

Aus dem Klinischen Department für Kleintiere und Pferde
der Veterinärmedizinischen Universität Wien
Klinisches Zentrum für Pferde
(Leiterin: Univ. Prof. Dr. med. vet. Jessika-Maximiliane Cavalleri)

Vorkommen des Usutu-Virus in der Stechmückenpopulation in der Nähe von Pferdeställen in Ostösterreich

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von
Isabella Valerie Lässer

Wien, im März, 2024

Betreuerin: Dr. med. vet. Phebe de Heus DVM Dipl. ECEIM
Klinisches Department für Kleintiere und Pferde
Klinisches Zentrum für Pferde
Veterinärmedizinische Universität Wien

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

Eigenständigkeitserklärung

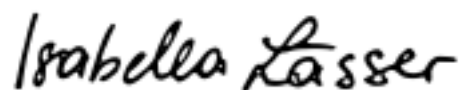
Hiermit erkläre ich, Isabella Lässer, dass ich die vorgelegte Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle übernommenen Textstellen aus fremden Quellen wurden kenntlich gemacht.

Ich habe die entscheidenden Arbeiten selbst durchgeführt und alle zuarbeitenden Tätigen mit ihrem Beitrag zur Arbeit angeführt.

Die vorliegende Arbeit wurde nicht an anderer Stelle eingereicht oder veröffentlicht.

Wien, den 10.03.2024

Isabella Lässer

A handwritten signature in black ink that reads "Isabella Lässer". The script is cursive and fluid, with the first letters of the first and last names being capitalized and prominent.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Usutu-Virus wurde 1959 welches erstmals in Afrika entdeckt, und hat sich seitdem durch die fortschreitende Globalisierung und Veränderung der Umweltbedingungen weltweit verbreitet. Das Usutu-Virus gehört zu den *Flaviviridae*, einer Familie von Viren, welche von Arthropoden, wie Stechmücken, übertragen werden. Zu den *Flaviviridae* zählen unter anderem bekannte Viren wie das Dengue-Virus, das Frühsommer-Meningoenzephalitis Virus, das Gelbfieber-Virus, das West-Nil-Virus und eben auch das Usutu-Virus. In Österreich, sowie in weiteren Ländern auf der Welt spielen Arthropoden, wie *Culex pipiens* s.l., eine wichtige Rolle als kompetente Überträger des West-Nil-Virus und Usutu-Virus. In dieser Arbeit wurden insgesamt 398 Stechmücken in den Sommermonaten 2023 mithilfe der BG-Sentinel 2 CO₂ Mückenfalle von Biogents gefangen und danach differenziert. Aufgestellt wurden diese in der Nähe von Pferden. Für die Aufarbeitung der gewonnenen RNA wurde ein bereits etabliertes Nested-PCR-Verfahren verwendet, wobei der Fokus auf dem Nichtstrukturprotein 5 des Flavivirus lag, das für die Virusreplikation unerlässlich ist. Das Screening der Stechmücken auf *Flaviviridae*, insbesondere auf das Usutu-Virus, ergab, dass zwar kein Usutu-Virus nachgewiesen wurde, jedoch ein bisher wenig beschriebenes Virus in einer Auswahl der gepoolten Stechmücken entdeckt wurde. Die nun detektierten insektenspezifischen Viren sind auch schon in anderen Ländern der Welt beschrieben, jedoch sind sie noch weitgehend unerforscht. In unserer Studie wurden die insektenspezifischen Viren erstmals in Österreich gefunden und ausschließlich bei *Culiseta annulata* detektiert. Über die Wechselwirkung zwischen den insektenspezifischen Viren und den pathogenen Flaviviren ist noch wenig bekannt, dennoch gibt es Anzeichen, dass eine reduzierte Pathogenität der pathogenen Flaviviren besteht, wenn die Mücken mit einem bestimmten insektenspezifischen Flavivirus bereits infiziert wurde, dennoch ist die weitere Erforschung dieser Viren notwendig.

ABSTRACT

The Usutu virus was discovered in Africa in 1959 and has since spread due to advancing globalization and changing environmental conditions, such as global warming. The Usutu virus belongs to the *Flaviviridae* family, a group of viruses that are transmitted by arthropods such as mosquitoes. Among the *Flaviviridae* there are well-known viruses like the Dengue virus, the Tick-borne encephalitis virus, the Yellow fever virus, the West Nile virus, and, for this study notably, the Usutu virus. In Austria and other countries worldwide, arthropods such as *Culex pipiens* s.l. play a crucial role as competent vectors for the West Nile virus and the Usutu virus. In the course of this diploma thesis, a total of 398 mosquitoes were captured during four consecutive summer months of 2023 using the BG-Sentinel 2 CO₂ mosquito trap from Biogents. These traps were placed near horses. A previously established Nested-PCR was used, with the focus on the Non-Structural Protein 5 (NS5) of the Flavivirus, which is essential for virus replication. The screening of mosquitoes for *Flaviviridae*, particularly for the Usutu virus, revealed that while no Usutu virus was detected, a previously little-described virus was found in a selection of the pooled mosquitoes. The detected insect-specific viruses have been described in other parts of the world as well, but they remain largely unexplored. In our study, the insect-specific viruses were detected the first time in Austria and exclusively in *Culiseta annulata*. The interaction between insect-specific viruses and pathogenic flaviviruses is still poorly understood. However, there are indications of reduced infectivity of pathogenic flaviviruses when mosquitoes are already infected with an insect specific flavivirus. Further research into these viruses will be necessary.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	3
ABSTRACT.....	4
1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	1
EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	3
2. LITERATURÜBERSICHT	5
2.1. VIRUS	5
2.1.1. Taxonomische Einordnung.....	5
2.1.2. Morphologie.....	5
2.1.3. Vorkommen und Ausbreitung	6
2.1.4. Klinik.....	8
2.2. VEKTOREN.....	8
2.2.1. Taxonomische Einordnung.....	9
2.2.2. Morphologie der adulten Stechmücke.....	10
2.2.3. Lebenszyklus	11
2.2.4. Morphologische Bestimmung der häufigsten adulten Stechmücken	11
2.2.4.1. Culex pipiens s. l.....	11
2.2.4.2. Culiseta annulata	12
2.2.4.3. Anopheles claviger s. l.	13
3. MATERIAL UND METHODIK	14
3.1. BETRIEBE	14
3.2. MATERIAL	14
3.2.1. Stechmückenfalle Aufbau.....	14
3.2.2. Funktionsweise der Mückenfalle.....	16
3.2.3. Mückenfallen Standort	16
3.3. TIERMATERIAL	16
3.4. METHODIK	16

3.4.1.	Differenzierung der Stechmücken.....	16
3.4.2.	Extraktion.....	17
3.4.3.	Nested PCR.....	18
3.4.4.	Gelelektrophorese und Sequenzierung.....	20
4.	ERGEBNISSE.....	22
4.1.	STECHMÜCKEN-FALLEN	22
4.2.	GELELEKTROPHORESE.....	24
4.3.	SEQUENZIERUNG.....	26
5.	DISKUSSION.....	29
6.	LITERATURVERZEICHNIS.....	35
7.	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	44
8.	ANHANG.....	46

1. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Ae.	<i>Aedes</i>
AEFV	Aedes Flavivirus
An.	<i>Anopheles</i>
bp	Basenpaar
CFAV	Zellfusionsagent-Virus/ Cell fusing agent virus
cISF	klassisches Insekten spezifisches Flavivirus/ classic insect specific flavivirus
CLBOV	Calbertado Virus
CO ₂	Kohlendioxid
CPE	zytopathische Effekte/ cytopathic effects
Cs.	<i>Culiseta</i>
Cx.	<i>Culex</i>
CxFV	Culex Virus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FSME	Frühsommer-Meningoenzephalitis
g	Zentrifugenbeschleunigung/ G-Zahl
ICH	Immunhistochemie
ISF	Insekten spezifisches Virus, Insektenspezifisches Flavivirus, insect specific flavivirus
ISH	in situ Hybridisation
ISV	insektenspezifische Viren
KRV	Kamiti River Virus
L	Ladder
LB	Lower Band
MBV	Mücken übertragene Viren/ mosquito borne viruses
MMV	Marisma Mosquito Virus
MVEV	Murray Valley Enzephalitis Virus/ Murray Valley encephalitis virus
NAKV	Kakiwogo Virus
NKV	nicht bekannte Arthropoden übertragenes Virus/ not-known-vector viruses
Nr.	Nummer
NS	Nichtstrukturprotein
NTC1	Negativkontrolle der Nest1
NTC2	Negativkontrolle der Nest2
ORF	offenen Leserahmen/open reading frame
PCR	Polymerase-Kettenreaktion/ polymerase chain reaction
PK	Positiv-Kontrolle

PLZ	Postleitzahl
QBV	Quang Binh Virus
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transkription Polymerase-Kettenreaktion
SCxFV	Spanischen Culex Flavivirus
SOcFV	Spanischen Ochlerotatus Flavivirus
Tab.	Tabelle
TBV	Zecken übertragenes Virus/ tick-borne viruses
USUV	Usutu-Virus, Usutu-Virus
WNV	West-Nil-Virus
µl	Mikroliter

