

Aus dem Department für Pathobiologie
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

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

**Filarien, aviäre Plasmodien und Trypanosomidae in Stechmücken aus
Wien, Oberösterreich und dem Burgenland (2022)**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

Vorgelegt von Caroline Isabelle Glass

Betreuer: Priv.-Doz. Dr. Hans-Peter Fuehrer

Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Herbert Weissenböck

Wien, November 2023

Inhaltsverzeichnis	
Zusammenfassung	5
Abstract	6
1. Einleitung und Fragestellung	7
1.1. Stechmücken in Österreich	7
1.2. Stechmücken als Vektoren	9
1.2.1. Trypanosomen	10
1.2.2. Plasmodien	11
1.2.3. Filarien	13
1.3. Resultierende Fragestellungen	15
2. Material und Methoden	16
2.1. Stechmücken	16
2.2. DNA-Extraktion und PCR	17
2.2.1 Typanosomen	17
2.2.2. Plasmodien	19
2.2.3. Filarien	21
2.3. Sequenzanalyse	22
3. Ergebnisse	23
3.1. Trypanosomen	23
3.1.1. Wien	24
3.1.2. Oberösterreich	26
3.1.3. Burgenland	27
3.2. Plasmodien	28
3.2.1. Wien	28
3.2.2. Oberösterreich	32
3.2.3. Burgenland	33
3.3. Filarien	35

3.3.1. Wien	35
3.3.2. Oberösterreich	35
3.3.3. Burgenland	36
3.4. Zusammenfassung der Ergebnisse	37
3.4.1. Wien	37
3.4.2. Oberösterreich	38
3.4.3. Burgenland	38
3.4.4. Proben mit mehreren Erregern	39
4. Diskussion.....	41
Literaturverzeichnis	45
Eigenständigkeitserklärung	48
Danksagung	49

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ae.	Gattung <i>Aedes</i>
An.	Gattung <i>Anopheles</i>
B	Burgenland (im Probenamen)
bp	Basenpaare
Cq.	Gattung <i>Coquillettida</i>
Cs.	Gattung <i>Culiseta</i>
Cx.	Gattung <i>Culex</i>
O	Oberösterreich (im Probenamen)
P.	Gattung <i>Plasmodium</i>
s.l.	sensu lato (im weiteren Sinn)
sp.	Spezies (Singular)
spp.	Spezies (Plural)
T.	Gattung <i>Trypanosoma</i>
Tab.	Tabelle
V	Wien (im Probenamen)

Zusammenfassung

Stechmücken spielen weltweit, so auch in Österreich, eine bedeutende Rolle bei der Übertragung von Krankheitserregern. Sie können sowohl Viren, Bakterien als auch Parasiten übertragen. Bisher konnten in Österreich 52 unterschiedliche Stechmückenarten nachgewiesen werden. Diese können unterschiedliche Erreger übertragen.

Im Jahr 2022 wurden Stechmücken in Wien, Oberösterreich und dem Burgenland mit Hilfe von Kohlendioxid-Fallen gesammelt und in dieser Studie untersucht. Die adulten Stechmücken wurden morphologisch bestimmt und in insgesamt 213 gepoolte Proben (von 1-50 Individuen) separiert. Folgende Stechmückenarten konnten identifiziert werden: *Culex pipiens* s.l., *Coquillettidia richiardii*, *Aedes japonicus*, *Ae. vexans*, *Ae. annulipes*, *Ae. geniculatus*, *Ae. koreicus*, *Anopheles claviger* s.l., *An. hyrcanus*, *An. plumbeus*, *An. maculipennis* s.l. *Culiseta annulata*. Dabei machte *Cx. pipiens/torrentium* den größten Teil (137 Poolproben = 64,32 %) aus.

Aus den gepoolten Proben wurde die DNA extrahiert, mehrere PCR auf verschiedene Erreger durchgeführt und die positiven Proben zum Sequenzieren eingeschickt. Anschließend wurden die Sequenzen mit Gendatenbanken abgeglichen. Dadurch konnten Trypanosomen, Plasmodien und Filarien nachgewiesen werden.

Es konnten sowohl *Trypanosoma culicavium* als auch andere nicht näher definierte Trypanosomatidae gefunden werden.

Auch unterschiedliche Arten von Plasmodien konnten nachgewiesen werden. So wurden *Plasmodium vaughani*, *P. relictum*, *P. matutinum* und *P. elongatum* identifiziert.

Außerdem konnten aus der Gruppe der Filarien *Setaria tundra* und zwei Typen Onchocercidae nachgewiesen werden.

Abstract

Mosquitoes play a major role in the transmission of various pathogens around the globe. Not only viruses, but also bacteria and parasites are transmitted by Culicidae. This is also the case in Austria. So far at least 52 different mosquito species are known in Austria. These are able to transmit different pathogens.

This study aims to find genetic material of *Trypanosoma*, Plasmodidae and filarioid helminths using PCR and DNA sequencing. Mosquitoes were collected with carbon dioxide traps in Vienna, Upper Austria, and Burgenland in 2022. Before storing the mosquitoes were morphologically specified and pooled according to species.

Altogether 213 pool samples were analyzed. The following mosquito species were present: *Culex pipiens* s.l., *Coquillettidia richiardii*, *Aedes japonicus*, *Ae. vexans*, *Ae. annulipes*, *Ae. geniculatus*, *Ae. koreicus*, *Anopheles claviger* s.l., *An. hyrcanus*, *An. plumbeus*, *An. maculipennis* s.l. and *Culiseta annulata*. The most abundant species was *Cx. pipiens/torrentium* (137 pools = 64,32 %).

From the pool samples DNA was extracted and analyzed with specific PCRs, positive samples were sequenced. Subsequently the DNA sequences were compared to sequences stored in genetic databases.

Trypanosoma culicavium and not further differentiated Trypanosomatidae were detected.

By testing for Plasmodidae different species were detected. These were *Plasmodium vauhani*, *P. relictum*, *P. matutinum* and *P. elongatum*.

Setaria tundra and two types of Onchocercidae were filarioid helminths identified in this study.

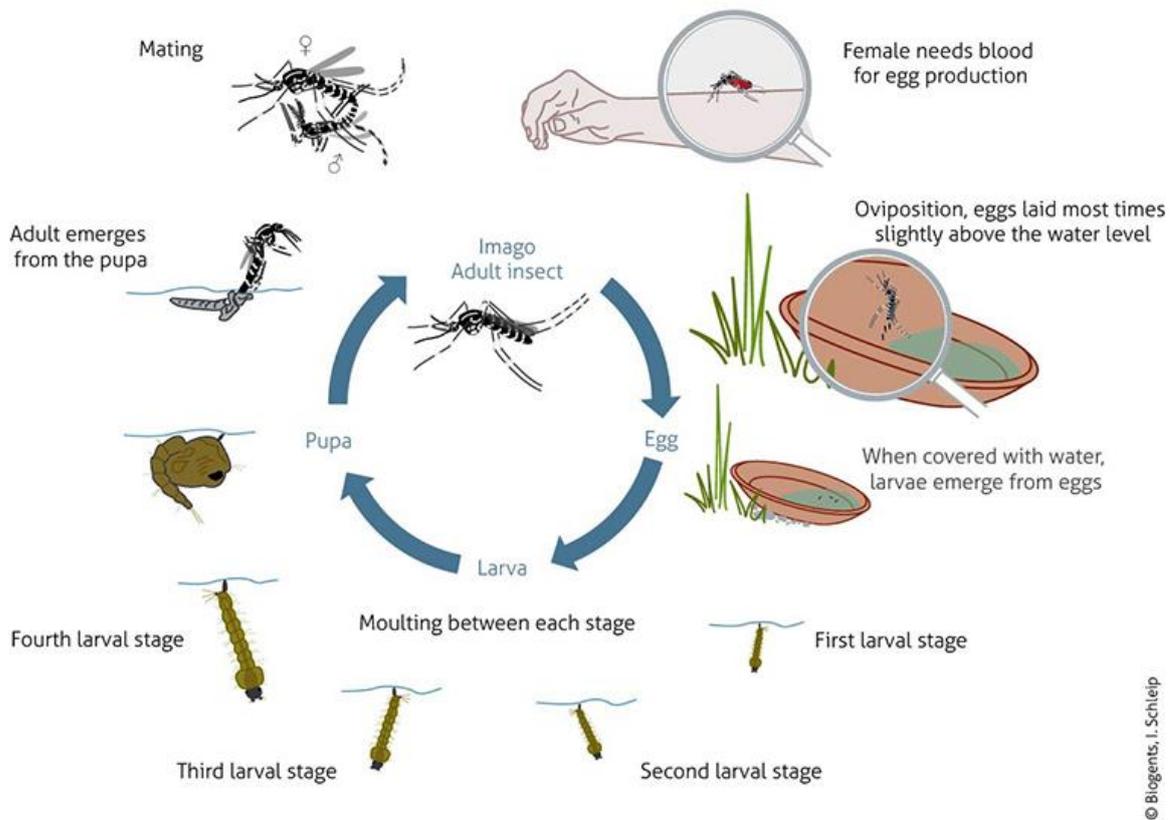
1. Einleitung und Fragestellung

1.1. Stechmücken in Österreich

In Österreich konnten bereits 52 unterschiedliche Stechmückenarten nachgewiesen werden. Diese Stechmücken (Culicidae) gehören zu den Zweiflüglern (Dipteren) und teilen sich in zwei Unterfamilien, die Anophelinae und die Culicinae. Acht Gattungen sind in Österreich bekannt: *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Coquilettidia*, *Culiseta*, *Orthopodomyia* und *Uranotaenia* (1, 2). Weltweit gibt es 113 Gattungen mit 3719 Arten (3).

In Österreich können bereits seit einigen Jahren nicht nur autochthone Arten wie *Culex pipiens* s.l. nachgewiesen werden, sondern auch potentiell invasive Arten wie *Aedes albopictus* (4). Durch den Klimawandel wird diese Entwicklung noch weiter zunehmen (1).

Stechmücken machen in ihrer Entwicklung eine komplette Metamorphose durch (Abb. 1). Sie entwickeln sich vom Ei über 4 Larvenstadien zur Puppe und schließlich zur adulten Stechmücke. Für die Larvenstadien werden je nach Art der Stechmücke unterschiedliche Wasserlebensräume benötigt (z.B. größere oder kleinere Wassermengen, kontinuierliches oder temporäres Wasservorkommen, unterschiedliche Wasserqualitäten) (5).



© Biogenis, I. Schliep

Abb. 1: Entwicklungszyklus von Stechmücken (<https://i0.wp.com/sea.biogenis.com/wp-content/uploads/2018/05/life-cycle-aedes-albopictus-asian-tiger-mosquito-en.jpg?w=800&ssl=1>).

