Untersuchungen wurden alle Eppendorf Tubes mit der extrahierten DNA auf -20 °C gelagert.

#### **4.3.2 Kombinierte DNA- und RNA-Extraktion**

Bei den Insekten, welche anhand der morphologischen Analyse in die Vektoren-Gruppe eingeordnet worden sind, wurden sowohl eine DNA- als auch eine RNA-Extraktion mithilfe des Zymo Research ZR-Duet™ DNA/RNA MiniPrep durchgeführt, um diese auch auf RNA-Viren untersuchen zu können.

Ähnlich wie in Kapitel „DNA-Extraktion“ beschrieben, wurden zunächst zu den Insekten in die Eppendorf Tubes jeweils zwei Ceramic Beads (Precelly Ceramic Kit®) von 2,8 mm Durchmesser und 200 µl mehrfach destilliertes Wasser hinzugegeben. Anschließend wurden mithilfe des Tissue Lyser II von der Firma QIAGEN® die Tubes drei Minuten lang auf maximaler Geschwindigkeit homogenisiert. Als nächstes wurden 100 µl vom homogenisierten Gewebe in einen sog. QIAShredder (QIAGEN®) gegeben, welches ein spezielles Filtergefäß mit einem dazugehörigen Collection Tube darstellt. Nachdem 300 µl DNA/RNA Lysis Buffer hinzugefügt wurden, wurde es anschließend bei 13000 rpm für zwei Minuten zentrifugiert. Die durchfiltrierte und im Collection Tube aufgefangene Flüssigkeit wurde nachfolgend in einen Zymo-Spin™ IIC Column mit einer dazugehörigen Collection Tube umgefüllt und erneut bei 12000 g für 60 Sekunden zentrifugiert. Für die RNA-Extraktion wurde die im Collection Tube aufgefangene Flüssigkeit, für die DNA-Extraktion wurde die durch das Filtergefäß aufgehaltene Flüssigkeit weiterverwendet.

RNA-Extraktion: Zur durchfiltrierten Flüssigkeit wurden 320 µl 99%iges Ethanol hinzugefügt und mittels Pipette gut vermischt. Das gesamte Gemisch wurde anschließend in einen Zymo-Spin™ IIC Column mit einem dazugehörigen Collection Tube umgefüllt und bei 12000 g für 60 Sekunden zentrifugiert. Die Collection Tubes mit der durchgefilterten Flüssigkeit wurden entsorgt. Nachfolgend wurden jeweils 400 µl RNA Prep Buffer in die Columns pipettiert und erneut bei 12000 g für 60 Sekunden zentrifugiert. Im Anschluss daran wurden jeweils 700 µl

RNA Wash Buffer in die Columns pipettiert, erneut bei 12000 g für 30 Sekunden zentrifugiert und die durchfiltrierte Flüssigkeit verworfen. Daraufhin wurden diese zwei Schritte mit diesmal 400 µl RNA Wash Buffer wiederholt. Darauffolgend wurde der Zymo-Spin™ IIC Column auf einen neuen Collection Tube gesetzt, wiederum bei 12000 g, diesmal für zwei Minuten zentrifugiert und anschließend der Collection Tube mit der sich darin angesammelten Flüssigkeit verworfen. Im nächsten Schritt wurden die Zymo-Spin™ IIC Columns auf jeweils eine leere Eppendorf Tube gesetzt, 25 µl DNase und RNase-freies Wasser dazu pipettiert, eine Minute lang inkubiert und anschließend bei 10000 g für 30 Sekunden zentrifugiert. Die so eluierte RNA wurde weiterhin auf -80 °C verwahrt.

DNA-Extraktion: Für die DNA-Reinigung wurden die Zymo-Spin™ IIC Columns in neue Collection Tubes gesetzt. Dieselben Schritte wie oben beschrieben wurden - diesmal mit DNA Prep und DNA Wash Buffer - durchgeführt. Anschließend wurden die Säulen jeweils in einen leeren Collection Tube gesetzt, bei 12000 g für zwei Minuten zentrifugiert und die Collection Tube samt Flüssigkeit entsorgt. Die Säulen wurden in neue Eppendorf Tubes gesetzt, jeweils 50 µl Buffer AE hinzugegeben, für zwei bis fünf Minuten inkubiert und im Anschluss auf höchster Geschwindigkeit für 30 Sekunden abzentrifugiert. Die Eppendorf Tubes wurden verschlossen und zusätzlich zur Probennummer jeweils mit dem Buchstaben „A“ versehen. Die letzten Schritte wurden mit Eppendorf Tubes mit dem Buchstaben „B“ beschriftet wiederholt, um so einen zusätzlichen Eluat zu erhalten. Die so gewonnenen DNA-Proben wurden bis zur weiteren Untersuchung auf -80 °C aufbewahrt.

### **4.3.3 COI-Gen und DNA-Barcoding**

Unter DNA-Barcoding versteht man die Sequenzierung eines bestimmten Fragments des sog. mitochondrialen COI-Gens (auch „DNA-Barcode“ genannt) aus einer taxonomisch unbekannt Probe und den anschließenden Abgleich mit einer Gendatenbank, um die Spezies bestimmen zu können (Wilson 2012). Die Abkürzung COI steht für Cytochrom-C-Oxidase-Untereinheit I (Hebert et al. 2003). Die Cytochrom-C-Oxidase ist ein in allen aeroben Zellen auffindbares Enzym, welches an der Atmungskette beteiligt, und somit ein wichtiger Bestandteil des Energiestoffwechsels ist. In eukaryoten Zellen ist die Cytochrom-C-Oxidase in der inneren Membran des Mitochondriums lokalisiert (Capaldi et al. 1983). Durch die

Sequenzunterschiede des COI-Gens wird die Unterscheidung nah verwandter Arten und somit eine Identifizierung ermöglicht (Hebert et al. 2003, Wilson 2012).

#### **4.3.4 PCR**

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Technik zur Amplifikation spezifischer DNA-Segmente. Dabei wird durch zwei spezifische Oligonukleotidprimer ein DNA-Fragment definiert, und mithilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase dieser Abschnitt vervielfältigt. Dieser Prozess besteht im Wesentlichen aus drei Abschnitten, welche viele Male nacheinander wiederholt werden. Im ersten Schritt, der sog. Denaturierung, wird die Lösung auf etwa 94 °C erhitzt, damit sich die DNA-Stränge voneinander trennen können. Danach folgt das sog. Annealing. Dabei wird die Lösung abgekühlt (je nach Primer auf einen Wert zwischen 45°C und 60 °C), damit die DNA-Primer an der Matrize binden können. Die letzte Phase ist die sog. Elongation. Dabei wird die Lösung auf 72 °C erwärmt, damit die DNA-Polymerase bei den Primern am DNA-Strang bindet und einen neuen DNA-Strang synthetisiert. Diese Schritte werden beliebig oft wiederholt, wodurch eine Vielzahl an identen DNA-Doppelsträngen entsteht (Graw 2020). Diese Doppelstränge können dann mittels Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden.

Eine Variante der Polymerasekettenreaktion ist die sog. Real-Time- oder qPCR. Dabei werden Farbstoffe angewendet, die nur an doppelsträngiger DNA binden. Hiermit kann die Bildung der neuen DNA-Strängen computergestützt gemessen werden (Graw 2020). Somit wird es zu einem quantitativen Verfahren.

Um das durchführen zu können, wurde die DNA, wie im vorherigen Kapitel beschrieben, aus den gefangenen Dipteren extrahiert.

#### **4.3.5 PCR-Protokoll – LCO/HCO**

Eine PCR mit den Primern LCO und HCO wurde durchgeführt, um einen Abschnitt des oben beschriebenen COI-Gens der Dipteren zu amplifizieren (Sharma und Kobayashi 2014).

Im folgenden Abschnitt werden die Primer, in Tab. 7 das Rezept des Mastermixes und in Tab. 8 die Temperaturkurve angeführt.

Forward Primer: LCO1490: 5'- AGCCATTTAATCGCGACAA - 3' 10 pmol/μl

Reverse Primer: HCO2198: 5'- GGATGTCCAAAAAATCAAAATAAATGTT - 3' 10 pmol/μl

Da die PCRs in mehreren Runden mit verschiedener Anzahl an Proben durchgeführt wurden, wurde in der Mastermix-Tabelle die Menge für zehn Tubes vereinfacht angegeben.

Die PCRs für das Barcoding-Gen wurden mit einem Biometra Trio Thermocycler der Firma Analytik-Jena® durchgeführt.

**Tabelle 7:** Mastermix-Rezept (LCO/HCO).

<b>Mastermix</b>		
<b>Reagens</b>	<b>Mengen (μl)</b>	
	<b>für ein Tube</b>	<b>für 10 Tubes</b>
<b>Wasser</b>	12,175	121,75
<b>5X Green Reaction Buffer</b>	5	50,0
<b>dNTP's (25mM) (Nucleotide)</b>	0,2	20
<b>TaqPolymerase (GoTaq) 5u/μl</b>	0,125	1,25
<b>Primer (10pmol/μl)</b>	2,5	25,0
<b>Primer (10pmol/μl)</b>	2,5	25,0
<b>Template</b>	2,5	10 x 2,5
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>25</b>	<b>250</b>

**Tabelle 8:** Temperaturkurve (LCO/HCO).

<b>Temperaturkurve</b>		
<b>95 °C</b>	2 min	Initiale Denaturierung
<b>94 °C</b>	1 min	40 x
<b>45 °C</b>	1 min	
<b>72 °C</b>	1 min	
<b>72 °C</b>	5 min	finale Elongation
<b>15 °C</b>	Lagerung	

Das erwartete Produkt beträgt ca. 708 bp.

Anschließend wurde, wie in Kapitel 4.3.11 beschrieben, eine Gelelektrophorese durchgeführt.

#### 4.3.6 PCR-Protokoll – Lepidoptera

Um den Anteil des erfolgreich vervielfachten, zur Sequenzierung geeigneten Barcoding-Gens zu erhöhen, wurden bei allen Proben noch zusätzlich PCRs mit einem anderen Primer-Paar durchgeführt, welche ebenfalls einen Teil des schon genannten COI-Gens binden. Anbei werden diese, das Mastermix-Rezept, sowie die angewendete Temperaturkurve aufgeführt (Tab. 9 und 10).

Forward Primer: Lep-F1: 5' - ATTCAACCAATCATAAA- 3' 10 pmol/μl

Reverse Primer: Lep-R1: 5' -TAAACTTCTGGATGTCCAAAAA- 3' 10 pmol/μl

Da die PCRs in mehreren Runden mit verschiedener Anzahl an Proben durchgeführt wurden, wurde in der Mastermix-Tabelle vereinfacht die Menge für zehn Tubes angegeben.

**Tabelle 9:** Mastermix-Rezept (Lep).

<b>Mastermix</b>		
<b>Reagens</b>	<b>Mengen (μl)</b>	
	<b>für ein Tube</b>	<b>für 10 Tubes</b>
<b>Wasser</b>	13,675	136,75
<b>5X Green Reaction Buffer</b>	5	50,0
<b>dNTP's (25mM) (Nucleotide)</b>	0,2	20
<b>TaqPolymerase (GoTaq) 5u/μl</b>	0,125	1,25
<b>Forward primer (10pmol/μl)</b>	1	10
<b>Reverse primer (10pmol/μl)</b>	1	10
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	1	10
<b>Template</b>	3	10 x 3
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>25</b>	<b>250</b>

**Tabelle 10:** Temperaturkurve (Lep).

<b>Temperaturkurve</b>		
<b>94 °C</b>	<b>2 min</b>	<b>Initiale Denaturierung</b>

94 °C	1 min	
45 °C	90 sek	6 x
72 °C	75 sek	
94 °C	5 min	
51 °C	90 sek	36 x
72 °C	75 sek	
72 °C	5 min	Finale Extension
4 °C	Lagerung	

Das erwartete Produkt beträgt ca. 648 bp.

