

Aus dem Department für Pathobiologie  
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Parasitologie

(Leiterin: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Anja Joachim, Dipl. EVPC)

**West-Nil Virus bei Pferden in Österreich – Eine Untersuchung  
von Stechmücken auf Flaviviren bei in den Vorjahren betroffenen  
Pferdekoppeln**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

Vorgelegt von Julia Wigger

Wien, im März 2023

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

Institut für Parasitologie

Department für Pathobiologie

Veterinärmedizinische Universität Wien

GutachterIn:

## Inhaltsverzeichnis

|       |                                                     |                                           |
|-------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| 1     | Abkürzungsverzeichnis .....                         | 6                                         |
| 2     | Einleitung und Fragestellung .....                  | 8                                         |
| 3     | Literaturübersicht .....                            | 10                                        |
| 3.1   | <i>Culex pipiens</i> s.l. / <i>torrentium</i> ..... | 10                                        |
| 3.1.1 | Morphologie .....                                   | 11                                        |
| 3.1.2 | Lebenszyklus .....                                  | 13                                        |
| 3.1.3 | Klinik .....                                        | 16                                        |
| 3.1.4 | Diagnostik.....                                     | <b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b> |
| 3.1.5 | Therapie und Prophylaxe .....                       | 17                                        |
| 3.2   | West-Nil-Virus.....                                 | 18                                        |
| 3.2.1 | Morphologie .....                                   | 18                                        |
| 3.2.2 | Lebenszyklus .....                                  | 18                                        |
| 3.2.3 | Klinik .....                                        | 20                                        |
| 3.2.4 | Diagnostik.....                                     | 21                                        |
| 3.2.5 | Therapie und Prophylaxe .....                       | 21                                        |
| 3.3   | Setarien .....                                      | 24                                        |
| 3.3.1 | Morphologie .....                                   | 25                                        |
| 3.3.2 | Lebenszyklus .....                                  | 25                                        |
| 3.3.3 | Klinik .....                                        | 25                                        |
| 3.3.4 | Diagnostik.....                                     | 26                                        |
| 3.3.5 | Therapie und Prophylaxe .....                       | 26                                        |
| 4     | Material und Methodik.....                          | 27                                        |
| 4.1   | Morphologische Analyse .....                        | 33                                        |

|           |                                       |    |
|-----------|---------------------------------------|----|
| 4.1.1     | <i>Culex pipiens/torrentium</i> ..... | 34 |
| 4.1.2     | <i>Aedes vexans</i> .....             | 35 |
| 4.2       | Molekulare Analyse .....              | 36 |
| 4.2.1     | Probenaufbereitung .....              | 36 |
| 4.2.2     | RNA-Isolierung .....                  | 36 |
| 4.2.3     | DNA-Isolierung .....                  | 37 |
| 4.2.4     | PCR .....                             | 38 |
| 4.2.4.1   | PCR-Protokolle .....                  | 38 |
| 4.2.4.1.1 | Flaviviren NS51 One-Step RT-PCR ..... | 39 |
| 4.2.4.1.2 | Flaviviren NS52 Nested-PCR .....      | 40 |
| 4.2.4.1.3 | Filarioide Nematoden .....            | 41 |
| 4.2.5     | Herstellung des Argarosegels .....    | 42 |
| 4.2.6     | Gelelektrophorese .....               | 43 |
| 4.2.7     | Sequenzierung .....                   | 43 |
| 4.3       | Statistische Analyse .....            | 43 |
| 5         | Ergebnisse .....                      | 45 |
| 5.1       | Morphologische Analyse .....          | 45 |
| 5.2       | Molekularbiologische Analyse .....    | 46 |
| 5.3       | Statistische Analyse .....            | 47 |
| 6         | Diskussion .....                      | 48 |
| 7         | Zusammenfassung .....                 | 51 |
| 8         | Summary .....                         | 52 |
| 9         | Literaturverzeichnis .....            | 53 |
| 10        | Abbildungsverzeichnis .....           | 60 |
| 12        | Tabellenverzeichnis .....             | 62 |

|    |                 |    |
|----|-----------------|----|
| 14 | Anhang.....     | 63 |
| 16 | Danksagung..... | 72 |

## 1 Abkürzungsverzeichnis

|                 |                                                         |
|-----------------|---------------------------------------------------------|
| °C              | Grad Celsius                                            |
| <i>Ae.</i>      | <i>Aedes</i>                                            |
| AK              | Antikörper                                              |
| <i>An.</i>      | <i>Anopheles</i>                                        |
| <i>Bac.</i>     | <i>Bacillus</i>                                         |
| BG              | BG-Sentinel der Firma Biogents, Regensburg, Deutschland |
| bp              | Basenpaare                                              |
| Bti             | <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>               |
| CO <sub>2</sub> | Kohlendioxid                                            |
| <i>Cq.</i>      | <i>Coquillettidia</i>                                   |
| <i>Cs.</i>      | <i>Culiseta</i>                                         |
| <i>Cx.</i>      | <i>Culex</i>                                            |
| D.              | <i>Dirofilaria</i>                                      |
| DNA             | Desoxyribonukleinsäure                                  |
| ECDC            | European Centre for Disease Prevention and Control      |
| ELISA           | Enzyme-linked Immunosorbent Assay                       |
| f.              | forma                                                   |
| g               | Gramm                                                   |
| g               | Erdbeschleunigung                                       |
| Hz              | Hertz                                                   |
| Ig              | Immunglobulin                                           |
| JEV             | Japanisches-Enzephalitis-Virus                          |

|           |                           |
|-----------|---------------------------|
| L         | Larvalstadium             |
| m         | Meter                     |
| min       | Minuten                   |
| mm        | Millimeter                |
| µl        | Mikroliter                |
| PCR       | Polymerase-Kettenreaktion |
| pmol      | Picomol                   |
| RNA       | Ribonukleinsäure          |
| rpm       | runs per minute           |
| <i>S.</i> | <i>Setaria</i>            |
| s.l.      | sensu lato                |
| sp.       | Spezies                   |
| TBE       | TRIS-Borat-EDTA-Buffer    |
| UV        | Ultraviolett              |
| WNF       | West-Nil-Fieber           |
| WNV       | West-Nil-Virus            |
| ZNS       | Zentralnervensystem       |

## 2 Einleitung und Fragestellung

Stechmücken sind nicht nur Lästlinge, sondern können von großer human- und veterinärmedizinischer Bedeutung sein (Becker et al. 2020). Sie stellen die wichtigsten Vektoren für viele Infektionserreger dar, dazu gehören unter anderem die Erreger von Malaria, das Zika-Virus, West-Nil-Virus (WNV) sowie verschiedene Arten der Gattung *Dirofilaria* (*D.*) (Fuehrer et al. 2016, Becker et al. 2020).

Die unter Anderem in Österreich einheimische Gattung *Culex* (*Cx.*) ist der relevanteste Überträger des WNV (Rossi et al. 2010). Dieses Virus verursacht das West-Nil-Fieber, wobei es sich um eine schwerwiegende Krankheit handelt, die zwar oft asymptomatisch bleibt, jedoch auch ernste Krankheitsverläufe zeigen kann (Semenza und Suk 2018). Dieser Infektionserreger ist ursprünglich in Regionen wie Afrika und dem Mittleren Osten endemisch, wird von Vögeln – v.a. migrierenden – über weite Strecken verbreitet und fand so wahrscheinlich auch seinen Weg nach Mitteleuropa (Rappole und Hubálek 2003). Zwar ist hierzulande das Risiko einer Ansteckung noch als sehr gering zu bewerten (Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH. Zugriff: 26.02.2022), dennoch kommt es in Europa zu saisonalen Ausbrüchen dieser Viruserkrankung (Camp und Nowotny 2020). Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob sich das Risiko einer Infektion mit WNV in Österreich mit weiter ansteigenden Temperaturen und den damit verbundenen Änderungen von Vektorvorkommen und Zugverhalten der Zugvögel nicht bald ändern könnte (Semenza und Suk 2018). Darüber hinaus wurde die Ribonukleinsäure (RNA) des Erregers bereits in überwinterten Stechmücken nachgewiesen, was eine Persistenz des Erregers über den europäischen Winter hinweg demonstriert (Rudolf et al. 2017).

Durch den andauernden globalen Klimawandel sowie die Globalisierung haben sich mittlerweile auch nicht heimische Stechmückenarten erfolgreich in Mitteleuropa etabliert (Semenza et al. 2016, Semenza und Suk 2018). Dazu zählt unter anderem die Asiatische Buschmücke *Ae. japonicus*. Während die asiatische Tigermücke *Ae. albopictus* noch seltener in Österreich dokumentiert wird, ist *Ae. japonicus* hierzulande bereits weit verbreitet (Bakran-Lebl et al. 2022). Mit der Etablierung nicht indigener Arten und den daraus resultierenden



medizinischen Folgen gewinnen diese Vektoren in Bezug auf das Gesundheitswesen immer mehr an Bedeutung (Fuehrer et al. 2020).

Ein Beispiel für einen Infektionserreger, der vermutlich durch den Klimawandel erst vor Kurzem Einzug hierzulande erhalten und zu den ersten autochthonen Erkrankungen geführt hat ist der Parasit *D. repens*, welcher auch von potentiell invasiven Mückenspezies übertragen werden kann (Zittra et al. 2014). Auch Filarien wie *Setaria (S.) tundra* und *S. equina* bedienen sich der Stechmücken als Vektoren (Kronefeld et al. 2014, Mera y Sierra et al. 2017). Vor allem *S. tundra* hat seinen Lebensraum in den letzten Jahrzehnten um viele tausend Kilometer erweitert. Dieser Parasit ist insbesondere für Rentiere und Rehwild infektiös und hat in den vergangenen Jahren große wirtschaftliche Verluste in Fennoskandinavien verursacht (Oloś et al. 2021). Das Vorkommen von *S. equina* hingegen wird als kosmopolitisch beschrieben (Hornok et al. 2007). Dieser Parasit hat vor allem veterinärmedizinische Relevanz und kann bei Equiden ebenfalls schwere Krankheitserscheinungen hervorrufen (Schnieder 2006).

In dieser Diplomarbeit soll das Risiko einer WNV-Infektion in der Nähe von Pferdekoppeln im Osten Österreichs untersucht werden. Dafür werden Stechmücken morphologischen und molekularen Analysen unterzogen, um neben des Infektionsrisikos auch einen Überblick über die vorkommenden Arten zu erhalten. Eine Eruiierung über die Prävalenz von Filarien in Stechmücken wird ebenfalls angeschlossen. Auswahlkriterium für diese Standorte war zumindest ein positiver WNV-Fall bei Pferden innerhalb der letzten Jahre.

### 3 Literaturübersicht

#### 3.1 *Culex pipiens* s.l. /*torrentium*

Die Familie der Culicidae gilt mit über 3000 Vertretern weltweit als besonders artenreich (Hiepe et al. 2006). Von diesen kommen in Europa ca. 100 Arten vor (Deplazes et al. 2021). Man kann diese große Gruppe in zwei Unterfamilien teilen. Zum einen die Anophelinae und zum anderen die Culicinae (Becker et al. 2020). In der Unterfamilie Anophelinae gibt es lediglich die Gattung *Anopheles*. Der Unterfamilie Culicinae sind die Gattungen *Aedes*, *Culex*, *Culiseta* (Cs.) und *Coquillettidia* (Cq.) angehörig. Vor allem die Gattungen *Aedes* und *Culex* werden immer wieder zur Qual für Mensch und Tier, da sie in großer Zahl vorkommen können. Die Arten *Ae. albopictus* und *Ae. japonicus* stammen ursprünglich nicht aus Europa, konnten sich hier jedoch in vielen Regionen als potentiell invasive Art behaupten. Als Insekten gehören die Culicidae dem Stamm der Arthropoda (Gliederfüßer) und der Klasse Insecta an. Weiters sind sie der Ordnung Diptera (Zweiflügler) und der Unterordnung Nematocera (Mücken) zugehörig (Deplazes et al. 2021). Die Gattung *Culex* beinhaltet unter anderem die Arten *Cx. torrentium*, *Cx. restuans* und *Cx. nigripalus*, sowie den Artenkomplex *Cx. pipiens* s.l., welcher sieben Taxa (*Cx. quinquefasciatus*, *Cx. pipiens pallens*, *Cx. australicus*, *Cx. globocoxitus*, *Cx. pipiens* L., *Cx. pipiens* forma (f.) *pipiens* und *Cx. pipiens* f. *molestus*) einschließt. Diese sind in ihrer Morphologie kaum zu unterscheiden, weisen aber erhebliche Unterschiede bezüglich ihres Verhaltens, Wirtspräferenz und Physiologie auf. Auch die eigenstehende Art *Cx. torrentium* ist durch äußere Merkmale nicht von dem *Cx. pipiens* Komplex zu unterscheiden (Zittra et al. 2016). Stechmücken zählen zu den für die Human- und Veterinärmedizin relevantesten Vektoren. Besonderer medizinischer Bedeutung kommt ihrer Funktion als Vektoren für verschiedene Infektionserreger wie West-Nil-Virus, Erreger der Malaria und Zika-Virus zu (Becker et al. 2020).

Arten, die in Zentraleuropa auftreten, präferieren bestimmte Habitate, wodurch auch die deutsche Namensgebung erklärt wird. Als Überschwemmungsmücken werden *Ae. vexans*, und *Ae. sticticus* bezeichnet, die vor allem in Feuchtgebieten, Auwäldern und Weiden gefunden werden (Deplazes et al. 2021). Die Arten *Ae. vexans* und *Ae. sticticus* können lange Strecken (bis 20 Meilen) zurücklegen und kommen so auch in Gebieten vor, die nicht direkt ihrem Brutgebiet anliegen (Becker et al. 2020). Waldmücken sind solche, die besonders Tümpel oder

Gräben in Wäldern als Vermehrungsort bevorzugen. Dazu gehört unter anderem *Ae. cantans*. Die Gattungen *Culex* und *Culiseta* kommen vor allem in menschlicher Nähe vor und werden als Hausmücken bezeichnet (Deplazes et al. 2021).

Die größte Aktivität verzeichnen die meisten Vertreter der Culicidae in der Dämmerung, jedoch gibt es auch nachtaktive Arten wie *Cx. pipiens* s.l. (gemeine Hausmücke) oder Exemplare der Anophelinae. Verschiedene indigene sowie potentiell invasive Arten (*Ae. albopictus* und *Ae. japonicus*) sind auch tagsüber aktiv. Nur die Weibchen saugen Blut, leben also hämatophag. Diese sind meist nicht wirtsspezifisch, nur einige Arten sind wirtsliebend und werden dann entsprechend als ornithophil, zoophil oder anthropophil bezeichnet. Arten der Gattungen *Anopheles*, *Aedes* und Hausmücken (*Culex* spp.) dringen des Öfteren in Häuser und Wohnungen ein. Die Wirtsfindung kann in drei Phasen gegliedert werden, bei denen die Weibchen besonders auf olfaktorische, thermale und visuelle Stimuli reagieren (Becker et al. 2020). Über gewisse Distanzen (bis zu über 20 m) können geeignete Wirte mithilfe olfaktorischer Reize ausfindig gemacht werden (Becker et al. 2010). Dabei spielt sowohl das abgeatmete Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) als auch der abgesonderte Schweiß mit seinen spezifischen Duftstoffen eine wichtige Rolle (Becker et al. 2020). Die Wirtsfindung über kurze Distanzen erfordert vor allem bei tagaktiven Stechmücken zusätzlich optische Stimulationen. Olfaktorische und thermale Reize helfen, eine geeignete Lokalisation zur Blutaufnahme auf dem Wirt auszuwählen (Becker et al. 2010). Bei einer Mahlzeit kann ein adultes Weibchen das bis zu dreifache seines Gewichts in Blut aufnehmen. Da es für diese Parasiten von äußerster Wichtigkeit ist, dass das Blut flüssig bleibt und nicht gerinnt, wird bei jedem Saugakt auch antikoagulatorisch wirkender Speichel in die Wunde des Wirts abgesondert. Dieser Speichel sorgt für eine immunologische Antwort des Wirts und führt zu Irritationen und Pruritus. Blut wird von den weiblichen Stechmücken vor allem für die Produktion von Eiern benötigt und trägt nicht wesentlich zur Deckung des Eigenenergiebedarfs bei. Für letzteres dienen bei beiden Geschlechtern vor allem pflanzliche Zucker wie von Früchten oder Blütennektar (Becker et al. 2020).

### 3.1.1 Morphologie

Typische Merkmale der Culicidae sind eine Körpergröße von 4-10 mm und schlanke, lange Beine (Deplazes et al. 2021). Die weiblichen Individuen sind blutsaugend, besitzen zur

Nahrungsaufnahme einen langen Stechrüssel (Proboscis) und zusätzlich stechend-saugende Mundwerkzeuge (Becker et al. 2020). Männchen besitzen diese Mundwerkzeuge nur in zurückgebildeter Form, wodurch sie nicht zur Blutaufnahme fähig sind. Sie sind jedoch nötig für die Aufnahme von Pflanzensäften. Ein weiteres Merkmal der Culicidae, durch welches ebenfalls eine zuverlässige Unterscheidung zwischen Männchen und Weibchen möglich ist, sind die Antennen (Antennae). Diese bestehen bei beiden Geschlechtern aus 15 Gliedern und sind beim Männchen stark gefiedert, beim Weibchen jedoch nur mit kurzen Haaren besetzt. Ähnlich verhält es sich mit den Maxillartastern. Bei männlichen Individuen sind auch diese lang und deutlich behaart, beim weiblichen Geschlecht wiederum sind sie kurz und Haare nur marginal vorhanden (Deplazes et al. 2021). Die Flügel werden beim Ruhen flach übereinander gehalten. Anophelinae lassen sich von Culicinae durch mehrere typische Merkmale leicht unterscheiden. So erscheinen Anophelinae im Allgemeinen eher schlank und zierlich, während Culicinae einen gedrungenen Habitus besitzen. Auch die Sitzhaltung hilft zur Gattungsbestimmung: Stechrüssel und Körperachse sind bei allen Arten außer Anophelinae abgewinkelt, bei *Anopheles* hingegen, bilden sie eine gerade Linie, wodurch der Körper von der Unterlage wegweist. Auch die Abdominalsegmente sind unterschiedlich ausgebildet. Bei Culicinae sind sie dicht mit farbigen Schuppen besetzt, wohingegen sie bei den Anophelinae keine Schuppen tragen. (Hiepe et al. 2006).