Die Weibchen der meisten Stechmückenarten brauchen zur Eiablage eine obligate Blutmahlzeit (z.B. *Culex pipiens f. pipiens*); dies beschreibt eine nicht autogene Entwicklung. Dem gegenüber steht die autogene Entwicklung, bei der die Weibchen auch ohne Blutmahlzeit die ersten Eier in Wasser ablegen können (z.B. *Culex pipiens f. molestus*). Das heißt jedoch nicht, dass die Weibchen keine Blutmahlzeiten zu sich nehmen würden. Tatsächlich kann nach der Eiablage oft eine Blutmahlzeit beobachtet werden. Außerdem werden bei dem Gelege meist weniger Eier abgelegt, wenn die Blutmahlzeit vorher ausfiel (5). Die für die Blutmahlzeit ausgewählten Wirte unterscheiden sich je nach Stechmückenart. So können Menschen, Säugetiere, Vögel oder auch Reptilien und Amphibien Wirte sein.

Die in Österreich am weitesten verbreitete Stechmücke gehört zu dem *Culex pipiens* Komplex. Der *Culex pipiens* Komplex umfasst *Culex pipiens* s.l. und *Cx. p. quinquefasciatus*. *Culex pipiens* besteht wiederum aus zwei Biotypen, *Culex pipiens f. pipiens* und *Cx. pipiens f.*

molestus (5). *Cx. pipiens* s.l. und deren Schwesternart *Cx. torrentium* sind sich morphologisch sehr ähnlich.

In Österreich kommen *Culex pipiens* f. *pipiens*, *Cx. pipiens* f. *molestus* und *Cx. torrentium* vor, welche sich morphologisch jedoch nicht ohne weiteres unterscheiden lassen (5). In ihrem Verhalten findet man jedoch nicht nur den Unterschied der der autogenen oder nicht autogenen Eiablage, sondern auch der Wirt der Blutmahlzeit ist unterschiedlich. So bevorzugt *Cx. pipiens* f. *pipiens* Vögel als Wirt, während *Cx. pipiens* f. *molestus* Säugetiere, auch den Menschen benutzt. Außerdem haben Weibchen von *Cx. pipiens* f. *molestus* keine obligate Diapause (5).

1.2. Stechmücken als Vektoren

Da Stechmücken sowohl Viren, Bakterien als auch Parasiten übertragen können, gibt es mittlerweile an vielen Instituten unterschiedliche Monitoring-Projekte. Dazu zählen in Österreich das West Nile Virus Projekt (u.a. Veterinärmedizinische Universität Wien) oder das Gelsen-Monitoring-Programm am Flughafen Wien-Schwechat, bei dem es darum geht neue potentiell invasive Arten zu erfassen (2) .

Stechmücken können eine Vielzahl an Parasiten in sich tragen. Diese Parasiten können einen monoxenen Lebensstil aufweisen oder aber für ihre Entwicklung einen Wirtswechsel vollziehen, also polyxen leben.

Da der Wirtswechsel bei solchen Parasiten auf Menschen oder Tiere vorkommt, sind Stechmücken als Vektoren sowohl in der Humanmedizin als auch in der Veterinärmedizin von Interesse. Durch den Klimawandel und die Globalisierung konnten einige Stechmückenarten (z.B. *Ae. albopictus*) ihren Lebensraum erweitern und können seit einigen Jahren vereinzelt in Österreich nachgewiesen werden (6, 7, 1).

Eine solche Veränderung der vorkommenden Stechmückenarten führt auch zu einem Wandel der potenziell übertragenen Parasiten. Dazu kommt ein anderes Verhalten dieser neobiotischen Stechmücken. So sticht *Cx. pipiens* s.l. nachts, während *Ae. albopictus* auch tagsüber Blutmahlzeiten sucht (5). Damit ändert sich auch beispielsweise das Risiko für einen in Österreich lebenden Haushund sich mit *Dirofilaria immitis* zu infizieren. Das Risiko war vorher niedrig, da *Cx. pipiens* s.l. erst aktiv ist, wenn die meisten Haushunde sich im Haus befinden. Dadurch, dass *Ae. albopictus* jedoch tagaktiv ist, vergrößert sich so die potenzielle

Expositionszeit und der Hund könnte auch tagsüber infiziert werden. Damit wird es vermutlich keine große Rolle mehr spielen, dass sich in Österreich die Hunde nur selten nachts draußen aufhalten.

1.2.1. Trypanosomen

Trypanosomen sind Parasiten, die je nach Art ihren Wirt in Wirbeltieren oder Insekten finden. Sie zählen zu den Protozoen aus der Ordnung der Kinetoplastida.

Die Einzeller werden u.a. von Stechmücken übertragen und leben im Blutkreislauf ihrer Wirte. Die bekanntesten auf den Menschen übertragbare Krankheiten sind in Äquatorialafrika die Afrikanische Schlafkrankheit, übertragen von *Trypanosoma brucei* (8) (Abb. 2) und in Amerika die Chagaskrankheit, übertragen von *T. cruzi* (9).

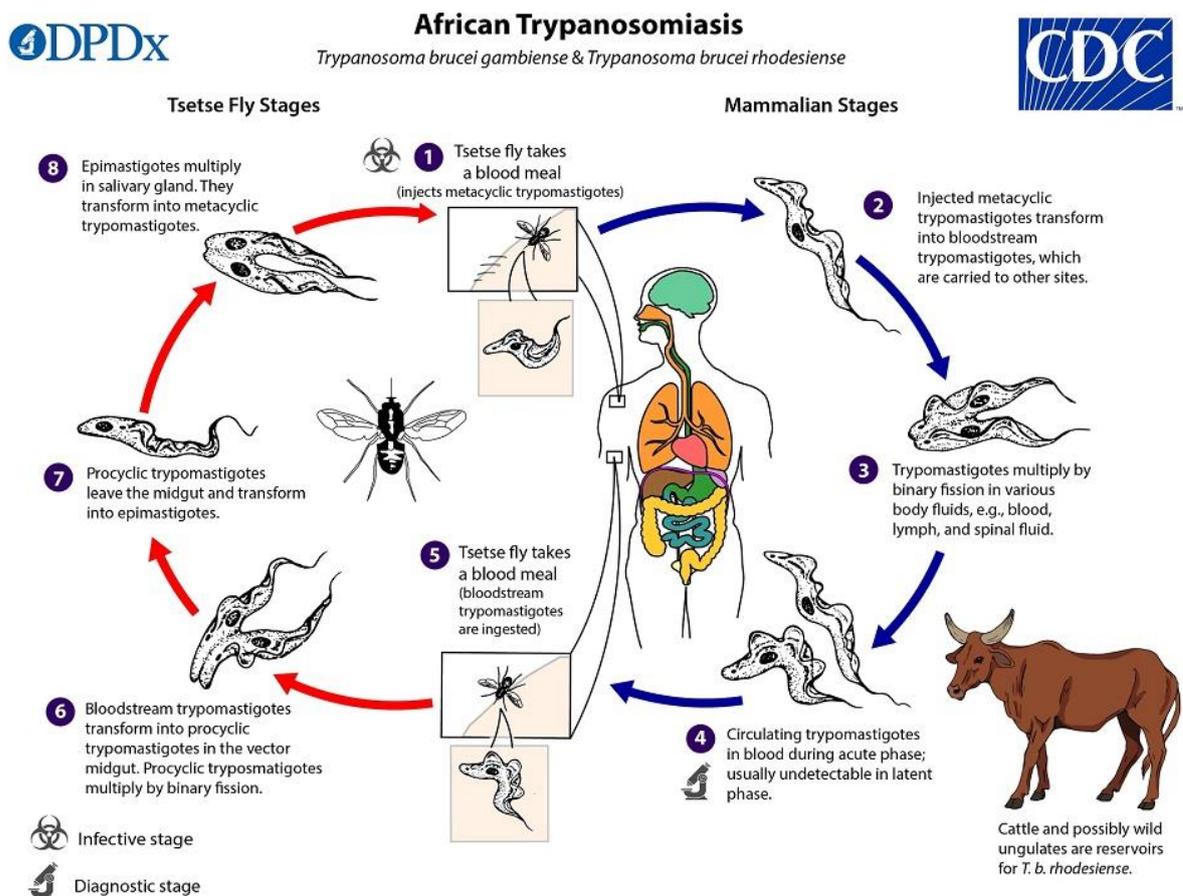


Abb. 2: Entwicklungszyklus von *Trypanosoma brucei* (<https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisafrican/index.html>).

Neuere Studien versuchen den Lebenszyklus von aviären Trypanosomen aufzuklären. Sie zeigen anhand von Versuchen mit *T. culicaviium* und *T. thomasbancrofti* wie sich Stechmücken und Vögel infizieren können (10). Bereits nachgewiesen wurde auch, dass *T. culicaviium* auf Vögel übertragen werden kann, in dem der Vogel infizierte weibliche *Culex*-Stechmücken frisst und verdaut. Bei anderen Arten war dies nicht möglich (11). Diese Studien jedoch zeigen den Lebenszyklus nur weniger aviärer Trypanosomen und als Vektoren dienender Stechmücken. Dennoch wird bereits mit diesen wenigen gesicherten Erkenntnissen klar, wie vielfältig die Übertragungswege von Trypanosomen sein können.

1.2.2. Plasmodien

Plasmodien sind weltweit verbreitete Parasiten, die zu der Ordnung der Haemosporida gehören. Ihre Wirte sind zum einen blutsaugende Insekten wie Stechmücken zum anderen Säugetiere, Vögel und auch Reptilien. Besondere Wichtigkeit erhalten die Plasmodien, da sie beim Mensch Malaria (bspw. durch *Plasmodium falciparum* (12)) und bei Vögeln Vogel malaria (bspw. durch *P. relictum* (13)) auslösen können (Abb. 3).

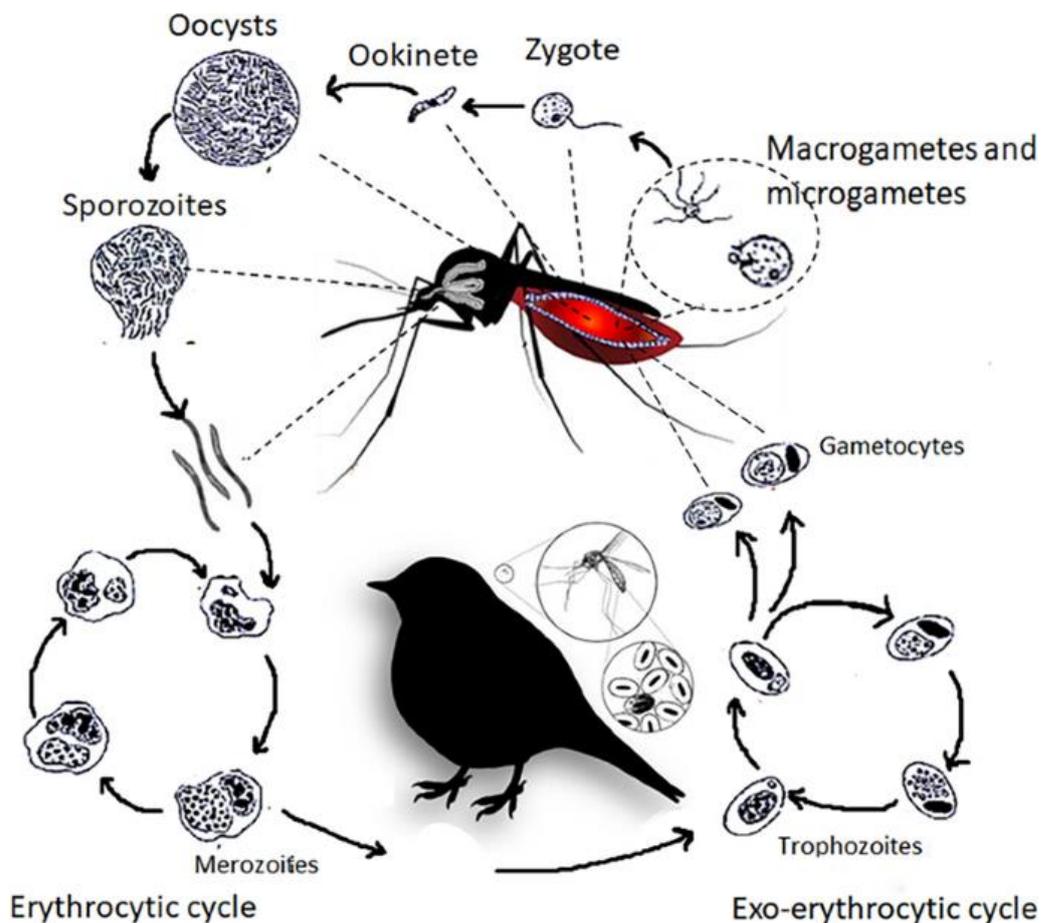


Abb. 3: Lebenszyklus von Plasmodien (Ishtiaq, Farah. Implications of Land Use Changes and Climate Change on Disease Dynamics).