Einleitung und Fragestellung

Stechmücken spielen in der Übertragung von Krankheitserregern eine wichtige Rolle. Viele dieser Krankheiten kommen durch die Veränderung der Umweltbedingungen, insbesondere durch den Klimawandel, von ihren tropischen Heimatorten auch in vorher nicht endemische Gebiete (1). Stechmücken haben bis auf die Antarktis und weitere wenige Gebiete die ganze Welt besiedelt (2). Viren, die von Stechmücken oder anderen Arthropoden übertragen werden, werden als Arboviren beschrieben (1). Das in dieser Studie untersuchte Usutu-Virus (USUV) ist ein durch Stechmücken übertragenes *Flavivirus* (2). Die meisten pathogenen Viren, die sich als Flaviviren einteilen lassen, können nun nach ihren Vektoren in drei Gruppen unterteilt werden: in durch Zecken übertragene Viren (tick-borne viruses, TBV), durch Stechmücken übertragene Viren (mosquito-borne viruses, MBV) und durch nicht bekannte Arthropoden übertragene Viren (not-known-vector viruses, NKV) (3). Das USUV zirkuliert vor allem zwischen Stechmücken (Vektor) und Vögeln (Wirt) und findet seinen Weg auch manchmal zum Menschen und zu Pferden (Fehlwirt). Der Fehlwirt stellt eine Sackgasse dar, er ist ein suboptimaler Organismus, in ihnen kann es nicht zu einer Weiterentwicklung kommen. Das USUV stammt ursprünglich aus Afrika, wo es 1959 das erste Mal entdeckt wurde. Im Jahr 2001 wurde es dann anhand von Organproben in verstorbenen Wildvögeln, das erste Mal in Europa, Österreich nachgewiesen (2). Vor dem Tod zeigen die Vögel meist ein zerzaustes Gefieder (4), Apathie Anorexie, verminderte Aufnahme von Wasser und Futter, Koordinationsstörung und Krampfanfälle (5). Eine retrospektive Studie zeigt auf, dass in archivierten Gewebeproben von verstorbenen Vögeln, das USUV schon im Jahr 1996, in Italien, aufgetreten ist (6). In den Jahren nach 2001 nahm das Vogelsterben in Österreich immer weiter zu und auch das USUV blieb etabliert (7). Das spiegelt sich in einer Studie aus den Jahren 2017–2018 wider, in der das Usutu-Virus in 67 der 86 toten Vogel-Proben nachgewiesen wurde (8). Zuvor wurde das USUV als eher unwichtig eingestuft, da die Pathogenität als unbedeutend angesehen wurde. Es kam nie zu schweren oder gar tödlichen Erkrankungen im Zusammenhang mit dem USUV beim Menschen oder bei Tieren außerhalb von Vögeln, außerdem wurde das Virus davor nicht außerhalb Afrikas nachgewiesen (7). Auch über die österreichischen Grenzen hinaus gab es langsam Berichte in denen das USUV detektiert wurde. Die ersten serologisch positiven Pferde wurden 2008 in Italien, 2009 in Serbien, 2011 in Kroatien und Spanien und 2012 in den Niederlanden beschrieben (9). In etwa der Hälfte der europäischen Länder gab es zwischen den Jahren 2012-2021 bei verschiedenen Säugetieren wie etwa bei Menschen, Pferden, **Stechmücken**, Fledermäusen,

Hunden, Eichhörnchen und vielen mehr einen molekularer und/oder serologischer Nachweis des USUV (10). Die jüngsten Studien mit serologisch positiven Pferden stammen aus dem Jahr 2023. In Südwestspanien wurden fast 80% der Pferde als seropositiv getestet (11), während in Ost-Zentraldeutschland 0,4% der Pferde seropositiv waren. Das bedeutet, dass bei einem Pferd Antikörper gegen das USUV nachgewiesen wurden, und bei einem anderen eine potenzielle Co-Infektion mit dem WNV (12). Um nun den Flavivirus in den Stechmücken nachzuweisen, wurde eine nested PCR mit anschließender Gelelektrophorese und Sequenzierung gemacht. Die PCR dient zur Amplifizierung und Detektion spezifischer DNA/RNA-Genomabschnitten. Dadurch kann eine Virale-Genesequenz mit hoher Sensitivität und Spezifität nachgewiesen werden. Die hohe Spezifität ergibt sich aus den verwendeten Primern und die Sensitivität aus den vielen zyklischen Wiederholungen, die aus Auftrennung der DNA, Bindung der Primer und Verlängerung der DNA-Abschnitte durch DNA-Polymerasen bestehen. Mit der Nested PCR kann die Sensitivität erhöht werden, vor allem wenn das vorhandene Genmaterial in einer geringen Häufigkeit vorliegt. Bei dieser Art von PCR handelt es sich um zwei aufeinanderfolgenden Amplifikationsreaktion. Dadurch ergibt sich eine für NS5 empfindliche Amplifikation und genauere Charakterisierung der Gen-Probe.

Das Hauptziel dieser vorliegenden Arbeit ist es, das Vorkommen des USUV in österreichischen Mückenpopulationen und eine eventuelle Virusbelastung in Ostösterreich Pferdeställen aufzuzeigen. Dazu wurde über den Sommer 2023 eine Überwachungsstudie der Stechmücken in Österreich etabliert. Die gefundenen Mücken wurden auf ihre Gattung untersucht und danach im Labor aufgearbeitet. Im Labor wurde eine Nested PCR mit Gelelektrophorese durchgeführt und anschließend wurden die positiven Nukleinsäure Ergebnisse hinsichtlich der weiteren Identifikation auf Flaviviren sequenziert, ins besonders wurde auf das Vorkommen des USUV geachtet.

2. Literaturübersicht

2.1. Virus

2.1.1. Taxonomische Einordnung

Der in dieser Arbeit untersuchte Virus gehört zur Familie der **Flaviviradae**, zu dieser Familie gehören vier Genera, der *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus* und *Pegivirus* (13). Die größte der vier Gattungen ist der *Flavivirus*, hierzu zählen über 70 Virusarten; dazu gehören unter anderem Viren wie das Dengue-Virus, Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME), Gelbfieber-Virus, West-Nil-Virus (WNV) und eben auch das Usutu-Virus (USUV) (7). Der Name Flavivirus ist abgeleitet vom lateinischen Begriff „flavus“, was so viel wie gelb bedeutet und somit Bezug auf das Gelbfieber-Virus nimmt. Im Allgemeinen werden Erreger aus dem Genus *Flavivirus* durch Arthropoden, wie zum Beispiel die gemeine Stechmücke, übertragen, und sind somit Arboviren (14).

2.1.2. Morphologie

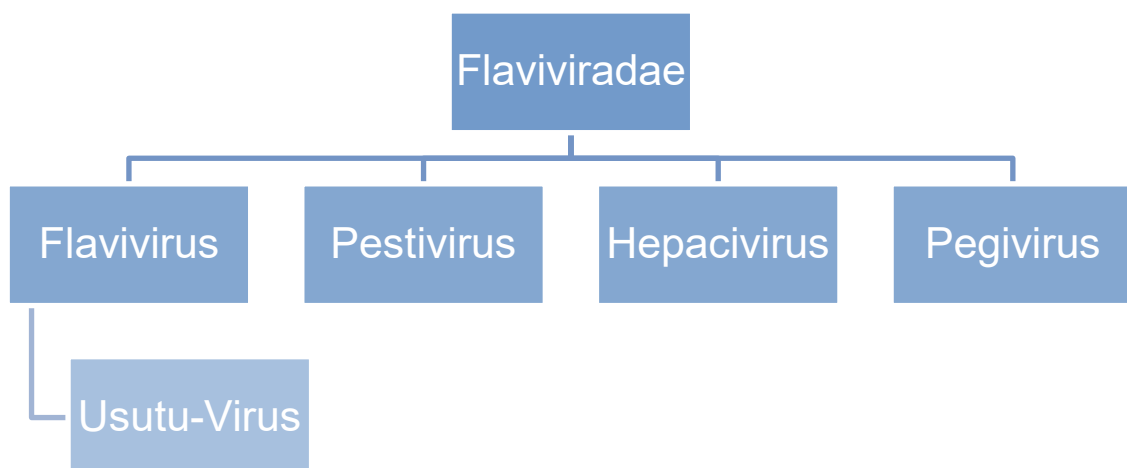


Abbildung 1: Taxonomische Einordnung des Flavivirus; Abbildung gemäß Artikel 'ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae'

Das Flavivirus ist ein rundes, behülltes, 11 Kilobyte großes, positives Einzelstrang-Ribonukleinsäure (RNA) -Virus, mit einer Größe von etwa 40-60 Nanometer. Es besitzt einen offenen Leserahmen (open reading frame, ORF), der die Nukleotide 97-10.401 umfasst, sowie eine 5'-Cap-Struktur ohne polyadenylierten Schwanz. Der ORF des USUV codiert für ein Polyprotein mit 3.434 Aminosäuren, dass sowohl durch virale als auch zelluläre Proteasen proteolytisch gespalten wird, um mindestens 10 separate Produkte zu erhalten. Das Virion besteht daher aus N-terminalen Region, die aus den drei Strukturproteinen dem Kapsid- (C;

codiert durch 97-474), Prämembran/Membran- (prM; codiert durch 475-975 und M; codiert zwischen 751-975) und dem Hüllprotein (E: codiert durch 076-2.475) besteht und den Nichtstrukturproteinen (NS) NS1 (2476-3531), NS2a (3532-4212), NS2b (4213–4605), NS3 (4604-6462), NS4a (6463-6840), 2K Protein (6841-6909), NS4b (6910-7683), and NS5 (7684-10398) (15). Den zentralen Kern des Virions bildet das Kapsidprotein (C), es ist mit der viralen RNA assoziiert. Das Hüllprotein (E) ist für die Bindung an die Wirtszelle zuständig und fördert den Eintritt in Zytoplasma der Zelle und das Prämembranprotein (prM) ist für den Aufbau und die Reifung des Virions notwendig, indem es die Faltung der Hülle unterstützt. Die Nichtstrukturproteine erfüllen verschiedene Funktionen während der Infektion, der Replikation und der Virion-Reifung (16).