Abbildung 1 zeigt ein adultes Individuum von *Cx. pipiens* zur Veranschaulichung.



**Abbildung 1:** Individuum der Art *Culex pipiens*. (DeVries P., Wikipedia.  
[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Culex\\_pipiens\\_Pete\\_DeVries.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Culex_pipiens_Pete_DeVries.jpg), Zugriff: 20.02.2022)

### 3.1.2 Lebenszyklus

Als Mitglied der Ordnung Diptera durchlaufen die Stechmücken eine vollständige Metamorphose. Nach dem Schlupf folgen bei den Stechmückenlarven vier Larvenstadien, wonach sie sich über Verpuppung schließlich zum adulten Individuum entwickeln (Becker et al. 2020).

Der Lebenszyklus wird in Abbildung 2 verdeutlicht.

Die meisten Vertreter der Culicidae benötigen zur Eiablage, welche nachts erfolgt, stehende Gewässer (Hiepe et al. 2006). Solange das entsprechende Biotop geeignet ist, können als Ablageplatz alle erdenklichen Wasserkörper in Frage kommen - von Überschwemmungsgebieten über Tümpel bis hin zu kleinen Pfützen. Als einzige Ausnahme hierzu stehen die Vertreter der Überschwemmungsmücken, die zur Eiablage lediglich feuchte Erde benötigen, welche die Eier vor Austrocknung schützt. Mit steigendem Wasserlevel werden diese Eier allmählich überschwemmt (Becker et al. 2020).

Nahezu sofort nach der Eiablage beginnt die Entwicklung der Embryonen, diese ist je nach Umgebungstemperatur und Spezies innerhalb von 2-7 oder mehr Tagen abgeschlossen. So können die Larven der Gattung *Culex* bei einer Umgebungstemperatur von 30 Grad Celsius (°C) schon einen Tag nach Eiablage schlüpfen. Im Gegensatz dazu stehen die relativ langen embryonalen Entwicklungszeiten der Gattung *Aedes*, die bei einer Temperatur von 25°C 4-8 Tage von Oviposition bis zum Schlupf benötigen. Im Kontrast dazu stehen einige andere Arten, die eine Diapause zwischengeschaltet haben, bis die optimalen abiotischen Umweltbedingungen für den Schlupf der Larven erreicht sind (Becker et al. 2020).

Das Schlüpfen dauert nur wenige Minuten und wird durch einen Abfall der O<sub>2</sub>-Konzentration des umgebenden Gewässers stimuliert (Becker et al. 2020).

Die im Wasser geschlüpften Larven sind beweglich und entwickeln sich über vier Stadien durch Häutung zu einer ebenfalls beweglichen Puppe. Die Dauer dieser Entwicklung ist je nach Art unterschiedlich und abhängig von den gegebenen Umweltbedingungen (Becker et al. 2020). Innerhalb von 8-21 Tagen kann diese Metamorphose unter günstigen Voraussetzungen vollständig abgeschlossen werden. So können sehr große Populationen von Stechmücken entstehen. Vor allem warme und feuchte Sommer erlauben einen schnellen Generationswechsel

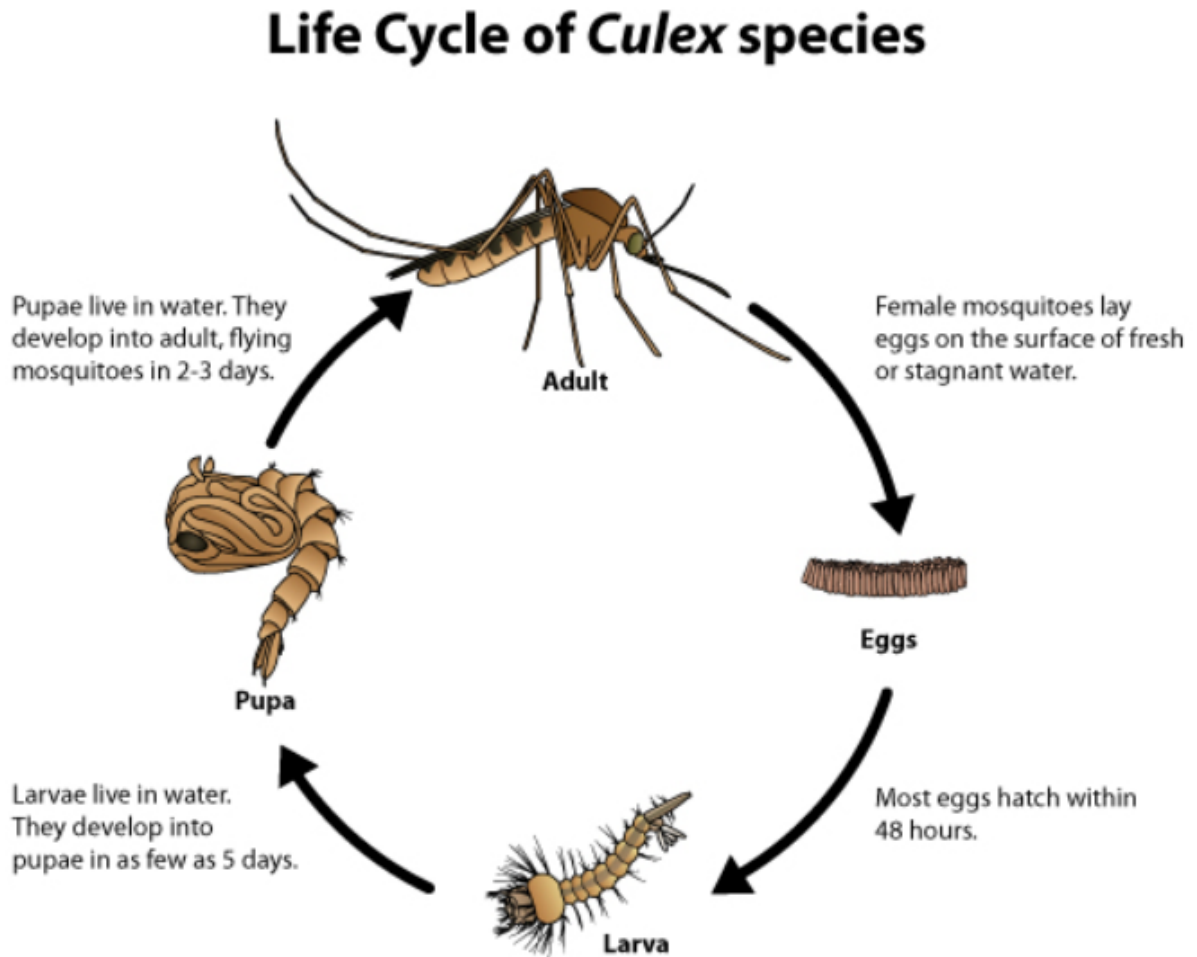
und es kommt zu einer regelrechten Massenentwicklung von Mücken. *Cx. pipiens* s.l. beispielsweise kann so im Jahr bis zu 7 Generationen entwickeln. *Coquillettidia* hingegen entwickelt jährlich nur eine Generation, deren Individuen schlüpfen im Juni oder Juli (Deplazes et al. 2021). Sowohl Larven als auch Puppen leben und atmen an der Oberfläche des Wassers (Hiepe et al. 2006). Als einzige Ausnahme hierzu stehen *Coquillettidia* und *Mansonia*, deren Larven submers leben und ihren Sauerstoffbedarf durch luftführendes Gewebe von Wasserpflanzen, welches sie anstechen, decken können (Becker et al. 2020).

Der Zeitraum, in dem die Stechmücken als Puppen verweilen ist stark abhängig von der Umgebungstemperatur, in der Regel dauert dieses Stadium zwei Tage. Verpuppt nehmen diese Insekten keine Nahrung zu sich. Im Gegensatz zu Puppenstadien anderer Insektenarten, sind die Puppen der Stechmücken relativ beweglich und in der Lage bei Störungen abzutauchen. In diesem Stadium können die meisten Arten Trockenheit gut tolerieren. Auch nach Strandung sind die Adulten noch in der Lage zu schlüpfen (Becker et al. 2020).

Die aus der Puppe geschlüpften geschlechtsreifen Adulten (Imagines) können innerhalb von wenigen Minuten fliegen und paaren sich sehr schnell. Männliche Individuen benötigen nach dem Schlupf noch ca. einen Tag für die vollständige sexuelle Entwicklung, wohingegen Weibchen direkt nach dem Schlupf paarungsbereit sind. Aus diesem Grund schlüpfen die Männchen meist 1-2 Tage vor den Weibchen (Becker et al. 2020). Das Schlagen der Flügel der Männchen erzeugt durch bestimmte Bewegungsabfolgen einen Sirrton der Weibchen anlockt (Hiepe et al. 2006, Becker et al. 2020). Die meisten Arten benötigen nach der Kopulation eine Blutmahlzeit für die Eiablage, sie werden als anautogen bezeichnet. Nur einige Arten wie *Cx. pipiens* biotype *molestus* leben autogen und können ihre Eier auch ohne vorherige Mahlzeit legen. Die eigentliche Eiablage ist je nach Art unterschiedlich. Es werden dabei von unter 50 bis mehr als 500 Eier abgelegt. *Anopheles* sowie *Aedes* legen ihre Eier einzeln ab, während die Eier von *Culex* zusammenhängend in Form von sogenannten Gelegeschiffchen abgelegt werden. *Aedes* bevorzugt einen Ablageplatz am Rand von Wasseransammlungen, wohingegen *Anopheles* und *Culex* die Oberfläche des Gewässers präferieren (Becker et al. 2020). Die größte Aktivität zeigt *Cx. pipiens* s.l. (Deplazes et al. 2021).

Die kalten Temperaturen im Winter überstehen diese Arten durch verschiedene Überwinterungsmethoden. So sind die Überwinterungsstadien der Gattung *Aedes* die gelegten

Eier und nur mit wenigen Ausnahmen auch die Larven. Die Arten *An. plumbeus*, *Cs. morsitans* und Exemplare der Gattung *Coquillettidia* überwintern in Larvenform. Die meisten übrigen Vertreter der Familie Culicidae haben als Überwinterungsstadium begattete Weibchen etabliert. Überwinternde Adulte suchen im Herbst nach Unterschlupfmöglichkeiten und verbringen dort den Winter bis zum Frühling. In dieser Zeit verbrauchen die Weibchen ihre körpereigenen Nahrungsreserven, lediglich einige Vertreter des *Anopheles maculipennis* Komplexes verlassen ihr Winterquartier gelegentlich zur Blutaufnahme (Becker et al. 2020). Die begatteten Weibchen legen Anfang des Frühlings Eier. Bei den überwinterten Eiern der Gattung *Aedes* sind steigende Wasserspiegel für den Schlupf der Larven entscheidend. Jedoch schlüpfen nicht alle Larven zur gleichen Zeit, einige Eier verharren in einer Diapause. Sie sind resistent gegen Austrocknung und somit in der Lage Jahre zu überdauern, falls es zu keiner Überflutung kommen sollte. Durch den Menschen sind diese Arten in der Lage neue Habitate zu besiedeln. Dies geschieht z.B. durch längere Transporte der Eier beispielsweise in Alltagsgegenständen oder Pflanzen (Deplazes et al. 2021).



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *Culex*. (Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/mosquitoes/about/life-cycles/culex.html/>, Zugriff: 08.05.2022).

### 3.1.3 Klinik

Der Speichel der Stechmücken verursacht beim Blutsaugen Hauteffloreszenzen und Juckreiz. Symptome eines Sticks von *Culex* halten nur kurz an und sind in der Regel bereits am nächsten Tag verschwunden. Auch allergische Reaktionen des Typ IV kommen gelegentlich vor. Eine signifikante Beeinträchtigung von Allgemeinbefinden und der Leistung wird vor allem verzeichnet, wenn es zu massenhaftem Auftreten der Stechmücken kommt. Das ist besonders für *Aedes* im Norden Europas und Amerikas beschrieben, kommt gegebenenfalls aber auch in Überschwemmungsgebieten in Mitteleuropa vor (Deplazes et al. 2021). Die größte klinische



Bedeutung kommt den Stechmücken jedoch in ihrer Funktion als Überträger verschiedener Krankheitserreger zu. Parasiten wie Plasmodien oder Filarien aber auch verschiedene Viren finden so ihren Weg von Stechmücke auf den Wirt. Die Arten der Gattung *Anopheles* sind insofern hervorzuheben, als dass sie die einzigen Überträger der humanen Malaria darstellen. Einige Filarienarten von sowohl Mensch als auch Tier benutzen verschiedene Culicidae als Zwischenwirt (Becker et al. 2020).

### 3.1.4 Therapie und Prophylaxe

Besonderes Augenmerk wird hier auf die Prophylaxe gelegt. Dies schützt zum Einem vor der Irritation und dem Pruritus, der mit einem Mückenstich einhergeht, jedoch auch vor der Infektion mit von der Mücke übertragenen Krankheitserregern. Repellentien z.B. Icaridin sind beim Pferd zu empfehlen. Einen weiteren Lösungsansatz stellt die Permethrin-Lösung dar, diese ist zwar zur Fliegenbekämpfung vorgesehen, hat aber durch den repellierenden und insektiziden Effekt auch Wirkung auf Mücken, welcher einige Tage anhält. Auch Proteine aus *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) werden zur Bekämpfung von Überschwemmungsmücken eingesetzt. Die Wirkung ist larvizid und richtet sich spezifisch gegen Culicidae und Simuliidae. Nachdem die Proteine an Rezeptoren auf Darmzellen der juvenilen Mücken gebunden haben werden Poren gebildet, was den Tod der Larven zur Folge hat. Sogenannte container breeders sind all jede Stechmückenarten, deren Larven sich hauptsächlich in kleinen Wasseransammlungen entwickeln. Diese Brutmöglichkeiten sollten möglichst vermieden bzw. eliminiert werden. Für Wasseransammlungen, die nicht vermieden oder abgedeckt werden können, gibt es die Möglichkeit der Behandlung mit Wachstumshemmern oder Larviziden. Erreicht wird eine Hemmung der Larvenentwicklung von bis zu fünf Wochen. Es eignen sich Bti oder *Bac. sphaericus*-Protein, Methopren, Pyriproxyfen, Diflubenzuron und Spinosad. Die Bekämpfung der Imagines hingegen ist aufwändig, kompliziert und die Wirksamkeit fraglich. Empfohlene Insektizide werden in der Luft versprüht oder vernebelt. Eine Strategie für kleinräumige Verbreitungsgebiete wird in Europa nur gegen *Ae. albopictus* verwendet. Großräumigere Maßnahmen werden insbesondere in warmen Ländern eingesetzt, um eine Eindämmung von Malaria und Viruserkrankungen zu erreichen. Entsprechend richten sich diese Strategien spezifisch gegen Anophelinae und *Ae. aegypti*. Aufgrund von zahlreichen Resistenzen der Stechmücken gegen diese Insektizide wird die Wirksamkeit jedoch angezweifelt (Deplazes et al. 2021).

### 3.2 West-Nil-Virus

WNV ist nahezu weltweit verbreitet und auch in Europa endemisch, wo es derzeit zu saisonalen Ausbrüchen dieser von dem Virus verursachten Erkrankung kommt (Camp und Nowotny 2020).

West-Nil-Fieber (WNF) unterliegt wie alle Pferdeenzephalomyelitiden einer Anzeigepflicht in Österreich (de Heus et al. 2020). Sollte ein Verdacht auf die Krankheit bestehen, muss unverzüglich Bürgermeister/Bürgermeisterin oder Polizeidienststelle und die Bezirksverwaltungsbehörde bzw. Amtstierarzt/Amtstierärztin informiert werden. Grundlage hierzu ist das Tierseuchengesetz (Rechtsinformationssystem der Republik Österreich. <https://www.ris.bka.gv.at/GeltendeFassung.wxe?Abfrage=Bundesnormen&Gesetzesnummer=10010172>. Zugriff: 21.02.2023). In der gesamten Europäischen Union herrscht eine Meldepflicht von positiven WNV-Fällen sowohl bei Menschen als auch Pferden (de Heus et al. 2020). 2017 wurde WNV von Rudolf et al. (2017) als der derzeit in Europa wichtigste Erreger beschrieben, der von Stechmücken übertragen wird. Die Virus-RNA konnte in überwinternden Stechmücken nachgewiesen werden, wodurch sich eine Persistenz des Erregers über den Winter hinweg bestätigt hat (Rudolf et al. 2017).