Aktuelle Studien von tot aufgefundenen Vögeln zeigen, dass jeweils eine relevante Anzahl der Vögel Träger von Plasmodien waren (14, 15). Auch in der Zootierhaltung spielen Plasmodien eine große Rolle, da zum Beispiel Pinguine besonders geschützt und beobachtet werden.

Die Schaffung der eigenen Datenbank „MalAvi“ zeigt auch die Wichtigkeit der aviären Haemosporidien, von denen eine der drei Gattungen Plasmodien sind.

1.2.3. Filarien

Filarien gehören zum Stamm der Nematoda (Fadenwürmer). Zu den Nematoda gehören die beiden Familien der Filariidae und Onchocercidae.

Ihre Vertreter können je nach Art Menschen, Säugetiere, Vögel oder auch Amphibien befallen.

Die in Europa bedeutendsten Filarien sind *Dirofilaria immitis* und *D. repens*. Während *D. immitis* weltweit verbreitet ist, ist *D. repens* nur in Europa, Asien und Afrika verbreitet (16). Durch den Klimawandel wächst die Verbreitung von Südeuropa auch weiter nach Nordeuropa (17).

In Österreich sind beide Arten im Moment noch nicht autochthon vorhanden (trotz einzelner autochthoner Funde in Stechmücken, Hunden und einer Katze). Dies hängt vor allem damit zusammen, dass die bei uns hauptsächlich vorkommenden übertragenden Stechmückenart (*Cx. pipiens* s.l.) tagsüber nicht auf Wirtssuche ist. Andere Arten, die neobiotisch in Österreich sind, wie beispielsweise *Ae. albopictus*, können Filarien ebenfalls übertragen. Diese stechen ihre Wirte jedoch auch tagsüber. Wenn diese Arten heimisch werden, sind österreichische Haushunde, Füchse und weitere Tierarten, sowie der Mensch, tagsüber exponiert und es steigt die Wahrscheinlichkeit, dass diese potenziellen naiven Wirte infiziert werden.

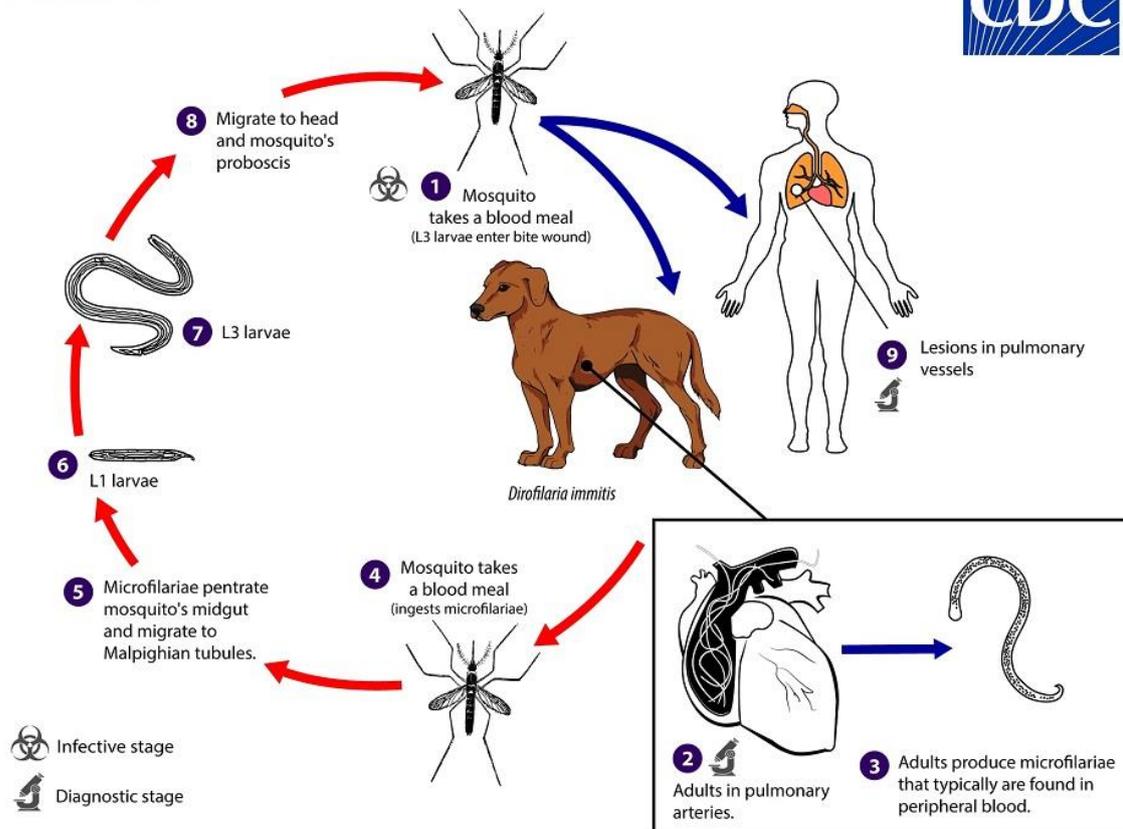


Abb. 4: Lebenszyklus von *Dirofilaria immitis* (<https://www.cdc.gov/dpdx/dirofilariasis/index.html>).

Obwohl beide Dirofilarienarten mit kaninen Endwirten und Stechmücken als Vektoren assoziiert werden, sind ihre Zielorgane unterschiedlich. Im Falle von *D. immitis*, der auch als Herzwurm bezeichnet wird, ist das Ziel die Pulmonalarterie des Herzens (Abb. 4), bei *D. repens*, dem Hautwurm, ist das Zielorgan das Unterhautgewebe oder das Auge (18). Zwar sind vor allem Hundartige bevorzugte Endwirte, jedoch können Dirofilarien auch Menschen oder Katzen infizieren (17).

In Österreich kann aber auch *Seteria tundra* gefunden werden, der als weißer Fadenwurm des Rehwilds bekannt ist.

1.3. Resultierende Fragestellungen

Aus dem Wissen über die Stechmücken in Österreich und ihre Parasiten resultieren folgende Fragestellungen:

Sind bei uns vorkommende Stechmücken mit Parasiten infiziert?

Sind es vor allem Stechmücken aus dem *Culex pipiens* s.l., die infiziert sind?

Können Trypanosomen, Filarien oder Plasmodien nachgewiesen werden?

Gibt es Stechmücken, die mit mehr als einem Erreger infiziert sind?

Werden die gleichen Erreger nachgewiesen, die bereits in früheren Studien nachgewiesen (in Österreich oder Europa) wurden?

2. Material und Methoden

2.1. Stechmücken

Die für diese Studie verwendeten Stechmücken wurden 2022 in Wien, Oberösterreich und im Burgenland mit Hilfe von BG-Sentinel CO₂-Falle (Regensburg, Germany) gefangen. Anschließend wurden diese Stechmücken bei -80 °C eingefroren und gelagert. Vor der DNA-Extraktion wurden die Stechmücken entsprechend ihres Fundortes und ihrer Gattung in Pools von bis zu 50 Exemplaren aufgeteilt. Die Gattung wurde morphologisch nach Becker (5) identifiziert.

Diese Einteilung ergab für die verschiedenen Bundesländer folgende Stechmückenarten:

Wien: *Culex pipiens* s.l., *Coquillettidia richiardii*, *Aedes japonicus*, *Ae. vexans*, *Aedes* sp., *Culiseta* sp., *Anopheles claviger* s.l.

Burgenland: *Culex pipiens* s.l., *An. hyrcanus*, *An. plumbeus*, *An. maculipennis* s.l., *An. claviger* s.l., *Ae. geniculatus*, *Ae. japonicus*, *Ae. annulipes*, *Ae. vexans*, *Ae. koreicus*, *Aedes* sp., *Cq. richiardii*

Oberösterreich: *Culex pipiens* s.l., *Ae. japonicus*, *Ae. geniculatus*, *An. plumbeus*, *Cq. richiardii*, *Cs. annulata*

Insgesamt wurden 137 *Cx. pipiens/torrentium*-Pools und 76 Pools mit anderen Arten erstellt.

Die Poolprobennummern setzen sich aus drei Teilen zusammen:

1. Das Jahr in dem gesammelt wurde, in diesem Fall 22 für 2022,
2. Dem Buchstaben für das Bundesland, aus dem die Probe stammt (V für Wien, O für Oberösterreich und B für Burgenland) und
3. Einer fortlaufenden Nummer.

Die Stechmücken, die in dieser Studie verwendet wurden, waren bereits im Rahmen von Monitoring-Programmen gefangen und auf Artniveau bestimmt worden.

2.2. DNA-Extraktion und PCR

Die gepoolten Proben wurden nach Bundesländern sortiert in den Bundesländergruppen nach Artengruppen (*Cx. pipiens/ torrentium* und andere Arten) eingeteilt und bearbeitet.

Die Pools wurden mit dem Qiagen® DNeasy™ Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) bearbeitet um die DNA zu extrahieren. Für diese Studie wurde zusätzlich bereits vorher extrahierte DNA der „*Cx. pipiens/torrentium*“ Gruppe verwendet.

Bei der Extraktion wurde nach der Anleitung von Qiagen® vorgegangen. Zuerst wurden die Proben homogenisiert. Dazu wurden die Stechmücken mit Lysis-Puffer und Keramikugeln, mit der Größe von 2,8 mm, beides von Qiagen im Set enthalten, in ein Röhrchen gegeben. Die Tubes wurden mit Hilfe des TissueLyserII- Qiagen® 3 Minuten bei $f = 30/s$ homogenisiert. Anschließend wurden die Proben 10 Minuten stehen gelassen. Danach wurde Proteinase K dazugegeben und die Tubes über Nacht bei $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 350 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde mit Puffern und Ethanol in mehreren Waschschritten die DNA extrahiert und Proben A und B erzeugt. Für die weiteren Schritte wurden die Proben A verwendet.