Diese PCR wurde ebenfalls mit dem Biometra Trio Thermocycler der Firma Analytik-Jena® durchgeführt. Das weitere Vorgehen wird in Kapitel 4.3.11 beschrieben.

#### 4.3.7 PCR-Protokoll für Flaviviren

Alle Insekten, die im Rahmen der morphologischen Untersuchung als Vektor eingestuft worden sind, wurden mittels sog. Nested-PCR auf Flaviviren untersucht. (Insgesamt zwölf Proben, welche in Tab. 21 ersichtlich sind). Die Nested-PCR ist eine Modifikation der klassischen PCR. Darunter versteht man die Verwendung von zwei Primer-Paaren in zwei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen. Aus der ersten PCR-Reaktion resultierende Amplikons werden als Matrize für ein zweites Primer-Paar und einen zweiten Amplifikationsschritt verwendet. Das zweite Primer-Paar ist so gestaltet, dass dieses sich an eine Sequenz - innerhalb der durch den ersten Primer-Paar amplifizierten Sequenz - anlagert. So werden sowohl die Sensitivität, als auch die Spezifität der Methode verbessert (Carr et al. 2010, McPherson 2021). Die verwendeten Primer und Protokolle werden im Folgenden aufgelistet.

Da die Flaviviren zu den RNA-Viren gehören, muss als erstes durch eine Reverse Transkriptase (RT) vom RNA-Strang ein komplementärer DNA-Strang gebildet werden. Im nächsten Schritt wird eine konventionelle PCR durchgeführt, wofür der im vorherigen Schritt gebildete komplementäre DNA-Strang als Matrize dient (Rio 2014).

In diesem Fall wurde ein Protokoll mit einem entsprechenden Mastermix benutzt, welches es ermöglicht, die oben erwähnten zwei Schritte in einer PCR durchführen zu können (sog. One-Step PCR). Dies stimmt mit dem ersten Schritt der oben beschriebenen Nested-PCR überein.

Folgende Primer wurden benutzt:

Forward Primer: NS51+: 5'- GCATCTAYAWCAYNATGGG- 3' 100 pmol/μl

Reverse Primer: NS51-: 5'- CCANACNYNRTTCCANAC - 3' 100 pmol/μl

Um einen gewissen Pipettierpuffer zu haben, wurde die Menge des Mastermixes auf 14 Proben errechnet. Das benutzte Mastermixrezept und die verwendete Temperaturkurve werden in Tab. 11 und 12 aufgeführt.

**Tabelle 11:** Mastermix-Rezept (Flaviviren 1).

<b>Mastermix</b>		
<b>Reagens</b>	<b>Mengen (μl)</b>	
	<b>für ein Tube</b>	<b>für 14 Tubes</b>
<b>Wasser</b>	14,9	208,6
<b>5X OneStep RT-PCR Buffer</b>	5	70,0
<b>dNTP's (10mM)</b>	1	14
<b>OneStep RT-PCR Enzyme Mix</b>	1	14
<b>NS51+ (100 pmol/μl)</b>	0,3	4,2
<b>NS51- (100pmol/μl)</b>	0,3	4,2
<b>Template</b>	2,5	14 x 2,5
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>25</b>	<b>250</b>

**Tabelle 12:** Temperaturkurve (Flaviviren 1).

<b>Temperaturkurve</b>		
<b>50 °C</b>	45 min	Retro-Transkription
<b>94 °C</b>	15 min	Initiale Denaturierung
<b>94 °C</b>	1 min	40 x
<b>54 °C</b>	4 min	
<b>72 °C</b>	1 min 15 sek	
<b>72 °C</b>	5 min	finale Elongation
<b>4 °C</b>	Lagerung	

Das erwartete Produkt beträgt 1010 bp.

Folgend wird das zweite verwendete Primer-Paar, bzw. in Tab. 13 und 14 das Mastermix-Rezept sowie die Temperaturkurve des zweiten PCR-Schrittes aufgelistet. In diesem Fall wurde ebenfalls eine für 14 Reaktionen genügende Mastermix-Menge errechnet.

Forward Primer: NS52+: 5'- GCNATNTGGTWTYATGTGG - 3' 10 pmol/μl

Reverse Primer: NS52-: 5'- CATRTCTTCNGTNGTCATCC - 3' 10 pmol/μl

Tabelle 13: Mastermix-Rezept (Flaviviren 2).

<b>Mastermix</b>		
<b>Reagens</b>	<b>Mengen (µl)</b>	
	<b>für ein Tube</b>	<b>für 14 Tubes</b>
<b>Wasser</b>	14,675	205,45
<b>5X Green Reaction Buffer</b>	5	70,0
<b>dNTP's (25mM) (Nucleotide)</b>	0,2	2,8
<b>TaqPolymerase (GoTaq) 5u/µl</b>	0,125	1,75
<b>NS52+(10pmol/µl)</b>	2	28,0
<b>NS52- (10pmol/µl)</b>	2	28,0
<b>Template</b>	1	14 x 1
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>25</b>	<b>250</b>

Tabelle 14: Temperaturkurve (Flaviviren 2).

<b>Temperaturkurve</b>		
<b>94 °C</b>	5 min	initiale Denaturierung
<b>94 °C</b>	1 min	40 x
<b>50 °C</b>	3 min	
<b>72 °C</b>	1 min	
<b>72 °C</b>	5 min	finale Elongation
<b>15 °C</b>	Lagerung	

Diese PCRs wurden ebenfalls mit dem Biometra Trio Thermocycler der Firma Analytik-Jena® durchgeführt.

Anschließend wurde wie in Kapitel 4.3.11 beschrieben eine Gelelektrophorese durchgeführt.

#### 4.3.8 PCR-Protokoll für EqHV

Die Vektoren wurden mittels One-Step RT-qPCR auf EqHV getestet. Hierfür wurde das NEB Luna Universal Probe 1-step RT-qPCR Kit von der Firma BioLabs® benutzt. Die Reaktionen wurden jeweils als Triplikat durchgeführt, um im Nachhinein jeweils einen Durchschnittswert errechnen zu können. So waren mit den zwölf Proben, der Positivkontrolle und dem NTC insgesamt 42 PCR-Reaktionen durchzuführen. Um einen gewissen Pipettierpuffer zu haben, wurde die Menge des Mastermixes für 46 Reaktionen errechnet und zusammengemischt.

Anschließend wurden jeweils 12 µl Mastermix und 3 µl Probe in eine 96 Well-Platte pipettiert. In Tab. 15 und 16 sind das Rezept des Mastermixes und die Temperaturkurve angeführt. Folgende Primer wurden verwendet:

Forward Primer: 5136-F: 5'- AGGCYAARGCTCCCAGCAA-3'

5138-F: 5'- GCTAARGCTCCCAGCAARGA - 3'

Reverse Primer: 5138-R: 5'- GGGYGTTGGAGTHCGGTT - 3'

Die PCRs wurden mit einem qTOWER<sup>3</sup>G Thermocycler der Firma Analytik-Jena<sup>®</sup> durchgeführt und mit dem Computerprogramm „qPCRsoft 4.1“ ausgewertet, welches ebenfalls von der Firma Analytik-Jena<sup>®</sup> entwickelt worden ist.

**Tabelle 15:** Mastermix-Rezept (EqHV).

<b>Mastermix</b>		
<b>Reagens</b>	<b>Mengen (µl)</b>	
	<b>für eine Reaktion</b>	<b>für 46 Reaktionen</b>
<b>Wasser</b>	0,45	20,7
<b>Luna Universal Probe One-Step Reaction Mix (20x)</b>	7,5	345
<b>Luna Warmstart RT Enzyme Mix (20x)</b>	0,75	34,5
<b>Probe Hepaci-5162-FAM (20x)</b>	0,3	13,8
<b>Forward primer 5136-F (20x)</b>	0,9	41,4
<b>Forward primer 5138-F (20x)</b>	0,9	41,4
<b>Reverse primer 5212-R (20x)</b>	1,2	55,2
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>12</b>	<b>552</b>

**Tabelle 16:** Temperaturkurve (EqHV).

<b>Temperaturkurve</b>		
<b>55 °C</b>	10 min	Reverse Transkription
<b>95 °C</b>	2 min	RT inactivate, Poly activate
<b>95 °C</b>	10 sek	
<b>56 °C</b>	20 sek	45 x
<b>60°C</b>	30 sek	

#### 4.3.9 PCR-Protokoll für EqPV

Die Vektoren wurden ebenfalls mittels qPCR auf EqPV getestet. Sowohl die A-, als auch die B-Elutionen der DNA-Extraktion wurden untersucht. Hier wurden die Reaktionen auch als Triplikat durchgeführt. So waren mit den 24 Proben (12 Insekten, davon Probe A und B), der Positivkontrolle und dem NTC auf insgesamt 78 PCR-Reaktionen durchzuführen. Um wieder einen gewissen Pipettierpuffer zu haben, wurde die Menge des Mastermixes auf 86 Reaktionen gerechnet und zusammengemischt. Anschließend wurden jeweils 12 µl Mastermix und 3 µl Probe in eine 96 Well-Platte pipettiert. In Tab. 17 und 18 sind das Rezept des Mastermixes und die Temperaturkurve angeführt. Folgende Primer wurden verwendet:

Forward Primer: 5' - AAGATATTGCCGCCATTTGAA - 3'

Reverse Primer: 5' - CTGAAAAGGCATTCCGTCAG - 3'

Die PCRs wurden hier ebenfalls mit einem qTOWER3G Thermocycler der Firma Analytik-Jena® durchgeführt und mit dem Programm „qPCRsoft 4.1“ ausgewertet.

Tabelle 17: Mastermix-Rezept (EqPV).

<b>Mastermix</b>		
<b>Reagens</b>	<b>Mengen (µl)</b>	
	<b>für ein Tube</b>	<b>für 86 Tubes</b>
<b>Wasser</b>	5,65	485,90
<b>10 × PCR buffer B2 (Solis Biodyne)</b>	1,5	129,00
<b>25 mM MgCl<sub>2</sub></b>	2,1	180,60
<b>dNTP mix (Solis Biodyne)</b>	1,5	129,00
<b>HotFirePol (5 U, Solis Biodyne)</b>	0,20	17,20
<b>Forward primer F1</b>	0,38	32,25
<b>Reverse primer R1</b>	0,38	32,25
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>12</b>	<b>1032</b>

Tabelle 18: Temperaturkurve (EqPV).

<b>Temperaturkurve</b>	
<b>95 °C</b>	<b>15 min</b>

<b>95 °C</b>	15 sek	45 x
<b>60 °C</b>	1 min	

#### 4.3.10 PCR Protokoll für *S. equi ssp. equi*

Auf den Druse-Erreger wurden nicht nur die Vektoren, sondern auch alle Fliegen untersucht, welche anhand der morphologischen Untersuchung aussortiert worden sind. So wurden insgesamt 75 Proben auf *S. equi ssp. equi* (SEE) untersucht. Zwölf Vektoren plus 63 Fliegen. In Tab. 19 ist der Mastermix-Rezept mit für 87 Reaktionen ausreichende Mastermix-Menge aufgeführt, um einen gewissen Pipettierpuffer zu haben. Folgend werden sowohl die verwendeten Primer, als auch die angewendete Temperaturkurve (Tab. 20) aufgeführt. Die PCRs wurden in diesem Fall mit einem Mastercycler „nexus gradient“ der Firma Eppendorf® durchgeführt.

Forward Primer: SEE 1: 5'- TGCATAAAGAAGTTCCTGTC - 3'

Reverse Primer: SEE 2: 5'- GATTCGGTAAGAGCTGACG - 3'

**Tabelle 19:** Mastermix-Rezept (SEE).

<b>Mastermix</b>		
<b>Reagens</b>	<b>Mengen (µl)</b>	
	<b>für ein Tube</b>	<b>für 87 Tubes</b>
<b>Wasser</b>	9	783
<b>DreamTaq Green PCR Master Mix</b>	12,5	1087,5
<b>SEE 1</b>	0,5	43,5
<b>SEE 2</b>	0,5	43,5
<b>Template</b>	2,5	75 x 2,5
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>25</b>	

**Tabelle 20:** Temperaturkurve (SEE).

<b>Temperaturkurve</b>		
<b>92 °C</b>	2 min	Initiale Denaturierung

92 °C	1 min	
58 °C	1 min	30 x
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	finale Elongation
15 °C		Lagerung

Das erwartete Produkt beträgt ca. 679 bp.