#### 3.2.1 Morphologie

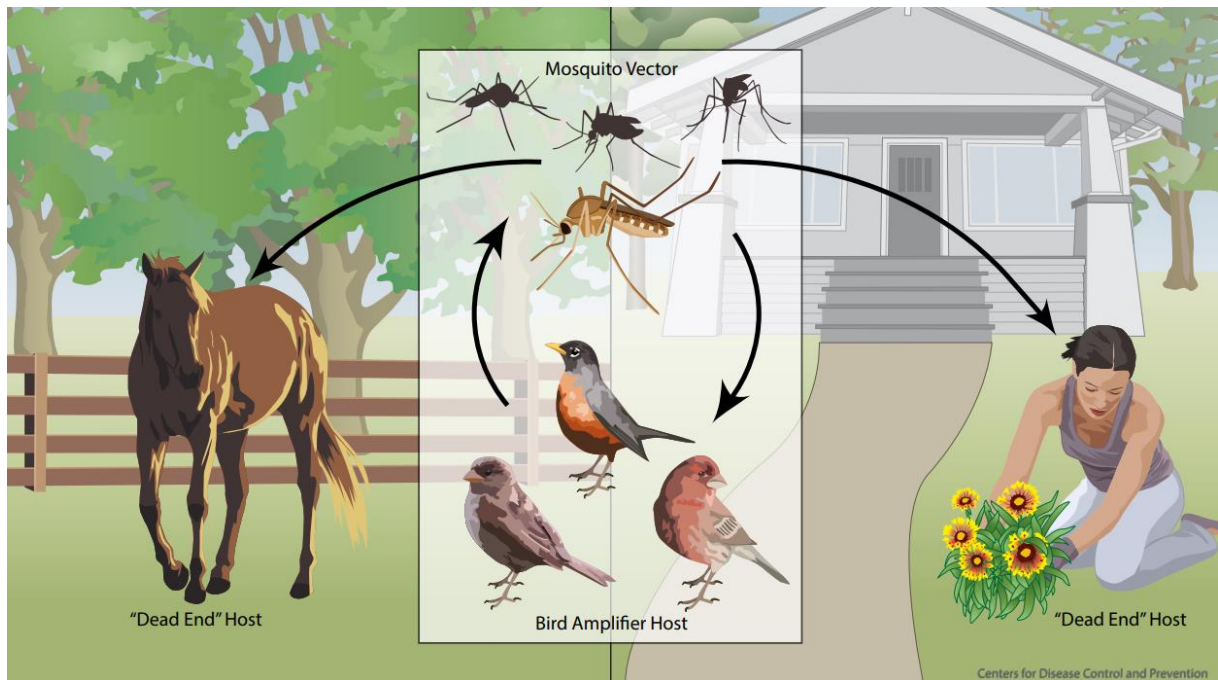
Bei dem WNV handelt es sich um ein behülltes RNA-Virus, welches in zwei Subtypen unterteilt werden kann: WNV-1 und WNV-2 (Bakonyi et al. 2006, Brehm et al. 2017). WNV-2 wurde in Europa erstmals im Jahre 2004 in Ungarn nachgewiesen und hat sich seitdem in andere europäische Länder verbreitet. Im östlichen Österreich wurde diese Viruslinie erstmals 2008 in Wildvögeln und Stechmücken nachgewiesen (de Heus et al. 2020).

#### 3.2.2 Lebenszyklus

Das bedeutendste Virusreservoir des WNV stellen Vögel dar. Sie können das Virus beherbergen, ohne selbst klinische Symptome zu entwickeln. Um auf einen Endwirt übertragen zu werden, benötigt das Virus einen Zwischenwirt in Form von Stechmücken (Habarugira et al. 2020). Als Hauptüberträger des WNV konnte der Artenkomplex *Cx. pipiens* s.l. definiert werden, welcher in Österreich sehr häufig vertreten ist (Lebl et al. 2015). Die Stechmücken saugen das Blut eines virämischen Wirts, wodurch sie auch WNV-RNA aufnehmen. Im Verdauungstrakt der Culicidae vermehrt sich das Virus nun im Mitteldarm und gelangt

anschließend auf haemolymphatischem Weg zu den Speicheldrüsen. Aus diesen wird es bei erneuter Blutmahlzeit ausgeschieden und auf den (End-)Wirt transferiert. Die Mücken selbst bilden keine Krankheitssymptome aus (Habarugira et al. 2020). Säugetier-Endwirte stellen eine Sackgasse für WNV dar, es kann also nicht wieder von Mücken aufgenommen und auf andere Individuen übertragen werden (Knap et al. 2020). Der Speichel der Stechmücken enthält verschiedene Proteine, die eine Koagulation des Blutes und eine Immunantwort des Wirts unterbinden. Somit findet das mit dem Saugakt in den Blutkreislauf eingetretene WNV optimale Bedingungen zur Immunevasion und Verbreitung im Wirt vor. Durch Endozytose gelangen die Viruspartikel in das Lumen der Wirtszellen, in dem es nun zur Vermehrung des Krankheitserregers kommt. Nach vollendeter Replikation werden die neu entstandenen Viruspartikel wieder durch Exozytose aus der Zelle ausgeschleust (Habarugira et al. 2020). Die häufigsten Infektionswege mit WNV werden in Abbildung 3 dargestellt.

Andere nicht so häufige Übertragungswege sind beim Menschen z.B. Organtransplantationen oder Bluttransfusionen. Bei Nutzgeflügel wurde die direkte horizontale Übertragung beschrieben. Es wird vermutet, dass hier vor allem Kannibalismus und Federpicken eine Rolle spielen. Horizontale Übertragung wurde auch bei Salzwasserkrokodilen und amerikanischen Alligatoren dokumentiert, wobei hier das Virus über den Kot ins Wasser gelang und oral erneut aufgenommen wird (Habarugira et al. 2020).



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung des Übertragungswegs von WNV zwischen Stechmücken und Vögeln sowie von Stechmücken auf „Sackgassen“-Wirte. (Centers for Disease Control and Prevention. [https://www.cdc.gov/westnile/resources/pdfs/13\\_240124\\_west\\_nile\\_lifecycle\\_birds\\_plainlanguage\\_508.pdf](https://www.cdc.gov/westnile/resources/pdfs/13_240124_west_nile_lifecycle_birds_plainlanguage_508.pdf), Zugriff: 28.06.2022).

### 3.2.3 Klinik

2016 wurde erstmals eine WNV-Infektion eines Pferdes in Österreich bestätigt. Insgesamt gab es zwischen 2016 und 2021 elf diagnostizierte Fälle von WNV in Equiden, die an der Veterinärmedizinischen Universität Wien therapiert wurden (de Heus et al. 2021). Verschiedene Faktoren beeinflussen die Art und den Schweregrad der Symptome eines infizierten Endwirts. Dazu zählen unter anderem die Spezies, das Alter sowie Koinfektionen Wirts aber auch der Tropismus des Virus, Virusstamm und die Pathogenese (Habarugira et al. 2020). Ca. 90 % der infizierten Pferde sind asymptomatische Träger, sollte sich die Krankheit jedoch klinisch manifestieren, sind die Symptome oft unspezifisch und ähneln denen anderer Zentralnervensystem (ZNS)-Erkrankungen. Beschrieben sind aber unter anderem Depression bis hin zu Koma, Inappetenz, Festliegen, Kopfpresen, Koliken und Fieber (Selim et al. 2021). Bei ungeimpften Pferden verläuft die Krankheit in 30-50 % der Fälle tödlich. Bei 10-20 % der Pferde, die diese Krankheit überlebten, wurden bleibende neurologische Symptome festgestellt (Byas und Ebel 2020). Diese Klinik repräsentiert die Pathogenität des Erregers am zentralen

und peripheren Nervensystem. Da es jedoch keine eindeutige pathognomonische Symptomatik für WNF gibt, müssen weitere spezifische labordiagnostische Untersuchungen angeschlossen werden, um einen eindeutigen Nachweis des Erregers zu erhalten (Porter et al. 2011).

#### **3.2.4 Diagnostik**

Aufgrund der unspezifischen Klinik müssen weiterführende Untersuchungen zur sicheren Diagnostik durchgeführt werden (Porter et al. 2011). Hierzu kann man dem Pferd Blutserum entnehmen und dieses mittels eines Immunglobulin (Ig) G-Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) auf spezifische Antikörper (AK) gegen Flaviviren testen. Dieser Test besitzt jedoch nur begrenzte Aussagekraft, da er nicht zwischen WNV, Usutu-Virus und Tick-borne-Encephalitis Virus unterscheidet. Um eine bessere Sensitivität und Spezifität des Tests zu erhalten, empfiehlt es sich, sowohl auf Immunglobulin (Ig) G, als auch auf IgM zu testen. (Stiasny et al. 2013). In einer Studie wurden Pferde, die neurologische Symptomatik präsentierten als wahrscheinlich positiv auf WNF eingestuft, wenn der ELISA für IgG positiv ausfiel, der ELISA auf IgM jedoch negativ. Als bestätigte WNF-Fälle wurden Equiden definiert, die sowohl die klassische Symptomatik als auch positive ELISA auf IgM zeigten (Porter et al. 2011). Eine weitere Möglichkeit der serologischen Diagnostik stellt ein Serumneutralisationstest dar (Stiasny et al. 2013).

Falls tatsächlich spezifische AK gegen WNV nachgewiesen wurden, ist es zudem wichtig, zu identifizieren, ob es sich hierbei um Impf-AK handelt oder diese tatsächlich durch eine Infektion hervorgerufen wurden (Dauphin und Zientara 2007). Des Weiteren sollten bestimmte Risikofaktoren identifiziert und nachvollzogen werden, ob das Pferd diesen vor kurzem ausgesetzt war (Porter et al. 2011). Da WNV nur eine kurze virämische Phase durchmacht, gestaltet sich eine Diagnostik mittels PCR mit Serum als Herausforderung (Stiasny et al. 2013). Bei Patienten, die bereits an der Krankheit erlegen sind, kann der Nachweis mittels PCR von Organproben erfolgen. Empfohlen wird hierfür Hirnstamm und Medulla (Kleiboeker et al. 2004).

#### **3.2.5 Therapie und Prophylaxe**

Die Therapie erfolgt wie für die meisten Viren rein symptomatisch. Betroffene Pferde benötigen eine intensive medizinische Betreuung (Sambri et al. 2013). Aufgrund der Schwere

der vorliegenden Symptomatik mussten von den elf an WNF erkrankten Pferden, die an der Vetmeduni Vienna behandelt wurden, sechs euthanasiert werden (de Heus et al. 2021).

Als Prävention steht vor allem das Eindämmen der Vektoren im Vordergrund. Dies wurde in Kapitel 4.1.6 bereits ausführlich beschrieben. Lediglich für Pferde gibt es eine zugelassene Impfung gegen WNV, für Menschen und andere Spezies befindet sich diese noch in Forschung (Habarugira et al. 2020). Die Vakzine für Pferde schützt zuverlässig vor der Krankheit und ist seit 2008 in der Europäischen Union zugelassen. (Bowen et al. 2014, European Medicines Agency. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/equip-wnv-previously-duvaxyn-wnv>. Zugriff: 22.02.2023).

Einer Studie von 2021 zufolge, in der geimpfte Pferde auf neutralisierende AK gegen WNV getestet wurden, zeigten alle Probanden einen ausreichend hohen AK-Titer. Auch bei Pferden, die bereits sechs Jahre vor dieser Beprobung geimpft wurden, zeigte sich ein ausreichender Impfschutz (de Heus et al. 2021).

Die Organisation European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) veröffentlichte im Oktober letzten Jahres (2021) Daten zu den Prävalenzen von WNV in Europa sowohl in Menschen, als auch in Equiden und Vögeln. Veranschaulicht sind diese Ergebnisse in Abbildung 5 für die nachgewiesenen humanen Fälle und Abbildung 4 für Fälle in Pferdeartigen und Vögeln. Diese Daten werden in Kapitel 6 (Diskussion) mit den generierten Ergebnissen dieser Diplomarbeit genauer besprochen, und verglichen.



**Distribution of animal West Nile virus outbreaks  
in NUTS 3 regions of the EU/EEA countries during  
the 2021 season, as of 4 November 2021**

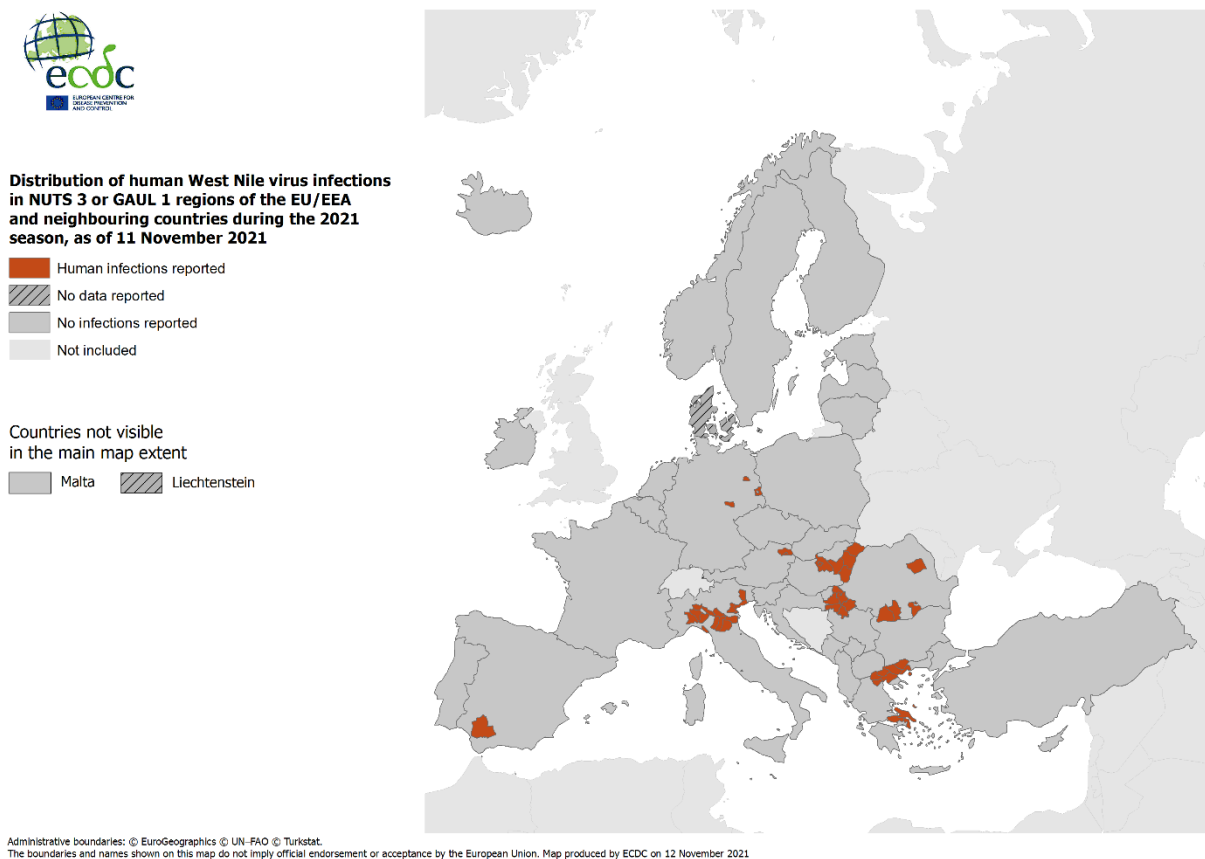
- Outbreaks among equids and birds
- Outbreaks among equids
- Outbreaks among birds
- No outbreaks reported
- Not included

Countries not visible  
in the main map extent

- Malta
- Liechtenstein

Administrative boundaries: © EuroGeographics  
The boundaries and names shown on this map do not imply official endorsement or acceptance by the European Union. Map produced by ECDC on 5 November 2021

**Abbildung 4:** Abbildung der nachgewiesenen WNV Infektionen in Equiden und Vögeln in Europa im Jahr 2021. (European Centre for Disease Prevention and Control. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/west-nile-virus-europe-2021-outbreaks-among-equids-andor-birds-updated-11>. Zugriff: 20.02.2022).



**Abbildung 5:** humane WNV- Infektionen im Jahr 2021. (European Centre for Disease Prevention and Control. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/west-nile-virus-europe-2021-human-cases-updated-11-november-2021>, Zugriff: 20.02.2022).

### 3.3 Setarien

Die Setariose des Pferdes ist eine durch Parasiten ausgelöste Krankheit, vorwiegend durch *S. equina*, in seltenen Fällen können auch *S. digitata* und *S. labiatopapillosa* Equiden befallen (Schnieder 2006). Die Gattung *Setaria* gehört zum Stamm der Nematoda und wird der Klasse Secernentea zugeordnet. Als Mitglied der Familie Onchocercidae gehört sie ebenfalls zur Ordnung Spirurida (Rollschwänze) (Deplazes et al. 2021). Einige Setarienarten kommen auf der ganzen Welt in geeigneten Habitaten vor und gelten damit als kosmopolitisch (Nabie et al. 2017). Auch in einigen europäischen Ländern, unter anderem Polen, Rumänien, Deutschland, Tschechien und der Slowakei wurden Infektionen mit *S. equina* bereits nachgewiesen. Allerdings gibt es nur selten eine Meldung der Prävalenz und die Diagnostik beruht meist auf dem Vorkommen der adulten Würmer in der Peritonealhöhle (Hornok et al. 2007). Sie leben



vorwiegend in der Peritonealhöhle von Ungulaten. *S. equina* findet man teilweise auch im Skrotum von Pferdeartigen (Marino et al. 2009, Nabie et al. 2017). Als Endwirte für *S. equina* fungieren Pferde, Esel, Maultiere, Maulesel und Dromedare (Schnieder 2006).

### 3.3.1 Morphologie

Bei Setarien handelt es sich um Parasiten mit Geschlechtsdimorphismus. So sind männliche Individuen 3-8 cm lang und besitzen drei bis vier Paar postanale, vier Paar präanale Papillen sowie Spikulae am Hinterende. Weibliche Adulte können eine Größe von 7-15 cm erreichen, das Hinterende ist knopfförmig mit nur zwei Papillen (Schnieder 2006). Makroskopisch stellen sich die adulten Parasiten fadenförmig mit eingerolltem Hinterende dar und sind von milchig-weißer Farbe (Abdel Rahman 2020). Am Kopf befinden sich konische Papillen, die den Mund umgeben. Dieser mündet in einen zweigeteilten Ösophagus. Mikrofilarien sind mit einer Größe von 240-260 µm deutlich kleiner und besitzen als typische Merkmale ein abgerundetes Vorder- und ein s-förmiges Hinterende (Schnieder 2006).

### 3.3.2 Lebenszyklus

Im Blut befinden sich die Mikrofilarien, diese sind von einer Scheide umgeben. Zur Übertragung auf weitere Huftiere benötigen die Parasiten einen Zwischenwirt (Schnieder 2006). Diesen stellen Culicidae, im Speziellen *Cx. pipiens* s.l. und einige Arten der Gattung *Aedes* dar. Innerhalb der Thoraxmuskeln der Stechmücken entwickeln sich die Filarien innerhalb von zwei Wochen von Larvalstadium (L) 1 zur infektiösen L3 und treten schließlich beim Stechakt erneut auf Equiden über. Innerhalb von weiteren 8-10 Monaten der Lebenszyklus der Würmer abgeschlossen (Abdel Rahman 2020). Genaue Einzelheiten zu dieser Entwicklung sind noch nicht erforscht. Obwohl die adulten Würmer am häufigsten in der Peritonealhöhle des Endwirts gefunden werden, können die Larven auch Organe erreichen und sich dort ebenfalls bis zur Geschlechtsreife weiterentwickeln. Die von Weibchen erzeugten Mikrofilarien gelangen in den Blutkreislauf und zirkulieren dort (Schnieder 2006).