Für die Replikation von Flaviviren sind enzymatische Aktivitäten erforderlich. Diese finden sich in zwei Nichtstrukturproteinen, NS3 und NS5 wieder. Das Nichtstrukturprotein 5 (NS5) ist für die Synthese des RNA-Genoms des Flavivirus wichtig und daher für die Virusreplikation unerlässlich. Es fungiert als Capping-Enzym, Methyltransferase (MTase) und RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRP) (17). Prozesse wie das RNA-Capping und die Methylierung sind ausschlaggebend für die Stabilität des viralen Genoms, die Ribosomenbindung und wichtig für das Umgehen des Immunsystems des Wirtes (18). Das NS5 ist unter anderem aber auch eine spezielle Kodierungsregion, ein Genlocus, die in vielen verschiedenen Flavivirus-Arten konserviert wurde, somit handelt es sich um eine Sequenz, die für die Identifizierung geeignet ist (19).

2.1.3. Vorkommen und Ausbreitung

Das USUV wurde im Jahr 1959 in Afrika, Swasiland erstmals in einer adulten Stechmücke nachgewiesen; dort verursachte es ein Massensterben bei Wildvögeln (20). Das Virus ist zum ersten Mal von *Culex neavei*, einer Stechmücke der Gattung *Culex*, isoliert worden. Auch in Europa spielt die Gattung *Culex*, insbesondere *Culex pipens* s.l., eine wichtige Rolle, um das USUV zu verbreiten (2). Der Name Usutu-Virus leitet sich vom Fluss „Usutu“ aus dem Swasiland ab(16). Im Jahr 2001-2002 gab es die ersten Aufzeichnungen in Wien, Österreich, dass das USUV außerhalb Afrikas das erste Mal aufgetreten ist; von dort breitete es sich in ganz Europa aus. Dieser kam vor allem in Gewebeproben von Amsel-/Schwarzdrosselpopulationen (*Turdus merula*) aber auch in fünf Bartkauzpopulationen (*Strix nebulosa*) vor (21). Das USUV wurde vermutlich durch Rauchschwalben (*Hirundo rustica*) oder andere Zugvögel in den österreichischen Wildvogelbestand eingeschleppt (22). In den weiteren Jahren zwischen 2003-2005 wurden USUV weiters in toten Wildvögeln in Österreich

dokumentiert. In den vergangenen Jahren ging die Zahl der positiven Fälle, die anhand von verstorbenen Wildvögeln festgestellt wurden, zurück. Gleichzeitig stieg jedoch die Anzahl der Wildvögel, die Antikörper gegen das USUV aufwiesen und somit zur Herdenimmunität beitrugen (23). In den Jahren 2005, wo in Ungarn die Organproben der ersten toten Amsel positiv auf USUV, mittels Reverse-Transkription-PCR (RT-PCR), Immunhistochemie (ICH), und in situ Hybridisation (ISH) getestet wurden, wurde 2006 in sechs weiteren toten Amseln ebenso der Nachweis auf das USUV gefunden (24). In Spanien wurde 2006 in einer Stechmückenpopulation von **Cx. pipiens**, ebenso das USUV dokumentiert (25). Im selben Jahr und in den zwei darauffolgenden Jahren wurde auch in Italien das USUV aufgezeichnet. Zuerst 2006 in einem verstorbenen Bartkauz, der vor dem Verstreben Anzeichen von plötzlicher Apathie, zerzaustem Gefieder und verminderter Wasseraufnahme zeigte, daraufhin verstarben sechs weitere der gleichen Art. 2007 wurde das USUV durch Immunmarkierung in zwei Raufußkäuzen (*Aegolius funereus*) und einer Amsel nachgewiesen. Im Jahr 2008 wurde das Virus dann noch einmal in einer Amsel gefunden (5). Das USUV wurde voraussichtlich das Erste Mal 2006 auch in die Schweiz eingeschleppt, es kam zu einer erheblichen Sterberate bei Sperlingsvögeln und Eulen in der Nähe von Zürich. Gefunden wurde das Virus in Organproben der Verstorbenen Vögel mittels USUV-spezifischen ICH und RT-PCR (26). 2010 wurde das Virus dann in einem Pool von *Cx. pipiens* in Deutschland. Die Detektierte Sequenz zeigt Ähnlichkeit mit dem 2001 gefunden USUV in Österreich (27). In Kroatien mit zwei seropositiven Pferden im Jahr 2011, 2013 mit drei neuroinvasiven Fällen bei Menschen und in den Jahren 2016-2019 wurde das USUV in der Stechmückenpopulation, vor allem **Cx. pipiens** und *Ae. albopictus* nachgewiesen (28). Weiters wurde 2015 in Ost-Frankreich das USUV in Gewebeproben von drei Amseln durch Sequenzierung identifiziert (29). Im Jahr 2017 kam es dann erneut in Ostösterreich zu einem Massensterben von Amseln, das im Zusammenhang mit USUV steht.

Der natürliche Lebenszyklus des USUV hat einen ähnlichen Lebenszyklus wie andere Flaviviren, mit verschiedenen Vogelarten als Reservoirs, Stechmücken als Vektoren und Pferden bzw. Menschen als Fehlwirten (30). Das USUV wurde bei 62 Vogelarten in verschiedenen afrikanischen und europäischen Ländern nachgewiesen. Die meisten positiven Fälle wurden der Vogelart *Turdus merula* zugeschrieben. Das USUV kann in acht Abstammungslinien eingeteilt werden, die je nach geografischem Ursprung in zwei Hauptgruppen, afrikanische und europäische, unterschieden werden können. In der afrikanischen Hauptgruppe besteht aus drei verschiedenen Abstammungslinien (Afrika 1 bis

3), während die europäische Gruppe aus fünf verschiedenen Abstammungslinien (Europa 1 bis 5) besteht (16).

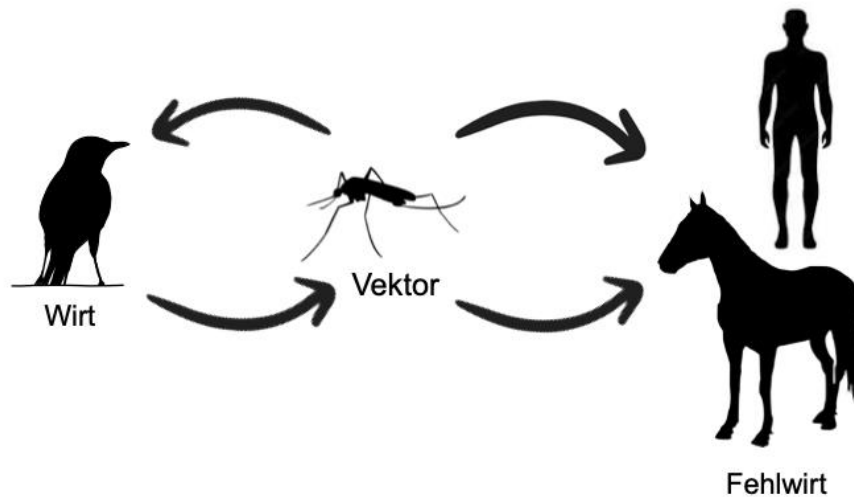


Abbildung 2: Übertragungsweg des Usutu-Virus; Abbildung gemäß Artikel 'Targeted surveillance reveals native and invasive mosquito species infected with Usutu virus' mit Silhouetten von Vecteezy

2.1.4. Klinik

Obwohl das USUV weitaus seltener vorkommt als sein Verwandter, das WNV, sind sie sich in der klinischen Manifestation, mit neurologischen Symptomen, doch ähnlich. Zurzeit sind keine Studien bekannt, in denen Pferde, die serologisch positiv auf USUV getestet wurden, auch klinische Symptome zeigen (31). Mehreren Studien zufolge besitzt das USUV auch ein zoonotisches Potenzial (9). Die beschriebene Symptomatik reicht von milden Symptomen wie Hautausschlägen, Fieber und Kopfschmerzen bis hin zu schweren Symptomen, die sich vor allem in neurologischen Störungen äußern wie Meningoenzephalitis, Enzephalitis, Polyneuritis oder Gesichtslähmung (16). Meist ist die Krankheit jedoch asymptomatisch (32). Der erste Fall beim Menschen trat in den 1980er Jahren in Afrika auf, seitdem kam es zu insgesamt 21 Reporten im humanen Bereich (16). Die im humanen Bereich bekannten Fälle traten vor allem bei Patienten auf, die schon durch Immunsuppression vorstellig waren (33). In 2011 wurden Antikörper in Pferden aus Nord-Kroatien (34) und 2012-2013 in drei verstorbenen Vogelarten und sechs Pferderassen in Polen (35) detektiert. Laut unveröffentlichten Daten wurden im Jahr 2017 Antikörper gegen den pathogenen Flavivirus USUV auch in Pferden aus Österreich gefunden (32).