#### 4.3.11 Herstellung des Gels und Gelelektrophorese (Barcoding und Flaviviren)

Für die Barcoding- und Flaviviren-PCRs wurde folgendes Rezept und Methode verwendet: Als erstes wurden 1,8 g Agarose abgewogen. Dieses wurde in einen Glaskolben verbracht und in 100 ml TBE gelöst. Der Glaskolben wurde in der Mikrowelle aufgekocht. Anschließend wurden 4,2 µl Midori Green hinzugefügt und durch gründliches Schwenken miteinander vermengt. Das fertige Gel wurde in vorgefertigte Kunststoff-Kammer gegossen, zwei Kämme eingefügt und ausgehärtet. Im Anschluss wurde die Gelplatte aus der Kunststoff-Kammer sowie die Kämme entfernt. Bis zur Verwendung wurden die Platten in Frischhaltefolie verpackt im Kühlschrank verwahrt.

Die Gelplatte wurde in eine mit TBE-Pufferlösung gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. In die erste Tasche wurde der bp-Leiter, in die nächsten Taschen jeweils 5 µl von den jeweiligen Proben pipettiert. Bei einer Spannung von 120 V lief die Gelelektrophorese unter kontinuierlicher Beaufsichtigung etwa 60 Minuten. Nach der Gelelektrophorese wurde die Gelplatte in einen UV-Lichtscanner (DNR Bio-Imaging Systems von der Firma genXpress®) verbracht, um die Banden sichtbar zu machen.

#### 4.3.12 Herstellung des Gels und Gelelektrophorese (*S. equi ssp. equi*)

Bei der Untersuchung auf *S. equi ssp. equi* wurde eine Methode angewendet, die von der oben beschriebenen geringgradig abweicht: In diesem Fall wurden in 100 ml TBE-Pufferlösung 2 g Agarose aufgelöst, aber kein Midori Green hinzugefügt. Darüber hinaus wurde die Gelplatte auf identer Weise hergestellt wie in Kapitel 4.3.11 beschrieben.

Anschließend wurde die Gelplatte in eine mit TBE-Pufferlösung gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. In die erste und letzte Tasche wurde der bp-Leiter, in die

nächsten Taschen jeweils 8 µl von den jeweiligen Proben pipettiert. Bei einer Spannung von 220 V lief die Gelelektrophorese 60 Minuten. Nach der Elektrophorese wurde die Gelplatte für 15 Minuten in eine Ethidiumbromid-Lösung (mit einer Konzentration von 2 mg/ml) eingelegt und anschließend in einen UV-Lichtscanner (ChemiDoc MP Imaging System von der Firma Bio-Rad®) verbracht, um die Banden sichtbar zu machen.

#### **4.3.13 Sequenzierung**

Alle Proben, welche im Rahmen der PCR Untersuchung auf das Barcoding-Gen eine Bande in der Gelelektrophorese zeigten, wurden zur Sequenzierung zur Firma LGC Genomics GmbH nach Deutschland geschickt.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Morphologische Analyse

Bereits bei der Untersuchung mittels Stereomikroskop konnten anhand der Morphologie 90 aus insgesamt 175 Proben zu einer Unterordnung, Familie oder Gattung zugeordnet werden. Auch fünf Spinnen konnten in der Probensammlung gefunden werden, welche aber in die Klasse der Spinnentiere (Arachnida), und nicht in die Klasse der Insekten gehören. Diese werden in dieser Arbeit nicht weiter diskutiert.

Von den 90 Insekten wurden 31 als Schmetterlingsmücken erkannt. In Abb. 2 ist ein solches Exemplar ersichtlich, und ist an den schmetterlingsartigen Flügeln und dem komplett behaarten Körper gut zu erkennen. Außerdem konnten sieben Proben als Stechmücken, 46 als Fliegen (davon vier als Stechfliegen) identifiziert werden. Wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, besitzen Stechfliegen einen schlanken, nach vorne stehenden Stechrüssel, anhand dessen sie gut zu erkennen sind. Das in Abb. 3 ersichtliche Exemplar (und ein weiteres Tier) konnten aufgrund des Stechrüssels und den charakteristischen schwarzen Flecken auf dem Bauch als Wadenstecher (*Stomoxys calcitrans*) identifiziert werden.



Abbildung 2: Stereomikroskopische Aufnahme einer Schmetterlingsmücke von ventral.



**Abbildung 3:** Stereomikroskopische Aufnahme einer *Stomoxys calcitrans* Fliege oder Wadenstecher von ventral.

Anhand dieser Untersuchung wurden die gefangenen Dipteren als „Vektor“ oder „nicht Vektor“ eingeordnet. Es wurden alle Stechmücken (Culicidae), Stechfliegen (*Stomoxys*) und sandmückenartigen Schmetterlingsmücken (Psychodidae) als Vektor eingestuft. Die Stechmücken wurden anschließend anhand spezifischer morphologischer Merkmale auch bis auf Artniveau mithilfe des Schlüssels von Becker et al. 2010 bestimmt. Die genaue Artbestimmung der Stechmücken bedarf viel Erfahrung und wurde von Experten mit entsprechender Ausbildung durchgeführt. Abb. 4 und 5 stellen zwei Beispielbilder von Exemplaren zwei verschiedener Stechmückengattungen dar. So wurde eine vorläufige Vektoren-Gruppe mit insgesamt zwölf Insekten erstellt, welche sich aus vier Stechfliegen, sieben Stechmücken (davon sechs aus der Gattung *Culex* und eins aus der Gattung *Anopheles*) und einer sandmückenartigen Schmetterlingsmücke zusammenstellte. In Tab. 22 im Anhang in der Spalte „Morph. An.“ sind die morphologischen Bestimmungen von allen 175 Proben aufgeführt. Bei den Proben, wo diese Zelle leer blieb, konnte keine Zuordnung anhand der Morphologie erfolgen. Die Vektoren-Gruppe ist im nachfolgenden Kapitel in Tab. 21 nochmals zusammenfassend dargestellt.



**Abbildung 4:** Stereomikroskopische Aufnahmen einer Stechmücke aus der Gattung *Anopheles* von lateral (links) und von dorsal (rechts).



**Abbildung 5:** Stereomikroskopische Aufnahme einer männlichen *Culex* spp. von lateral.

## 5.2 Barcoding

Wie in Kapitel 4.3 bereits beschrieben, wurden PCRs mit zwei verschiedenen Primer-Paaren in der Barcode-Region durchgeführt. Bei 49 Proben wurde das gewonnene Genmaterial von den

LCO/HCO PCRs, bei 22 Proben die von den Lepidoptera-PCRs zur Sequenzierung eingeschickt. Bei elf Proben wurden Produkte von beiden PCRs sequenziert. So wurden von den insgesamt 175 Proben 82 zur Sequenzierung geschickt. Die restlichen Proben ergaben weder mit dem einen, noch mit dem anderen Primer-Paar eine Bande in der Elektrophorese. So war auch keine Sequenzierung möglich. Von den 82 verschickten Proben konnten acht nicht erfolgreich sequenziert werden. Trotz positiver Banden in der Elektrophorese ist die weitere Analyse auf molekularer Ebene nicht gelungen. Die Barcoding-Ergebnisse von beiden PCRs wurden in Tab. 21 aufgelistet. Der Prozent-Wert deutet auf den Grad der Übereinstimmung mit der Genbank hin. Die ergebnislosen Sequenzierungen wurden mit „nicht erfolgreich“ (n.e.) markiert. Wie oben bereits erläutert, wurde von manchen Proben von beiden PCRs Material zur Sequenzierung eingeschickt. So ergab das Barcoding bei einer der Proben zwei verschiedene Arten als Ergebnis. Dafür ist womöglich eine Kontamination der Probe verantwortlich. Dieses wurde ebenfalls in Tab. 22 aufgeführt.

Die Sequenzierungsergebnisse in der Vektoren-Gruppe waren wie folgt: Bei vier Proben wurde die morphologisch bestimmte Art mittels Sequenzierung bestätigt. I009 als *Culex pipiens* s.l., I033 als *Anopheles maculipennis* s.l., I048 und I057 als Wadenstecher (*Stomoxys calcitrans*). Bei weiteren sieben Proben wurde die Gattung bestätigt und es konnte zusätzlich die Art bestimmt werden: I002 und I024, I086, I097, I102 wurden als *Culex pipiens* s.l., I115 und I144 als *Stomoxys calcitrans* identifiziert. Bei der Probe mit der Nummer I063 wurde die Vermutung, dass es eine Sandmücke sei, nicht bestätigt. Nach der Sequenzierung konnte das Insekt zur Familie der Gallmücken (Cecidomyiidae) zugeordnet werden. Weiters konnte mithilfe der Sequenzierung ein neues Mitglied der Vektoren-Gruppe identifiziert werden: Die Probe I150 konnte morphologisch nicht, mittels Barcoding jedoch als *Stomoxys calcitrans* Fliege erkannt werden. In Tab. 21 ist sowohl die vorläufige, als auch die endgültige Vektoren-Gruppe aufgelistet, sowie in Abb. 7 die Verteilung der Vektoren veranschaulicht.

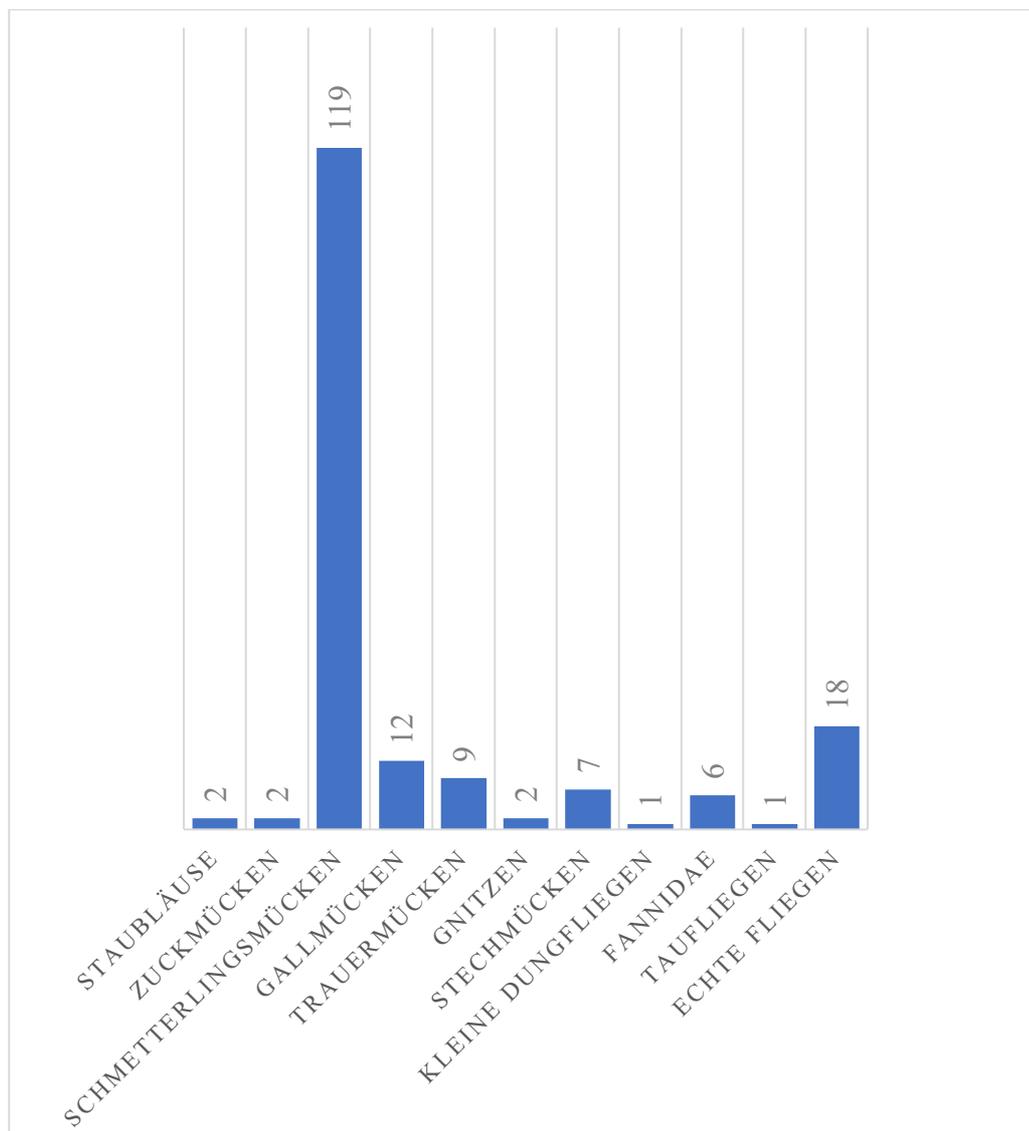
**Tabelle 21:** Vektoren-Gruppe.