### 3.3.3 Klinik

Im Peritonealraum werden adulte Exemplare mit Ausnahme von *S. tundra* (Ionică et al. 2017) entweder als geringgradig (Schnieder 2006) oder nicht pathogen (Abdel Rahman 2020) beschrieben. Da sie vor allem in der Bauchhöhle von Pferden und Eseln vorkommen, ist das häufigste Symptom eine Peritonitis in unterschiedlichen Ausbildungsgraden (Abdel Rahman

2020). Larven können durch Körperwanderung auch in Organe wie Auge, Gehirn, Lunge und Skrotum gelangen (Schnieder 2006, Abdel Rahman 2020). Dort können sie, entsprechend der jeweiligen Lokalisationen Blindheit, übermäßigen Tränenfluss, neurologische Störungen sowie Paraplegie verursachen (Abdel Rahman 2020). Ein Parasitenbefall von 20 Individuen reicht aus, um klinische Erscheinungen hervorzurufen, Infektionen mit einer höheren Anzahl an Filarien sind nicht die Regel (Schnieder 2006).

### **3.3.4 Diagnostik**

Obwohl Mikrofilarien von *S. equina* regelmäßig im Blutkreislauf des Wirts zirkulieren, ist eine Diagnostik der Mikrofilariose des Pferdes aufgrund von Klinik und serologischen Tests unzureichend und nicht aussagekräftig (Schnieder 2006, Hornok et al. 2007). Empfohlen wird die PCR, mit der man auf das Genom der Mikrofilarien testet, welches sich nicht von den adulten Stadien unterscheidet (Abdel Rahman 2020). Bei der okulären Form kann der Nachweis von Larven im Auge zur Diagnostik herangezogen werden. Makrofilarien sind am toten Tier in der Peritonealhöhle makroskopisch zu erkennen (Schnieder 2006).

### **3.3.5 Therapie und Prophylaxe**

Die Therapie beim Pferd erfolgt mit einmaliger subkutaner Gabe von Ivermectin. Dies zeigt gegen adulte Stadien in der Bauchhöhle eine Wirksamkeit von 80-85 %. Auch die perorale Verabreichungsform soll ähnliche Erfolge erzielen. Bei der okulären Form ist die einmalige Therapie mit Ivermectin ebenfalls erfolgreich und führt zum Absterben sowohl der Makro- als auch der Mikrofilarien. *Restitutio ad integrum* wird hier innerhalb von zwei Wochen erreicht (Schnieder 2006).

#### 4 Material und Methodik

Die zu untersuchenden Stechmücken wurden über vier Monate (Juli bis Oktober 2021) in speziellen Stechmückenfallen gesammelt und anschließend im Labor auf Gattung und Art bestimmt. Des Weiteren wurde eine molekularbiologische Analyse vorgenommen.

Als Standorte wurden drei Pferdeställe gewählt, bei denen in den Vorjahren jeweils zumindest ein positiver Fall von WNV dokumentiert wurde. Dabei handelt es sich um die Klinik für Pferdemedizin an der Veterinärmedizinischen Universität Wien, das Equestrian Centre Austria in Gerasdorf und den Weinhapplstall in Roseldorf, Großmugl. In jedem Stall wurden drei Lokalisationen mit genügend Distanz zueinander ausgewählt, an denen die Fallen platziert wurden. Das ergab insgesamt neun Standorte und somit neun Proben pro Aufbau. Die Standorte wurden mit nachfolgendem Schema nummeriert: Jedem Stall wurde die Abkürzung PF für Pferdeprojekt sowie eine eigene Nummer zugeordnet. Vetmeduni Vienna: PF1, Equestrian Centre Austria: PF2, Weinhappl Stall: PF3. Den einzelnen Plätzen pro Stall wurde jeweils wieder die Nummer 1,2 oder 3 zugeteilt und hinter die Stallnummer angehängt. Daraus ergibt sich die folgende Schreibweise für die erste Lokalisation in der Klinik für Pferdemedizin an der Vetmeduni Vienna: PF1\_01. Eine präzise Auflistung über die einzelnen Lokalisationen findet sich in Tabelle 1. Darstellungen der Standorte sind sowohl in dieser Tabelle als auch in den Abbildungen 6, 7, 8, 9 und 10 nachzuvollziehen.

Die Stechmücken-Fallen wurden mittags aufgebaut und am Folgetag nach 24 Stunden abgeholt. Aus logistischen Gründen wurden die Fallen an den Standorten PF2 (Equestrian Center Austria, Gerasdorf) und PF3 (Weinhapplstall, Roseldorf, Großmugl) einen Tag nach den Fallen von Standort PF1 (Veterinärmedizinische Universität Wien) auf- und wieder abgebaut (Tabelle 10).

Bei den Fallen, die verwendet wurden, um die Mücken zu fangen handelt es sich um das Modell BG-Sentinel der Firma Biogents, Regensburg, Deutschland (BG). Als Lockstoff wurde Hefe verwendet. Diese wurde zusammen mit zwei Liter warmen Wasser und 500 g Zucker in einem Beutel vermischt, welcher über einen Schlauch an die Falle angeschlossen wurde. Die Hefe setzt die Kohlenhydrate um, wodurch CO<sub>2</sub> entsteht, welches das Ausatmen von Tieren simuliert und die Stechmücken anlockt. Zusätzlich wurde als Simulation für Schweiß Lure (Biogents, Regensburg, Deutschland) an die Falle angeschlossen, welche ebenfalls die Wirkung eines Lockstoffs für Culicidae erbringt. Innerhalb der Falle ist ein Ventilator eingebaut, der eine Art

Sogwirkung erzeugt. Dadurch werden Insekten, die über die Falle fliegen in einen Netzbeutel gesogen und am erneuten Herausfliegen gehindert. Als Stromquelle für diesen wurden Autobatterien verwendet, die gegen Flüssigkeit – insbesondere vor Regen – mit einem übergestülpten Eimer geschützt wurden. Die Fallen wurden alle zwei Wochen aufgestellt – jeweils in der zweiten und vierten Woche des Monats von Juli bis einschließlich September an allen drei Ställen. Im Oktober wurden nur noch die drei Fallen an der Vetmeduni Vienna aufgestellt. Die Standorte der Fallen wurden zu Beginn des Projekts festgelegt und haben sich nicht geändert. Um etwaigen Wetterverhältnissen vorzubeugen, wurde ein möglichst windgeschützter Platz gewählt. Da der Inhalt des Hefebeutels eine Temperatur von 37 °C nicht überschreiten durfte war es insbesondere wichtig, dass die Fallen im Schatten standen und der Hefebeutel zusätzlich durch isolierende Taschen vor übermäßigem Aufheizen geschützt wurde. An Tagen mit regnerischen Wettervoraussichten wurden die Fallen überdies mit einem Plastikdach versehen.

Die mit den Netzbeuteln gesammelten Insekten wurden – während der Ventilator noch lief – aus der Falle entfernt und die Netze in Plastikgefäße überführt, die genau gekennzeichnet waren. Jede Probe wurde eindeutig beschriftet mit der Abkürzung für den Fallentyp, dem Namen des Standorts sowie dem Datum des Aufstellens der Falle. Daraus ergibt sich für Stall 1, Standort 1, erste Falle folgende Bezeichnung: BG\_PF1\_01\_20210714. Alle Fänge wurden in der App VECMAP® der Firma Avia-GIS, 2980 Zoersel, Belgien eingetragen und dokumentiert. Vor der morphologischen Bestimmung der Stechmücken wurden diese Gefäße am Institut für Parasitologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien für mindestens zwei Stunden bei -18 °C gefroren. So konnte sichergestellt werden, dass die Insekten vor einem Öffnen der Netze tot und vor allem flugunfähig waren.

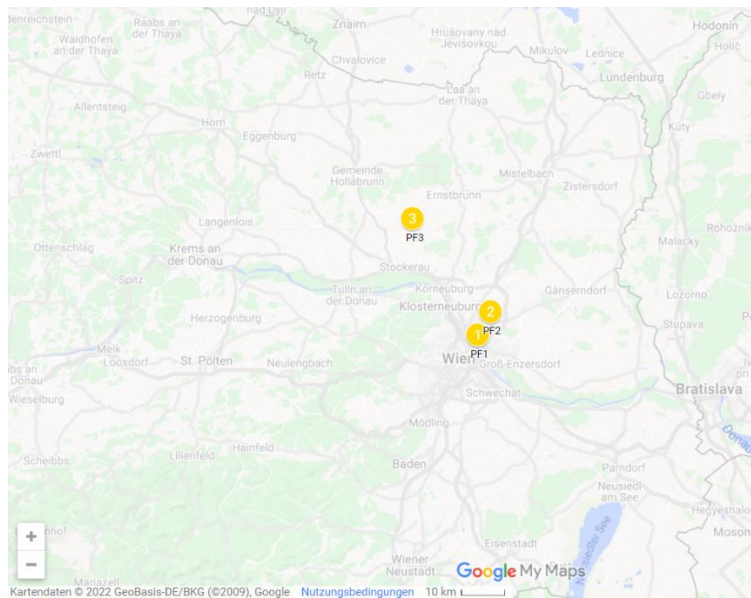
**Tabelle 1:** Übersicht über die Standorte der aufgestellten Fallen

| Bezeichnung<br>des<br>Standorts | Koordinaten                                 | Beschreibung des Standorts                             | Bild der Falle<br>am Standort                                                         |
|---------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| PF1_01                          | Latitude: 48,256292<br>Longitude: 16,431914 | Vetmeduni, Pferdeklinik, in<br>der Stallgasse          |    |
| PF1_02                          | Latitude: 48,257345<br>Longitude: 16,431908 | Vetmeduni, bei der<br>Wetterstation                    |    |
| PF1_03                          | Latitude: 48,2579<br>Longitude: 16,432497   | Vetmeduni, bei der<br>Schafkoppel                      |  |
| PF2_01                          | Latitude: 48,300457<br>Longitude: 16,462869 | Equestrian Centre Austria,<br>hinter der Schrittanlage |  |
| PF2_02                          | Latitude: 48,300388<br>Longitude: 16,463528 | Equestrian Centre Austria,<br>neben den Stallgebäuden  |  |

|        |                                             |                                                   |                                                                                       |
|--------|---------------------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| PF2_03 | Latitude: 48,299728<br>Longitude: 16,464293 | Equestrian Centre Austria,<br>neben dem Reitplatz |    |
| PF3_01 | Latitude: 48,47954<br>Longitude: 16,238251  | Zwischen dem Misthaufen und<br>der Wassertonne    |    |
| PF3_02 | Latitude: 48,479637<br>Longitude: 16,237678 | Beim Stromkasten                                  |   |
| PF3_03 | Latitude: 48,479835<br>Longitude: 16,237108 | Hinter der Koppel                                 |  |



**Abbildung 6:** Überblick über die Standorte PF1, PF2, PF3 in Österreich.

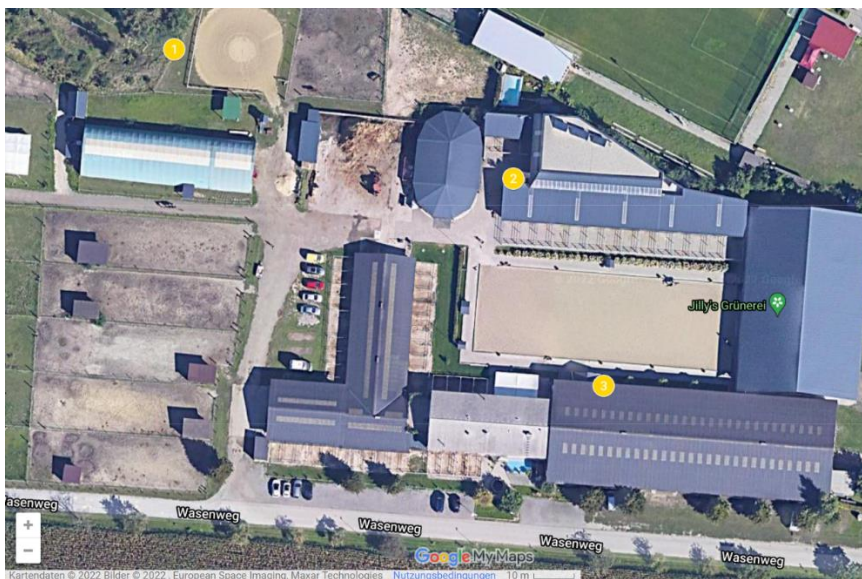


**Abbildung 7:** Überblick über die Standorte PF1, PF2, PF3 im Osten Österreichs.



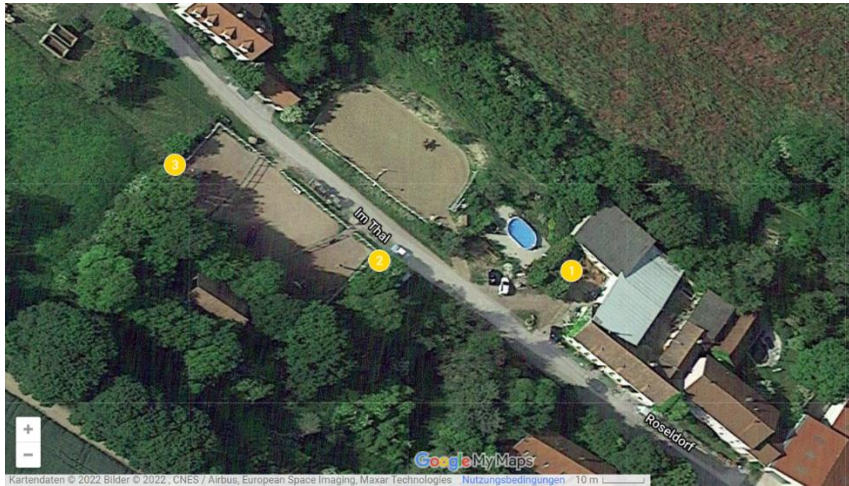


**Abbildung 8:** Standorte PF1\_01, PF1\_02, PF1\_03 an der Vetmeduni Vienna.



**Abbildung 9:** Standorte PF2\_01, PF2\_02, PF2\_03 bei Equestrian Centre Austria in Gerasdorf.





**Abbildung 10:** Standorte PF3\_01, PF3\_02, PF3\_03 bei Weinapfler in Roseldorf, Großmugl.

#### 4.1 Morphologische Analyse

Die Beutel wurden geöffnet und der Beifang von den Stechmücken auf einer Petrischale aussortiert. Als Beifang wird jedes Individuum bezeichnet, das nicht in die Familie der Stechmücken fällt. Bei der Auswertung gab es in der Regel keine Schwierigkeiten, lediglich einige Netze in die Schnecken geraten sind, waren zum Teil verklebt und führten dazu, dass die Morphologie der Stechmücken nicht mehr wie im Lehrbuch erschien, die Gattung und Art konnte jedoch stets identifiziert werden.

Jede Mücke wurde einzeln mit Hilfe einer Federpinzette und einer Sonde identifiziert. Die Stechmücken wurden mithilfe eines Stereomikroskops des Modells SZH 10 der Marke Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg, Deutschland auf einer weiteren Petrischale auf Gattung und Art bestimmt. Mithilfe des Bestimmungsschlüssels „Mosquitoes: Identification, Ecology and Control“ von Becker et al. 2020 konnten die Exemplare zuverlässig identifiziert werden. Weibliche Mücken wurden auf Artniveau bestimmt, männliche Individuen lediglich auf Gattungsniveau, da sie nicht blutsaugend und somit für diese Diplomarbeit von geringem Interesse sind.

Im Folgenden wird die Vorgehensweise beschrieben, um ein Individuum der Art *Cx. pipiens/torrentium* sowie der Art *Ae. vexans* gemäß dieser Quelle zu identifizieren. Eine

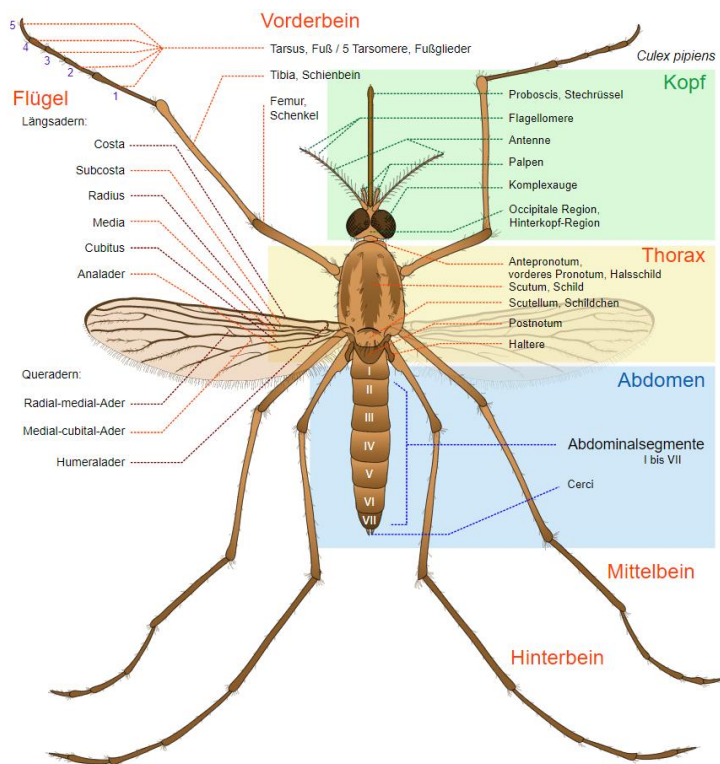
Übersicht über die wichtigsten anatomischen Strukturen von Stechmücken stellt Abbildung 11 in deutscher Sprache am Beispiel von *Cx. pipiens* s.l. dar.