Die durch diesen Prozess gewonnene DNA und die bereits vorher zur Verfügung gestellte DNA wurden anschließend für die entsprechenden PCR-Protokolle verwendet. Je nach gesuchtem Erreger wurden unterschiedliche Primer und Protokolle genutzt. Dabei wurden sowohl eine einfache, konventionelle PCR als auch zwei nested PCR verwendet. Bei einer nested PCR wird das Produkt aus der ersten konventionellen PCR als Template für eine weitere PCR mit einem anderen Primer-Paar eingesetzt.. Dies führt zu einer höheren Spezifität. Das Herstellen des Master Mixes erfolgte jeweils mit den Reagenzien GoTaq-Polymerase und dem Green Buffer von Promega (Fitchburg, USA).

2.2.1 Trypanosomen

Für Trypanosomen wurde eine nested PCR mit Primern, die am 18SrRNA Gen binden, angewendet. Gefunden werden sollen Trypanosomatidae. Die Primersequenzen wurden bereits früher in einer Studie verwendet (19).

Primersequenz für Nest 1:

Tryp_18S_F1: 5'- GTGGACTGCCATGGCGTTGA -3'

Tryp_18S_R1: 5'- CAGCTTGGATCTCGTCCGTTGA -3'

Primersequenz für Nest 2:

Forward Primer: Tryp_18S_F2: 5'- CGATGAGGCAGCGAAAAGAAATAGAG -3'

Reverse Primer: Tryp_18S_R2: 5'- GACTGTAACCTCAAAGCTTTCGCG -3'

Der Master Mix wurde aus folgenden Substanzen zusammengesetzt (Tab. 1):

Tab. 1: Master Mix 18S Pipettierschema.

Reagens	Amount (µl)	
	1 tube	100 tubes
H ₂ O	14,675 µl	1467,5 µl
5X Green Reaction Buffer	5 µl	500 µl
dNTP's (25mM)	0,2µl	20 µl
TaqPolymerase (GoTaq) 5u/µl	0,125 µl	12,5 µl
Primer (10pmol/µl)	2 µl	200 µl
Primer (10pmol/µl)	2 µl	200 µl
Template / Nest 1 Produkt	1 µl	100 x 1 µl
Total	25	2500

Das folgende Temperaturprofil wurde für beide Nester eingestellt (Tab. 2):

Tab. 2: Temperaturkurve 18S.

94 °C	5 min	Initiale Denaturierung
94 °C	1 min	
56 °C	1 min	35 x

72 °C	1 min	
72 °C	5 min	
15 °C	Pause	

Das positive PCR-Produkt hat bei Nest 1 eine Größe von 1320 bp bzw. bei Nest 2 eine Größe von 960 bp. Nur das Produkt der zweiten PCR wurde auf ein Agarosegel aufgetragen, mittels Gelelektrophorese analysiert und anschließend unter UV-Licht (der Firma DNR Bio Imaging Systems Ltd.) betrachtet.

2.2.2. Plasmodien

Auch zum Nachweis von Plasmodien wurde eine nested PCR, mit Sequenzen nach Hellgren, verwendet (20). Mit dieser sollen *Haemoproteus* und *Plasmodium* nachgewiesen werden.

Primersequenz für Nest 1:

Forward Primer: Haem NF1: 5'- CATATATTAAGAGAA5TATGGAG -3'

Reverse Primer: Haem NR3: 5'- ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC -3'

Primersequenz für Nest 2:

Forward Primer: Haem FL: 5'- ATGGTGCTTTTCGATATATGCATG -3'

Reverse Primer: Haem R2L: 5'- GCATTATCTGGATGTGATAATGGT -3'

Für den Master Mix wurde folgende Mischung verwendet (Tab. 3):

Tab. 3: Master Mix Plasmodien Pipettierschema.

Reagens	Menge (µl)	
	1 tube	100 tubes
H ₂ O	15.375 µl	1537.5 µl
5X Green Reaction Buffer	5 µl	500.0 µl

dNTP's (25mM)	0.2 µl	20,0 µl
TaqPolymerase (GoTaq) 5u/µl	0.125 µl	12,5 µl
Primer (100pmol/µl)	0.150 µl	15.0 µl
Primer (100pmol/µl)	0.150 µl	15.0 µl
Template / Nest 1 Produkt	4 µl	100 x 4µl
Gesamt	25	2500

Folgendes Temperaturprofile wurden angewendet (Tab. 4):

Tab. 4: Temperaturkurve Plasmodien

95 °C	2 min	Initial Denaturierung
95 °C	45 sec	
50 °C	45 sec	35 x
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	
15 °C	Pause	

Das gesuchte PCR-Produkt ist 480 bp groß. Auch in diesem Fall wurde nur das Produkt von der zweiten PCR auf einem Agarosegel aufgetrennt und unter UV-Licht (der Firma DNR Bio Imaging Systems Ltd.) betrachtet.

2.2.3. Filarien

Zum Nachweis von *Setaria tundra*/ *S. equina* bzw. *Dirofilaria immitis*/ *D. repens* wurde wie in ähnlichen Studien das „COI Primer“-Paar verwendet (21). Die Primer haben folgende Basenpaarabfolge:

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

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

Für den Master Mix wurde folgendes Mischungsverhältnis verwendet (Tab. 5):

Tab. 5: Master Mix Col Pipettierschema.

Reagens	Menge (µl)	
	1 tube	100 tubes
H ₂ O	13.675 µl	1367.5 µl
5X Reaction Buffer	5 µl	500.0 µl
dNTP's (25mM)	0.2 µl	20.0 µl
TaqPolymerase (GoTaq) 5u/µl	0.125 µl	12.5 µl
Primer (25pmol/µl)	2 µl	200.0 µl
Primer (25pmol/µl)	2 µl	200.0 µl
Template	2 µl	100 x 2µl

Folgendes Temperaturprofil wurde angewendet (Tab. 6):

Tab. 6: Temperaturkurve Col.

94 °C	2 min	Initiale Denaturierung
94 °C	45 sek	
51 °C	45 sek	8x reduziert um 0,5°C bei jedem Zyklus

72 °C	1,5 min	
94 °C	45 sek	
45 °C	45 sek	25x
72 °C	1,5 min	
72 °C	7 min	
15°	Pause	

Hierbei handelt es sich um eine Touchdown-PCR, was bedeutet, dass die Temperatur mit jedem Zyklus reduziert wird und so eine höhere Spezifität erreicht wird.

Das PCR-Produkt wurde auf ein Agarosegel aufgetragen und per Gelelektrophorese auf eine Basenpaarlänge von 668 bp untersucht.

2.3. Sequenzanalyse

Die Proben, deren PCR-Produkte nach der Gelelektrophorese eine Bande in der gesuchten Größe aufwiesen, wurden anschließend zum Sequenzieren eingeschickt (LGC Genomics GmbH, Germany). Hiermit sollte überprüft werden, ob jene gepoolten Proben tatsächlich gesuchte Erregersequenzen enthalten, und, wenn möglich, festgestellt werden um welchen Erreger es sich genau handelt.

Die Ergebnisse der Sequenzanalysen wurden zum Abgleich mit bekannten Sequenzen in der GenBank® des NIH (USA) verglichen. Hierzu wurden die Sequenzergebnisse in den Datenbanken eingegeben und mit den am besten übereinstimmenden Ergebnissen, also bestehenden Sequenzen, verglichen. Die Ergebnisse der Plasmodien-PCRs wurden zusätzlich in die MalAvi-Datenbank eingegeben und verglichen. Dabei wurde auch auf geographische Nähe geachtet.

Die Ergebnisse wurden anschließend tabellarisch ausgewertet.

3. Ergebnisse

Insgesamt wurden 62 gepoolte Proben positiv getestet. Davon sind 49 der Art *Cx. pipiens/torrentium* zuzuordnen (Abb. 5).

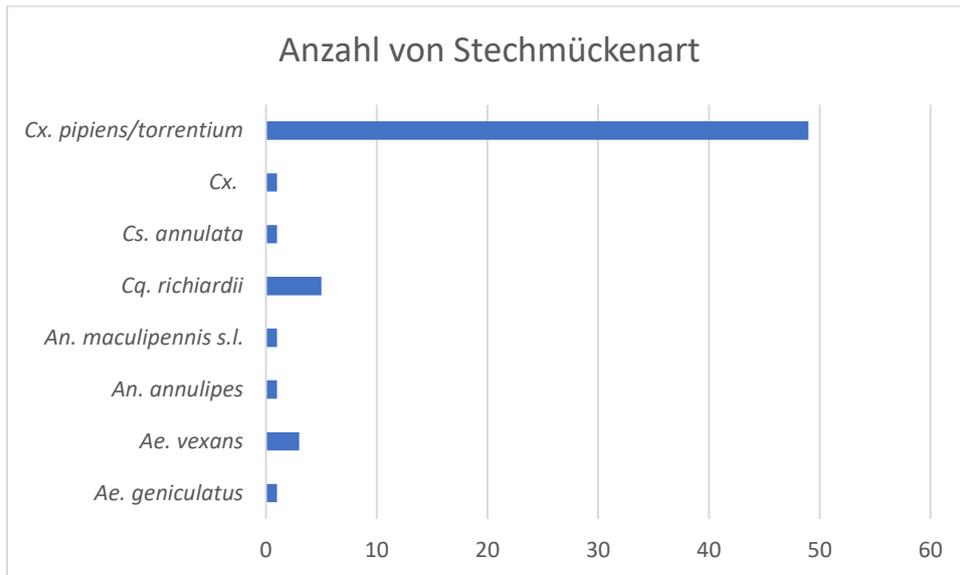


Abb. 5: Verteilung Stechmückenarten.

3.1. Trypanosomen

Insgesamt wiesen 37 gepoolte Proben im Agarosegel eine spezifische Bande auf. Bei diesen Proben ist die Artenverteilung wie in der Abbildung 6 dargestellt:

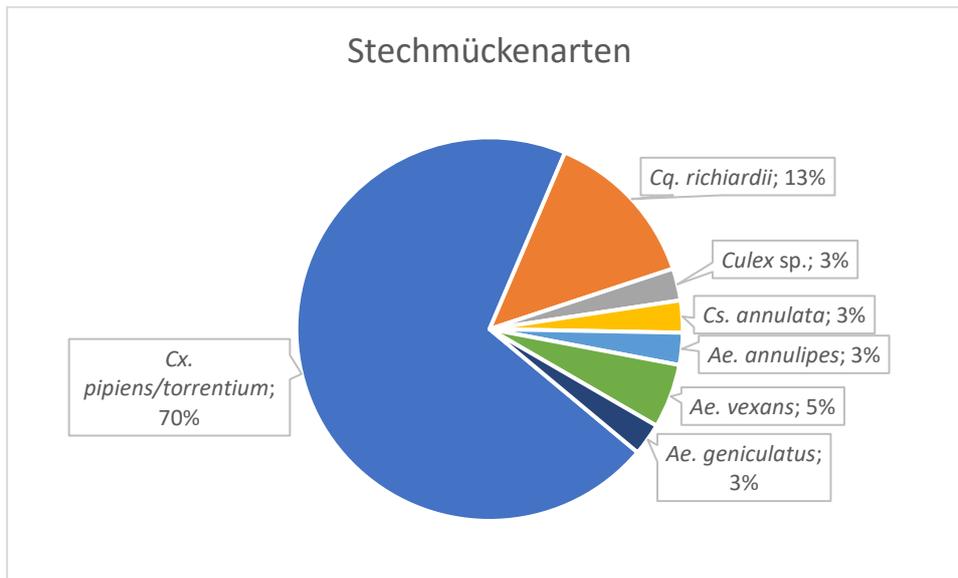


Abb. 6: Verteilung der positiven Stechmückenarten beim Nachweis von Trypanosomen.