<b>Probennummer</b>	<b>Morph. An.</b>	<b>Barcoding</b>
<b>I002</b>	<i>Culex</i> spp., männlich	<i>Culex pipiens</i> s.l.
<b>I009</b>	<i>Culex pipiens/torrentium</i>	<i>Culex pipiens</i> s.l.
<b>I024</b>	<i>Culex</i> spp., männlich	<i>Culex pipiens</i> s.l.

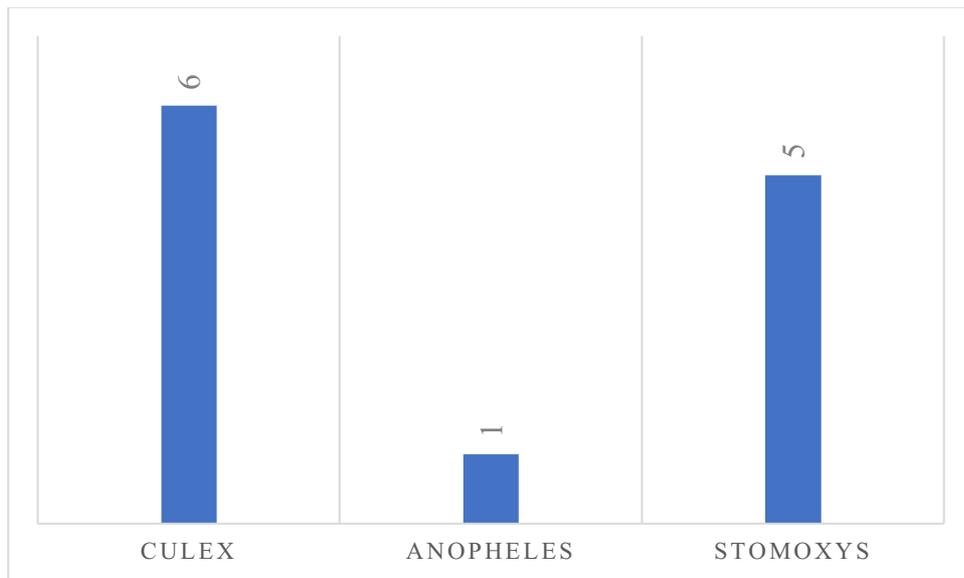
<b>I033</b>	<i>Anopheles maculipennis s.l.</i>	<i>Anopheles maculipennis s.l.</i>
<b>I048</b>	<i>Stomoxys calcitrans</i>	<i>Stomoxys calcitrans</i>
<b>I057</b>	<i>Stomoxys calcitrans</i>	<i>Stomoxys calcitrans</i>
<b>(I063)</b>	Sandmücke?	(Cecidomyiidae)
<b>I086</b>	<i>Culex</i> spp., männlich	<i>Culex pipiens s.l.</i>
<b>I097</b>	<i>Culex</i> spp., männlich	<i>Culex pipiens s.l.</i>
<b>I102</b>	<i>Culex</i> spp., weiblich	<i>Culex pipiens s.l.</i>
<b>I115</b>	Stechfliege	<i>Stomoxys calcitrans</i>
<b>I144</b>	Stechfliege	<i>Stomoxys calcitrans</i>
<b>I150</b>		<i>Stomoxys calcitrans</i>

Außerhalb der Vektoren konnten folgende Insekten bestimmt werden: 33 aus den 175 Proben gehören zu der Familie der Schmetterlingsmücken. 31 davon konnten anhand der makroskopischen Untersuchung zur Familie zugeordnet werden. Innerhalb davon erlaubte das Barcoding eine genauere Identifizierung von elf *Clogmia albipunctata*, eine *Psychoda alternata*, und eine *Psychoda cinerea*, welche alle zur Gruppe der sog. Abortfliegen gehören. 18 der bestimmten Proben gehörten zur Familie der Echten Fliegen (Muscidae). Die fünf Wadenstecher, die bei der Vektoren-Gruppe schon beschrieben worden sind, gehörten ebenfalls zu dieser Familie. Die restlichen 13 konnten mithilfe des Barcodings als Stubenfliegen (*Musca domestica*) erkannt werden. Weitere drei Proben wurden als kleine Stubenfliegen (*Fannia canicularis*) identifiziert, diese Art gehört zur Familie der Fanniidae. Auch eine Taumücke (Drosophilidae), genauer gesagt eine *Drosophila funebris* wurde mittels Barcoding entdeckt. Eine weitere Familie, die bestimmt wurde, ist die Familie der Gallmücken (Cecidomyiidae). Diese wurde schon bei der Vektoren-Gruppe erwähnt, da die Probe I063 ebenfalls zu dieser Familie gehört. Zusätzlich konnten in der „nicht Vektoren“-Gruppe weitere zehn Proben zu dieser Familie zugeordnet werden. Eine davon konnte sogar bis auf Artniveau bestimmt werden, und zwar als *Ledomyia cardui*. Sechs Proben wurden mithilfe des Barcodings in die Familie der Trauermücken (Sciaridae) eingeteilt. Bei vier davon konnte auch die genaue Art definiert werden: *Lycoriella ingenua*, *Lycoriella sativae*, *Bradysia impatiens*, *Bradysia tilicola*. Eine der Proben wurde der Familie der Kleinen Dungfliegen zugeordnet, innerhalb davon in die Gattung *Spelobia*. Der Familie der Gnitzen (Ceratopogonidae) konnten zwei Proben zugeordnet werden. Eine davon konnte nur bis auf Familienniveau bestimmt werden, die andere konnte als *Forcipomyia* sp. identifiziert werden. Eine der Proben konnte bis zur Gruppe der Schizophora bestimmt werden, welche eine Art Sektion in der Ordnung der Dipteren darstellt,

und mehrere verschiedene Familien zusammenfasst. Zwei der Proben konnten als *Limnophyes* sp., und damit als Mitglieder der Familie der Zuckmücken (Chironomidae) identifiziert werden. Darüber hinaus konnten zwei Proben als zwei verschiedene Staublausarten (*Lepinotus reticularis* und *Lepinotus patruelis*) erkannt werden, welche eine weitere Ordnung in der Klasse der Insekten darstellt. In Abb. 6 sind alle identifizierten Insekten auf Familienniveau zusammenfassend aufgelistet.



**Abbildung 6:** Differenzierung der gefangenen Dipteren auf Familienniveau.

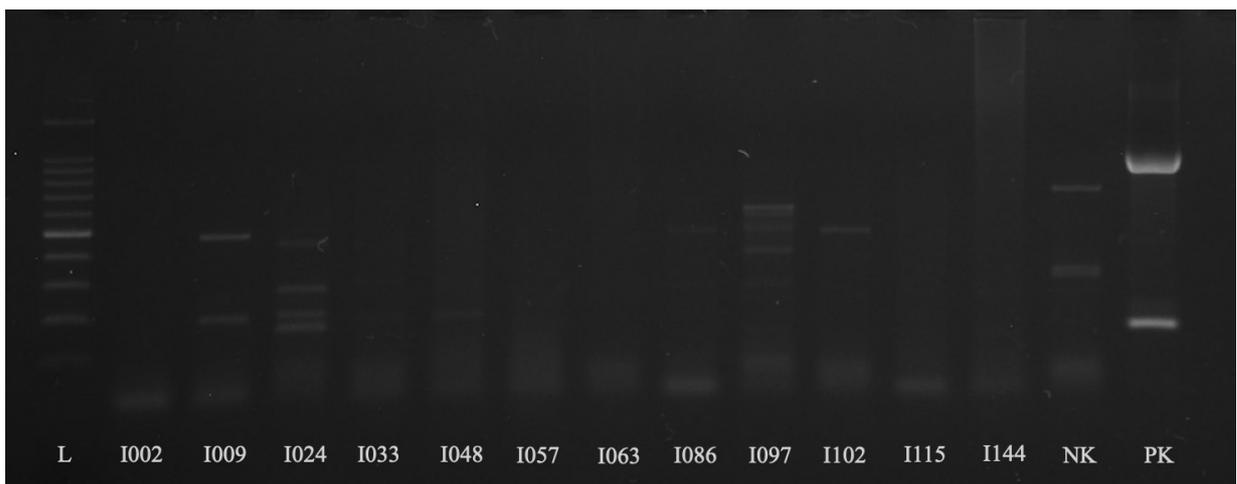


**Abbildung 7:** In der Vektoren-Gruppe vorkommende Gattungen und deren Häufigkeit.

### 5.3 Pathogen-Screening

#### 5.3.1 WNV

Insgesamt zwölf Proben, welche im Rahmen der morphologischen Untersuchung als Vektoren klassifiziert worden sind, wurden auf Flaviviren untersucht. Abb. 8 zeigt das Ergebnis der Gelelektrophorese. Alle untersuchten Proben waren negativ auf Flaviviren.



**Abbildung 8:** Ergebnisse des Flaviviren-PCRs bei den Vektoren. L=Leiter, NK=Negativkontrolle, PK=Positivkontrolle.

### 5.3.2 EqHV

Dieselben zwölf Dipteren (die Vektoren-Gruppe) bzw. die aus denen gewonnene RNA-Probe wurde mittels qPCR auf EqHV untersucht. EqHV war in keinen der Proben nachweisbar.

### 5.3.3 EqPV

Sowohl die A, als auch die B DNA-Eluate der Vektoren-Gruppe wurde mittels qPCR auf EqPV untersucht. In Abb. 9 ist das Ergebnis der qPCR ersichtlich. Ähnlich zur Untersuchung auf EqHV war auch EqPV in keinen der Proben nachweisbar.