2.2. Vektoren

Aufgrund der Möglichkeiten der Stechmücken, bestimmte Krankheiten, die gefährlich für Mensch und Tier sind, zu übertragen, wird es immer wichtiger, mehr über sie zu erfahren. Durch die Klimaveränderungen und die Globalisierung kommt es zunehmend zur Einschleppung bzw. Einwanderung verschiedener Stechmücken und mit ihnen neue Krankheiten (36). Das USUV wurde bisher aus acht verschiedenen Stechmückenarten isoliert, darunter fallen die Gattungen *Aedes* (Ae.), *Anopheles* (An.), *Culex* (Cx.), *Culiseta* (Cs.), *Ochlerotatus*, *Coquillettidia* und *Mansonia*, wobei die letzten beiden vor allem in Afrika potenzielle Vektoren sind (16). Arten wie *Ae. albopictus*, *An. maculipennis* s.l., *Cx. perexiguus*, ***Cx. pipiens***, ***Cx. pipiens* s.l.**, *Cs. annulata*, *Ae. caspius*, *Ae. detritus* sind dafür bekannt das USUV zu verbreiten (37). Bisher sind ca. 50 Stechmückenarten in Österreich beschrieben, diese kann man in acht Genera einteilen: *Aedes*, *Anopheles*, *Coquillettidia*, *Culex*, *Culiseta*, *Orthopodomyia* und *Uranotaenia* (38). Beschrieben wird vor allem ***Cx. pipiens*** als hauptüberträger von USUV in Österreich, wobei eine Studie aus dem Jahr 2018 durchaus auch *Ae. japonicus* als kompetenten Überträger beschreibt (30). Daher besteht die Möglichkeit, dass sich das USUV auch in unseren Breitengraden etablieren könnte.

2.2.1. Taxonomische Einordnung

Die Stechmücken der Familie Culicidae bilden mit rund 3500 beschriebenen Spezies eine riesige Gruppe der Mücken (*Nematocera*). Diese können in drei Unterfamilien, den Anophelinae, mit der Gattung *Anopheles*, den Culicinae und den Toxorhynchitinae unterteilt werden (2). Zu der Unterfamilie der Culicinae gehören unter anderem die Gattungen *Culex*, *Aedes* und *Culiseta* (39).

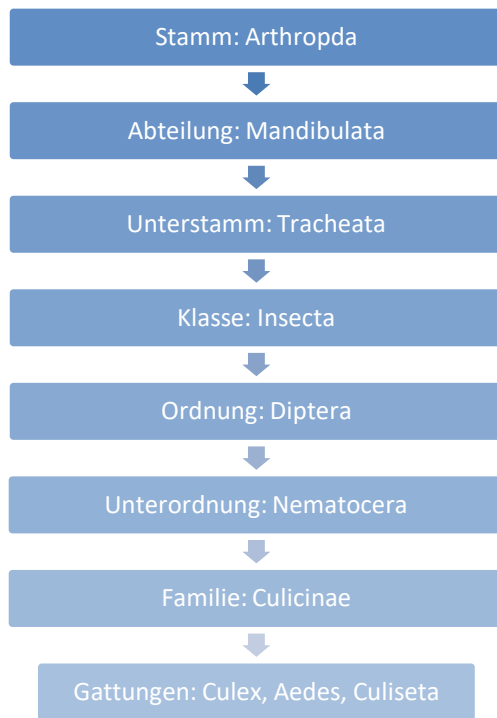


Abbildung 3: Taxonomie; Abbildung gemäß Band 3 des Buches 'Mosquitoes: Identification, Ecology and Control'

2.2.2. Morphologie der adulten Stechmücke

Der Aufbau der Culicidae kann grob in Kopf, Thorax und Abdomen unterteilt werden. Sie besitzen drei Paar Beine, ein Flügelpaar, zwei Antennen und einen Rüssel, mit dem sie Nahrung aufnehmen. Weibliche Insekten, die sich von Blut ernähren, haben eine verlängerte Mandibula und Maxilla, die sie zum Durchdringen der Haut von Säugetieren oder Vögeln benötigen. Adulte Männchen hingegen besitzen kein ausreichend entwickeltes Mundwerkzeug und sind daher auf die Nektarsuche angewiesen. Weibliche Stechmücken ernähren sich so wie die Männchen von Nektar, außer wenn sie für die Brutablage auf eine Blutmahlzeit angewiesen sind. Das deutlichste Unterscheidungsmerkmal zwischen männlichen und weiblichen Insekten sind die Antennen, die bei männlichen Insekten stark befiedert sind und dem Männchen zum Orten der Weibchen dienen.

Zur Differenzierung weiblicher Stechmücken zwischen den Gattungen kann man nun die Beschuppung des Thoraxes, des Abdomens, der Flügel und Beine heranziehen; diese können verschiedene Färbungen oder auch Muster aufweisen. Weitere morphologische Unterscheidungsmerkmale findet man bei den Venen der Flügel, der Tarsomere und den Afterreife (Cerci) (2).

2.2.3. Lebenszyklus

Im Laufe der Evolution haben sich die Stechmücken an viele verschiedene Umweltgegebenheiten angepasst. Die Eier werden, je nach Stechmückenart, in verschiedensten Wasserkörpern abgelegt. Von Sumpfgebieten, vorübergehend überschwemmten Gebieten, Wassertonnen im Garten bis hin zu Hufabdrücken, die sich mit Wasser füllen, kann alles als Brutstätte genutzt werden. Diese Wasserkörper sind für eine vollständige Metamorphose notwendig. Nach dem Schlüpfen durchlaufen die Stechmücken vier Larvenstadien und ein Puppenstadium, bis sie zu adulten Mücken werden. Nach der Paarung müssen die weiblichen Stechmücken eine Blutmahlzeit nehmen, um Eier zu entwickeln. Die meisten Stechmücken, wie *Culex*, *Culiseta*, *Uranotaenia* und *Anopheles*, überwintern als adulte Insekten. Sie finden Unterschlupf in trockenen und frostfreien Orten, wie in Höhlen, Ställen, Kellern oder Erdhöhlen. Einige Gattungen von *Aedes* überwintern hingegen als Eier und behalten diese Form, solange die Umweltbedingungen nicht optimal zum Schlüpfen sind (2). Um nun zu einer Blutmahlzeit zu gelangen, nutzen die weiblichen Stechmücken verschiedene Kriterien, um sich in ihrer Umgebung zurechtzufinden. Kohlendioxid (CO₂) ist der erste Indikator, dass sich ein Lebewesen in der Nähe aufhält. CO₂ wird als potenzielles Wirtssignal angesehen. Danach orientiert sich die weibliche Stechmücke an Hitze und weiteren Gerüchen, wie zum Beispiel Tierkot, einem weiteren Lebensraumsignal, um den Wirt zu erkennen (40).

2.2.4. Morphologische Bestimmung der häufigsten adulten Stechmücken

2.2.4.1. *Culex pipiens* s. l.

Stechmücken der Gattung *Culex*, vor allem die Art *Culex pipiens* s. l., sind die häufigsten Vektoren für das USUV. *Cx. pipiens* s. l. besitzt Taster (Palpi), die kürzer sind als der Rüssel, ein Rückenschild (Scutellum), das dreilappig ist, kaudale Flügelvenen, die gleichmäßig gebogen sind, und sie besitzt keine kleinen Härchen (Prespiracular setae) die sich am Thorax befinden. Tarsomer I der Vorderbeine ist kürzer als das Tarsomer II-IV und das Tarsomer IV ist nicht verkürzt. Das Abdomen ist abgerundet und besitzt zwei kurze, nicht wirklich sichtbare Afterreife (Cerci). Morphologisch sind adulte *Cx. pipiens* schwer von *Cx. torrentium* zu differenzieren (2).



Abbildung 4: Weibchen einer *Cx. pipiens* s. l.; Isabella Lässer und Maria Rummerstorfer - Abteilung: Parasitologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien

2.2.4.2. *Culiseta annulata*

Die *Culiseta annulata* besitzt Taster (Palpi), die kürzer sind als der Rüssel, ein Rückenschild (Scutellum) das dreilappig ist, kaudale Flügelvenen, die gleichmäßig gebogen sind und Härchen (Prespiracular setae) die sich am Thorax der Mücke befinden. Am Rückenschild der *Cs. annulata* befinden sich keine weißen Streifen, die Kreuzvenen von r-m (Radius und Median) und m-cu (Median und Cubitus) liegen in einer Linie und die Flügel sind leicht gepunktet. An den Beinen (Femora) findet man weiße subapikal Ringe und am Tarsomer I der Hinterbeine median einen weiteren weißen Ring (2).



Abbildung 5: Weibchen einer *Cs. annulata*; Isabella Lässer und Maria Rummerstorfer - Abteilung: Parasitologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien

2.2.4.3. *Anopheles claviger* s. l.

Die *Anopheles claviger* besitzt Taster (Palpi) die gleich lang wie der Rüssel sind. Die Spitze des Rüssels ist dunkel gefärbt. Der Körper der *An. claviger* hat eine gelbbraune bis bräunliche Farbe. Der Anteakrostichale Bereich, kranial am Körperschild, ist schwach entwickelt und von gelblicher Farbe (2).



Abbildung 6: Weibchen einer *An. claviger* s. l.; Isabella Lässer und Maria Rummerstorfer - Abteilung: Parasitologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien

3. Material und Methodik

3.1. Betriebe

Für die Studie zum Monitoring von Stechmücken wurden sieben Pferdeställe mit folgenden Postleitzahlen (PLZ): 2011, 2115, 2151, 2041, 2020, 2013 und 3464 in Ostösterreich, rund um Wien, abgefahren. Das Monitoring ging einmal pro Monat über 24 Stunden von Juli bis Oktober 2023. Aufgrund des Datenschutzes werden keine weiteren Details zu den Pferdeställen freigegeben.