3.1.1. Wien

Die in Wien gesammelten Stechmücken wurden auf 95 gepoolte Proben aufgeteilt, wovon 69 Stück der *Cx. pipiens/torrentium* Gruppe und 26 Stück anderen Arten zugeordnet wurden (Tab. 7).

Insgesamt 19 Poolproben durch die PCR als positiv gewertet werden, davon sind 16 der Gruppe *Cx. pipiens/torrentium* zuzuordnen. Bei einer weiteren Probe konnte nur auf Artniveau (*Culex*) bestimmt werden. Die zwei anderen positiven gepoolten Proben wurden *Cq. richiardii* zugeordnet.

Mit 12 Poolproben waren ca. 12,6 % der Wiener Proben positiv auf Trypanosomen. Dabei wurden elf Proben *Trypanosoma culicavium* isolate CUL6 zugeordnet und eine weitere Probe *Trypanosoma* sp. LZ-2011 isolate CUL2, welche beide bereits aus der Tschechischen Republik bekannt sind.

Des Weiteren wurden Übereinstimmungen mit Trypanosomatidae sp. Isolate DN1136 (vier Proben) und Trypanosomatidae sp. G38 (eine Probe) gefunden. Beide wurden außerhalb Europas identifiziert. Der Anteil an positiven Proben macht ca. 5,3 % aus.

Die Probe 22V058, aus einer *Cq. richiardii* Poolprobe isoliert, stimmt zu 99,16 % mit dem Genbank®-Eintrag KX901634 überein, welche als *Crithidia flexonema* isolate COLPROT 016 definiert ist. In diesem Fall wurde ein Pathogen der Stechmücken nachgewiesen.

Tab. 7: Trypanosomen Wien

Probe	Art	Sequenz- Ergebnis	Übereinstimmung %	Locus Genbankeintrag
22V005	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	Uncultured bodonid_Typ1 partial		
22V007	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Trypanosoma</i> sp. LZ-2011 isolate CUL2	100	JN006834
22V020	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Trypanosoma culicavium</i> isolate CUL6	100	HQ107970
22V021	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Trypanosoma culicavium</i> isolate CUL6	100	HQ107970
22V029	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Trypanosoma culicavium</i> isolate CUL6	100	HQ107970
22V031	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Trypanosoma culicavium</i> isolate CUL6	100	HQ107970
22V041	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Trypanosoma culicavium</i> isolate CUL6	100	HQ107970
22V045	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Trypanosoma culicavium</i> isolate CUL6	100	HQ107970
22V046	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Trypanosoma culicavium</i> isolate CUL6	100	HQ107970
22V053	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Trypanosoma culicavium</i> isolate CUL6	100	HQ107970
22V060	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Trypanosoma culicavium</i> isolate CUL6	100	HQ107970
22V073	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Trypanosoma culicavium</i> isolate CUL6	100	HQ107970
22V096	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Trypanosoma culicavium</i> isolate CUL6	100	HQ107970

22V042	Cx.	Trypanosomatidae sp. isolate DN1136	98,5	MW869897
22V064	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	Trypanosomatidae sp. isolate DN1136- like	99,89	MW869897
22V071	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	Trypanosomatidae sp. isolate DN1136	97,98	MW869897
22V093	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	Trypanosomatidae sp. isolate DN1136	99,37	MW869897
22V032	<i>Cq. richiardii</i>	Trypanosomatidae sp. G38	98,91	JQ658828
22V058	<i>Cq. richiardii</i>	<i>Crithidia flexonema</i> isolate COLPROT 016	99,16	KX901634

3.1.2. Oberösterreich

Bei den 59 gepoolten Proben aus Oberösterreich konnten insgesamt 42 Pools zu *Cx. pipiens/torrentium* und 17 zu „andere Arten“ zugeordnet werden. Positiv getestet wurden davon vier Proben zugehörig zu der *Cx. pipiens/torrentium*-Gruppe, sowie je eine zu *Cs. annulata* und *Cq. richiardii* (10,2 %) (Tab. 8).

In einer Probe konnte *Trypanosoma* sp. LZ- 2011 isolate CUL2 und in zwei Proben *Trypanosoma culicavium* isolate CUL6 nachgewiesen werden. Zusammen machen sie also 50 % der positiven oberösterreichischen Proben aus.

Eine Probe konnte als Trypanosomatidae sp. Isolate DN1136 identifiziert werden.

Zwei weitere Proben wurden als Parasiten der Stechmücken ermittelt. Hier wurden *Blastocrithidia* sp. ex *Lygus* sp. und *Leptomonas spiculata* isolate Re31_cult gefunden. Sie entsprechen ca. 3,4 % aller Proben aus diesem Bundesland.

Tab. 8: Trypanosomen Oberösterreich.

Probe	Art	Sequenz- Ergebnis	Übereinstimmung %	Locus Genbankeintrag
22O033	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Trypanosoma</i> sp. LZ- 2011 isolate CUL2	100	JN006834

22O034	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Trypanosoma culicavium</i> isolate CUL6	100	HQ107970
22O047	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Trypanosoma culicavium</i> isolate CUL6	90,23	HQ107970
22O036	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	Trypanosomatidae sp. isolate DN1136	98,5	MW869897
22O016	<i>Cs. annulata</i>	<i>Blastocrithidia</i> sp. ex Lygus sp	100	KX138601
22O037	<i>Cq. richiardii</i>	<i>Leptomonas spiculata</i> isolate Re31_cult	100	MT174505

3.1.3. Burgenland

Aus den im Burgenland gesammelten Proben wurden 61 gepoolte Proben erstellt. Diese verteilen sich auf 26 *Cx. pipiens/torrentium* Proben und 35 andere Arten Proben. Jeweils sechs gepoolte Proben wurden als positiv gewertet und zum Sequenzieren geschickt (19,7 %)

Die Proben 22B021 und 22B056 sind beide aus *Cx. pipiens/torrentium* isoliert worden. Beide Proben stimmen zu 99,89 % mit dem Genbank®-Eintrag MW869897 aus Thailand überein.

Drei Proben konnten *Trypanosoma culicavium* isolate CUL6 (4,9 %) zugeordnet werden. Zwei weitere Proben ergaben Trypanosomatidae sp. isolate DN1136. Je eine Probe erzielte 100 % Übereinstimmung mit *Trypanosoma* sp. isolate 5alces bzw. *Trypanosoma* sp. isolate D1812. Ebenfalls drei Proben konnten nur auf Artniveau bestimmt werden (*Trypanosoma* sp.). Insgesamt konnten aus dem Burgenland also zehn Proben den Trypanosomatidae zugeordnet werden, was ca. 16,4 % entspricht.

Des Weiteren wurden je einmal *Crithidia dobrovolskii* isolate C23 und *Crithidia brevicula* isolate S24 gefunden. Bei diesen handelt es sich um Parasiten der Stechmücken.

Tab. 9: Trypanosomen Burgenland.

Probe	Art	Sequenz-Ergebnis	Übereinstimmung %	Locus Genbankeintrag
22B003	<i>Ae. annulipes</i>	<i>Crithidia brevicula</i> isolate S24	100	MT232056
22B015	<i>Ae. vexans</i>	<i>Trypanosoma</i> sp. isolate 5alces	100	ON870925
22B017	<i>Ae. vexans</i>	<i>Trypanosoma</i> sp. isolate D1812	100	OM256721
22B019	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Crithidia dobrovolskii</i> isolate C23	99,83	MN809265
22B021	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	Trypanosomatidae sp. isolate DN1136	99,89	MW869897
22B056	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	Trypanosomatidae sp. isolate DN1136	99,89	MW869897
22B023	<i>Cq. richiardii</i>	<i>Trypanosoma</i> sp.		
22B046	<i>Cq. richiardii</i>	<i>Trypanosoma</i> sp.		
22B060	<i>Ae. geniculatus</i>	<i>Trypanosoma</i> sp.		
22B027	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Trypanosoma culicavium</i> isolate CUL6	99,67	HQ107970
22B043	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Trypanosoma culicavium</i> isolate CUL6	100	HQ107970
22B061	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Trypanosoma culicavium</i> isolate CUL6	100	HQ107970

3.2. Plasmodien

Insgesamt wurden 35 Proben als positiv gewertet. Darunter konnten 34 zu *Cx. pipiens/torrentium* und nur eine zu einer anderen Art, nämlich *An. maculipennis* s.l., geordnet werden.

3.2.1. Wien

In Wien wurden 22 von 69 Proben (entspricht 31,9 %) positiv auf Plasmodien getestet. (Tab. 10). Alle diese Proben sind *Cx. pipiens/torrentium* zuzuordnen.

Die Probe 22V006 konnte mit der Genbank® nicht genauer bestimmt werden als *Plasmodium vaughani*. Bei MalAvi zeigte sich eine 97%ige Übereinstimmung zu dem Isolat SYAT05. Genauer bestimmt werden konnten sieben Poolproben. Diese stimmen zu 100 % mit der Voucherprobe AH0063 für *Plasmodium vaughani* isolate syat05 aus Österreich überein. Aber auch andere Proben aus Europa erreichen eine so hohe Übereinstimmung. Auch in MalAvi hat die Probe 100 % Übereinstimmung mit dem Eintrag SYAT05. Diese wurde in vielen Ländern Europas, den USA, Brasilien, Marokko, Iran, Kenia, Russland, Japan und auch Neuseeland bestätigt. Insgesamt machen diese Proben einen Anteil von 11,6 % aus.

Ebenfalls sieben Proben konnten dem Genbank®-Eintrag MK652232 aus Österreich zugeordnet werden. Dieser wurde als *Plasmodium relictum* voucher VETMED AH0069 bestimmt. Bei MalAvi ist die Übereinstimmung zu 100 % mit dem Eintrag SGS1, der in vielen Ländern Europas, Afrikas, Asiens, Nordamerika, und Neuseeland gefunden wurde. Ihr Anteil der Proben macht 10,1 % aus.

Nur zwei Proben konnten als *P. relictum* bestimmt werden. In MalAvi konnten sie SYCON02 aus Spanien (22V039) bzw. YWT4 aus Spanien, Bulgarien, Südafrika und Japan zugeordnet werden. Ihr Anteil beträgt nur 2,9 %.

Zu *Plasmodium elongatum* voucher VETMED AH0420 passten zwei Poolproben (2,9 %). Dieser Eintrag stammt ebenfalls aus Österreich. In MalAvi passen die Proben zu dem Eintrag TRMUS02, der aus Brasilien und Argentinien stammt.