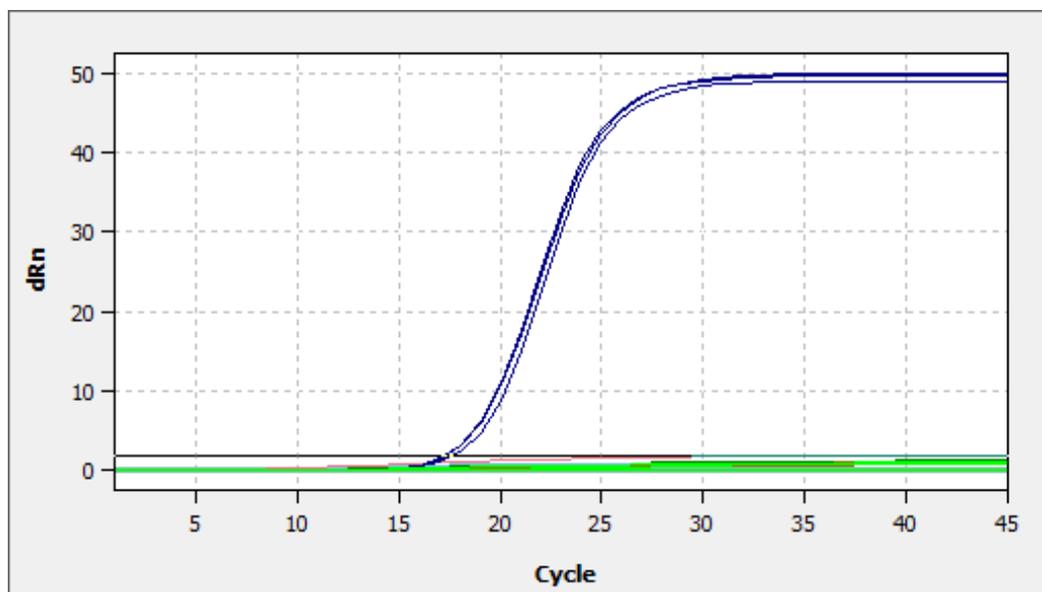
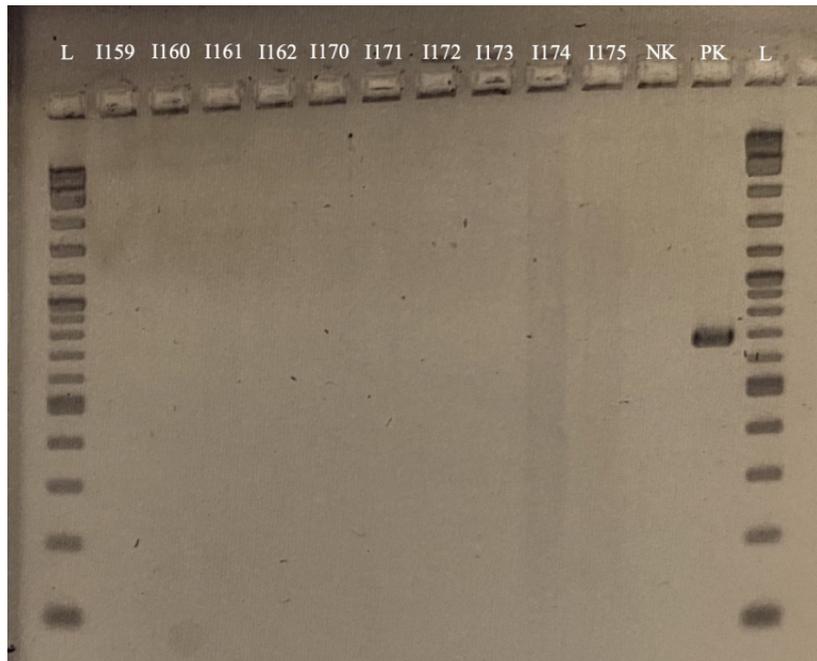


Abbildung 9: Ergebnisse des qPCRs auf EqHV bei der Vektoren-Gruppe. Die dunkelblauen Kurven stellen die Positivkontrollen da, die grünen bzw. roten Linien die getesteten Proben und die Negativkontrollen.

### 5.3.4 SEE

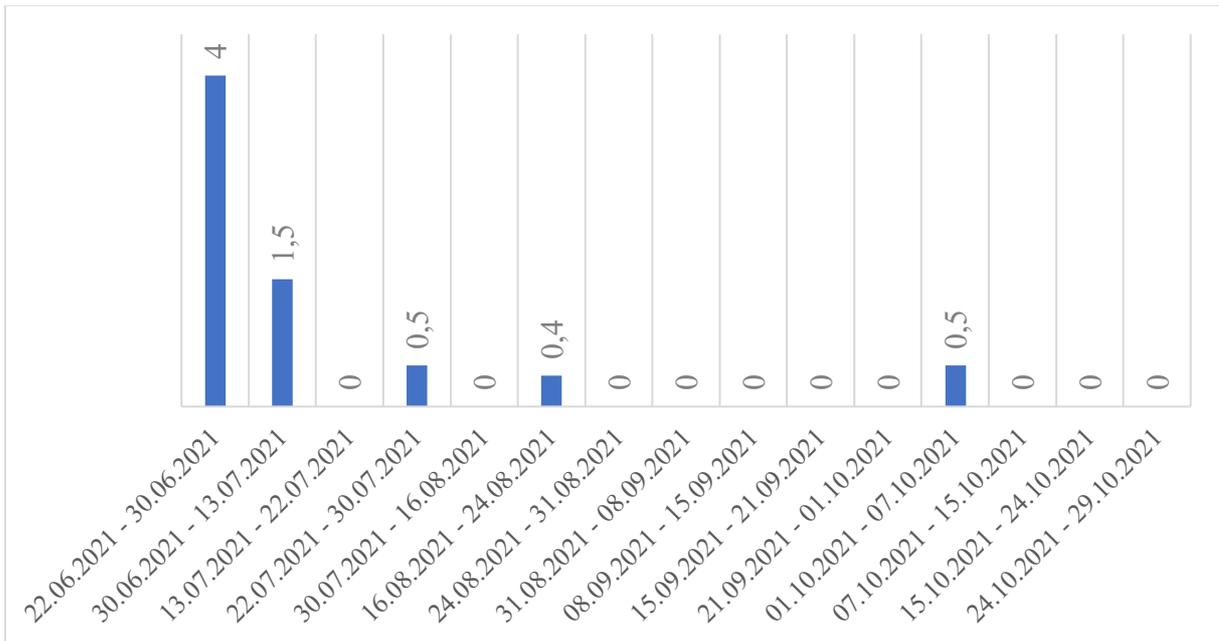
Wie in Kapitel 4.3.10 beschrieben, wurden insgesamt 75 Proben auf SEE mittels PCR untersucht. Alle untersuchten Proben sind negativ ausgefallen. Abb. 10 zeigt das Ergebnis der Elektrophorese bei den Proben I159 bis I175.



**Abbildung 10:** Ergebnisse des PCRs auf SEE bei den Proben von I159–I175. L=bp Leiter, NK=Negativkontrolle, PK=Positivkontrolle.

#### 5.4 Klebefallen

In Abb. 11 ist angeführt, in welchen Zeitabständen die „Entleerung“ der Klebefallen durchgeführt worden ist und der dazugehörige Durchschnittswert, wie viele Exemplare pro Tag in diesen jeweiligen Zeiträumen mittels Klebefallen gefangen worden sind. Im ersten Intervall (22.06.–30.06.) wurden durchschnittlich 4 Dipteren pro Tag mittels Klebefalle gefangen. Im zweiten Intervall (30.06.–13.07.) war dieser Wert bei 1,5 und in den nachfolgenden Intervallen wurde eine noch niedrigere Anzahl an Dipteren gefangen. Die Bedeutung dieser Zahlen und mögliche Ursachen werden im folgenden Kapitel diskutiert.



**Abbildung 11:** Mit Klebefallen durchschnittlich pro Tag gefangene Exemplare.

## 6 Diskussion

Eines der Ziele dieser Arbeit war es, einen Überblick zu erschaffen, welche Arten von Dipteren auf der Isolierstation der Pferdeklinik der Veterinärmedizinischen Universität Wien aufzufinden sind. Insgesamt wurden 175 Proben morphologisch und anschließend mithilfe von molekularen Barcoding analysiert. Von den identifizierten Insekten stellt der Großteil keine Vektoren dar: Staubläuse, Zuckmücken, Gallmücken, Trauermücken, Taufliegen und kleine Dungfliegen. Davon können zwar einige als Parasiten von Pflanzen fungieren, sind aber veterinärmedizinisch gesehen (und daher auch für diese Arbeit) weitgehend unbedeutend (Mullen und Durden 2009). Bei den Schmetterlingsmücken ist eventuell daran zu denken, dass einige Arten, sowohl beim Menschen, als auch beim Tier eine Myiasis verursachen können. Dies ist aber noch weitgehend unerforscht (Zittra et al. 2020a). Sonst stellen die gefangenen Schmetterlingsmücken-Arten keine Vektoren dar und sind aus veterinärmedizinischer Sicht nicht besonders bedeutsam.

Eine der zwei gefangenen Gnitzen konnte nur bis auf Familienniveau identifiziert, aber nicht in eine Gattung eingeordnet werden. Da innerhalb dieser Familie hauptsächlich die Gattung *Culicoides* Vektoren darstellt, lässt sich bei dieser Probe nicht ausschließen, dass es sich um ein Exemplar aus der Gattung *Culicoides* und es somit um einen potenziellen Vektor handelte.

Insgesamt zwölf Proben wurden als „Vektoren“ eingeordnet: fünf Wadenstecher, und sieben Stechmücken. Darunter konnten zwei verschiedene Stechmückenarten bestimmt werden: *Culex pipiens* s.l. und *Anopheles maculipennis* s.l. Beide Arten sind in Österreich heimisch (Zittra et al. 2014). *Cx. pipiens* s.l. ist einer der bedeutendsten Überträger von WNV, aber auch in *An. maculipennis* s.l. wurde der Erreger schon nachgewiesen (Becker et al. 2020).

Die morphologische Analyse erwies sich in den meisten Fällen als nicht ausreichend, um eine genaue Bestimmung durchführen zu können. Insbesondere bei den Klebefallen war das der Fall. Auch bei den Proben, die mit BG-Sentinel Fallen gefangen worden sind, war die Analyse oft zu ungenau oder gar fehlerhaft (aus Mangel an taxonomischer Expertise). Als Beispiel lässt sich die Probe I067 nennen, bei der morphologisch noch eine Sandmücke vermutet wurde, obwohl sie sich beim Barcoding als Gallmücke herausstellte. Eine Verwechslung zwischen

Gallmücken und Sandmücken ist leicht möglich, da sie sich morphologisch sehr ähnlich sind. Solche Verwechslungen sind noch bei vielen anderen Dipteren-Arten möglich und bei Benutzung dieser Methode der Analyse mit zu berücksichtigen. Daher ist die Kombination einer morphologischen Analyse mit Barcoding vor allem bei „Nicht-Experten“ zu empfehlen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass auch Dipteren gefangen wurden, die als Vektoren fungieren können. Jedoch war deren Anzahl sehr gering. Von den insgesamt 285 gefangenen Insekten wurden nur 12 der Vektoren-Gruppe zugeordnet werden. Das bedeutet, dass nur 4,2 % der gefangenen Dipteren Vektoren waren. Dies unterstützt die Hypothese, dass die Dipteren auf der Isolierstation nur ein minimales Risiko für die Patienten darstellen.

Außerdem war das primäre Ziel dieser Arbeit mittels Pathogen-Screening zu bestätigen, dass die in der Isolierstation aufzufindende Dipteren nicht als Überträger von Krankheitserregern fungieren. Keiner der Erreger, auf die im Rahmen dieser Arbeit gescreent worden ist, konnte in den Proben nachgewiesen werden. Dies unterstützt die Hypothese, dass das durch Dipteren dargestellte Infektionsrisiko auf der Isolierstation minimal ist. Es kann allerdings keine eindeutige Aussage aufgrund dieser Ergebnisse getroffen werden. Einerseits wurde nur ein enges Spektrum an Pathogenen getestet. Um über mehrere Krankheitserreger Aussagen treffen zu können, müssten weitere Untersuchungen auf diese Pathogene durchgeführt werden. In Bezug auf die oben genannten Erreger müssen ebenfalls einige Punkte berücksichtigt werden: In ganz Österreich wurde im Jahr 2021 kein WNV-Fall bei Pferden oder Stechmücken gemeldet (<https://www.ecdc.europa.eu/en/west-nile-fever/surveillance-and-disease-data/disease-data-ecdc> 2022). So war die Wahrscheinlichkeit, eine WNV-positive Stechmücke zu finden gering. Da aber die Prävalenz dieses Erregers in der Region von Jahr zu Jahr stark variiert (de Heus et al. 2021), müsste man die Untersuchung über einen längeren Zeitraum durchführen, um genauere Aussagen treffen zu können.