3.2. Material

3.2.1. Stechmückenfalle Aufbau

Um die Stechmücken für unsere Studie zu sammeln, haben wir die BG-Sentinel 2 CO₂ Mückenfalle von Biogents, Regensburg, Deutschland, verwendet. Um die Falle nun aufzubauen ist zuerst sicherzustellen, dass alle Teile vorhanden sind (siehe Abb. 7). Die BG-Sentinel 2 CO₂ Mückenfalle (Nummer 10) lässt sich einfach entfalten, indem man den Tragegurt vom Hacken nimmt. Danach kann man auf den Ansaugtrichter (Nr. 9) das Trichternetz (Nr. 8) und den auf links gedrehten Fangsack (Nr. 7) schnüren. Den Trichter mit dem Netz kann man nun in die BG-Sentinel 2 CO₂-Mückenfalle stecken. Um nun die Stechmücken anzulocken, haben wir uns für von Hefe-Bakterien produziertes CO₂ entschieden, um nun das CO₂ in die Umwelt zu lassen, schließt man die CO₂-Spenderdrüse (Nr. 4) mit angeschlossenem Rohr an den BG-CO₂ Generator Beutel (Nr. 5) an. Angemischt wird die Hefe mit warmem Wasser (Nr. 2). Der BG-CO₂ Generator Beutel kann in der isolierten BG-Pro-Tasche (Nr. 1) verstaut werden. Damit die Falle nun autonom ist, wird eine Autobatterie (Nr. 3) verwendet. Um die Autobatterie vor den Umwelteinflüssen zu schützen, wurde ein handelsüblicher Kübel (Nr. 6) darübergestülpt.



Abbildung 7: BG-Sentinel 2 CO₂ Mückenfalle von Biogents und andere Materialien; Isabella Lässer und Maria Rummerstorfer



Abbildung 8: Zusammengebaute BG-Sentinel 2 CO₂ Mückenfalle; Isabella Lässer und Maria Rummerstorfer

3.2.2. Funktionsweise der Mückenfalle

Bei der BG-Sentinel 2 CO₂ Mückenfalle können verschiedene Lockstoffe verwendet werden. Wir haben uns für den BG-CO₂ Generator entschieden, hierfür nimmt man sich den Mischbeutel, füllt diesen bis zur Linie mit ca. 500 Gramm Zucker an. Im nächsten Schritt gibt man zwei Messlöffel Hefe-Mischung (BG-Sentinel 2 CO₂ Mückenfalle Powder) hinzu, danach füllt man den Beutel bis zur Wasserlinie mit etwa 38 Grad (°C) warmem Wasser auf, um das zu überprüfen wird ein Thermometer mitgeliefert. Um nun zu gewährleisten, dass für 24 Stunden CO₂ produziert wird, gibt man den Beutel in die isolierte BG-Pro-Tasche, um die Temperatur zu halten. Um nun die Stechmücken anzulocken und in das Netz zu saugen, verwenden wir handelsübliche Autobatterien mit einer Spannung von 12 Volt, dies betreiben den Ventilator der Mückenfalle. Durch die Autobatterien sind die Mückenfallen flexibel und an jedem Standort einsetzbar.

3.2.3. Mückenfallen Standort

Der Outdoor-Standort wurde so gewählt, dass die Falle wettergeschützt, im Schatten und in der Nähe von Pferden und den Rastplätzen der Stechmücken steht.

3.3. Tiermaterial

Die adulten Stechmücken wurden an jeweils einem Tag in den Monaten Juli 2023, August 2023, September 2023 und Oktober 2023 über einen Zeitraum von 24 Stunden in den ausgewählten Pferdeställen gesammelt. Anschließend wurden sie bei -80 °C tiefgefroren, um sie zu immobilisieren und zu töten. Im Institut für Parasitologie wurden sie gemäß dem Identifikationsschlüssel von Norbert Becker differenziert und in 38 Pools mit maximal 50 Stechmücken pro Pool unterteilt. Die Pools wurden nach Fangdatum, Fangort und Stechmücken-Gattung aufgeteilt.

3.4. Methodik

3.4.1. Differenzierung der Stechmücken

Die Stechmücken wurden nach dem Identifikationsschlüssel Becker N, Petric D, Zgomba M, Boase C, Madon MB, Dahl C, Kaiser A. Mosquitoes: Identification, Ecology and Control. Cham: Springer International Publishing AG; 2020 differenziert. Zuerst wurde der Beifang, diverse andere Insekten und die Stechmücken auseinander geteilt. Danach wurden zuerst die

Männchen von den Weibchen differenziert, indem man sich zuerst auf die Antennen konzentriert, bei männlichen Insekten sind diese stark befiedert. Die weiblichen Insekten wurden dann anhand ihrer Palpi, dem Thorax, der Flügel, der Beine und dem Thorax unterschieden.

3.4.2. Extraktion

Die RNA-Isolation erfolgt mittels QIAamp Viral RNA Mini Kit und dem Qiagen ATL Buffer (Lysis Buffer) (Qiagen, Hilden, Deutschland), die Zerkleinerung der Stechmücken mittels Precellys ceramic beads mit einem Durchmesser von 2,8 mm.

Die Proben werden zunächst homogenisiert und anschließend lysiert. Dazu werden die Stechmücken in ein 1,5-ml-Eppendorf-Röhrchen gegeben, zusammen mit 3 Keramikperlen und 180 Mikroliter (µl) des Qiagen ATL-Buffers. Die Mischung wird dann für 3 Minuten bei Höchstgeschwindigkeit in einem Tissue Lyser (Tissue Lyser LT, Qiagen, Hilden) zerkleinert. Bei Proben mit vielen Stechmücken haben wird zusätzlich 100 µl des ATL-Buffers hinzugefügt, um ausreichend Material für die folgenden Schritte zu gewährleisten. Anschließend werden die Eppendorf-Röhrchen für 5 Minuten bei 12.000 Zentrifugenbeschleunigung (g) zentrifugiert, und der Überstand, der nun die Desoxyribonukleinsäure (DNA) enthalten sollte, wird in ein frisches Eppendorf-Röhrchen transferiert. Zum Überstand werden nun 20 µl der Proteinase K (2mg/ml Stammlösung) hinzugefügt. Damit die Proteinase K wirken kann, werden die Eppendorf-Röhrchen bei 56 °C für eine Stunde inkubiert. Die Proteinase K wird für den Abbau von Proteinen in Zelllysaten und zur Freisetzung von Nukleinsäuren verwendet. Um diesen Prozess nach einer Stunde zu stoppen, werden die Eppendorf-Röhrchen für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Dieser Prozess wird mit allen 38 Pools durchgeführt.

Nun wird mit dem Qiagen Viral RNA Mini Kit weitergearbeitet. Zuerst werden der AVL-Buffer und der Carrier RNA-Buffer AVE je nach Anzahl der Proben gemischt. Von diesem Mix werden nun 560 µl zu 140 µl unserer Probe hinzugefügt. Die Eppendorf-Röhrchen werden für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach kurz zentrifugiert, um alle kleinen Tropfen vom Deckel herunterzuzentrifugieren. Durch Zugabe von 560 µl Ethanol wird die Nukleinsäure ausgefällt. Das neue Gemisch wird nun für 15 Sekunden gepulsvortex und wieder kurz zentrifugiert. Anschließend werden 630 µl des Lysats vorsichtig auf die Silica-Membran des Spin-Column geladen. Die RNA bindet nun an die Silica-Membran. Dieser Schritt wird bei 6.000 g für 1 Minute zentrifugiert, und das Column mit der Membran wird in ein neues 2 ml

Collectiontube gegeben. Dieser Schritt wird wiederholt, das heißt noch einmal werden vorsichtig 630µl auf die Membran transferiert.

Nun beginnt der Waschvorgang, indem man 500 µl des AW1 Buffers auf die Membran pipettiert und die Röhrchen dann bei 6.000g für 1 Minute zentrifugiert. Das Filtrat wird entsorgt, und das Column wird in ein neues Collectiontube gesteckt. Danach werden 500µl AW2 Buffer bei 20.000 g für 3 Minuten zentrifugiert. Auch hier wird das Filtrat entsorgt, und der Filter wird ein zweites Mal bei 20.000 g für 1 Minute zentrifugiert. Das Column mit der Membran wird wieder in ein neues 1,5-ml-Eppendorf-Röhrchen transferiert. Hierzu werden 60µl AVE Buffer hinzugegeben und bei Raumtemperatur für 1 Minute inkubiert. Danach wird noch einmal bei 6.000g für 1 Minute zentrifugiert. Nach diesem Schritt kann die Probe bei -80 °C gelagert oder mit der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) fortgefahren werden.

3.4.3. Nested PCR

Für die Aufarbeitung der gewonnen RNA wurde nun das Qiagen One Step RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Die in diesem Kit enthaltenen Inhalte, Nuclease-freies Wasser, 5x One step RT PCR Buffer, dNTPs für die Synthese des neuen DNA-Strangs, One Step RT PCR Enzyme Mix, NS51+ Forward-Primer (5'- GCA TCT AYA WCA YNA TGG G -3') und NS51- Revers-Primer (5'- CCA NAC NYN RTT CCA NAC -3') wurden zum Mastermix NS51 zusammengemischt. Zu jedem der von uns definierten 38 Pools, die jeweils 2,5 µl umfassen, wurden anschließend 22,5 µl Mastermix zugefügt.