Drei Poolproben stimmen zu 100 % mit *Plasmodium matutinum* voucher VETMED AH0079 aus Österreich überein (4,3 %). In MalAvi stimmen die Sequenzen mit dem Eintrag LINN1 zu 100 % überein. Dieser wurde in großen Teilen Europas, den USA, Japan und Neuseeland bestätigt.

Am häufigsten wurde also *P. relictum* nachgewiesen, gefolgt von *P. vaughani*. Aber auch *P. matutinum* und *P. elongatum* konnten gefunden werden. In der folgenden Grafik werden die Anteile dargestellt (Abb. 7):

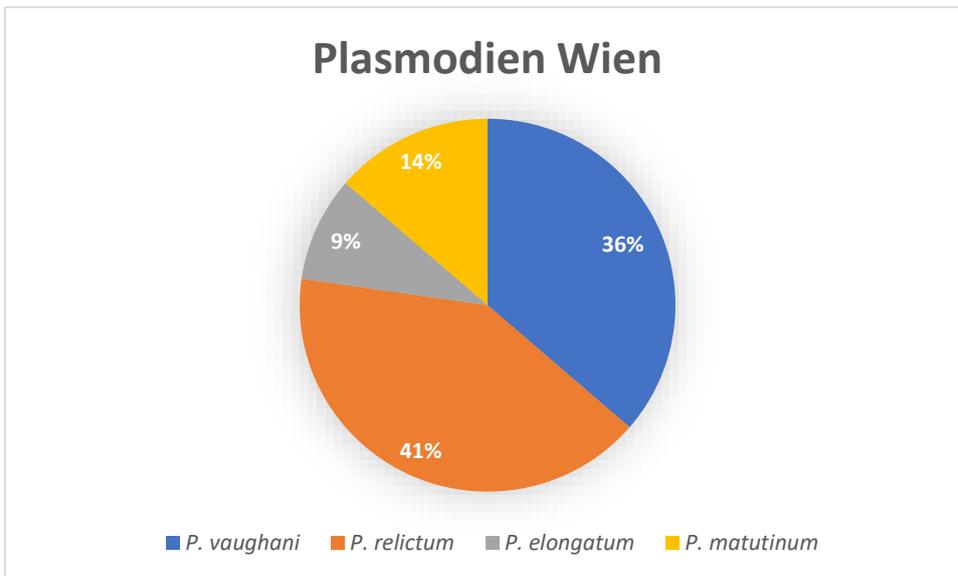


Abb. 7: Plasmodien Wien.

Tab. 10: Plasmodien Wien.

Probe	Art	Sequenz Ergebnis	Übereinstimmung %	Locus Genbank-eintrag	MalAvi	Übereinstimmung %
22V006	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Plasmodium vaughani</i>	97,39	JQ778281	SYAT05	97
22V009	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Plasmodium vaughani</i> isolate syat05	100	MT912207	SYAT05	100
22V014	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Plasmodium vaughani</i> isolate syat05	100	MT912207	SYAT05	100
22V020	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Plasmodium vaughani</i> isolate syat05	100	MT912207	SYAT05	100
22V021	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Plasmodium vaughani</i> isolate syat05	100	MT912207	SYAT05	100
22V029	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Plasmodium vaughani</i> isolate syat05	100	MT912207	SYAT05	100

22V046	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Plasmodium vaughani</i> isolate syat05	100	MT912207	SYAT05	100
22V064	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Plasmodium vaughani</i> isolate syat05	100	MT912207	SYAT05	100
22V026	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Plasmodium relictum</i> voucher VETMED AH0069	100	MK652232	SGS1	100
22V034	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Plasmodium relictum</i> voucher VETMED AH0069	100	MK652232	SGS1	100
22V049	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Plasmodium relictum</i> voucher VETMED AH0069	100	MK652232	SGS1	100
22V055	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Plasmodium relictum</i> voucher VETMED AH0069	100	MK652232	SGS1	100
22V062	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Plasmodium relictum</i> voucher VETMED AH0069	100	MK652232	SGS1	100
22V077	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Plasmodium relictum</i> voucher VETMED AH0069	100	MK652232	SGS1	100
22V096	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Plasmodium relictum</i> voucher VETMED AH0069	100	MK652232	SGS1	100
22V039	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Plasmodium relictum</i>			SYCON02	97
22V041	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Plasmodium relictum</i>			YWT4	98

22V031	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Plasmodium elongatum</i> voucher VETMED AH0420	100	MK652238	TRMUS02	100
22V052	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Plasmodium elongatum</i>	98,76	MK652238	TRMUS02	99
22V045	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Plasmodium matutinum</i> voucher VETMED AH0079	100	MK652234	LINN1	100
22V067	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Plasmodium matutinum</i> voucher VETMED AH0079	100	MK652234	LINN1	100
22V071	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Plasmodium matutinum</i> voucher VETMED AH0079	100	MK652234	LINN1	100

3.2.2. Oberösterreich

Von den 59 gepoolten Proben aus Oberösterreich waren insgesamt vier Pools positiv (6,8 %) (Tab. 11). Genauso wie bei den Proben aus Wien sind alle vier Isolate aus *Cx. pipiens/torrentium*.

Zwei Proben konnten als *Plasmodium vaughani* isolate syat05 bestimmt werden. Der passende Genbank®-Eintrag stammt aus Österreich. Der MalAvi-Eintrag SYAT05 konnte ebenfalls zugeordnet werden (gefunden in vielen Ländern Europas, den USA, Brasilien, Marokko, Iran, Kenia, Russland, Japan und Neuseeland).

Eine Poolprobe wurde *Plasmodium relictum* voucher VETMED AH0069 aus Österreich zugeordnet. Ebenfalls zu 100 % passt diese Sequenz zu dem MalAvi-Eintrag SGS1, der in vielen Ländern Europas, Afrikas, Asiens, Nordamerika, und Neuseeland eingetragen wurde.

Zu 100 % passt eine vierte Probe zu *Plasmodium matutinum* voucher VETMED AH0079. In MalAvi kann eine 100%ige Übereinstimmung mit LINN1 aus großen Teilen Europas, den USA, Japan und Neuseeland gefunden werden.

Tab. 11: Plasmodien Oberösterreich.

Probe	Art	Sequenz Ergebnis	Übereinstimmung %	Locus Genbank-eintrag	MalAvi	Übereinstimmung %
22O035	Cx. <i>pipiens/torrentium</i>	<i>Plasmodium vauhani</i> isolate syat05	100	MT912207	SYAT05	100
22O036	Cx. <i>pipiens/torrentium</i>	<i>Plasmodium vauhani</i> isolate syat06	100	MT912207	SYAT05	100
22O040	Cx. <i>pipiens/torrentium</i>	<i>Plasmodium relictum</i> voucher VETMED AH0069	100	MK652232	SGS1	100
22O047	Cx. <i>pipiens/torrentium</i>	<i>Plasmodium matutinum</i> voucher VETMED AH0079	100	MK652234	LINN1	100

3.2.3. Burgenland

Aus den Burgenlandproben waren acht Proben von *Cx. pipiens/torrentium* positiv in der PCR, während nur eine Probe von *An. maculipennis* s.l. zum Sequenzieren eingeschickt wurde. Somit wurden nur neun der 61 Proben in weiteren Schritten verwendet (14,8 %) (Tab. 12).

Drei Proben wurden *Plasmodium matutinum* voucher VETMED AH0079 aus Österreich zugeordnet. Sie passen außerdem zu 100 % zu dem MalAvi-Eintrag LINN1, welcher in großen Teilen Europas, den USA, Japan und Neuseeland gefunden wurden. Eine weitere Probe konnte nicht genauer als *P. matutinum* bestimmt werden, passt in MalAvi jedoch auch zu dem gleichen Eintrag LINN1. Sie machen zusammen 6,6 % der Burgenlandproben aus.

Als *Plasmodium vaughani* isolate syat05 definiert der österreichische Genbank®-Eintrag MT912207, zu welchem die Probe 22B030 zu 100 % passt. In MalAvi konnte eine 100%ige Übereinstimmung mit dem Eintrag SYAT05 erzielt werden. Diese Sequenz hat Einträge aus vielen europäischen Ländern, den USA, Brasilien, Marokko, Iran, Kenia, Russland, Japan und aus Neuseeland.

Zwei Proben konnten nicht genauer als *Plasmodium sp.* bestimmt werden. Die einzige andere Arten Probe, die in der PCR positiv war, ist aus *An. maculipennis* isoliert worden. Diese konnte ebenfalls nicht näher als *Plasmodium sp.* bestimmt werden. Bei MalAvi konnten Übereinstimmungen mit MALNI02 und PLOSAN05 gefunden werden. Beide Übereinstimmungen wurden mehrfach in Zentralafrika gefunden. Zusammen haben sie einen Anteil von 4,9 % der Proben aus dem Burgenland.

Eine weitere Probe konnte nicht genauer als *Haemoproteus sp.* zugeordnet werden. Auch in MalAvi konnte keine höhere Übereinstimmung als 96 % festgestellt werden. Diese Übereinstimmung ist mit dem Eintrag CCF23 aus Österreich, Portugal, Schweden und der Slowakei.

Tab. 12: Plasmodien Burgenland.

Probe	Art	Sequenz Ergebnis	Übereinstimmung %	Locus Genbank -eintrag	MalAvi	Übereinstimmung %
22B006	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Haemoproteus sp.</i>	100	MK061708	CCF23	96
22B012	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Plasmodium matutinum</i> voucher VETMED AH0079	100	MK652234	LINN1	100
22B027	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Plasmodium matutinum</i> voucher VETMED AH0079	100	MK652234	LINN1	100
22B036	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Plasmodium matutinum</i> voucher VETMED AH0079	100	MK652234	LINN1	100
22B038	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Plasmodium matutinum</i>	97,71	MK652234	LINN1	98

22B030	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Plasmodium vaughani</i> isolate syat05	100	MT91220 7	SYAT0 5	100
22B050	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Plasmodium</i> sp.			MALNI 02	98
22B051	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	<i>Plasmodium</i> sp.			PLOS AN05	99
22B053	<i>An. maculipennis</i> s.l.	<i>Plasmodium</i> sp.			PLOS AN05	96

3.3. Filarien

Von allen Poolproben waren nur vier Proben in der PCR auf Filarien positiv.

3.3.1. Wien

In Wien konnten keine Filarien gefunden werden.

3.3.2. Oberösterreich

In Oberösterreich konnte in zwei Proben Filarien nachgewiesen werden beide von *Cx. pipiens/torrentium* (Tab. 13).

Die Probe 22O030 ist 99 % übereinstimmend zu dem Genbank®-Eintrag LC107818, während die Probe 22O046 zu 99,69 % mit dem Eintrag LC107819 übereinstimmt. Beide stammen aus Spanien, sind ebenfalls aus *Cx. pipiens* isoliert worden und sind als Onchocercidae bestimmt worden.

Tab. 13: Filarien Oberösterreich.

Probe	Art	Sequenz- Ergebnis	Übereinstimmung %	Locus Genbankeintrag
22O030	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	Onchocercidae_Typ1	99	LC107818
22O046	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	Onchocercidae_Typ2	99,69	LC107819

3.3.3. Burgenland

Beide auf Filarien positiven Poolproben aus dem Burgenland sind aus *Ae. vexans* isoliert worden.