Im Gegensatz dazu stand ab Ende Juni etwa vier Wochen lang ein bestätigt *S. equi ssp. equi*-positiver Patient auf der untersuchten Isolierstation. Obwohl in diesem Zeitraum aufgrund der nicht funktionierenden Klimaanlage die Türen der Box offenstanden (wird folgend noch weiter ausgeführt), und so deutlich mehr Fliegen und weitere Insekten Zugang in die Box

hatten, konnte der Druse-Erreger bei keinem der 75 getesteten Proben nachgewiesen werden. Obwohl Pusterla et al. im Jahr 2020 an Fliegen, die während eines Druse-Ausbruchs gesammelt wurden, *S. equi* ssp. *equi* nachweisen konnte, konnte im Rahmen jener Arbeit kein *S. equi* ssp. *equi* festgestellt werden. In der oben genannten Studie waren alle untersuchten Fliegen sog. Gesichtsfiegen (*Musca autumnalis*). Dahingegen wurden in dieser Arbeit jedoch keine Gesichtsfiegen gefangen und so auch nicht untersucht. Gegebenenfalls unterscheiden sich die verschiedenen Fliegenarten in der Affinität, *S. equi* ssp. *equi* übertragen zu können. Diese Annahme bedarf jedoch noch weiterer Untersuchungen. Zudem konnte in der genannten Studie der Erreger in insgesamt 0,54 % der Fliegen nachgewiesen werden, und dieses Ergebnis wurde bei einem viel größeren Probenpool festgestellt, als die in vorliegender Arbeit gescreent wurde. So muss man berücksichtigen, dass es sich eventuell um eine nicht repräsentative Stichprobe handelt. Weiter lässt sich auch vermuten, dass eventuell die Übertragung von *S. equi* ssp. *equi* nicht so effektiv durch Fliegen möglich ist oder an einen bestimmten Faktor gebunden ist, welcher jedoch noch nicht erforscht sei.

Alle zwölf Vektoren wurden auf EqHV untersucht. Bis jetzt gibt es keinen Hinweis darauf, dass das Equine Hepacivirus, wie viele andere Flaviviren durch Stechmücken übertragbar wäre (Badenhorst et al. 2019). Ergebnisse dieser Arbeit konnten diese Aussage unterstützen, da kein EqHV in den getesteten Proben nachgewiesen werden konnte.

Da das Equine Parvovirus sich durch Blutprodukte übertragen lässt, ist davon auszugehen, dass eine mechanische Übertragung durch Stechfliegen wahrscheinlich ist (Tomlinson et al. 2020). Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle zwölf Vektoren, darunter auch vier Stechfliegen auf EqPV untersucht, wobei in keinen dieser DNA des genannten Erregers nachweisbar war. Anhand dieser Ergebnisse lassen sich jedoch keine eindeutigen Aussagen treffen. Zum einen ist die Probenanzahl sehr klein und so nicht repräsentativ. Zum anderen wurde auch im Zeitraum der Probensammlung kein Patient mit diagnostiziertem Equines Parvovirus-Hepatitis auf der Isolierstation aufgestellt, wo sich die dort gefangenen Stechfliegen hätten infizieren können. Es wird diskutiert, dass eventuell die Übertragung an eine hohe Anzahl an Stichen gebunden ist, oder die vergehende Zeit zwischen Aufnahme des Erregers und der Weitergabe

eine entscheidende Rolle spielt (Tomlinson et al. 2020). All diese Faktoren bedürfen jedoch noch weiterer Forschung.

Obwohl dies nicht zu den primären Zielen dieser Arbeit gehört, werden zum Schluss die in Bezug auf das benutzte Material und der Funktionsweise der Isolierstation festgestellten Bemerkungen erläutert: Im Laufe der Sammelperiode hat sich herausgestellt, dass die in den Boxen hängenden Klebefallen nicht mit dem Klinikalltag vereinbar waren. Da - wie im Kapitel 4.1 beschrieben - die Fallen an den Infusionskränen aufgehängt worden sind, hat es das Handling der Infusionen aufgrund deren stark klebender Eigenschaft erheblich erschwert, und unter anderem auch stark unhygienisch gemacht. Da die Infusionskräne in erster Linie dazu dienen, Infusionen und Infusionspumpen aufhängen zu können, um die Intensivpatienten infundieren zu können, und die sichere Versorgung der Patienten an erster Stelle steht, wurden die Klebefallen Ende Juli in die Vorräume umgehängt.

Ebenfalls hat die Entfernung der einzelnen Fliegen von den Klebefallen immer wieder eine Herausforderung dargestellt. Es sind Teile der Insekten öfters abgerissen und an dem Klebestreifen hängen geblieben. Fliegen von kleineren Größen konnte man auch ausgesprochen schwer in die Sammelröhrchen transferieren, ohne dass sie hochgradig verklebten und eine kugelige Form annahmen, die für die morphologische Untersuchung weitgehend ungeeignet war. Aus diesem Grund wurden Insekten unter einer bestimmten Größe nicht gesammelt, sondern an den Klebestreifen belassen. Infolgedessen war nur eine einzige Probe der Familie der Taufliegen (*Drosophilae*) zuordenbar, welche im Durchschnitt eine Körperlänge von 2–4 mm aufweisen (Deplazes et al. 2013). Folgend wurde der Versuch diese Insekten von den Streifen zu entfernen, unterbrochen und weitere Exemplare solcher Größen wurden aufgrund der eben genannten Schwierigkeiten auf den Klebestreifen belassen und nicht analysiert. Es wurden jedoch weitere Insekten ähnlicher Größe an den Klebestreifen gesichtet und so ist davon auszugehen, dass mehr als eine einzige Taufliege sich auf der Isolierstation befand. Im Gegensatz zu den Taufliegen, können *Culicoides*-Arten eine Reihe von verschiedenen Viren übertragen und fallen mit einer Körperlänge von 1–2,5 mm deutlich in die Größenordnung der Insekten, die nicht von den Klebestreifen entfernbar waren. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass *Culicoides*-Exemplare ebenfalls an den Klebestreifen klebten, jedoch nicht

analysiert worden sind. Allerdings werden Gnitzen der Gattung *Culicoides* auch von den im Rahmen dieser Studie verwendeten BG Sentinel Fallen angelockt. Wiederum wurden keine Vertreter der Gattung *Culicoides* mit diesen Fallen gefangen.

Aus dem oben erwähnten Grund war die morphologische Untersuchung der mittels Klebefallen gefangenen Dipteren teilweise auch deutlich erschwert. Nicht nur das Verbringen der Insekten in die Sammelröhrchen war herausfordernd, die Entfernung aus demselben war durch das Kleben ebenfalls deutlich beeinträchtigt und das Manipulieren hat die Morphologie der einzelnen Proben weiter geschädigt. Dadurch war die genaue Identifizierung anhand morphologischer Merkmale ebenfalls erschwert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Methode der Dipteren-Sammlung wenig geeignet ist, falls morphologische Untersuchungen geplant sind.

Zwischen dem 20.06. und dem 05.07.2021 hatte die Klimaanlage der Isolierstation einen Defekt. Dieser Zeitraum entspricht in etwa den ersten zwei Wochen der Sammelperiode dieser Arbeit. Da ohne funktionierende Klimaanlage und mit sommerlichem Wetter die Temperatur in den Isolierboxen in unerträgliche Höhen gestiegen wäre, wurden die großen Türen der Boxen in diesem Zeitraum offengehalten, um ein vertretbares Klima in den Boxen zu verschaffen. In diesem anfänglichen Zeitabschnitt konnte man beobachten, dass die Anzahl der mittels Klebefallen gefangenen Dipteren deutlich höher war im Vergleich zu Zeiten mit verschlossenen Türen (siehe Kapitel 5.4). Diese sinkende Tendenz ist jedoch nicht nur der funktionierenden Klimaanlage und den geschlossenen Türen zu verschulden, sondern auch der Umplatzierung der Klebefallen in die Vorräume, welches aufgrund der Kollision mit dem Klinikalltag vorgenommen wurde (siehe oben). Nichtsdestotrotz ist jedoch ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Offenhaltung der Türen und der Anzahl der Insekten festzustellen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass dies ein durchaus beeinflussender Faktor ist, wie viele Dipteren die in der Isolierstation befindlichen Patienten erreichen können. Dieses ist nicht nur in Hinblick auf die potenzielle Übertragung jeglicher Krankheitserreger zu berücksichtigen. Auch die Belästigung der Pferde durch diese Insekten lässt sich deutlich minimieren, in dem man die Türe geschlossen hält.

## 7 Zusammenfassung

Auf der Pferdeklunik der Veterinärmedizinischen Universität Wien steht für Patienten mit (potenziell) infektiösen Erkrankungen eine Isolierstation zur Verfügung. Hier wurden im Zeitraum zwischen Juni und Oktober 2021 mit zwei verschiedenen Techniken Dipteren gefangen. Ziel der Studie war die Ermittlung welche Arten von Dipteren in der Isolierstation aufzufinden sind. Die gefangenen Dipteren wurden zuerst morphologisch, anschließend mithilfe von molekularen Techniken mit anschließender DNA-Sequenzierung bestimmt. Von insgesamt 175 Proben konnten 78 auf mindestens die Familie genau identifiziert werden. Es konnten Mitglieder zehn verschiedener Familien von Insekten bestimmt werden. Ebenfalls erfolgte eine Kategorisierung der Proben in „Vektoren“ und „nicht Vektoren“. Insgesamt konnten sieben Stechmücken und fünf Stechfliegen als Vektoren eingestuft werden.

Weiters wurden die gesammelten Dipteren auf folgende vier pferdemedizinisch relevante Erreger mittels PCR getestet, welche potenziell durch Dipteren übertragbar sind: West-Nil-Virus, Equines Hepacivirus, Equines Parvovirus, und *Streptococcus equi* ssp. *equi*. Keiner der Erreger konnte in den getesteten Dipteren nachgewiesen werden.

Aufgrund der geringen Anzahl an gefangenen Dipteren und der nicht gelungenen Nachweis der oben aufgelisteten Erreger lässt sich die Aussage stellen, dass Stechmücken und andere Dipteren kein bis minimales Risiko als Überträger von Krankheitserregern für die Pferde auf der Isolierstation darstellen.

Ebenfalls wurde die Methodik Dipteren mittels Klebefallen zu fangen evaluiert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Methode der Dipteren-Sammlung wenig geeignet ist. Insbesondere dann, wenn morphologische Untersuchungen geplant sind, da diese Methode die Morphologie der Tiere hochgradig beeinträchtigt.

## 8 Summary

An isolation unit is available for patients with (potentially) infectious diseases at the Equine Clinic of the University of Veterinary Medicine, Vienna. Diptera were caught using two different sampling techniques between June and October 2021. The main goal of the study was to assess which species of diptera are present in the isolation department. The captured diptera were first analysed morphologically, then identified by molecular analysis and subsequent DNA sequencing. From a total of 175 samples, 78 could be aligned at least to family level. Members of ten different insect families were identified. The samples were also categorized into "vectors" and "non-vectors". A total of seven mosquitoes and five *Stomoxys*-flies were specified as vectors.

Furthermore, the collected diptera were tested with PCR for the following pathogens (relevant to equine medicine): West Nile virus, equine hepacivirus, equine parvovirus, and *Streptococcus equi* ssp. *equi*. None of the pathogens were detected in the analysed samples.

Based on the small number of diptera caught and the failure to detect the pathogens listed above, it can be concluded that mosquitoes and other diptera pose no to minimal risk as vectors of pathogens for the horses in this isolation unit.

Additionally, the method of catching diptera using adhesive traps was also evaluated. In summary, this method of diptera collection is not very suitable, especially if morphological analyses are planned, since this method highly affects the morphology of the animals.