Anschließend wurden aus einer Probe bis zu 50 Mücken derselben Art und desselben Geschlechts in ein Eppendorftube gegeben, beschriftet und bei -80 °C gelagert. Auch der Beifang wurde in präzise beschriftete Eppendorftubes überführt und eingefroren, um ihn für etwaige spätere Projekte aufzubewahren.

#### **4.1.1 *Culex pipiens/torrentium***

Exemplare der Art *Cx. pipiens/torrentium* zeichnen sich aus durch dicht liegende Schuppen an abdominalen Terga, eine gleichmäßig gebogene Analader, sowie dass das Glied Tarsomer I der Vorderbeine kürzer ist als die Glieder II-V zusammen. Tarsomer IV der Vorderbeine ist überdies nicht reduziert und deutlich länger als breit. Krallen sind einfach und ohne subbasalen Zahn entwickelt. Das Abdomen zeigt nach apikal keine Verjüngung, Cerci sind kurz und kaum zu erkennen. Die Krallen der Hinterbeine sind sehr klein und nicht deutlich sichtbar, Pulvilli sind vorhanden und die Schuppen der Flügel liegen sehr nah beieinander. Zudem ist der Stechrüssel mindestens so lang wie der Femur. Das erste Fußglied der Hinterbeine ist gleich lang oder minimal länger als die Tibia der Hinterbeine. An den Tarsi sind keine blassen Ringe ausgebildet und die Adern der Flügel sind von Schuppen von hauptsächlich dunkler Farbe bedeckt. Blasse basale Abzeichen stellen sich als Banden und/oder laterale Flecken auf den abdominalen Terga dar. Die Beine dieser Art besitzen keinerlei blasse Markierungen, auch der Stechrüssel ist von dunklen Schuppen besetzt. Die Coxa der Vorderbeine sind sowohl mit hellen als auch mit dunklen Schuppen besetzt, es dominieren in der Regel die dunklen Schuppen. An den abdominalen Terga formen gelbe Schuppen schmale basale Banden, die sich nach lateral ausdehnen und für gewöhnlich weniger als die Hälfte des jeweiligen Tergum ausmachen. Die Flügel sind komplett von dunklen Schuppen besetzt (Becker et al. 2020).

Diese Merkmale wurden unter dem Stereomikroskop in dieser Reihenfolge abgefragt und ausfindig gemacht. Sobald sichergestellt war, dass alle diese phänotypischen Eigenschaften gegeben waren, konnte das jeweilige Exemplar sicher als *Cx. pipiens/torrentium* s.l. angesprochen werden.



**Abbildung 11:** schematische Abbildung einer adulten weiblichen *Culex pipiens* mit Beschriftung der anatomischen Körperteile auf Deutsch. (Ruiz Villareal M., Wikipedia. [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Culex\\_pipiens\\_diagram\\_de.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Culex_pipiens_diagram_de.svg). Zugriff: 20.02.2022).

#### 4.1.2 *Aedes vexans*

Für *Aedes* wurde als Bestimmungsschlüssel ebenfalls „Mosquitoes: Identification, Ecology and Control“ von Becker et al. 2020 verwendet. Auch hier werden die morphologischen Merkmale, in derselben Reihenfolge beschrieben, wie sie in der Bestimmungshilfe vorgesehen ist.

Die Analader ist auch bei dieser Art gleichmäßig gebogen. Das erste Fußglied der Vorderbeine ist kürzer als die Länge der Tarsomere II-IV zusammen. Der vierte Tarsomer der Vorderbeine ist überdies nicht reduziert und erkennbar länger als breit. Als erste Unterscheidung zu der zuvor beschriebenen Art besitzt *Aedes* postspiracular Setae und an den Krallen ist ein subbasaler Zahn ausgebildet. Des Weiteren läuft das Abdomen apikal spitz zu und hat deutlich sichtbare lange Cerci entwickelt. An den Tarsomeren lassen sich blasse Ringe erkennen, die üblicherweise an den Hinterbeinen deutlicher ausgeprägt sind. Durch ihre geringe Breite sind sie teilweise schwer zu identifizieren. Diese sind nur an der Basis der Tarsomeren ausgebildet. Der Proboscis ist deutlich länger als der Femur des Vorderbeins und das Scutellum dicht mit

gebogenen gelben oder blassen Schuppen besetzt. Die hellen Ringe an den Tarsi sind sehr schmal und nehmen in der Regel nicht mehr als ein Viertel der Länge des jeweiligen Tarsomers ein. Die Terga besitzen weiße transversale basale Banden, die sich in der Mitte verengen, wodurch ein zweilappiges Aussehen entsteht (Becker et al. 2020).

## **4.2 Molekulare Analyse**

### **4.2.1 Probenaufbereitung**

Zur RNA- und DNA-Extraktion wurde das DR-Duet™DNA/RNA Mini Prep verwendet. Um die Probe dem Protokoll entsprechend vorzubereiten wurden 200 µl Reinstwasser/MQH<sub>2</sub>O und zwei Keramikperlen mit einem Durchmesser von 2,8 mm der Probe hinzugefügt. Mit Hilfe des Tissue Lyser II der Marke Quiagen wurde die Probe für drei Minuten auf der höchsten Stufe – 30 Hertz (Hz) – homogenisiert. Anschließend ruhte das Probengemisch für zehn Minuten.

Das ZR-Duet™DNA/RNA MiniPrepKit enthält 24 ml DNA/RNA Wash Buffer Konzentrat. Dieses muss mit 96 ml von 100%igem Ethanol gemischt werden, bevor es im nächsten Schritt verwendet werden kann.

100 µl der homogenisierten Probe wurden mit einer Pipette in ein Column and Collection Tube transferiert. Hierzu wurden 300 µl DNA/RNA Lysis Buffer gegeben und das Ganze für zwei Minuten bei 13 000 rounds per minute (rpm) zentrifugiert. 50 µl der homogenisierten Masse wurden bei 20 °C für spätere Versuche aufbewahrt. Nach der Zentrifugation wurde der Durchfluss im Collection Tube in ein neues Zymo-Spin™ IIC Column überführt, was wiederum in ein neues Collection Tube gegeben und erneut bei mindestens 12 000 Erdbeschleunigung (g) für eine Minute zentrifugiert wurde. Der nun entstandene Durchfluss wurde für die RNA-Aufbereitung in einem weißen Tube aufbewahrt. Der Inhalt des Column-Tubes wurde für die DNA-Aufbereitung in einem Kühlschrank aufbewahrt.

### **4.2.2 RNA-Isolierung**

Die RNA Isolation fand in einer Umgebung frei von Ribonukleasen (RNase) statt. RNase 320 µl von 95-100%igem Ethanol wurden dem Durchfluss beigefügt und durch Pipettieren gut gemischt. Danach wurde das Gemisch in ein beschriftetes Zymo-Spin™ IIC Column in einem neuen Collection Tube transferiert und bei wenigstens 12 000 g für eine Minute zentrifugiert. Der entstandene Flow-through wurde verworfen. 400 µl RNA Prep Buffer werden dem Column

Tube hinzugefügt und bei mindestens 12 000 g für eine Minute zentrifugiert. Der entstandene Durchfluss wurde erneut verworfen. Anschließend wurden 700 µl des RNA Wash Buffers hinzugegeben und bei wenigstens 12 000 g für 30 Sekunden (s) zentrifugiert. Der flow-through wurde verworfen. Dieser Waschschrift wurde mit 400 µl RNA Wash Buffer wiederholt.

Die Zymo-Spin™ IIC Column wurde in der entleerten Collection Tube bei mindestens 12 000 g für zwei Minuten zentrifugiert. Der Flow-through wurde verworfen. Die Zymo-Spin™ IIC Column wurde von der Collection Tube entfernt und in ein neues RNase-freies Eppendorftube gegeben. Nun wurden mindestens 25 µl Desoxyribonuklease (DNase)/RNase freies Wasser direkt in die Column Matrix gegeben und das Ganze für eine Minute bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Eine erneute Zentrifugation bei 10 000 g für 30 s fand statt. Die eluierte RNA musste sofort in einen -80 °C kalten Gefrierschrank zur Aufbewahrung gegeben werden.

#### **4.2.3 DNA-Isolierung**

Die grüne DNA Zymo-Spin™ IIC Colum Tube, die im vorherigen Schritt im Kühlschrank zwischengelagert wurde, wurde nun in ein neues Collection Tube eingebracht. Dazu wurden 400 µl DNA Prep Buffer in die Column gegeben und bei mindestens 12 000 g für eine Minute zentrifugiert. Der Flow-through wurde erneut verworfen. Im nächsten Schritt wurden 700 µl DNA Wash Buffer der Column zugefügt und bei wenigstens 12 000 g für 30 s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Dieser Waschschrift wurde mit 400 µl Wash Buffer wiederholt.

Die Zymo-Spin™ IIC Column wurde in der entleerten Collection Tube bei mindestens 12 000 g für zwei Minuten zentrifugiert. Der Flow-through wurde verworfen. Das Zymo-Spin™ IIC Column wurde von dem Collection Tube getrennt und in eine neues sauberes Mikrozentrifugentube (Eppendorftube) gegeben.

Direkt in die Column Matrix wurden mindestens 50 µl des Buffer AE der Firma QIAGEN gegeben und für zwei bis fünf Minuten bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Danach wurde die Probe auf Maximalgeschwindigkeit für 30 s zentrifugiert. Die eluierte DNA (Sample A) wurde bei -20°C aufbewahrt. Dieser letzte Schritt wurde wiederholt für die Eluierung der Reserveprobe (Sample B).

#### 4.2.4 PCR

Die PCR ist ein enzymgestütztes Verfahren zur Vervielfältigung bestimmter Genomsequenzen. Geringste Mengen Genmaterial reichen aus, um mit dieser Methode genügend Amplifizierungen für nachfolgende Untersuchungen zu erreichen. Dies erklärt unter anderem die hohe Sensitivität dieses Testverfahrens. Für die Vervielfältigung nötig ist eine Mischung aus verschiedenen „Bausteinen“, die benötigt werden, um DNA zu generieren. Diese wird im Folgenden „Mastermix“ genannt. Jeder Mastermix enthält als Enzym die DNA-Polymerase, Primer und die vier Nucleotide Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin. Der gewählte Primer ist komplementär zu einem spezifischen Abschnitt des Probengenoms und bestimmt somit, welche Nukleotidsequenz vervielfältigt wird. Diese Mixtur wird nun in das PCR-Gerät, einen Thermocycler gegeben. Dieses Gerät erhöht und erniedrigt die Temperatur in genauen vorprogrammierten Abständen. Die eigentliche Amplifizierung kann in drei grobe Schritte unterteilt werden. Der erste Schritt ist die Denaturierung der vorhandenen Proben-DNA. Hier kommt es durch einen Anstieg der Temperatur zu einem Trennen der komplementären DNA-Stränge des Probengenoms. Danach verursacht eine Abkühlung die Hybridisierung: Hier binden die spezifischen Primer an die aufgelösten DNA-Matrizen. Im letzten Schritt – der Amplifikation – wird die Temperatur wieder gesteigert, um der DNA-Polymerase zu ermöglichen, die DNA-Stränge zu vervollständigen. Das Enzym erzeugt eine Elongation des zuvor gebundenen Primers durch Verknüpfung von Nukleotiden. Somit wird in 5' → 3'-Richtung eine neue Doppelhelix erzeugt. Diese trizyklische Abfolge kann beliebig oft wiederholt werden, wobei sich jedes Mal die Anzahl der DNA-Stränge verdoppelt. Die am häufigsten verwendete Methode um die PCR-Produkte zu bestimmen ist die Gelelektrophorese. Dabei werden die Genome nach Größe und Ladung in Banden dargestellt und mit bekannten Referenzwerten verglichen (Garibyan und Avashia 2013).

##### 4.2.4.1 PCR-Protokolle

Entsprechend der Fragestellung dieser Arbeit wurden die gefangenen Stechmücken sowohl auf Flaviviren als auch auf Filarien labordiagnostisch untersucht. Dafür wurde das PCR-Protokoll an die jeweilige zu untersuchende Spezies angepasst. In einem Fall, in dem die *Aedes*-Art morphologisch nicht eindeutig bestimmt werden konnte, wurde diese mit PCR und anschließender Sequenzierung bestimmt. Für die korrekte Durchführung wurde, wie in Kapitel 4.2.2 und 4.2.3 bereits beschrieben die DNA und RNA der zu testenden Proben extrahiert. Die

isolierten Genome wurden jeweils mit einem passenden Mastermix in Tubes vermengt und anschließend in das Laborgerät gegeben. Bei allen im Folgenden beschriebenen Protokollen wurde das Modell Mastercycler® Pro Marke Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland, als Thermocycler verwendet. Alle beschriebenen Protokolle wurden von dem Institut der Parasitologie der Vetmeduni Vienna ausgearbeitet.

#### 4.2.4.1.1 Flaviviren NS51 One-Step RT-PCR

Dieses Protokoll bedient sich einer reverse-transkriptase PCR mit der die RNA-Genome der Flaviviren Dengue-Virus, Usutu-Virus, WNV, Zika-Virus und Gelbfieberevirus in DNA-Stränge umgewandelt werden. Primerpaare, Mastermixrezept (Tabelle 4) und Temperaturkurve (Tabelle 5) sind im Folgenden aufgelistet. Die Größe des entstehenden PCR-Produkts beträgt 1111 bp.

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

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

**Tabelle 2:** Rezept Mastermix Flaviviren NS51.

| Reagens                    | Menge in μl pro 1 Tube | Menge in μl pro 10 Tubes |
|----------------------------|------------------------|--------------------------|
| Wasser                     | 14,9                   | 149                      |
| 5X Buffer (OneStep RT-PCR) | 5,0                    | 50,0                     |
| dNTP Mix (Nukleotide)      | 1,0                    | 10,0                     |
| OneStep RT-PCR Enzyme Mix  | 1,0                    | 10,0                     |
| Forward Primer             | 0,3                    | 3,0                      |
| Reverse Primer             | 0,3                    | 3,0                      |
| Template                   | 2,5                    | 10 x 2,5                 |
| <b>Gesamt</b>              | <b>25</b>              | <b>250</b>               |

**Tabelle 3:** Temperaturkurve Flaviviren NS51 One-Step RT-PCR.

| Temperaturkurve |          |                        |
|-----------------|----------|------------------------|
| 50°C            | 45 min   | Retro-Transkription    |
| 94°C            | 15 min   | Initiale Denaturierung |
| 94 °C           | 1 min    | 40 x                   |
| 54°C            | 4 min    |                        |
| 72°C            | 1 min 15 |                        |
| 72°C            | 5 min    | Finale Elongation      |
| 4°C             | Lagerung |                        |

#### 4.2.4.1.2 Flaviviren NS52 Nested-PCR

Um die umgeschriebenen DNA-Genomabschnitte der Flaviviren vervielfältigen zu können wurde ein modifiziertes PCR-Protokoll verwendet. Mit dieser Pan-Flavivirus-PCR können unter anderen Sequenzen von Dengue-Virus, Usutu-Virus, WNV, Zika-Virus und Gelbfieber-Virus detektiert werden. Im Folgenden ist das verwendete Primerpaar aufgelistet, sowie in Tabelle 2 das Rezept des Mastermix als auch die Temperaturkurve des PCR-Geräts in Tabelle 3. Dieses Protokoll wurde mit einer Nested-PCR durchgeführt, das PCR-Produkt beträgt 1010 Basenpaare (bp).

Forward Primer: NS52+: 5'- GCNATNTGGTWYATGTGG-3' 10 Picomol (pmol)/µl

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



**Tabelle 4:** Rezept Mastermix Flaviviren NS52.

| Reagens               | Menge in µl pro 1 Tube | Menge in µl pro 10 Tubes |
|-----------------------|------------------------|--------------------------|
| Wasser                | 14,675                 | 146,750                  |
| 5X Buffer (Green)     | 5,0                    | 50,0                     |
| dNTP Mix (Nukleotide) | 0,2                    | 2,0                      |
| Go Taq Polymerase     | 0,125                  | 1,25                     |
| Forward Primer        | 2,0                    | 20,0                     |
| Reverse Primer        | 2,0                    | 20,0                     |
| Template              | 1,0                    | 10 x 1                   |
| <b>Gesamt</b>         | <b>25</b>              | <b>250</b>               |

**Tabelle 5:** Temperaturkurve Flaviviren NS52 Nested-PCR.

| Temperaturkurve |          |                        |
|-----------------|----------|------------------------|
| 94°C            | 5 min    | Initiale Denaturierung |
| 94°C            | 1 min    | 40x                    |
| 50°C            | 3 min    |                        |
| 72°C            | 1 min    |                        |
| 72°C            | 5 min    | Finale Elongation      |
| 15°C            | Lagerung |                        |

#### 4.2.4.1.3 Filarioide Nematoden

Dieses PCR-Protokoll zielt darauf ab, DNA von diversen Filarien wie *S. equina*, *S. tundra*, *D. immitis* und *D. repens* nachzuweisen. Erneut finden sich im Folgenden die verwendeten Primerpaare sowie der modifizierte Mastermix in Tabelle 6 und die Temperaturkurven in Tabelle 7. Anzumerken ist, dass dieses Protokoll nicht für Rotwild angewendet werden darf. Die Produktgröße beträgt hier 667 bp.