Die Probe 22B015 stimmt zu 98,68 % mit dem Genbank®-Eintrag KF692104 aus Deutschland überein. Damit lässt sich dieses Isolat als *Setaria tundra* einordnen (Tab. 14).

Mit 100 % Übereinstimmung zu dem Eintrag MF695094 kann die Probe 22B025 als *Setaria tundra* isolate SU902 bestimmt werden. Diese Vergleichssequenz stammt ebenfalls aus Österreich.

Tab. 14: Filarien Burgenland.

Probe	Art	Sequenz-Ergebnis	Übereinstimmung %	Locus Genbankeintrag
22B015	<i>Ae. vexans</i>	<i>Setaria tundra</i>	98,68	KF692104
22B025	<i>Ae. vexans</i>	<i>Setaria tundra</i> isolate SU902	100	MF695094

3.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Bundesländer kurz dargelegt, ohne erneut genauer auf die Erregerarten einzugehen.

3.4.1. Wien

In Wien konnten sowohl Trypanosomen als auch Plasmodien nachgewiesen werden. Filarien konnten nicht nachgewiesen werden.

Außerdem waren elf Poolproben sowohl bei Trypanosomen sowie Plasmodien positiv (Tab.15).

Tab. 15: Erreger Wien, schwarz einfacher Erregerfund – rot doppelter Erregerfund.

Probe	Trypanosomen	Plasmodien	Filarien
22V005	X		
22V006	X	X	
22V007	X		
22V009		X	
22V014		X	
22V020	X	X	
22V021	X	X	
22V026		X	
22V029	X	X	
22V031	X	X	
22V032	X		
22V034		X	
22V039		X	
22V041	X	X	
22V042	X		
22V045	X	X	
22V046	X	X	
22V049		X	
22V052		X	
22V053	X		
22V055		X	
22V058	X		
22V060	X		
22V062		X	
22V064	X	X	
22V067		X	
22V071	X	X	

22V073	X		
22V077		X	
22V093	X		
22V096	X	X	

3.4.2. Oberösterreich

In Oberösterreich konnten Trypanosomen, Plasmodien und Filarien nachgewiesen werden.

Bei zwei der Proben konnten sowohl Trypanosomen, als auch Plasmodien nachgewiesen werden (Tab. 16).

Tab. 16: Erreger Oberösterreich, schwarz einfacher Erregerfund – rot doppelter Erregerfund.

Probe	Trypanosomen	Plasmodien	Filarien
22O016	X		
22O030			X
22O033	X		
22O034	X		
22O035		X	
22O036	X	X	
22O037	X		
22O040		X	
22O046			X
22O047	X	X	

3.4.3. Burgenland

Im Burgenland konnten Trypanosomen, Plasmodien und Filarien nachgewiesen werden.

Mit *Setaria tundra* wurden hier Filarien gefunden.

Auch im Burgenland konnten in zwei Proben Sequenzen von zwei Filarien gefunden werden (Tab. 17).

Tab. 17: Erreger Burgenland, schwarz einfacher Erregerfund – rot doppelter Erregerfund.

Probe	Trypanosomen	Plasmodien	Filarien
22B003	X		
22B006		X	
22B012		X	

22B015	X		X
22B017	X		
22B019	X		
22B021	X		
22B023	X		
22B025			X
22B027	X	X	
22B030		X	
22B036		X	
22B038		X	
22B043	X		
22B046	X		
22B050		X	
22B051		X	
22B053		X	
22B056	X		
22B060	X		
22B061	X		

3.4.4. Proben mit mehreren Erregern

Insgesamt waren 15 Poolproben bei zwei PCRs positiv. Dabei war nur in einer Probe auch eine Filarienart enthalten (Tab. 18).

Keine der gepoolten Proben war auf alle drei getesteten Erreger positiv.

Tab. 18: Doppelter Erregernachweis.

Probe	Trypanosomen	Plasmodien	Filarien
22V006	X	X	
22V020	X	X	
22V021	X	X	
22V029	X	X	
22V031	X	X	
22V041	X	X	
22V045	X	X	
22V046	X	X	
22V064	X	X	
22V071	X	X	
22V096	X	X	
22O036	X	X	
22O047	X	X	

22B015	X		X
22B027	X	X	

4. Diskussion

Ziel dieser Studie war es, festzustellen, ob und wenn, welche Erreger die gesammelten Stechmücken in Wien, Oberösterreich und dem Burgenland aus 2022 in sich tragen.

Getestet wurde dabei auf Trypanosomen, aviäre Plasmodien und Filarien.

Die gefangenen Stechmücken wurden je nach Art, Sammelort und -datum in gepoolten Proben mit 1 bis 50 einzelnen Individuen zusammengefasst. Diese 213 Poolproben teilten sich auf in *Cx. pipiens/torrentium* (137) und „andere Arten“ (76). In insgesamt 62 Proben konnten Erreger nachgewiesen werden, was ca. 29,1 % der Proben entspricht. Hiervon konnten in 15 Proben zwei Erreger nachgewiesen werden (7,04 %).

Die überwiegende Mehrheit (49) der Stechmücken gehörten zu *Cx. pipiens/torrentium* s.l. Nur 13 der positiven Proben gehörten zu anderen Arten. Diese verteilten sich folgendermaßen: *Cq. richiardii* (5), *Ae. vexans* (3), *Ae. geniculatus* (1), *An. annulipes* (1), *An. maculipennis* (1), *Cs. annulata* (1), *Culex* sp.(1).

Außerdem ist auch der Anteil der gepoolten Proben, die positiv sind, höher in der Gruppe der *Cx. pipiens/torrentium*. Hier waren mit 137 Proben, ca. 35,8 %, positiv, während nur ca. 17,1 % der Anderen Arten positiv waren.

Es konnten in allen drei Bundesländern Parasiten nachgewiesen werden:

In Wien konnten sowohl Trypanosomen als auch Plasmodien nachgewiesen werden. Darunter sowohl Parasiten, die Stechmücken als Vektoren und für ihren Entwicklungszyklus nutzen, als auch Parasiten, die nur Stechmücken als Wirt nutzen. Filarien konnten nicht nachgewiesen werden.

Anders verhielt es sich in Oberösterreich und dem Burgenland. Hier wurden Parasiten mit monoxenem und polyxenem Lebensstil gefunden. Es konnten sowohl Trypanosomen, Plasmodien als auch Filarien (Burgenland) bzw. Onchocercidae (Oberösterreich) nachgewiesen werden.

Die Trypanosomen-PCR erbrachte 12 positive Ergebnisse von *T. culicavium*. Das Isolat CUL6 wurde bereits 2011 in einer Studie veröffentlicht (gefunden in der Tschechischen Republik aus *Cx. pipiens*) (11). Ebenfalls aus der Tschechischen Republik, aus *Cx. pipiens* und aus dem Jahr 2011 stammt der Nachweis von dem Isolat CUL2 (22). Außerhalb Europas wurde Trypanosomatidae sp. isolate DN1136, gefunden in *Cx. fuscocephala*, publiziert, zu welchem auch hohe Übereinstimmungen, bis zu 99,89 % festgestellt werden konnten. Außerdem

wurden u. a. auch andere Arten wie *Blastocrithidia* sp. und *Leptomonas spiculata* nachgewiesen. Beide gehören zu den Leishmaniinae, eine Unterfamilie der Trypanosomatidae, und sind Parasiten der Stechmücken.

Die gefundenen Plasmodien waren *P. relictum*, *P. vaughani*, *P. matutinum* und *P. elongatum*. Dabei wurde eine 100%ige Übereinstimmung mit den Voucherproben aus einer Studie festgestellt, die 2019 veröffentlicht wurde. Diese Datenbankeinträge heißen *Plasmodium relictum* voucher VETMED AH0069 (aus *Parus major*), *Plasmodium matutinum* voucher VETMED AH0079 (aus *Turdus merula*) und *Plasmodium elongatum* voucher VETMED AH0420 (aus *Corvus corone*) (23). In jenen Studien wurden die Erreger in Vögeln gefunden, in dieser Studie erfolgte der Nachweis in Stechmücken. Die *P. vaughani*-DNA erzielte ebenfalls eine Übereinstimmung von 100 % mit dem Isolat *Plasmodium vaughani*_Syat05 aus derselben Studie aus Österreich.

Bei den im Burgenland gefundenen Filarien handelt es sich um den weißen Fadenwurm, der Rehwild befällt, *Setaria tundra*. Die zwei *S. tundra* Ergebnisse passen genetisch zu einer Sequenz einer 2018 veröffentlichten Studie aus dem Raum Wien bzw. zu einer Studie aus Deutschland von 2014 (24, 25).

Zu den Proben, die nicht genauer differenziert werden konnten, lässt sich keine genauere Aussage treffen. Die erhaltene Sequenz war nicht eindeutig genug (bzw. von schlechter Qualität) um sie den Genbankeinträgen entsprechend zuzuordnen.

Diese Studie hatte auch einige Limitierungen. Die einzelnen Stechmücken werden lebend in der Kohlendioxidfalle gefangen, die von außen und auf die Entfernung nicht beeinflusst werden kann. Daher sind diese dem Klima weiter ausgesetzt, soweit wie es das Innere der Falle zulässt. Es kann außerdem nicht bestimmt werden, wie lange sich die Stechmücken in der Falle befinden, bevor diese geleert wird. Die Fallen werden an einem Tag im Gelände an fixen Punkten aufgestellt und am nächsten Tag besammelt.

Es wurden somit nur adulte Stechmücken gefangen. Um einen Überblick über die vorhandenen Arten zu bekommen, wäre es auch möglich gewesen, Eier und Larven zu sammeln und zu bestimmen. Eier spielen jedoch als Vektor keine Rolle.

Das Poolen der Proben führt dazu, dass in den gepoolten Proben unterschiedlich viele Stechmückenindividuen enthalten sind (1-50 in dieser Studie). Es lässt sich daher nicht sagen, wie viele Stechmücken tatsächlich Erreger und Parasiten in sich trugen. Es kann nur eine Aussage über die Gesamtheit der gepoolten Probe getroffen werden. Eine oder mehrere Stechmücken in einer gepoolten Probe können also Träger von einem oder mehreren Erregern (oder Parasiten der gleichen Art) sein. Dies kann dazu führen, dass Sequenzen nicht eindeutig zu bestimmen sind. Es kommen also mehrere Gründe dafür in Frage, warum die genaue Erregerart nicht bestimmt werden konnte. Es lag möglicherweise daran, dass mehrere Erregerarten die Sequenz uneindeutig machten, das Material durch Lagern und Bearbeiten beschädigt wurde oder das durch die PCR nicht genügend Material amplifiziert wurde (26).

Ebenfalls möglich ist, dass die Sequenz nicht genauer bestimmt werden konnte, weil sie entweder noch nicht nachgewiesen oder nicht publiziert und in die entsprechenden Datenbanken eingetragen wurde (27). Zu bedenken ist hierbei auch, dass entsprechende Monitoring-Programme nicht überall stattfinden bzw. nicht alle Daten überall öffentlich zugänglich gemacht werden.