## 9 Literaturverzeichnis

- Badenhorst M, de Heus P, Auer A, Rümenapf T, Tegtmeyer B, Kolodziejek J, Nowotny N, Steinmann E, Cavalleri JMV. 2019. No Evidence of Mosquito Involvement in the Transmission of Equine Hepacivirus (Flaviviridae) in an Epidemiological Survey of Austrian Horses. *Viruses*, 11(11).
- Badenhorst M, de Heus P, Auer A, Tegtmeyer B, Stang A, Dimmel K, Tichy A, Kubacki J, Bachofen C, Steinmann E, et al. 2022. Active equine parvovirus-hepatitis infection is most frequently detected in Austrian horses of advanced age. *Equine Veterinary Journal*, 54(2):379–389.
- Baldacchino F, Muenworn V, Desquesnes M, Desoli F, Charoenviriyaphap T, Duvallet G. 2013. Transmission of pathogens by *Stomoxys* flies (Diptera, Muscidae): a review. *Parasite (Paris, France)*, 20(1).
- Becker N, Petrić D, Zgomba M, Boase C, Madon M, Dahl C, Kaiser A. 2010. Mosquitoes and their control: Second Edition. Springer.
- Becker N, Petrić D, Zgomba M, Boase C, Madon MB, Dahl C, Kaiser A. 2020. Mosquitoes: Identification, Ecology and Control. Third Edition. Springer.
- Biogents AG. 2017. Mosquito Control Instruction Manual.
- Biogents AG. <https://www.bg-sentinel.com>. (Zugriff: 05.02.2022).
- Boyle AG, Timoney JF, Newton JR, Hines MT, Waller AS, Buchanan BR. 2018. *Streptococcus equi* Infections in Horses: Guidelines for Treatment, Control, and Prevention of Strangles—Revised Consensus Statement. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32(2):633–647.
- Brehm W, Gehlen H, Ohnesorge B, Wehrend A, Bartmann CP, Dietz O, Huskamp B. 2017. Handbuch Pferdepraxis. Vierte Aufl. Stuttgart: Enke-Verlag.
- Capaldi RA, Malatesta F, Darley-Usmar VM. 1983. STRUCTURE OF CYTOCHROME c OXIDASE. *Biochimica et Biophysica Acta*, 726:135–148.
- Carr J, Williams DG, Hayden RT. 2010. Molecular Detection of Multiple Respiratory Viruses. *Molecular Diagnostics: Techniques and Applications for the Clinical Laboratory*. First Edition. 289–300, Elsevier Inc.

- Chapman GE, Archer D, Baylis M, Torr S, Solomon T. 2017. Potential vectors of equine arboviruses in the UK. *The Veterinary record*, 180(1):19.
- Ciota AT. 2017. West Nile virus and its vectors. *Current opinion in insect science*, 22:28–36.
- Colpitts TM, Conway MJ, Montgomery RR, Fikrig E. 2012. West Nile Virus: Biology, Transmission, and Human Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 635–648.
- David S, Abraham AM. 2016. Epidemiological and clinical aspects on West Nile virus, a globally emerging pathogen. *Infectious diseases*, 48(8):571–586.
- Deplazes P, Eckert J, Samson-Himmelstjerna G von, Zahner H. 2013. *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin*. Dritte Aufl. Stuttgart: Enke-Verlag.
- Deplazes P, Joachim A, Mathis A, Strube C, Taubert A, von Samson-Himmelstjerna G, Zahner H. 2021. *Parasitologie für die Tiermedizin*. Vierte Aufl. Stuttgart: Georg-Thieme-Verlag.
- Divers TJ, Tennant BC, Kumar A, McDonough S, Cullen J, Bhuva N, Jain K, Chauhan LS, Scheel TKH, Lipkin WI, et al. 2018. New Parvovirus Associated with Serum Hepatitis in Horses after Inoculation of Common Biological Product. *Emerging infectious diseases*, 24(2):303–310.
- Dörge DD, Cunze S, Klimpel S. 2020. Incompletely observed: niche estimation for six frequent European horsefly species (Diptera, Tabanoidea, Tabanidae). *Parasites & vectors*, 13(1).
- Engler O, Savini G, Papa A, Figuerola J, Groschup MH, Kampen H, Medlock J, Vaux A, Wilson AJ, Werner D, et al. 2013. European surveillance for West Nile virus in mosquito populations. *International journal of environmental research and public health*, 10(10):4869–4895.
- European Centre for Disease Prevention and Control. <https://www.ecdc.europa.eu/en/west-nile-fever/surveillance-and-disease-data/disease-data-ecdc>. (Zugriff: 25.04.2022)
- Gather T, Walter S, Todt D, Pfaender S, Brown RJP, Postel A, Becher P, Moritz A, Hansmann F, Baumgaertner W, et al. 2016. Vertical transmission of hepatitis C virus-like non-primate hepacivirus in horses. *The Journal of general virology*, 97(10):2540–2551.
- Graw J. 2020. *Genetik*. Siebte Aufl. Berlin: Springer Spektrum-Verlag.

- Hebert PDN, Ratnasingham S, DeWaard JR. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270.
- de Heus P, Kolodziejek J, Hubálek Z, Dimmel K, Racher V, Nowotny N, Cavalleri JMV. 2021. West Nile Virus and Tick-Borne Encephalitis Virus Are Endemic in Equids in Eastern Austria. *Viruses*, 13(9).
- Machtinger ET, Weeks ENI, Geden CJ, Lacher E. 2022. *Pests and parasites of horses*. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers.
- McPherson R. 2021. *Polymerase Chain Reaction And Other Nucleic Acid Amplification Technology*. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 24th Edition. Elsevier.
- Mehlhorn H, Ed. 2008. *Diptera*. *Encyclopedia of Parasitology*. 352–356, Berlin, Springer Berlin Heidelberg;
- Mullen GR, Durden LA. 2009. *Medical and veterinary entomology*. Second Edition. Elsevier.
- Onmaz AC, Beutel RG, Schneeberg K, Pavaloiu AN, Komarek A, van den Hoven R. 2013. Vectors and vector-borne diseases of horses. *Veterinary research communications*, 37(1):65–81.
- Pusterla N, Bowers J, Barnum S, Hall JA. 2020. Molecular detection of *Streptococcus equi* subspecies *equi* in face flies (*Musca autumnalis*) collected during a strangles outbreak on a Thoroughbred farm. *Medical and veterinary entomology*, 34(1):120–122.
- Ramsauer AS, Badenhorst M, Cavalleri JMV. 2021. Equine parvovirus hepatitis. *Equine veterinary journal*, 53(5):886–894.
- Reed SM, Bayly WM, Sellon DC. 2018. *Equine internal medicine*. Fourth Edition. St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Rio DC. 2014. *Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction*. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2014(11).
- Roesch F, Moratorio G, Moratorio G, Vignuzzi M. 2019. Usutu Virus: An Arbovirus on the Rise. *Viruses*, 11(7).
- Saiz JC, Martín-Acebes MA, Blázquez AB, Escribano-Romero E, Poderoso T, Jiménez de Oya N. 2021. Pathogenicity and virulence of West Nile virus revisited eight decades after its first isolation. *Virulence*, 12(1):1145–1173.

- Scheel TKH, Simmonds P, Kapoor A. 2015. Surveying the global virome: identification and characterization of HCV-related animal hepaciviruses. *Antiviral research*, 115:83–93.
- Selbitz H-J, Truyen U, Valentin-Weigand P. 2015. *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. zehnte Aufl. Stuttgart: Enke-Verlag.
- Semenza JC, Suk JE. 2018. Vector-borne diseases and climate change: a European perspective. *FEMS microbiology letters*, 365(2).
- Sharma P, Kobayashi T. 2014. Are “universal” DNA primers really universal? *Journal of applied genetics*, 55(4):485–496.
- Showler AT, Osbrink WLA. 2015. Stable Fly, *Stomoxys calcitrans* (L.), Dispersal and Governing Factors. *International Journal of Insect science*, (7):7–19.
- Tegtmeyer B, Echelmeyer J, Pfankuche VM, Puff C, Todt D, Fischer N, Durham A, Feige K, Baumgärtner W, Steinmann E, et al. 2019. Chronic equine hepacivirus infection in an adult gelding with severe hepatopathy. *Veterinary medicine and science*, 5(3):372–378.
- Tomlinson JE, Jager M, Struzyna A, Laverack M, Fortier LA, Dubovi E, Foil LD, Burbelo PD, Divers TJ, van de Walle GR. 2020. Tropism, pathology, and transmission of equine parvovirus-hepatitis. *Emerging microbes & infections*, 9(1):651–663.
- Waller AS, Robinson C. 2013. *Streptococcus zooepidemicus* and *Streptococcus equi* evolution: the role of CRISPRs. *Biochemical Society Transactions*, 41(6):1437–1443.
- Waller AS, Paillot R, Timoney JF. 2011. *Streptococcus equi*: a pathogen restricted to one host. *Journal of Medical Microbiology*, 60(9):1231–1240.
- Wilson JJ. 2012. DNA barcodes for insects. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 858:17–46.
- Zittra C, Joachim A, Fuehrer H-P. 2014. Stechmücken und Dirofilarien in Österreich - Ein Überblick über die derzeitige Situation von neobiotischen Culiciden und Dirofilarien. *Tierärztliche Umschau*, 70.
- Zittra C, Schoener ER, Wagner R, Heddergott M, Duscher GG, Fuehrer HP. 2020a. Unnoticed arrival of two dipteran species in Austria: the synanthropic moth fly *Clogmia albipunctata* (Williston, 1893) and the parasitic bird louse fly *Ornithoica turdi* (Olivier in Latreille, 1811). *Parasitology Research*, 119(2):737–740.
- Zittra C, Wöss G, van der Vloet L, Bakran-Lebl K, Barogh BS, Sehnal P, Fuehrer HP. 2020b. Barcoding of the Genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in Austria—An Update

of the Species Inventory Including the First Records of Three Species in Austria.  
Pathogens, 9(5).

## 10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Skizze von der Isolierstation und dem dazugehörigen Untersuchungsraum, Platzierung der verschiedenen Fallen; roter Kreis = BG-Sentinel Fallen, blaues Kreuz = originale Platzierung der Klebefallen, grünes Kreuz = Position der Klebefallen nach Umhängen.....	19
Abbildung 2: Stereomikroskopische Aufnahme einer Schmetterlingsmücke von ventral.....	34
Abbildung 3: Stereomikroskopische Aufnahme einer <i>Stomoxys calcitrans</i> Fliege oder Wadenstecher von ventral. ....	35
Abbildung 4: Stereomikroskopische Aufnahmen einer Stechmücke aus der Gattung <i>Anopheles</i> von lateral (links) und von dorsal (rechts). ....	36
Abbildung 5: Stereomikroskopische Aufnahme einer männlichen <i>Culex</i> spp. von lateral. ....	36
Abbildung 6: Differenzierung der gefangenen Dipteren auf Familienniveau. ....	39
Abbildung 7: In der Vektoren-Gruppe vorkommende Gattungen und deren Häufigkeit.....	40
Abbildung 8: Ergebnisse des Flaviviren-PCRs bei den Vektoren. L=Leiter, NK=Negativkontrolle, PK=Positivkontrolle. ....	40
Abbildung 9: Ergebnisse des qPCRs auf EqHV bei der Vektoren-Gruppe. Die dunkelblauen Kurven stellen die Positivkontrollen da, die grünen bzw. roten Linien die getesteten Proben und die Negativkontrollen. ....	41
Abbildung 10: Ergebnisse des PCRs auf SEE bei den Proben von I159–I175. L=bp Leiter, NK=Negativkontrolle, PK=Positivkontrolle. ....	42
Abbildung 11: Mit Klebefallen durchschnittlich pro Tag gefangene Exemplare. ....	43