Tabelle 1: Mastermix NS51; Informationen der Tabelle entnommen aus der Anleitung von Qiagen (Hilden, Deutschland)

		Volumen in µl pro Reaktion	Volumen in µl für X Reaktionen	X = Anzahl an Reaktionen
1	H2O (RNase free)	9,5	361	38
2	5x One step RT PCR buffer	5	190	
3	dNTPs (10mM each)	1	38	
4	One Step RT PCR Enzyme Mix	1	38	
5	NS51+ (10µM)	3	114	
6	NS51- (10µM)	3	114	
7	Template (isolated RNA)	2,5		

8	Totales Volumen	25	855	
---	-----------------	----	-----	--

Die Proben wurden dann mit folgendem Zyklus-Protokoll für etwa 5,2 Stunden im Thermocycler (Tab. 2) laufen gelassen.

Tabelle 2: Cycle-Bedingungen für den Thermocycler NS51; Informationen der Tabelle entnommen aus der Anleitung von Qiagen (Hilden, Deutschland)

	Temperatur	Zeit	Zyklus-Abschnitte
1	50 °C	45 min	Reverse Transkriptase
2	94°C	15 min	Initiale Denaturierung
3	94°C	1 min	40 Zyklen
4	54°C	4 min	
5	72°C	1 min 15 sec	
6	72°C	5 min	Finale Extension
7	4°C	Lagerung	

Davor kommt einmal bei 50 °C eine Reverse Transkriptase, mit der RNA in DNA umgeschrieben wird. Die darauffolgende initiale Denaturierung bei 94 °C trennt die Wasserstoffbrücken zwischen den DNA-Doppelsträngen. Nach dem Abschluss der 40 Zyklen werden die Proben bei 4 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Bei jedem Durchgang wurde auch eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitlaufen gelassen. Für die Positivkontrolle wurde der Gelbfieber RNA-Impfstoff der Parasitologie der Veterinärmedizinischen Universität, Wien, in einer 1:1000 Verdünnung, verwendet. Für die Negativkontrolle nur reines Nuclease-freies Wasser.

Für die weitere Amplifikation dient die NS52 Nested PCR, hier wird das Promega GoTaq® G2 Hot Start Green Master Mix (Promega GmbH, Walldorf, Deutschland) Kit, verwendet. Damit die NS52 binden kann, muss die NS51 zuvor gebunden haben. Die in diesem Kit enthaltenen Inhalte, Nuclease-freies Wasser, GoTaq G2 Green MM, NS52+ Forward-Primer (5'- GCN ATN TGG TWY ATG TGG -3') und NS51- Revers-Primer (5'- CAT RTC TTC NGT NGT CAT CC -

3') wurden zum Mastermix NS52 zusammengemischt. Vom vorangegangenen Durchlauf wurden von jedem Pool 1 µl übernommen.

Tabelle 3: Mastermix NS52; Informationen der Tabelle entnommen aus der Anleitung von Qiagen (Hilden, Deutschland)

		Volumen in µl pro Reaktion	Volumen in µl für X Reaktionen	X = Anzahl an Reaktionen
1	H ₂ O (RNase free)	7,5	285	38
2	GoTaq G2 Green MM, 2x	12,5	475	
3	NS52+ (10µM)	2	76	
4	NS52- (10µM)	2	76	
7	Template (von der ersten Runde)	1		
8	Totales Volumen	25	912	

Die Zyklen (Tab. 4) der Nested PCR im Thermocycler laufen ca. 3,5 Stunden lang und amplifizieren das Genmaterial des vorherigen Durchgangs.

Tabelle 4: Cycle-Bedingungen für den Thermocycler NS52; Informationen der Tabelle entnommen aus der Anleitung von Qiagen (Hilden, Deutschland)

	Temperatur	Zeit	Zyklus-Abschnitte
1	94°C	3 min	Initiale Denaturierung
2	94°C	1 min	40 Zyklen
4	50°C	3 min	
5	72°C	1 min	
6	72°C	5 min	Finale Extension
7	4°C	Lagerung	

Die Amplifikationen der NS52-PCR-Runde können bei 4 °C bis zu den Gelläufen gelagert werden.

3.4.4. Gelelektrophorese und Sequenzierung

Das Gel wird mittels 1,5 % Agarose in TAE Buffer vorbereitet und in vorgefertigte Rahmen gegossen. In der Gelelektrophorese werden die amplifizierten DNA-Abschnitte zu je 10 µl und die Promega Bench Top 1 kb DNA Ladder (G7541) (Promega GmbH, Walldorf, Deutschland), mit 6 µl, in die Taschen der zuvor vorbereiteten Gelkammer gefüllt und mittels elektrischem Gleichstromfeld, mit 100 Volt für 45-60 Minuten, aufgetrennt. Sie reihen sich je nach molekularer Größe auf und werden als Basenpaare (bp) angegeben. Dies geschieht, indem die negativ geladenen Fragmente unterschiedlich schnell durch das Agarosegel wandern. Sie wandern von der Anionen-Seite zur Kationen-Seite. Durch die Zugabe von Midori-Grün können die Banden unter Ultraviolett-Licht sichtbar gemacht werden. Nach dem finalen Durchlauf der Gelelektrophorese und der Isolation der Banden mit 1010bp, wurden die Proben für die Sequenzierung bei Microsynth Austria GmbH, Wien, Österreich, aufbereitet und verschickt. Für die Aufbereitung der DNA aus dem Gel wird das Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega GmbH, Walldorf, Deutschland) herangezogen. Die aus dem Gel geschnittenen Banden werden in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen gegeben und 10 µl membranbindende Lösung pro 10 mg Gel-Stück. Das Eppendorf-Röhrchen wird gevortext und bei 50-65 °C inkubiert, bis das Gel sich aufgelöst hat. Danach wird das SV Minicolumn in ein Collectiontube gegeben, das gesamte Produkt der Eppendorf-Röhrchen wird als gesamtes in die SV Minicolumn pipettiert und eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und danach bei 16.000 g für 1 Minuten zentrifugiert. Das Filtrat wird entsorgt und das SV Minicolumn wird in ein neues Collectiontube gesteckt. Der Membranwaschlösung wird Ethanol zugesetzt. Es werden 700 µl der Membranwaschlösung auf hinzugegeben und bei 16.000 g für 1 Minuten zentrifugiert. Das Filtrat wird entsorgt und es werden erneut 700 µl der Membranwaschlösung hinzugegeben und bei 16.000 g für 5 Minuten zentrifugiert. Das Filtrat wird entsorgt und die Collectiontube für 1 Minute bei offenem Deckel, um Verdunstung zuzulassen, noch einmal zentrifugiert. Das SV Minicolum wird in ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen gegeben, 50 µl Nuclease-freies Wasser hinzugegeben, für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert und danach bei 16.000g für 1 Minuten zentrifugiert. Das SV Minicolum kann entsorgt werden und die aufbereitete Probe kann bei 4 oder -20 °C gelagert werden. Zu beachten ist, dass beim Einsenden für Microsynth, für PCR-Amplifikationen zwischen 901 und 2000 bp eine Konzentration von 12-70 Nanogramm/µl und ein DNA-Probenvolumen von 12 µl verwendet wird.

4. Ergebnisse

4.1. Stechmücken-Fallen

Der Standort der Falle würde nach den Kriterien (in der Nähe von Pferden, wind- und wettergeschützt) als folgt gewählt, PLZ 2011, war in der Nähe einer Koppel und eines Baches. Bei PLZ 2115 wurde die Falle in der Nähe von Koppeln und dem Reitplatz aufgestellt. Die Falle bei PLZ 2151 wurde in der Nähe der Stallung und des Mistplatzes aufgestellt. Für die Falle an PLZ 2041 wurde ein Standort zwischen Stall und Reitplatz gewählt. Für die Falle an PLZ 2020 wurde ein Platz neben der Koppel und dem Reitplatz gewählt. Die Falle an PLZ 2013 wurde neben dem Stallwaschbecken in der Stallgasse platziert. Bei PLZ 3464 wurde die Falle neben den Paddocks platziert.

Insgesamt wurden in den Monaten Juli 2023, August 2023, September 2023 und Oktober 2023 – 398 Stechmücken in der BG-Sentinel 2 CO₂ Mückenfalle von Biogents gesammelt.

Die meiste gefangen Stechmücken konnten nach dem Identifikationsschlüssel von Becker identifiziert werden. Von den 398 gefangenen Culicidae waren 14 männlich (3,518 %), die als Culicinae nicht weiter differenziert wurden, und 384 weiblich. Die weiblichen Stechmücken konnten zum Großteil den Gattungen *Cx. pipiens* s. l. (343 Stück = 86,181 %), *Cs. annulata* (34 Stück = 8,543 %), *An. claviger* s.l. (3 Stück = 0,754 %) zugeordnet werden (Abb. 9). Vier weibliche Stechmücken erlitten durch das Fangen, den Transport oder das Einfrieren Schäden und konnten nicht mehr genau eingeteilt werden, diese wurden als Culicinae (1,005 %) vermerkt.