Forward Primer: COInt-F: 5'-TGATTGGTGGTTTTGGTAA-3' 100 pmol/µl

Reverse Primer: COInt-R: 5'-ATAAGTACGAGTATCAATATC-3' 100 pmol/µl

**Tabelle 6:** Rezept Mastermix Filarioidea, Buffer Green, Go Taq.

| Reagens               | Menge in µl pro 1 Tube | Menge in µl pro 100 Tubes |
|-----------------------|------------------------|---------------------------|
| Wasser                | 14,175                 | 1417,5                    |
| 5X Buffer (Green)     | 5,0                    | 500,0                     |
| dNTP Mix (Nukleotide) | 0,2                    | 20                        |
| Go Taq Polymerase     | 0,125                  | 12,5                      |
| Forward Primer        | 0,250                  | 25,0                      |
| Reverse Primer        | 0,250                  | 25,0                      |
| Template              | 5                      | 100 x 5                   |
| <b>Gesamt</b>         | <b>25</b>              | <b>2500</b>               |

**Tabelle 7:** Temperaturkurve Filarioidea, Buffer green, GoTaq.

| Temperaturkurve |          |                        |
|-----------------|----------|------------------------|
| 95°C            | 2 min    | Initiale Denaturierung |
| 95 °C           | 45 s     | 35 x                   |
| 52,3 °C         | 45 s     |                        |
| 72°C            | 1 min    |                        |
| 72°C            | 5 min    | Finale Elongation      |
| 15 °C           | Lagerung |                        |

#### 4.2.5 Herstellung des Agarosegels

Für die Herstellung des Gels, welches zur Gelelektrophorese benötigt wird, wurde 1,8 g Agarose in einem Glaskolben in 35 ml destilliertem Wasser und 100 ml TRIS-Borat-EDTA-Buffer (TBE) gelöst. Mit Frischhaltefolie wurde die Öffnung des Kolbens bedeckt und dieser für 10 min in eine Mikrowelle auf höchster Stufe gestellt, um dessen Inhalt zum Kochen zu bringen. Anschließend wurde das Gefäß zum Abkühlen entfernt. Als das Gemisch eine Temperatur von ca. 40 °C erreicht hatte, wurde diesem 4,2 µl Midori Green hinzugefügt. Durch Schwenkbewegungen wurde der gesamte Inhalt gründlich vermischt und anschließend zum Aushärten in eine bereits vorbereitete Gelkammer gefüllt. Diese Kammer wurde zuvor mit Kunststoffkämmen versehen, um eine Taschenbildung innerhalb des Agars zu ermöglichen.

Dort wurden im weiteren Verlauf die Proben hinein pipettiert. Nach 45 min Ruhezeit wurde die auselierte Gelplatte vorsichtig aus der Apparatur entfernt. Durch Einwickeln mit Frischhaltefolie wurde diese luftdicht verpackt und bis zur Durchführung der Gelelektrophorese im Kühlschrank aufbewahrt.

#### **4.2.6 Gelelektrophorese**

Für die Durchführung der Gelelektrophorese wurde die Gelplatte zunächst aus dem Kühlschrank entnommen und in eine Elektrophoresekammer eingesetzt. TBE-Pufferlösung wurde im Voraus in die Kammer eingefüllt. 9 µl destilliertes Wasser, 3 µl Promega 100 bp und 3 µl Blumarker wurden zur Fertigung der Ladder auf einem Parafilmstreifen vermengt. Auf der Gelplatte wurde die erste Tasche jeder Reihe mit dieser Lösung befüllt. Zusätzlich wurde in jede Tasche 5 µl der jeweiligen Probe hinein pipettiert. Lediglich die Tasche der letzten Reihe wurde nicht mit einer Probe, sondern mit der Negativkontrolle versehen. Die Gelelektrophorese lief 45 min und wurde bei einer Spannung von 120 Volt durchgeführt.

Nach Ablauf der 45 min wurde die Agarplatte aus der Kammer entfernt und unter Ultraviolett (UV)-Licht verbracht. Durch das in das Gel eingegebene Midori Green wurden die Banden unter dem UV-Licht sichtbar. Eine Quantifizierung der bp ermöglichte die Ladder. Zusätzlich wurden die Resultate am Computer durch Verwendung eines UV-Lichtscanners (ChemiBIS genXpress®, DNR Bio-Imaging Systems Ltd, Neve Yamin, Israel) und der Gelcapture Software Version 5.0 (DNR Bio-Imaging Systems Ltd, Neve Yamin, Israel) gesichert.

#### **4.2.7 Sequenzierung**

Alle Proben, welche bei der Gelelektrophorese ein positives Ergebnis durch entsprechende Banden darstellten, wurden zur Sequenzierung zu LGC Genomics (Berlin, Deutschland) geschickt.

Die Datenbanken Barcode of Life Data System (Guelph, Kanada) und GenBank® (Bethesda, USA) dienen zum Abgleich der generierten Barcodes.

### **4.3 Statistische Analyse**

Um eine Aussage darüber treffen zu können, wie oft eine Krankheit/ein Infektionserreger zu einem bestimmten Zeitpunkt an einem bestimmten Ort vorkommt, wird die Prävalenz errechnet. Diese ergibt sich aus der Anzahl der betroffenen Individuen durch die Anzahl der

Individuen der Gesamtpopulation. Da die Prävalenz in Prozent angegeben wird, wird das Ergebnis mit 100 multipliziert.

$$P = \frac{N_{\text{betroffen}}}{N_{\text{gesamt}}} \times 100$$

(Robert Koch Institut,  
[https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/Glossar/gbe\\_glossar\\_catalog.html?cms\\_lv2=3686300](https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/Glossar/gbe_glossar_catalog.html?cms_lv2=3686300), Zugriff: 10.07.2022; Centers for Disease Control and Prevention,  
<https://www.cdc.gov/csels/dsepd/ss1978/lesson3/section2.html#:~:text=Prevalence%20refers%20to%20proportion%20of,during%20a%20particular%20time%20period>, Zugriff: 10.07.2022).

Als Gesamtpopulation werden in dieser Studie alle gefangenen weiblichen Stechmücken definiert.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Morphologische Analyse

Insgesamt wurden in diesem Projekt 893 Stechmücken gefangen - davon 811 weibliche. Diese unterteilen sich zu folgenden Anteilen in die unterschiedlichen Arten: 756 *Cx. pipiens* s.l./*torrentium*, vier *Aedes vexans*, vier *Aedes geniculatus*, zwei *Ae. caspius*, zwei *Ae. intrudens*, eine *An. hyrcanus*, eine *Cq. richiardii*, und eine *Cs. annulata*. Eine graphische Darstellung der Verteilung des Geschlechterverhältnisses findet sich in Abbildung 12, sowie eine Verteilung von Anzahl und Artindividuen in Abbildung 13.

Das Vorkommen von *An. hyrcanus* ist insofern bedeutsam, da diese Art in Österreich ursprünglich nicht indigen war und aus der mediterranen Region im Zuge des Klimawandels eingewandert sein dürfte (Zittra et al. 2014).

Die Arten *Culex pipiens* s.l. und *Culex torrentium* sind morphologisch kaum voneinander zu unterscheiden, weshalb sie nach Bestimmung gemeinsam in ein Probenbehältnis gegeben wurden und die entsprechende Probe mit der Bestimmung „*Cx. pipiens/torrentium*“ gekennzeichnet wurde. Des Weiteren ist *Cx. pipiens* vielmehr ein Spezieskomplex als eine Art für sich. Man geht davon aus, dass diesem Komplex sieben verschiedene Arten angehören, die sich im Habitus nicht unterscheiden, jedoch aufgrund ihres Verhaltens differenziert werden können. Die Vertreter dieses Komplexes sind *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. pipiens pallens*, *Cx. australicus*, *Cx. globocoxitus*, *Cx. pipiens* forma (f.) *pipiens* und *Cx. pipiens* f. *molestus* (Zittra et al. 2016).

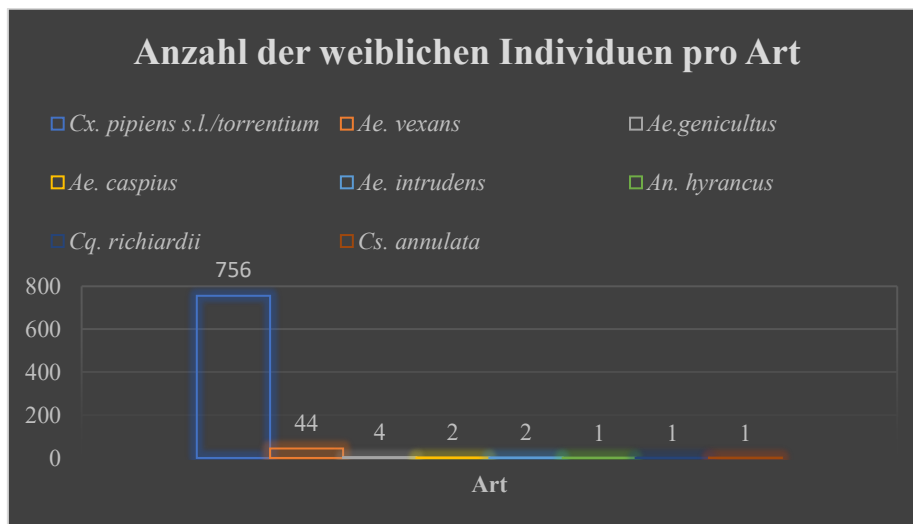
Mit 756 weiblichen Individuen stellt diese Artengruppe den größten Anteil der gefangenen Stechmücken und macht 93,2 % aus.

Eine genaue Auflistung über die Anzahl der Individuen pro Art jeder Falle mit der Bezeichnung der Probe findet sich im Anhang in Tabelle 11.

Da männliche Stechmücken nicht blutsaugend sind, wurde bei diesen nur das Geschlecht und die Gattung bestimmt, jedoch nicht die Art. Ebenso gab es Fallen, die nur Beifang aber keine Stechmücken beinhalten.



**Abbildung 12:** graphische Darstellung der prozentualen Verteilung zwischen männlichen und weiblichen Stechmücken.



**Abbildung 13:** Graphische Darstellung der Anzahl der weiblichen Individuen pro Art.

## 5.2 Molekularbiologische Analyse

Alle weiblichen Mücken wurden mittels PCR auf Flaviviren und Filarien untersucht. Mit Hilfe der im Anschluss erfolgten Gelelektrophorese konnte in keinem der gefangenen Individuen die RNA von *Flaviviridae* nachgewiesen werden.

Die Untersuchung auf Filarien hingegen ergab zwei positive Proben. Dies war zum einen die Probe P002 (*Ae. geniculatus*) und die Probe P083 (*Ae. vexans*) die beide Filarien-DNA der Art *S. tundra* enthielten.

### 5.3 Statistische Analyse

Mit der in Kapitel 4.6 angegebenen Formel wurde die Prävalenz von *S. tundra* in den 811 gefangenen weiblichen Stechmücken errechnet. Nur zwei Exemplare zeigten positive Ergebnisse im Hinblick auf Filarien, wodurch sich eine Prävalenz von 0,24% in allen gesammelten Stechmücken ergibt.

## 6 Diskussion

Ziel dieser Diplomarbeit war es, das Risiko einer WNV-Infektion mittels molekularer Analysen in der Umgebung von Pferdekoppeln zu eruieren, die in den vergangenen Jahren autochthone Infektionen von WNV bei Pferden verzeichnet hatten. Dafür wurden Stechmücken im Osten Österreichs morphologisch auf Art und Gattung bestimmt, um so zusätzlich einen Überblick über einheimische und das eventuelle Vorhandensein von invasiven Arten zu erhalten. Des Weiteren sollte die Prävalenz von Filarien in Stechmücken mittels molekularer Analyse untersucht werden.

Mit Hilfe eines Bestimmungsschlüssels konnten die Stechmücken auf Art und Gattung bestimmt werden. Es zeigte sich, dass bis auf ein Exemplar der Art *An. hyrcanus* alle Mücken indigenen Arten zugeordnet werden konnten. Mit der anschließenden molekularen Analyse wurde die Präsenz von Flaviviren und Filarien in allen weiblichen Individuen untersucht. In den Proben P002 (*Ae. geniculatus*) und P083 (*Ae. vexans*) wurden Filarien der Art *S. tundra* nachgewiesen. Beide Mücken wurden an demselben Standort – Weinhapplstall in Roseldorf, Großmugl (PF3) –, jedoch zu unterschiedlichen Zeitpunkten gefangen. So ist P002 (*Ae. geniculatus*) bereits im Juli gefangen worden, während P083 (*Ae. vexans*) fast zwei Monate später gefangen wurde. Beide Mücken, die diese Filarien beherbergten, waren Exemplare der Gattung *Aedes*. Um hier Bestimmungsfehler auszuschließen, wurde ein zusätzliches molekulares Barcoding der Mücken angeschlossen. Die Standorte PF1 (Vetmeduni Vienna, Wien) sowie PF2 (Equestrian Center Austria, Gerasdorf) zeigten keinerlei positive Ergebnisse im Hinblick auf Setarien. Flaviviren konnten in keinem Individuum nachgewiesen werden.

Mittels der molekularen Analyse wurde das Vorhandensein von Flaviviridae, in jedem gefangenen Individuum ausgeschlossen.

Die Organisation ECDC veröffentlichte im November 2021 Daten zur Prävalenz von WNV in Equiden und Vögeln (siehe Abbildung 4) sowie nachgewiesene humane Infektionen (verdeutlicht in Abbildung 5) in Europa. Die von dieser Seite generierten Daten decken sich nur zum Teil mit den Ergebnissen dieser Studie. Es geht hervor, dass es im Jahr 2021 in Österreich keinen Nachweis von WNV-Infektionen in Vögeln oder Equiden gab (European Centre for Disease Prevention and Control. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/west-nile-virus-europe-2021-outbreaks-among-equids-and-or-birds-updated-11>. Zugriff:



20.02.2022). Allerdings besagen die Daten der ECDC, dass wenige humane Fälle von WNF aufgetreten sind (European Centre for Disease Prevention and Control. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/west-nile-virus-europe-2021-human-cases-updated-11-november-2021>, Zugriff: 20.02.2022). Es ist jedoch nicht ersichtlich, wo sich diese Patienten mit dem Virus infiziert haben, weshalb davon auszugehen (bzw. es durchaus möglich) ist, dass es sich hierbei nicht um autochthone Infektionen, sondern vielmehr um „importierte“ Fälle handeln dürfte. Im Allgemeinen zeigt sich bei den Daten von ECDC, dass es in ganz Europa im Jahr 2021 nur wenige Fälle von WNV gab (European Centre for Disease Prevention and Control, <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/west-nile-virus-outbreaks-among-humans-and-animals-2021-transmission-season>. Zugriff: 10.07.2022). Eine weitere Untersuchung in den kommenden Jahren sollte unbedingt angeschlossen werden. Vor allem im Hinblick auf die vom Klimawandel verursachten steigenden Temperaturen und den dadurch verbesserten Umweltbedingungen für Stechmücken erscheint es äußerst wichtig, ein engmaschiges Monitoring von Infektionserregern, die Arthropoden als Vektoren nutzen aufrechtzuerhalten.

Die Fallenstandorte, die für dieses Projekt genutzt wurden, wurden allesamt ausgewählt, da es bei diesen in den Vorjahren positive Fälle von WNV in Pferden gab. Dies zeigt, dass es sich bei dem Ergebnis dieser Diplomarbeit lediglich um eine Momentaufnahme handelt. Durch die in den vergangenen Jahren nachgewiesenen Fälle und diversen Studien zu WNV ist bekannt, dass dieses Virus auch in Zentraleuropa Einzug erhält (Camp und Nowotny 2020). Hervorzuheben ist das Jahr 2018, in dem die positiven Fälle sowohl bei Menschen als auch Pferden eine starke Zunahme zeigten (Nagy et al. 2019; European Centre for Disease Prevention and Control. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/west-nile-virus-infection-annual-epidemiological-report-2019>, Zugriff: 10.07.2022). Auch ist auffällig, dass in Österreichs Nachbarland Ungarn seit 2008 konstant klinische Fälle von WNV in Pferdeartigen gemeldet wurden, wohingegen Österreich bis 2016 keinerlei solche Fälle zu verzeichnen hatte (de Heus et al. 2020).

Um auch in den kommenden Jahren eine repräsentative Aussage über ein mögliches Infektionsrisiko durch Stechmücken zu erhalten, sowie zukünftige Trends abschätzen zu können, sollte das durchgeführte Monitoring auf jeden Fall fortgesetzt werden.

Es ist auch zu bemerken, dass zeitgleich zu dieser Diplomarbeit in Ungarn an der Veterinärmedizinischen Universität Budapest ein gleichartiges Monitoring-Projekt – ebenfalls als Diplomarbeit – durchgeführt wurde. Durch Kommunikation der verantwortlichen Personen, ist bekannt, dass auch dort keine Stechmücke mit WNV nachgewiesen werden konnte.

In dieser Diplomarbeit sollte zusätzlich die Prävalenz von Filarien in Culiciden bestimmt werden. Als Prävalenz definiert man die Häufigkeit einer Krankheit oder eines Symptoms – hier das Vorhandensein von Filarien – zu einem bestimmten Zeitpunkt oder Zeitabschnitt in einer Population (Robert Koch Institut, [https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/Glossar/gbe\\_glossar\\_catalog.html?cms\\_lv2=3686300](https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/Glossar/gbe_glossar_catalog.html?cms_lv2=3686300). Zugriff: 10.07.2022). Als Population in diesem Projekt wurden alle weiblichen gefangenen Stechmücken definiert. Der Zeitabschnitt ist jener der ersten Fallenaufstellung (14.07.2021) bis zur Abholung der letzten Falle (24.10.2021). Die Prävalenz für *S. tundra* von 0,24% erscheint sehr gering. In einer Studie wurden in Mitteleuropa für diesen Parasiten eine sehr viel höhere Prävalenz von 12,5% in seinem Endwirt dem Reh dokumentiert (Büttner 1978). Es ist auffällig, dass *S. tundra* am häufigsten in der Gattung *Aedes* – v.a. *Ae. vexans* – vorkommt (Übleis et al. 2018), was sich auch mit den generierten Ergebnissen aus dieser Diplomarbeit deckt. Über die spezielle Art *S. tundra* ist in der Literatur noch nicht sehr viel bekannt. Da sich ein Parasit bzw. eine Erkrankung und die Folgen von ihnen nur dann richtig einschätzen und bekämpfen oder therapieren lassen, wenn genug Wissen über diese vorhanden ist, wäre es daher auch zu empfehlen, diese Arten in zukünftigen Projekten eingehender zu untersuchen.