## 11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Taxonomie der Dipteren, die in der Literaturübersicht präsentiert werden (Deplazes et al. 2021).	4
Tabelle 2: In Österreich auffindbaren Stechmückenarten; die mit Stern versehene Arten sind in Österreich auffindbar, aber ursprünglich nicht heimisch (Zittra et al. 2014).	5
Tabelle 3: Übersicht über diverse Dipteren und durch denen übertragbare Krankheitserreger (Mehlhorn 2008, Deplazes et al. 2013, Onmaz et al. 2013, Chapman et al. 2017, Dörge et al. 2020, Zittra et al. 2020b).	10
Tabelle 4: Genera und relevante Spezies der Virusfamilie Flaviviridae (Selbitz et al. 2015, Badenhorst et al. 2019, Roesch et al. 2019).	11
Tabelle 5: Stechmückengattungen, in dem das WNV nachgewiesen worden ist (Saiz et al. 2021).	13
Tabelle 6: Experimentelle Transmission nachgewiesen (Becker et al. 2020, Kampen et al. 2020).	13
Tabelle 7: Mastermix-Rezept (LCO/HCO).	24
Tabelle 8: Temperaturkurve (LCO/HCO).	24
Tabelle 9: Mastermix-Rezept (Lep).	25
Tabelle 10: Temperaturkurve (Lep).	25
Tabelle 11: Mastermix-Rezept (Flaviviren 1).	27
Tabelle 12: Temperaturkurve (Flaviviren 1).	27
Tabelle 13: Mastermix-Rezept (Flaviviren 2).	28
Tabelle 14: Temperaturkurve (Flaviviren 2).	28
Tabelle 15: Mastermix-Rezept (EqHV).	29
Tabelle 16: Temperaturkurve (EqHV).	29

Tabelle 17: Mastermix-Rezept (EqPV).....	30
Tabelle 18: Temperaturkurve (EqPV).....	30
Tabelle 19: Mastermix-Rezept (SEE).....	31
Tabelle 20: Temperaturkurve (SEE).....	31
Tabelle 21: Vektoren-Gruppe.....	37
Tabelle 22: Übersicht der Proben, deren morphologische Analyse, die Einteilung als Vektor, Barcoding Ergebnisse.....	59

## 12 Anhang

**Tabelle 22:** Übersicht der Proben, deren morphologische Analyse, die Einteilung als Vektor, Barcoding Ergebnisse.

Probennummer	Morph. An.	Vektor	LCO/HCO	Lep
I001		nein		
I002	<i>Culex</i> spp., männlich	ja	<i>Culex pipiens</i>	
I003		nein		
I004		nein	<i>Lepinotus reticulatus</i>	
I005		nein		
I006		nein		
I007		nein		
I008		nein	<i>Limnophyes</i> sp.	<i>Limnophyes</i> sp.
I009	<i>Culex pipiens/torrentium</i>	ja	<i>Culex pipiens</i>	
I010		nein		
I011	Schmetterlingsmücke	nein		
I012	Schmetterlingsmücke	nein		
I013		nein		
I014	Spinne	nein		
I015		nein		
I016	Schmetterlingsmücke	nein		
I017		nein		
I018		nein	<i>Psychoda alternata</i>	
I019		nein	Cecidomyiidae sp.	

<b>I020</b>		nein	91 % Cecidomyiidae sp.	
<b>I021</b>	Schmetterlingsmücke	nein		
<b>I022</b>		nein		
<b>I023</b>	Schmetterlingsmücke	nein		
<b>I024</b>	<i>Culex</i> spp., männlich	<b>ja</b>	<i>Culex pipiens</i>	
<b>I025</b>		nein		
<b>I026</b>		nein		
<b>I027</b>	Schmetterlingsmücke	nein		
<b>I028</b>		nein		
<b>I029</b>		nein		
<b>I030</b>	Schmetterlingsmücke	nein		
<b>I031</b>	Schmetterlingsmücke	nein	<i>Clogmia albipunctata</i>	
<b>I032</b>		nein		
<b>I033</b>	<i>Anopheles maculipennis</i> s.l.	<b>ja</b>	<i>Anopheles maculipennis</i>	
<b>I034</b>	Schmetterlingsmücke	nein		
<b>I035</b>		nein		
<b>I036</b>		nein		
<b>I037</b>	Schmetterlingsmücke	nein		
<b>I038</b>	Schmetterlingsmücke	nein	<i>Clogmia albipunctata</i>	
<b>I039</b>		nein	<i>Lycoriella ingenua</i>	
<b>I040</b>		nein	88 % <i>Sciaridae</i> sp.	
<b>I041</b>	Spinne	nein		

<b>I042</b>	Schmetterlingsmücke	nein		<i>Clogmia albipunctata</i>
<b>I043</b>		nein		<i>Lycoriella sativae</i>
<b>I044</b>		nein		<i>Lauthia cardui</i>
<b>I045</b>	Schmetterlingsmücke	nein	<i>Clogmia albipunctata</i>	
<b>I046</b>	Schmetterlingsmücke	nein		
<b>I047</b>		nein		<i>Schizophora</i>
<b>I048</b>	<i>Stomoxys calcitrans</i>	<b>ja</b>	<i>Stomoxys calcitrans</i>	
<b>I049</b>		nein		
<b>I050</b>	Schmetterlingsmücke	nein		
<b>I051</b>	Spinne	nein		
<b>I052</b>	Schmetterlingsmücke	nein		
<b>I053</b>		nein		
<b>I054</b>		nein		
<b>I055</b>	Fliege	nein		
<b>I056</b>		nein		
<b>I057</b>	<i>Stomoxys calcitrans</i>	<b>ja</b>	<i>Stomoxys calcitrans</i>	
<b>I058</b>	Fliege	nein		
<b>I059</b>		nein		
<b>I060</b>	Schmetterlingsmücke	nein		
<b>I061</b>		nein		
<b>I062</b>		nein		
<b>I063</b>	Sandmücke?	nein	Cecidomyiidae	
<b>I064</b>		nein		
<b>I065</b>		nein		

I066	Schmetterlingsmücke	nein		
I067		nein		
I068		nein		
I069		nein		
I070		nein		
I071		nein		
I072		nein		Cecidomyiidae sp.
I073		nein	n.e.	
I074		nein		
I075		nein	Cecidomyiidae sp.	
I076		nein		Cecidomyiidae sp.
I077		nein	<i>Forcipomyia sp.</i>	
I078		nein	Ceratopogonidae sp.	
I079		nein	89 % Sciaridae sp.	
I080		nein	<i>Spelobia sp.</i>	<i>Spelobia sp.</i>
I081	Spinne	nein	n.e.	
I082		nein	<i>Limnophyes sp.</i>	
I083	Schmetterlingsmücke	nein	<i>Psychoda albipennis</i>	<i>Psychoda albipennis</i>
I084		nein	<i>Bradysia impatiens</i>	
I085		nein	<i>Lepinotus patruelis</i>	
I086	<i>Culex spp.</i> , männlich	ja	<i>Culex pipens</i>	

<b>I087</b>		nein		91 % <i>Bradysia tilicola</i>
<b>I088</b>	Spinne	nein		n.e.
<b>I089</b>	Schmetterlingsmücke	nein		
<b>I090</b>		nein		
<b>I091</b>		nein		Cecidomyiidae sp.
<b>I092</b>	Schmetterlingsmücke	nein		<i>Psychoda cinerea</i>
<b>I093</b>		nein		90 % Cecidomyiidae sp.
<b>I094</b>		nein		94 % Cecidomyiidae sp.
<b>I095</b>		nein		
<b>I096</b>		nein	85 % Cecidomyiidae sp.	
<b>I097</b>	<i>Culex</i> spp., männlich	ja		
<b>I098</b>	Schmetterlingsmücke	nein		
<b>I099</b>	Schmetterlingsmücke	nein	<i>Clogmia albipunctata</i>	
<b>I100</b>	Schmetterlingsmücke	nein	<i>Clogmia albipunctata</i>	
<b>I101</b>		nein		
<b>I102</b>	<i>Culex</i> spp., weiblich	ja		
<b>I103</b>	Schmetterlingsmücke	nein	<i>Clogmia albipunctata</i>	
<b>I104</b>		nein		

I105		nein		
I106		nein		
I107	Schmetterlingsmücke	nein	<i>Clogmia albipunctata</i>	
I108	Schmetterlingsmücke	nein		
I109		nein		
I110	Fliege	nein		
I111	Fliege	nein		
I112	Fliege	nein		
I113	Fliege	nein		
I114	Fliege	nein		
I115	Stechfliege	ja		
I116	Fliege	nein		
I117	Fliege	nein		
I118	Fliege	nein		82 % <i>Clogmia albipunctata</i>
I119	Fliege	nein		
I120	Fliege	nein		70 % <i>Musca domestica</i>
I121	Fliege	nein		
I122	Fliege	nein		n.e.
I123	Fliege	nein		
I124		nein		
I125	Fliege	nein	n.e.	n.e.
I126	Fliege	nein	<i>Musca domestica</i>	n.e.
I127	Fliege	nein		n.e.
I128	Fliege	nein		
I129	Fliege	nein		
I130	Fliege	nein		

I131	Fliege	nein		
I132	Fliege	nein		
I133		nein	<i>Fannia canicularis</i>	
I134		nein	<i>Drosophila funebris</i>	
I135	Fliege	nein	<i>Musca domestica</i>	
I136	Fliege	nein	<i>Musca domestica</i>	
I137		nein	<i>Fannia canicularis</i>	
I138	Fliege	nein	<i>Musca domestica</i>	n.e.
I139		nein	<i>Fannia canicularis</i>	n.e.
I140	Fliege	nein Kont.	<i>Musca domestica</i>	<i>Stomoxys calcitrans</i>
I141		nein	<i>Fannia canicularis</i>	
I142	Fliege	nein		
I143	Fliege	nein	<i>Musca domestica</i>	
I144	Stechfliege	ja		
I145	Fliege	nein	<i>Musca domestica</i>	
I146	Fliege	nein	<i>Musca domestica</i>	
I147		nein		

I148		nein		80 % <i>Fannia canicularis</i>
I149	Fliege	nein		n.e.
I150		ja	<i>Stomoxys calcitrans</i>	n.e.
I151	Fliege	nein	<i>Musca domestica</i>	n.e.
I152	Fliege	nein		
I153	Fliege	nein		
I154		nein		
I155		nein		
I156		nein		
I157	Fliege	nein	<i>Musca domestica</i>	
I158	Fliege	nein	88 % <i>Musca domestica</i>	
I159	Fliege	nein	<i>Musca domestica</i>	
I160	Fliege	nein		n.e.
I161	Fliege	nein		
I162		nein	<i>Fannia canicularis</i>	
I163	Schmetterlingsmücke	nein	<i>Clogmia albipunctata</i>	
I164	Schmetterlingsmücke	nein	<i>Clogmia albipunctata</i>	
I165	Schmetterlingsmücke	nein		
I166	Schmetterlingsmücke	nein		
I167		nein		
I168		nein		

<b>I169</b>		nein		
<b>I170</b>	Fliege	nein		
<b>I171</b>		nein		
<b>I172</b>		nein		
<b>I173</b>		nein		
<b>I174</b>	Fliege	nein		
<b>I175</b>	Fliege	nein		

### **13 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Diplomarbeit unterstützt haben.

Mein herzlicher Dank geht an meinen Diplomarbeitsbetreuer Dr.rer.nat. Priv.-Doz. Hans-Peter Fuehrer, an wen ich mich jederzeit mit meinen Fragen und Anliegen wenden konnte. Ein großer Dank gilt auch Dr.med.vet. Maria Sophia Unterköfler, die mich mit Beantwortung all meiner Fragen und Betreuung im Labor groß unterstützt hat.

Ebenfalls möchte ich mich bei Dr.Sc. Dr.med.vet. Ramsauer Anna Sophie und bei Dipl.ECVM Dr.med.vet. Priv.-Doz. Spergser Joachim bedanken, die mir beide eine flexible Zusammenarbeit im Labor ermöglichten. Des Weiteren möchte ich mich auch ganz herzlich bei Mag.rer.nat. Preining Irina und bei Mag.rer.nat. Martina Zimmermann für die geduldige und liebe Betreuung im Labor bedanken.

Das gilt auch für Frau Bitu Shahi Barogh, und Herrn Miguel Angel Pena Espinoza, PhD., die mir beide im Labor eine große Hilfe leisteten.

Zuletzt möchte ich mich aller herzlichst bei Dipl.ECEIM Univ.-Prof. Dr.med.vet. Jessika-Maximiliane Cavalleri für die Hilfe und kontinuierliche Unterstützung bedanken.