Aufgelistet in der Abbildung 10 sieht man die Häufigkeit, mit der die Culicinae-Gattungen, in den Pferdeställen, in den Monaten Juli 2023, August 2023, September 2023 und Oktober 2023 gefangen worden sind. Die meisten Mücken wurden im Oktober 2023 mit 135 Stück, gefolgt von August 2023 mit 110 Stück, dann Juli mit 88 Stück und zum Schluss September mit 65 Stück, gefangen. In der Abbildung 11 sieht man hingegen in welchem Stall (per Postleitzahl, PLZ) wie viel und welche Gattung von Culicidae vorgekommen. Im Stall 2013 haben wir über den Sommer die meisten Mücken gefangen, mit *Cx. pipiens* s. l. als Hauptvertreter. Insgesamt hatten wir außerdem vier Pools, mit den Nummer (Nr.) 08 (1 *Cx. pipiens* s. l.), Nr. 11 (2 *Cs. annulata*), Nr. 28 (3 *Cx. pipiens* s. l.) und Nr. 36 (2 *Cx. pipiens* s. l.), die Stechmücken mit einer Blutmahlzeit enthielten.

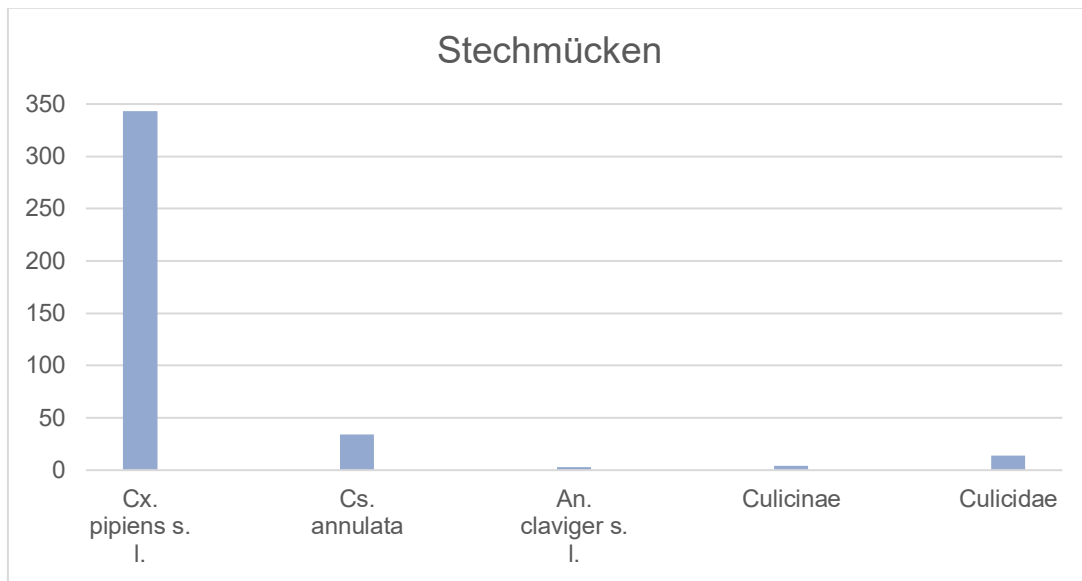


Abbildung 9: Stechmücken nach Häufigkeit ihrer Art; Isabella Lässer

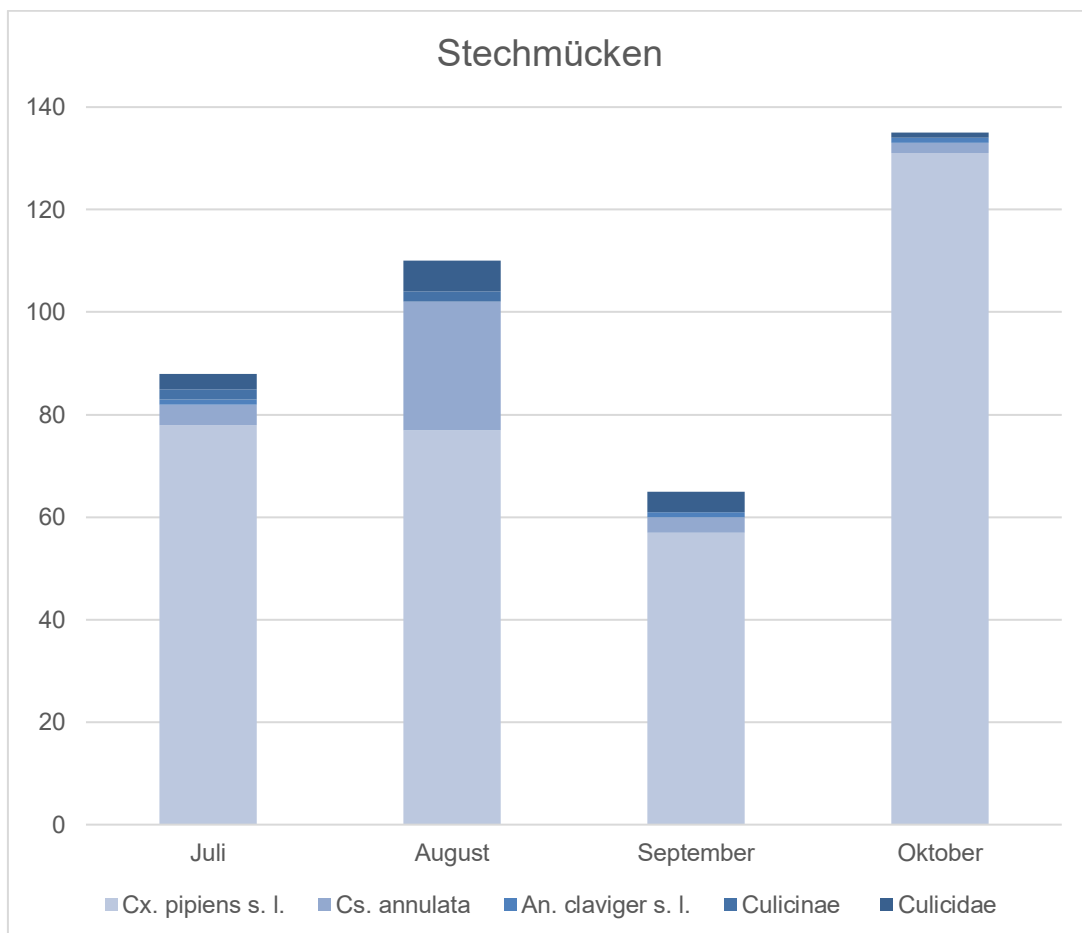


Abbildung 10: gefangene Stechmücken im Sommer 2023; Isabella Lässer

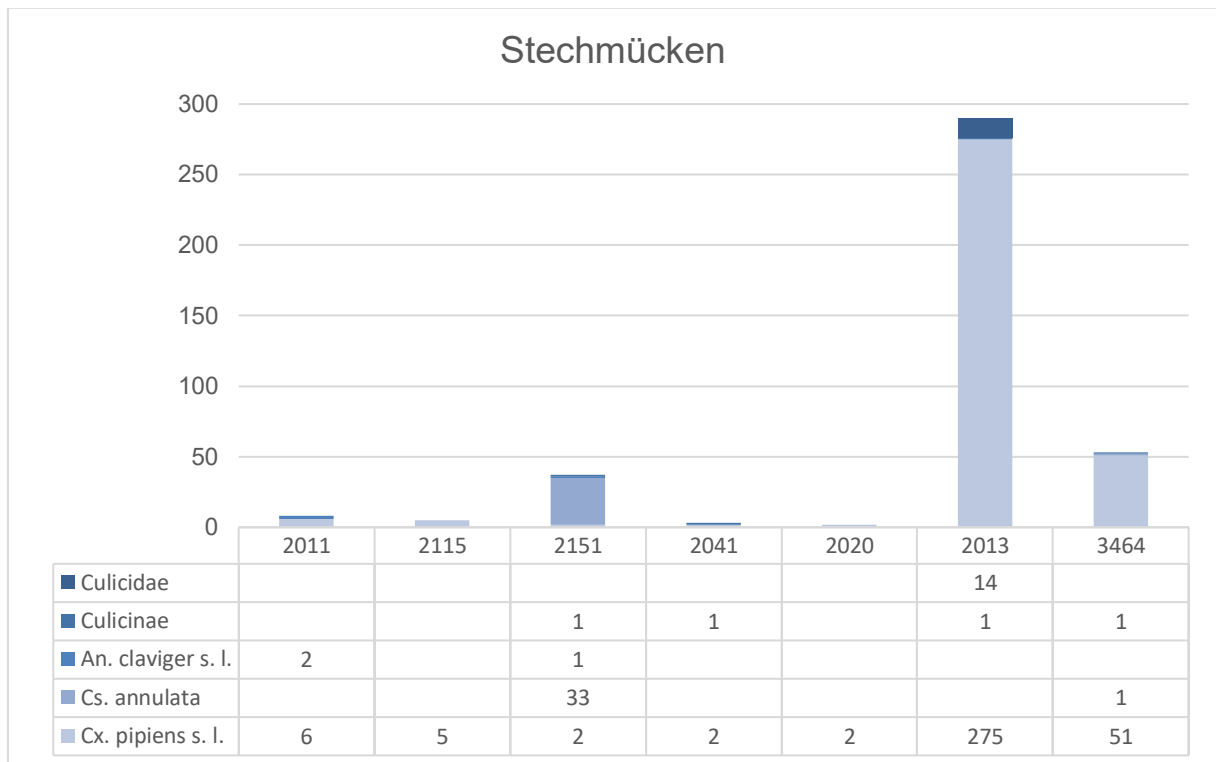


Abbildung 11: Stechmücken in den Pferdeställen; Isabella Lässer

4.2. Gelelektrophorese

Die Positiv-Kontrolle der Gelelektrophorese (PK) ist ein Gelbfieber RNA-Impfstoff und zeigt an auf welcher Höhe ein positives Ergebnis erwartet wird. Negativkontrolle der Nest1 (NTC1) und Nest2 (NTC2) wurden mitlaufen gelassen. Auf der Ladder (L) sieht man die 1010 bp markiert, die als Richtlinie gelten. Die rot markierten Banden sind die für die Sequenzierung verwendeten DNA-Proben. Als positiv wurden die Proben Nummer 03, Nr. 04 – Lower Band (LB), Nr. 10, Nr. 11, Nr.12, Nr. 16, Nr. 16 – LB, Nr. 19, Nr. 30, Nr. 37 und Nr. 38 (Tab. 7) mit leuchtenden Banden auf der Höhe der 1010 gezählt. Das bedeutet, dass 10 aus 38 Pools

(26,316%) positiv waren. Interessehalber wurden zwei Banden, die darunter lagen, auch mit sequenziert.