In dieser Studie wurden bestimmte Primer verwendet, deren Basensequenzen oben genannt wurden. Für den Nachweis der gesuchten Erreger können jedoch auch andere Primer mit anderen Basenfolgen verwendet werden. Diese könnten eine andere Spezifität oder Sensitivität haben und damit andere Ergebnisse erzielen (28).

Dazu wurden die PCR nur mit den A-Proben durchgeführt. Es gab keine Kontrollen mit den B-Proben.

Durch den Klimawandel verändern sich die natürlichen Lebensräume auch von Stechmücken (1). Damit verschieben sich auch die Lebensräume der Parasiten, die die Stechmücken in sich tragen. So können Parasiten, die ursprünglich nicht heimisch in Österreich sind, plötzlich auch in Österreich nachgewiesen werden (1, 6, 7). Besonderes Augenmerk liegt dabei auf den Filarien *Dirofilaria immitis* und *D. repens*. Diese kommen zurzeit nicht in Österreich vor und auch in dieser Studie wurden sie nicht nachgewiesen.

In Zukunft ist es jedoch wahrscheinlich, dass sich mit den Stechmückenarten, wie der Asiatischen Tigermücke (*Ae. albopictus*), auch die zwei Dirofilarienarten ausbreiten und heimisch werden. Dies liegt daran, dass sich das Stechverhalten von *Ae. albopictus* und *Cx. pipiens f. pipiens* grundlegend unterscheidet (5).

Außerdem ist es möglich, dass Erreger, die nicht in Österreich heimisch sind, eingeschleppt werden können. Dies kann für die Population, die naiv gegenüber solchen Erregern ist, sehr gefährlich werden und zu potentiellen Massensterben führen (z.B. Vogel malaria bei Pinguinen in Zoos (29)).

Um die mögliche Gefahr einer Infektion mit neuen Erregern rechtzeitig zu erkennen ist es daher notwendig, entsprechende Monitoring-Programme fortzuführen.

Literatuverzeichnis

1. Schoener E, Zittra C, Weiss S, Walder G, Barogh BS, Weiler S et al. Monitoring of alien mosquitoes of the genus *Aedes* (Diptera: Culicidae) in Austria. *Parasitol Res* 2019; 118(5):1633–8.
2. AGES. AGES - Infos zu Gelsen & Stechmücken; 2023 [cited 2023 Sep 13]. Available from: URL: <https://www.ages.at/mensch/krankheit/infos-zu-gelsen-krankheiten#c7629>.
3. Culicidae Classification | Mosquito Taxonomic Inventory; 2023 [cited 2023 Sep 13]. Available from: URL: <https://mosquito-taxonomic-inventory.myspecies.info/simpletaxonomy/term/6045>.
4. Medlock JM, Hansford KM, Schaffner F, Versteirt V, Hendrickx G, Zeller H et al. A review of the invasive mosquitoes in Europe: ecology, public health risks, and control options. *Vector-Borne Zoonot Dis* 2012; 12(6):435–47.
5. Becker N. Mosquitoes and their control. 2nd ed. Berlin, London: Springer; 2010.
6. Prudhomme J, Fontaine A, Lacour G, Gantier J-C, Diancourt L, Velo E et al. The native European *Aedes geniculatus* mosquito species can transmit chikungunya virus. *Emerg Microb Infect* 2019; 8(1):962–72.
7. Becker N, Geier M, Balczun C, Bradersen U, Huber K, Kiel E et al. Repeated introduction of *Aedes albopictus* into Germany, July to October 2012. *Parasitol Res* 2013; 112(4):1787–90.
8. CDC - DPDx - Trypanosomiasis, African; 2023 [cited 2023 Sep 20]. Available from: URL: <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisafrican/index.html>.
9. CDC - DPDx - American Trypanosomiasis; 2023 [cited 2023 Sep 20]. Available from: URL: <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>.
10. Fialová M, Santolíkova A, Brotánková A, Brzoňová J, Svobodová M. Complete Life Cycle of *Trypanosoma thomasbancrofti*, an Avian Trypanosome Transmitted by Culicine Mosquitoes. *Microorganisms* 2021; 9(10).
11. Votýpka J, Szabová J, Rádová J, Zídková L, Svobodová M. *Trypanosoma culicavium* sp. nov., an avian trypanosome transmitted by *Culex* mosquitoes. *Int J Syst Evol Microbiol* 2012; 62(Pt 3):745–54.

12. RKI - RKI-Ratgeber - Malaria; 2023 [cited 2023 Sep 20]. Available from: URL: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Malaria.html.
13. Schoener E, Uebleis SS, Butter J, Nawratil M, Cuk C, Flechl E et al. Avian Plasmodium in Eastern Austrian mosquitoes. *Malar J* 2017; 16(1):389.
14. Himmel T, Harl J, Matt J, Weissenböck H. A citizen science-based survey of avian mortality focusing on haemosporidian infections in wild passerine birds. *Malar J* 2021; 20(1):417.
15. Dinhopf N, Nedorost N, Mostegl MM, Weissenbacher-Lang C, Weissenböck H. In situ hybridization and sequence analysis reveal an association of Plasmodium spp. with mortalities in wild passerine birds in Austria. *Parasitol Res* 2015; 114(4):1455–62.
16. Genchi C, Kramer L. Subcutaneous dirofilariasis (*Dirofilaria repens*): an infection spreading throughout the old world. *Parasit Vectors* 2017; 10(Suppl 2):517.
17. Capelli G, Genchi C, Baneth G, Bourdeau P, Brianti E, Cardoso L et al. Recent advances on *Dirofilaria repens* in dogs and humans in Europe. *Parasit Vectors* 2018; 11(1):663.
18. CDC - DPDx - Dirofilariasis; 2023 [cited 2023 Sep 20]. Available from: URL: <https://www.cdc.gov/dpdx/dirofilariasis/index.html>.
19. Peña-Espinoza M, Em D, Shahi-Barogh B, Berer D, Duscher GG, van der Vloedt L et al. Molecular pathogen screening of louse flies (Diptera: Hippoboscidae) from domestic and wild ruminants in Austria. *Parasit Vectors* 2023; 16(1):179.
20. Hellgren O, Waldenström J, Bensch S. A new PCR assay for simultaneous studies of Leucocytozoon, Plasmodium, and Haemoproteus from avian blood. *J Parasitol* 2004; 90(4):797–802.
21. Gabrielli S, Mangano V, Furzi F, Oliva A, Vita S, Poscia R et al. Molecular Identification of New Cases of Human Dirofilariasis (*Dirofilaria repens*) in Italy. *Pathogens* 2021; 10(2).
22. Zídková L, Cepicka I, Szabová J, Svobodová M. Biodiversity of avian trypanosomes. *Infect Genet Evol* 2012; 12(1):102–12.
23. Harl J, Himmel T, Valkiūnas G, Weissenböck H. The nuclear 18S ribosomal DNAs of avian haemosporidian parasites. *Malar J* 2019; 18(1):305.

24. Kronefeld M, Kampen H, Sassnau R, Werner D. Molecular detection of *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* and *Setaria tundra* in mosquitoes from Germany. *Parasit Vectors* 2014; 7:30.
25. Übleis SS, Cuk C, Nawratil M, Butter J, Schoener E, Obwaller AG et al. Xenomonitoring of Mosquitoes (Diptera: Culicidae) for the Presence of Filarioid Helminths in Eastern Austria. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2018; 2018:9754695.
26. Vajpayee K, Dash HR, Parekh PB, Shukla RK. PCR inhibitors and facilitators - Their role in forensic DNA analysis. *Forensic Science International* 2023; 349:111773. Available from: URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0379073823002232>.
27. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J et al. GenBank. *Nucleic Acids Res* 2013; 41(Database issue):D36-42.
28. Green MR, Sambrook J. Touchdown Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harb Protoc* 2018; 2018(5).
29. Ings K, Denk D. Avian malaria in penguins: Diagnostics and future direction in the context of climate change. *Animals (Basel)* 2022; 12(5).

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Caroline Isabelle Glass, dass ich keine anderen als die erwähnten Hilfsmittel und Literaturstellen verwendet habe, die entscheidenden Arbeiten selbstständig durchgeführt habe und alle zuarbeitenden Tätigkeiten mit ihrem Beitrag zur Arbeit angeführt habe, die zur Beurteilung vorgelegte Diplomarbeit eigenständig verfasst habe, sowie die Arbeit nicht an anderer Stelle eingereicht oder veröffentlicht habe.

Danksagung

Zuerst möchte ich mich für die tolle Zusammenarbeit und die Hilfsbereitschaft beim den Mitarbeitern der Parasitologie, besonders meinem Betreuer Dr. Hans-Peter Fuehrer und seinem Team Barbara Eigner und Bitu Shahi-Barogh, bedanken.

Widmen möchte ich diese Arbeit meinen Eltern. Damit möchte ich mich für die andauernde Unterstützung und ihr Vertrauen bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Freunden, die ich während dem Studium gefunden habe, bedanken. Denn ohne sie wäre die Zeit nicht die gleiche gewesen.

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Entwicklungszyklus von Stechmücken (<https://i0.wp.com/sea.biogents.com/wp-content/uploads/2018/05/life-cycle-aedes-albopictus-asian-tiger-mosquito-en.jpg?w=800&ssl=1>).
- Abb. 2:** Entwicklungszyklus von *Trypanosoma brucei* (<https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisafrican/index.html>).
- Abb. 3:** Lebenszyklus von Plasmodien (Ishtiaq, Farah. Implications of Land Use Changes and Climate Change on Disease Dynamics).
- Abb. 4:** Lebenszyklus *Dirofilaria immitis* (<https://www.cdc.gov/dpdx/dirofilariasis/index.html>).
- Abb. 5:** Verteilung Stechmückenarten.
- Abb. 6:** Verteilung der positiven Stechmückenarten beim Nachweis von Trypanosomen.
- Abb. 7:** Plasmodien Wien.
- Tab. 9:** Master Mix 18S Pipettierschema.
- Tab. 10:** Temperaturkurve 18S.
- Tab. 11:** Master Mix Plasmodien Pipettierschema.
- Tab. 12:** Temperaturkurve Plasmodien
- Tab. 13:** Master Mix Col Pipettierschema.
- Tab. 14:** Temperaturkurve Col.
- Tab. 15:** Trypanosomen Wien.
- Tab. 16:** Trypanosomen Oberösterreich.
- Tab. 9:** Trypanosomen Burgenland.
- Tab. 10:** Plasmodien Wien.
- Tab. 11:** Plasmodien Oberösterreich.
- Tab. 12:** Plasmodien Burgenland.
- Tab. 13:** Filarien Oberösterreich.
- Tab. 14:** Filarien Burgenland.
- Tab. 15:** Erreger Wien, schwarz einfacher Erregerfund – rot doppelter Erregerfund.
- Tab. 16:** Erreger Oberösterreich, schwarz einfacher Erregerfund – rot doppelter Erregerfund.
- Tab. 17:** Erreger Burgenland, schwarz einfacher Erregerfund – rot doppelter Erregerfund.
- Tab. 18:** Doppelter Erregernachweis.