Ein hervorzuhebendes Ergebnis stellt die Probe P036 dar, die mit der morphologischen Analyse ein Exemplar der Art *An. hyrcanus* ergab. Diese Art war hierzulande ursprünglich nicht heimisch, hat es aber in den letzten Jahren erfolgreich geschafft, sich in Österreich zu etablieren (Zittra et al. 2014). Diese Art ist im Orient und der paläarktischen Region weit verbreitet und stellt einen bedeutenden Vektor der humanen Malaria (z.B. *Plasmodium vivax*) sowie anderen Infektionserregern, wie das Japanische-Enzephalitis-Virus (JEV) dar (Zhang et al. 2021). Es wäre zu empfehlen, weitere Studien durchzuführen, welche diesen Infektionserregern besonderes Augenmerk schenken.

## 7 Zusammenfassung

In einem Zeitraum von vier Monaten (Juli-Oktober 2021) wurden im Osten Österreichs Stechmückenfallen aufgestellt, um so die vorkommenden Culiciden-Arten zu bestimmen, sowie das Infektionsrisiko mit verschiedenen durch Stechmücken übertragenen Krankheitserregern zu untersuchen. Diese Fallen wurden an drei verschiedenen Standorten positioniert, die alle in den Vorjahren zumindest einen positiven Fall von WNV in Pferden zu verzeichnen hatten. Die gefangenen Stechmücken wurden im Institut für Parasitologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien sowohl morphologischen als auch molekularen Untersuchungen unterzogen. Dabei wurden alle weiblichen Stechmücken unter einem Stereomikroskop auf Gattung und Art bestimmt. Anschließend wurde mittels PCR und Gelelektrophorese eine Bestimmung auf Flaviviridae und Filarioidea durchgeführt.

Es wurden 811 weibliche Stechmücken aus acht Arten nachgewiesen. Davon war die gemeine Stechmücke/*Cx. pipiens* s.l./*Cx. torrentium* mit 756 Individuen und 93,2% die häufigste. Bei der molekularen Analyse ließen sich keine Hinweise auf das Vorhandensein von Flaviviren finden. Allerdings wurde in zwei Mücken der Gattung *Aedes* DNA von *Setaria tundra* nachgewiesen.

Schlussendlich kann gesagt werden, dass das Risiko einer Infektion mit Flaviviren im Osten Österreichs im Jahr 2021 als äußerst gering eingestuft werden konnte. Auch für eine Infektion mit Filarien durch Mückenstich ist das Risiko für Pferde und Menschen als sehr gering anzusehen. Um eine Aussagekraft für ganz Österreich zu erzielen, müsste dieses Projekt jedoch in größerem Rahmen angelegt werden.

## 8 Summary

Over a period of four months (July-October 2021) mosquito traps were placed in the East of Austria, in order to determine the culicid species inventory, as well as the risk of infection with various mosquito-borne pathogens. These traps were positioned in three different locations, at which all of them had at least one positive case of WNV in horses documented within the past years. The captured mosquitoes were further examined by morphological and molecular methods at the Institute of Parasitology at University for Veterinary Medicine Vienna. For that matter genus and species of all female mosquitoes were determined using a stereomicroscope. Furthermore, a determination of Flaviviridae and Filarioidea was performed with PCR and gel electrophoresis.

811 female mosquitoes out of eight different species were detected. Of these, the common mosquito/*Cx. pipiens* s.l./*Cx. torrentium* was the most abundant with 756 individuals (93.2 %). No findings of flaviviruses were documented using molecular analysis. However, DNA of *Setaria tundra* was recorded in two mosquitoes of the genus *Aedes*.

Ultimately it can be assumed, that the risk of infection with flaviviruses in eastern Austria in the year 2021 was very low. The risk of an infection with mosquito-borne filarioid helminths can also be considered to be very low for humans and horses. In order to gain information about the whole country of Austria, this project would need to be implemented in a larger scale.

## 9 Literaturverzeichnis

- Abdel Rahman MMI. 2020. Morphological and molecular characterization of *Setaria equina* in donkeys. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences, 9(1):17.
- Bakonyi T, Ivanics É, Erdélyi K, Ursu K, Ferenczi E, Weissenböck H, Nowotny N. 2006. Lineage 1 and 2 strains of Encephalitic West Nile Virus, Central Europe. Emerging Infectious Diseases, 12(4):618–623.
- Bakran-Lebl K, Pree S, Brenner T, Daroglou E, Eigner B, Griesbacher A, Gunczy J, Hufnagl P, Jäger S, Jerrentrup H, Klocker L, Paill W, Petermann JS, Shahi Barogh B, Schwerte T, Suchentrunk C, Wieser C, Wortha LN, Zechmeister T, Zezula D, Zimmermann K, Zittra C, Allerberger F, Fuehrer H-P. 2022. First nationwide Monitoring Program for the Detection of Potentially Invasive Mosquito Species in Austria. Insects, 13(3):276.
- Becker N, Petrić D, Zgomba M, Boase C, Madon M, Dahl C, Kaiser A. 2010. Mosquitoes and their Control. 2. Auflage. Heidelberg: Springer.
- Becker N, Petrić D, Zgomba M, Boase C, Madon M, Dahl C, Kaiser A. 2020. Mosquitoes: Identification, Ecology and Control. 3. Auflage. Cham: Springer.
- Büttner K. 1978. Untersuchungen zur Parasitierung des Rehwildes bei steigendem Jagddruck. Zeitschrift für Jagdwissenschaft. 24(3):139–155.
- Bowen RA, Bosco-Lauth A, Syvrud K, Thomas A, Meinert TR, Ludlow DR, Cook C, Salt J, Ons E. 2014. Protection of horses from West Nile virus Lineage 2 challenge following immunization with a whole, inactivated WNV lineage 1 vaccine. Vaccine, 32(42):5455–5459.
- Brehm W, Gehlen H, Ohnesorge B, Wehrend A, Dietz O, Huskamp B, Bartmann CP, Hrsg. 2017. Handbuch Pferdepraxis. 4., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage 4., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart: Enke Verlag.
- Byas AD, Ebel GD. 2020. Comparative pathology of West Nile Virus in Humans and Non-Human Animals. Pathogens, 9(1):48.

Camp JV, Nowotny N. 2020. The knowns and unknowns of West Nile virus in Europe: what did we learn from the 2018 outbreak? *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 18(2):145–154.

Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/csels/dsepd/ss1978/lesson3/section2.html#:~:text=Prevalence%20refers%20to%20proportion%20of,during%20a%20particular%20time%20period>. (Zugriff: 10.07.2022).

Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/mosquitoes/about/life-cycles/culex.html>. (Zugriff: 08.05.2022).

Centers for Disease Control and Prevention. [https://www.cdc.gov/westnile/resources/pdfs/13\\_240124\\_west\\_nile\\_lifecycle\\_birds\\_plainlanguage\\_508.pdf](https://www.cdc.gov/westnile/resources/pdfs/13_240124_west_nile_lifecycle_birds_plainlanguage_508.pdf). (Zugriff: 28.06.2022).

Dauphin G, Zientara S. 2007. West Nile virus: Recent trends in diagnosis and vaccine development. *Vaccine*, 25(30):5563–5576.

de Heus P, Kolodziejek J, Camp JV, Dimmel K, Bagó Z, Hubálek Z, den Hoven R, Cavalleri J-MV, Nowotny N. 2020. Emergence of West Nile virus lineage 2 in Europe: Characteristics of the first seven cases of West Nile neuroinvasive disease in horses in Austria. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67(3):1189–1197.

de Heus P, Kolodziejek J, Hubálek Z, Dimmel K, Racher V, Nowotny N, Cavalleri J-MV. 2021. West Nile virus and Tick-Borne Encephalitis Virus Are Endemic in Equids in Eastern Austria. *Viruses*, 13(9):1873.

Deplazes P, Joachim A, Mathis A, Strube C, Taubert A, von Samson-Himmelstjerna G, Zahner H. 2021. *Parasitologie für die Tiermedizin*. 4., überarbeitete Auflage Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.

DeVries P., Wikipedia. [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Culex\\_pipiens\\_Pete\\_DeVries.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Culex_pipiens_Pete_DeVries.jpg). (Zugriff: 20.02.2022).

- European Centre for Disease Prevention and Control.  
<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/west-nile-virus-europe-2021-human-cases-updated-11-november-2021>. (Zugriff: 20.02.2022).
- European Centre for Disease Prevention and Control.  
<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/west-nile-virus-europe-2021-outbreaks-among-equids-and-or-birds-updated-11>. (Zugriff: 20.02.2022).
- European Centre for Disease Prevention and Control.  
<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/west-nile-virus-infection-annual-epidemiological-report-2019>. (Zugriff: 10.07.2022).
- European Centre for Disease Prevention and Control.  
<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/west-nile-virus-outbreaks-among-humans-and-animals-2021-transmission-season>. (Zugriff: 10.07.2022).
- European Medicines Agency.  
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/equip-wnv-previously-duvaxyn-wnv>. (Zugriff: 22.02.2023).
- Fuehrer H-P, Schoener E, Weiler S, Barogh BS, Zित्रा C, Walder G. 2020. Monitoring of alien mosquitoes in Western Austria (Tyrol, Austria, 2018). *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 14(6):e0008433.
- Fuehrer H-P, Auer H, Leschnik M, Silbermayr K, Duscher G, Joachim A. 2016. *Dirofilaria* in humans, Dogs, and Vectors in Austria (1978–2014)—From Imported Pathogens to the Endemicity of *Dirofilaria repens*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(5):e0004547.
- Gariyban L, Avashia N. 2013. Research techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3):1–4.
- Habarugira G, Suen WW, Hobson-Peters J, Hall RA, Bielefeldt-Ohmann H. 2020. West Nile virus: An Update on Pathobiology, Epidemiology, Diagnostics, Control and “One Health” Implications. *Pathogens*, 9(7):589.

- Hiepe T, Lucius R, Gottstein B, Hrsg. 2006. Allgemeine Parasitologie – mit den Grundzügen der Immunbiologie, Diagnostik und Bekämpfung. Stuttgart: Parey.
- Hornok S, Genchi C, Bazzocchi C, Fok É, Farkas R. 2007. Prevalence of *Setaria equina* microfilaraemia in horses in Hungary. Veterinary Record, 161(24):814–816.
- Ionică AM, Zittra C, Wimmer V, Leitner N, Votýpka J, Modrý D, Mihalca AD, Fuehrer H-P. 2017. Mosquitoes in the Danube Delta: searching for vectors of filarioid helminths and avian malaria. Parasites & Vectors, 10(1):324.
- Kleiboeker SB, Loiacono CM, Rottinghaus A, Pue HL, Johnson GC. 2004. Diagnosis of West Nile virus Infection in Horses. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 16(1):2–10.
- Knap N, Korva M, Ivočić V, Kalan K, Jelovšek M, Sagadin M, Zakotnik S, Strašek Smrdel K, Slunečko J, Avšič-Županc T. 2020. West Nile Virus in Slovenia. Viruses, 12(7):720.
- Kronefeld M, Kampen H, Sassnau R, Werner D. 2014. Molecular detection of *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* and *Setaria tundra* in mosquitoes from Germany. Parasites & Vectors, 7(1):30.
- Lebl K, Zittra C, Silbermayr K, Obwaller A, Berer D, Brugger K, Walter M, Pinior B, Fuehrer H-P, Rubel F. 2015. Mosquitoes (Diptera: Culicidae) and their relevance as disease vectors in the city of Vienna, Austria. Parasitology Research, 114(2):707–713.
- Marino G, Zanghi A, Quartuccio M, Cristarella S, Giuseppe M, Catone G. 2009. Equine testicular Lesions Related to Invasion by Nematodes. Journal of Equine Veterinary Science, 29(10):728–733.
- Mehlhorn H, Piekarski G. 2002. Grundriß der Parasitenkunde – Parasiten der Menschen und der Nutztiere. 6., überarbeitete und erweiterte Auflage. Heidelberg: Spektrum.
- Mera y Sierra R, Iranzo J, Neira G. 2017. Vector borne Diseases in Mid Western Argentina, First Report of *Setaria Equina* [Nematoda: Onchocercidae] in A Horse [Equus caballus]. Austin Journal of Vector Borne Diseases: Open Access, 1(1): 1002.



- Nabie R, Spotin A, Rouhani S. 2017. Subconjunctival setariasis due to *Setaria equina* infection; a case report and a literature review. *Parasitology International*, 66(1):930–932.
- Nagy A, Mezei E, Nagy O, Bakonyi T, Csonka N, Kaposi M, Koroknai A, Szomor K, Rigó Z, Molnár Z, Dánielisz Á, Takács M. 2019. Extraordinary increase in West Nile virus cases and first confirmed human Usutu virus infection in Hungary, 2018. *Eurosurveillance*, 24(28): 1900038.
- Ołoś G, Nowakowska J, Welc-Falęciak R. 2021. *Setaria tundra*, what do we know, what is still to be discovered? *Annals of Parasitology*, 67(1):1–10.
- Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH.  
<https://www.ages.at/mensch/krankheit/krankheitserreger-von-a-bis-z/west-nil-virus>.  
 (Zugriff 26.02.2022).
- Porter RS, Leblond A, Lecollinet S, Tritz P, Cantile C, Kutasi O, Zientara S, Pradier S, van Galen G, Speybroek N, Saegerman C. 2011. Clinical diagnosis of West Nile Fever in Equids by Classification and Regression Tree (CART) Analysis and Comparative Study of Clinical Appearance in Three European Countries. *Transboundary and Emerging Diseases*, 58(3):197-205.
- Rappole JH, Hubálek Z. 2003. Migratory birds and West Nile virus. *Journal of Applied Microbiology*, 94:47–58.
- Rechtsinformationssystem der Republik Österreich.  
<https://www.ris.bka.gv.at/GeltendeFassung.wxe?Abfrage=Bundesnormen&Gesetzesnummer=10010172>. (Zugriff: 28.02.2022).
- Robert Koch Insitut.  
[https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/Glossar/gbe\\_glossar\\_catalog.html?cms\\_lv2=3686300](https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/Glossar/gbe_glossar_catalog.html?cms_lv2=3686300) (Zugriff: 10.07.2022).
- Rossi SL, Ross TM, Evans JD. 2010. West Nile Virus. *Clinics in Laboratory Medicine*, 30(1):47–65.

- Rudolf I, Betášová L, Blažejová H, Venclíková K, Straková P, Šebesta O, Mendel J, Bakonyi T, Schaffner F, Nowotny N, Hubálek Z. 2017. West Nile virus in overwintering mosquitoes, central Europe. *Parasites & Vectors*, 10(1):452.
- Sambri V, Capobianchi M, Charrel R, Fyodorova M, Gaibani P, Gould E, Niedrig M, Papa A, Pierro A, Rossini G, Varani S, Vocale C, Landini MP. 2013. West Nile virus in Europe: emergence, epidemiology, diagnosis, treatment, and prevention. *Clinical Microbiology and Infection*, 19:699-704.
- Schnieder T, Hrsg. 2006. *Veterinärmedizinische Parasitologie*. 6., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Berlin: Parey.
- Selim A, Megahed A, Kandeel S, Alouffi A, Almutairi MM. 2021. West Nile virus seroprevalence and associated risk factors among horses in Egypt. *Scientific Reports*, 11(1):20932.
- Semenza JC, Suk JE. 2018. Vector-borne diseases and climate change: a European perspective. *FEMS Microbiology Letters*, 365(2):fnx244.
- Semenza JC, Rocklöv J, Penttinen P, Lindgren E. 2016. Observed and projected drivers of emerging infectious diseases in Europe. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1382(1):73–83.
- Stiasny K, Aberle SW, Heinz FX. 2013. Retrospective identification of human cases of West Nile virus infection in Austria (2009 to 2010) by serological differentiation from Usutu and other flavivirus infections. *Eurosurveillance*, 18(43).
- Übleis SS, Cuk C, Nawaratil M, Butter J, Schoener E, Obwaller A, Zechmeister T, Duscher G, Rubel F, Lebl K, Zittra C, Fuehrer H. 2018. Xenomonitoring of mosquitoes (Diptera: Culicidae) for the Presence of Filarioid Helminths in Eastern Austria. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2018(5): 1-6.
- Zhang C, Yang R, Wu L, Luo C, Guo X, Deng Y, Zhou H, Zhang Y. 2021. Molecular phylogeny of the *Anopheles hyrcanus* group (Diptera: Culicidae) based on rDNA–ITS2 and mtDNA–COII. *Parasites & Vectors*, 14(1):454.

- Zittra C, Flechl E, Kothmayer M, Vitecek S, Rossiter H, Zechmeister T, Fuehrer H-P. 2016. Ecological characterization and molecular differentiation of *Culex pipiens* complex taxa and *Culex torrentium* in eastern Austria. *Parasites & Vectors*, 9(1):197.
- Zittra C, Joachim A, Führer H. 2014. Stechmücken und Dirofilarien in Österreich – Ein Überblick über die derzeitige Situation von neobiotischen Culiciden und Dirofilarien. *Tierärztliche Umschau*, 70 (4): 126–131.

## 10 Abbildungsverzeichnis

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Abbildung 1:</b> Individuum der Art <i>Culex pipiens</i> . (DeVries P., Wikipedia. <a href="https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Culex_pipiens_Pete_DeVries.jpg">https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Culex_pipiens_Pete_DeVries.jpg</a> . Zugriff: 20.02.2022) .....                                                                                                                                                                                      | 12 |
| <b>Abbildung 2:</b> Schematische Darstellung des Lebenszyklus von <i>Culex</i> . (Centers for Disease Control and Prevention. <a href="https://www.cdc.gov/mosquitoes/about/life-cycles/culex.html/">https://www.cdc.gov/mosquitoes/about/life-cycles/culex.html/</a> , Zugriff: 08.05.2022). .....                                                                                                                                                                 | 16 |
| <b>Abbildung 3:</b> Schematische Darstellung des Übertragungswegs von WNV zwischen Stechmücken und Vögeln sowie von Stechmücken auf „Sackgassen“-Wirte. (Centers for Disease Control and Prevention. <a href="https://www.cdc.gov/westnile/resources/pdfs/13_240124_west_nile_lifecycle_birds_plainlanguage_508.pdf">https://www.cdc.gov/westnile/resources/pdfs/13_240124_west_nile_lifecycle_birds_plainlanguage_508.pdf</a> , Zugriff: 28.06.2022). .....        | 20 |
| <b>Abbildung 4:</b> Abbildung der nachgewiesenen WNV Infektionen in Equiden und Vögeln in Europa im Jahr 2021. (European Centre for Disease Prevention and Control. <a href="https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/west-nile-virus-europe-2021-outbreaks-among-equids-andor-birds-updated-11">https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/west-nile-virus-europe-2021-outbreaks-among-equids-andor-birds-updated-11</a> . Zugriff: 20.02.2022). ..... | 23 |
| <b>Abbildung 5:</b> humane WNV- Infektionen im Jahr 2021. (European Centre for Disease Prevention and Control. <a href="https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/west-nile-virus-europe-2021-human-cases-updated-11-november-2021">https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/west-nile-virus-europe-2021-human-cases-updated-11-november-2021</a> . Zugriff: 20.02.2022). ..                                                                           | 24 |
| <b>Abbildung 6:</b> Überblick über die Standorte PF1, PF2, PF3 in Österreich. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 31 |
| <b>Abbildung 7:</b> Überblick über die Standorte PF1, PF2, PF3 im Osten Österreichs. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 31 |
| <b>Abbildung 8:</b> Standorte PF1_01, PF1_02, PF1_03 an der Vetmeduni Vienna. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 32 |
| <b>Abbildung 9:</b> Standorte PF2_01, PF2_02, PF2_03 bei Equestrian Centre Austria in Gerasdorf. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 32 |
| <b>Abbildung 10:</b> Standorte PF3_01, PF3_02, PF3_03 bei Weinhapplstall in Roseldorf, Großmugl. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 33 |
| <b>Abbildung 11:</b> schematische Abbildung einer adulten weiblichen <i>Culex pipiens</i> mit Beschriftung der anatomischen Körperteile auf Deutsch. (Ruiz Villareal M., Wikipedia. <a href="https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Culex_pipiens_diagram_de.svg">https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Culex_pipiens_diagram_de.svg</a> . Zugriff: 20.02.2022). .....                                                                                           | 35 |

- Abbildung 12:** graphische Darstellung der prozentualen Verteilung zwischen männlichen und weiblichen Stechmücken. ....46
- Abbildung 13:** Graphische Darstellung der Anzahl der weiblichen Individuen pro Art. ....46

## **11 Tabellenverzeichnis**

|                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabelle 1:</b> Übersicht über die Standorte der aufgestellten Fallen.....              | 29 |
| <b>Tabelle 4:</b> Rezept Mastermix Flaviviren NS51. ....                                  | 39 |
| <b>Tabelle 5:</b> Temperaturkurve Flaviviren NS51 One-Step RT-PCR.....                    | 40 |
| <b>Tabelle 2:</b> Rezept Mastermix Flaviviren NS52. ....                                  | 41 |
| <b>Tabelle 3:</b> Temperaturkurve Flaviviren NS52 Nested-PCR.....                         | 41 |
| <b>Tabelle 6:</b> Rezept Mastermix Filarioidea, Buffer Green, Go Taq. ....                | 42 |
| <b>Tabelle 10:</b> Übersicht über die Daten der Aufstellung und Abholung der Fallen. .... | 63 |
| <b>Tabelle 11:</b> Auflistung der Anzahl der Individuen pro Art und Falle. ....           | 65 |

## 12 Anhang

**Tabelle 7:** Übersicht über die Daten der Aufstellung und Abholung der Fallen.

| Bezeichnung der Probe | Datum des Aufstellens | Datum der Abholung |
|-----------------------|-----------------------|--------------------|
| BG_PF1_01_20210714    | 14.07.2021            | 15.07.2021         |
| BG_PF1_02_20210714    |                       |                    |
| BG_PF1_03_20210714    |                       |                    |
| BG_PF2_01_20210715    | 15.07.2021            | 16.07.2021         |
| BG_PF2_02_20210715    |                       |                    |
| BG_PF2_03_20210715    |                       |                    |
| BG_PF3_01_20210715    |                       |                    |
| BG_PF3_02_20210715    |                       |                    |
| BG_PF3_03_20210715    |                       |                    |
| BG_PF1_01_20210728    | 28.07.2021            | 29.07.2021         |
| BG_PF1_02_20210728    |                       |                    |
| BG_PF1_03_20210728    |                       |                    |
| BG_PF2_01_20210729    | 29.07.2021            | 30.07.2021         |
| BG_PF2_02_20210729    |                       |                    |
| BG_PF2_03_20210729    |                       |                    |
| BG_PF3_01_20210729    |                       |                    |
| BG_PF3_02_20210729    |                       |                    |
| BG_PF3_03_20210729    |                       |                    |
| BG_PF1_01_20210811    | 11.08.2021            | 12.08.2021         |
| BG_PF1_02_20210811    |                       |                    |
| BG_PF1_03_20210811    |                       |                    |
| BG_PF2_01_20210812    | 12.08.2021            | 13.08.2021         |
| BG_PF2_02_20210812    |                       |                    |
| BG_PF2_03_20210812    |                       |                    |
| BG_PF3_01_20210812    |                       |                    |
| BG_PF3_02_20210812    |                       |                    |
| BG_PF3_03_20210812    |                       |                    |

|                    |            |            |
|--------------------|------------|------------|
| BG_PF1_01_20210825 | 25.08.2021 | 26.08.2021 |
| BG_PF1_02_20210825 |            |            |
| BG_PF1_03_20210825 |            |            |
| BG_PF2_01_20210826 | 26.08.2021 | 27.08.2021 |
| BG_PF2_02_20210826 |            |            |
| BG_PF2_03_20210826 |            |            |
| BG_PF3_01_20210826 |            |            |
| BG_PF3_02_20210826 |            |            |
| BG_PF3_03_20210826 |            |            |
| BG_PF1_01_20210908 | 08.09.2021 | 09.09.2021 |
| BG_PF1_02_20210908 |            |            |
| BG_PF1_03_20210908 |            |            |
| BG_PF2_01_20210909 | 09.09.2021 | 10.09.2021 |
| BG_PF2_02_20210909 |            |            |
| BG_PF2_03_20210909 |            |            |
| BG_PF3_01_20210909 |            |            |
| BG_PF3_02_20210909 |            |            |
| BG_PF3_03_20210909 |            |            |
| BG_PF1_01_20210922 | 22.09.2021 | 23.09.2021 |
| BG_PF1_02_20210922 |            |            |
| BG_PF1_03_20210922 |            |            |
| BG_PF2_01_20210923 | 23.09.2021 | 24.09.2021 |
| BG_PF2_02_20210923 |            |            |
| BG_PF2_03_20210923 |            |            |
| BG_PF3_01_20210923 |            |            |
| BG_PF3_02_20210923 |            |            |
| BG_PF3_03_20210923 |            |            |
| BG_PF1_01_20211013 | 13.10.2021 | 14.10.2021 |
| BG_PF1_02_20211013 |            |            |
| BG_PF1_03_20211013 |            |            |



|                    |            |            |
|--------------------|------------|------------|
| BG_PF2_01_20211014 | 14.10.2021 | 15.10.2021 |
| BG_PF2_02_20211014 |            |            |
| BG_PF2_03_20211014 |            |            |
| BG_PF3_01_20211014 |            |            |
| BG_PF3_02_20211014 |            |            |
| BG_PF3_03_20211014 |            |            |
| BG_PF1_01_20211021 | 21.10.2021 | 22.10.2021 |
| BG_PF1_02_20211021 |            |            |
| BG_PF1_03_20211021 |            |            |
| BG_PF2_01_20211022 | 22.10.2021 | 23.10.2021 |
| BG_PF2_02_20211022 |            |            |
| BG_PF2_03_20211022 |            |            |
| BG_PF3_01_20211022 |            |            |
| BG_PF3_02_20211022 |            |            |
| BG_PF3_03_20211022 |            |            |

**Tabelle 8:** Auflistung der Anzahl der Individuen pro Art und Falle.

| Probennummer | Stechmückenart                        | Geschlecht | Anzahl der Individuen | Fallenbezeichnung  |
|--------------|---------------------------------------|------------|-----------------------|--------------------|
| P001         | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F          | 2                     | BG_PF3_03_20210715 |
| P002         | <i>Ae. geniculatus</i>                | F          | 1                     |                    |
| P003         | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F          | 25                    | BG_PF1_02_20210728 |
| P004         | <i>Ae. caspius</i>                    | F          | 1                     |                    |
| P005         | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F          | 29                    | BG_PF2_02_20210715 |
| P006         | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F          | 50                    | BG_PF2_03_20210715 |

|      |                                       |   |    |                    |
|------|---------------------------------------|---|----|--------------------|
| P007 | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | M | 5  |                    |
| P008 | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F | 29 |                    |
| P009 | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F | 4  |                    |
| P010 | <i>Culex</i> sp.                      | M | 1  | BG_PF3_01_20210715 |
| P011 | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F | 25 | BG_PF2_01_20210715 |
| P012 | <i>Culex</i> sp.                      | M | 37 |                    |
| P013 | <i>Ae. vexans</i>                     | F | 2  |                    |
| P014 | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F | 5  | BG_PF1_01-20210728 |
| P015 | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F | 27 | BG_PF1_03_20210728 |
| P016 | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F | 32 | BG_PF2_01_20210729 |
| P017 | <i>Culex</i> sp.                      | M | 10 |                    |
| P018 | <i>Ae. vexans</i>                     | F | 9  |                    |
| P019 | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F | 50 | BG_PF2_03_20210729 |
| P020 | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | M | 3  |                    |
| P021 | <i>Ae. vexans</i>                     | F | 1  |                    |
| P022 | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F | 1  | BG_PF3_02_20210715 |
| P023 | <i>Culex</i> sp.                      | F | 2  |                    |
| P024 | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F | 7  | BG_PF3_03_20210729 |
| P025 | <i>Culex</i> sp.                      | M | 1  |                    |

|      |                                       |   |    |                    |
|------|---------------------------------------|---|----|--------------------|
| P026 | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F | 11 | BG_PF1_03_20210714 |
| P027 | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F | 20 | BG_PF1_02_20210714 |
| P028 | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F | 3  | BG_PF1_01_20210714 |
| P029 | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F | 2  | BG_PF3_02_20210729 |
| P030 | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F | 18 | BG_PF2_02_20210729 |
| P031 | <i>Culicidae</i>                      | M | 1  |                    |
| P032 | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F | 4  | BG_PF3_01_20210729 |
| P033 | <i>Ae. vexans</i>                     | F | 1  |                    |
| P034 | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F | 9  | BG_PF2_01_20210812 |
| P035 | <i>Ae. vexans</i>                     | F | 5  |                    |
| P036 | <i>An. hyrcanus</i>                   | F | 1  |                    |
| P037 | <i>Ae. intrudens</i>                  | F | 1  |                    |
| P038 | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F | 34 | BG_PF1_03_20210825 |
| P039 | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F | 5  | BG_PF3_01_20210812 |
| P040 | <i>Aedes</i> sp.                      | M | 1  |                    |
| P041 | <i>Aedes</i> sp.                      | F | 2  |                    |
| P042 | <i>Ae. vexans</i>                     | F | 1  |                    |
| P043 | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F | 36 | BG_PF1_02_20210825 |
| P044 | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F | 50 | BG_PF2_03_20210812 |

|      |                                               |   |    |                    |
|------|-----------------------------------------------|---|----|--------------------|
| P045 | <i>Culex</i> sp.                              | M | 4  |                    |
| P046 | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./ <i>torrentium</i> | F | 5  |                    |
| P047 | <i>Ae. vexans</i>                             | F | 8  |                    |
| P048 | <i>Aedes</i> sp.                              | F | 1  |                    |
| P049 | <i>Ae. caspius</i>                            | F | 1  |                    |
| P050 | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./ <i>torrentium</i> | F | 2  | BG_PF3_02_20210812 |
| P051 | <i>Ae. vexans</i>                             | F | 2  |                    |
| P052 | <i>Ae. intrudens</i>                          | F | 1  |                    |
| P053 | <i>Ae. geniculatus</i>                        | F | 2  |                    |
| P054 | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./ <i>torrentium</i> | F | 50 | BG_PF2_02_20210812 |
| P055 | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./ <i>torrentium</i> | F | 22 |                    |
| P056 | <i>Ae. vexans</i>                             | F | 2  |                    |
| P057 | <i>Ae. geniculatus</i>                        | F | 1  |                    |
| P058 | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./ <i>torrentium</i> | F | 5  | BG_PF3_03_20210812 |
| P059 | <i>Ae. vexans</i>                             | F | 1  |                    |
| P060 | <i>Anopheles</i> sp.                          | M | 1  |                    |
| P061 | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./ <i>torrentium</i> | F | 2  | BG_PF2_01_20210826 |
| P062 | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./ <i>torrentium</i> | F | 1  | BG_PF1_01_20210825 |
| P063 | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./ <i>torrentium</i> | F | 14 | BG_PF2_02_20210826 |
| P064 | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./ <i>torrentium</i> | F | 44 | BG_PF1_03_20210811 |
| P065 | <i>Cq. richiardii</i>                         | F | 1  |                    |

|      |                                       |   |    |                    |
|------|---------------------------------------|---|----|--------------------|
| P066 | <i>Ae. vexans</i>                     | F | 4  | BG_PF1_03_20210811 |
| P067 | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F | 6  | BG_PF1_01_20210811 |
| P068 | <i>Ae. vexans</i>                     | F | 1  |                    |
| P069 | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F | 29 | BG_PF2_03_20210826 |
| P070 | <i>Culex</i> sp.                      | M | 2  |                    |
| P071 | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F | 25 | BG_PF1_02_20210811 |
| P072 | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F | 1  | BG_PF3_03_20210826 |
| P073 | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F | 8  | BG_PF2_03_20210909 |
| P074 | <i>Culex</i> sp.                      | M | 1  |                    |
| P075 | <i>Anopheles</i> sp.                  | M | 2  |                    |
| P076 | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F | 7  | BG_PF3_01_20210909 |
| P077 | <i>Cs. annulata</i>                   | F | 1  |                    |
| P078 | <i>Culex</i> sp.                      | M | 7  | BG_PF3_03_20210909 |
| P079 | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F | 4  |                    |
| P080 | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F | 3  | BG_PF1_03_20210908 |
| P081 | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F | 9  | BG_PF1_01_20210908 |
| P082 | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F | 4  | BG_PF2_02_20210909 |
| P083 | <i>Aedes vexans</i>                   | F | 1  | BG_PF3_02_20210909 |
| P084 | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F | 2  |                    |

|                                |                                       |   |   |                    |
|--------------------------------|---------------------------------------|---|---|--------------------|
| P085                           | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F | 5 | BG_PF1_02_20210922 |
| P086                           | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F | 2 | BG_PF1_03_20210922 |
| P087                           | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F | 7 | BG_PF2_02_20210923 |
| P088                           | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F | 1 | BG_PF1_02_20211013 |
| P089                           | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F | 4 | BG_PF3_01_20210923 |
| P090                           | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F | 4 | BG_PF3_03_20210923 |
| P091                           | <i>Ae. vexans</i>                     | F | 1 |                    |
| P092                           | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | M | 1 | BG_PF2_01_20210923 |
| P093                           | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F | 1 | BG_PF3_02_20210923 |
| P094                           | <i>Ae. vexans</i>                     | F | 2 |                    |
| P095                           | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F | 5 | BG_PF2_03_20210923 |
| P096                           | <i>Ae. vexans</i>                     | M | 1 |                    |
| P097                           | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | F | 4 | BG_PF1_02_20211021 |
| P098                           | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | M | 3 |                    |
| P099                           | <i>Cx. pipiens</i><br>s.l./torrentium | M | 1 | BG_PF1_01_20211021 |
| Keine Stechmücken, nur Beifang |                                       |   |   | BG_PF3_01_20210826 |
|                                |                                       |   |   | BG_PF1_02_20210908 |
|                                |                                       |   |   | BG_PF2_01_20210909 |

|  |                    |
|--|--------------------|
|  | BG_PF1_01_20210922 |
|  | BG_PF1_03_20211013 |
|  | BG_PF1_01_20211013 |
|  | BG_PF1_03_20211021 |

## **14 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinem Betreuer Priv. Doz. Dr. Hans-Peter Fuehrer bedanken, der immer für alle meine Fragen da war und sich stets Zeit genommen hat um alles zu beantworten.

Auch Frau Dr. Maria Unterköfler möchte ich meinen Dank aussprechen, dafür, dass sie mir eine super Einführung in Bezug auf die praktische Arbeit gegeben hat und stets Hilfe angeboten hat, wenn etwas unklar war.

Bei den Besitzerinnen des Weinhapplhofs und des Equine Austria Centre Frau Karin Weinhappl und Frau Anna Kleindienst sowie der Leiterin der klinischen Abteilung für Interne Medizin Pferde an der Universitätsklinik für Pferde der Vetmeduni Vienna Dipl. ECEIM Univ.-Prof Dr. Jessika-Maximiliane Cavalleri möchte ich mich ebenfalls bedanken. Ohne deren großartige Kooperation ein Aufstellen der Mückenfallen an diesen für das Projekt bedeutsamen Orten nicht möglich gewesen wäre.

Dieses Projekt wurde von der Stiftung Pro Pferd ermöglicht: PR 2021-04 - West-Nil-Virus-Infektionen bei Pferden in zwei betroffenen Ländern (Österreich und Ungarn) – Eine Vorstudie zur Analyse der Moskito-Biodiversität und der Flavivirus-Prävalenz in der Nähe von zuvor WNV-betroffenen Pferdepopulationen.

Vor allem gilt mein Dank meiner Familie. Meinen Eltern und meinem Bruder, die mich in diesem Studium großartig unterstützen und auch wieder bei dieser Diplomarbeit voll hinter mir standen und stets ein offenes Ohr für mich hatten.