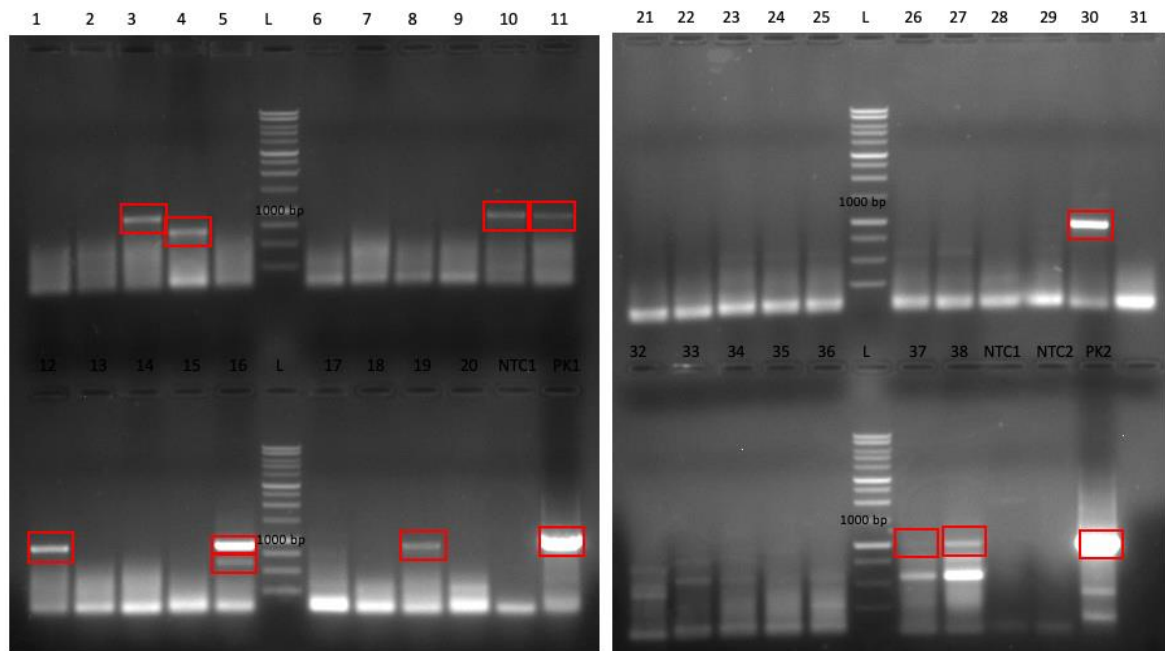


Abbildung 12: Ergebnisse PCR; Isabella Lässer und Maria Rummerstorfer Abteilung: Klinisches Zentrum für Pferde der Veterinärmedizinischen Universität Wien

In der Auflistung (Tab. 8) kommt hervor das im Stall, mit der PLZ 2151, die meisten positiven Stechmücken gefangen wurden. Auch geht hervor, dass *Cx. pipiens* s. l. mit 62 Stechmücken an erster Stelle und *Cs. annulata* mit 34 Stechmücken an zweiter Stelle steht. Anzumerken ist aber, dass von der Art *Cs. annulata* (Tab. 6), über die Fangperiode 2023, alle als positiv markiert wurden.

Tabelle 5: Gelelektrophorese-Positive Pferdeställe; Isabella Lässer

Probennummer	Postleitzahl	Stechmücke	Anzahl der Stechmücken
3	2151	<i>Cs. annulata</i>	4
4 (LB)	2041	Culicinae	1
10	2151	<i>Cs. annulata</i>	23
11	2151	<i>Cs. annulata</i>	2
12	2151	Culicinae	1
16 + 16 (LB)	2151	<i>Cs. annulata</i>	2
19	3464	<i>Cs. annulata</i>	1
30	2151	<i>Cs. annulata</i>	2

37	2013	<i>Cx. pipiens</i> s. l.	50
38	2013	<i>Cx. pipiens</i> s. l.	12

Somit ist zu sehen, dass die meisten positiven Ergebnisse nicht bei *Cx. pipiens* (18,076%) zu finden sind, sondern ausschließlich bei *Cs. annulata* (100%), die im Stall mit der PLZ 2151 gefangen wurden.

4.3. Sequenzierung

Nach der Sequenzierung durch Microsynth Austria GmbH in Wien, Österreich, und dem anschließenden Abgleich der Nukleinsäuresequenzen mit bekannten Sequenzen von Flaviviren mithilfe des Basic Local Alignment Search Tool - Nucleotide Blast (BLASTn) in der National Library of Medicine (NLM), Bethesda, Maryland, U.S. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, abgerufen am 17.01.2024), konnte festgestellt werden, dass drei der Proben nicht detektiert wurden und als NNNNN (Daten nicht angezeigt) zurückkamen. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Qualität der DNA möglicherweise nicht ausreichend ist, um diese nachzuweisen. Mit dem Sequenzieren, BLASTn und abgleichen der Gen-Sequenzen in der NLM, konnte man neben der Positivkontrolle, die einem Gelbfieber Impfstoff entspricht, weiters durch Mücken übertragene Viren (mosquito borne viruses, MBV), also Insektenspezifische Viren (ISF), nachweisen. Die größte Übereinstimmung, zeigt die detektierte DNA-Sequenz mit einem Flavivirus sp., einem Culex-Flavivirus und einem in Spanien isoliertem Flavivirus-Stamm, dem Flavivirus AV-2011/Spain. Zudem wurden noch zwei Low Band Sequenzen sequenziert, da uns interessiert hat, was diese zu bedeuten haben. Die Lower Band Sequenzen zeigen Übereinstimmung mit der Gattung *Culex*, *Melanotus villosus*, einem Käfer, der Elateroidea Familie, *Capaea hortensis*, einer Schnecke der Helicidae Familie und *Othius punctulatus*, einem Käfer der Staphylinidae Familie. Da diese Ergebnisse nicht mit einer Flavivirussequenz übereinstimmen wurden diese nicht weiter in der Diskussion besprochen.

Probe Nr. 3 zeigt eine Übereinstimmung des Flavivirus sp. mit 97,91 %, Culex flavivirus mit 98,75 % und des Flavivirus AV-2011/Spain mit 96,75 %.

Probe Nr. 4 – Lower Band, zeigt eine Übereinstimmung mit *Culex quinquefasciatus* mit 95,83 % und *Culex pipiens pallens* mit 95,14 %.

Probe Nr. 10 zeigt eine Übereinstimmung des *Flavivirus sp.* mit 99,35 %, *Culex flavivirus* mit 97,92 % und des *Flavivirus AV-2011/Spain* mit 97,20 %.

Probe Nr. 11 zeigt eine Übereinstimmung des *Flavivirus sp.* mit 97,67 % und *Culex flavivirus* mit 95,35 %.

Probe Nr. 12 zeigt eine Übereinstimmung des *Flavivirus sp.* mit 99,35 %, *Culex flavivirus* mit 97,92% und des *Flavivirus AV-2011/Spain* mit 97,20 %.

Probe Nr. 16 zeigt eine Übereinstimmung des *Flavivirus sp.* mit 99,55 %, *Culex flavivirus* mit 97,92 % und des *Flavivirus AV-2011/Spain* mit 97,20 %.

Probe Nr. 16 – Lower Band, zeigt eine Übereinstimmung des *Malanotus villosus* mit 91,07 %, *Cepaea hortensis* 88,68 % und *Othius punctulatus* 88,86 %.

Probe Nr. 30 zeigt eine Übereinstimmung des *Culex flavivirus* mit 98,83 %, *Flavivirus sp.* mit 98,27 %, des *Flavivirus AV-2011/Spain* mit 97,13 % und *Culex decens virus C23-K33* mit 76,81 %.

Aus den Proben mit *Cx. pipiens* s. l. (37 und 38) konnte kein Ergebnis gezogen werden, das bedeutet, dass alle von uns detektierten Viren bei *Cs. annulata* vorkommen. Bei den Viren handelt es sich um insektenspezifische Viren (ISV) oder auch insektenspezifische Flaviviren (ISF).

Tabelle 6: Ergebnisse der Sequenzierung; nach Local Alignment Search Tool - Nucleotide Blast (BLASTn) (National Library of Medicine (NLM), Bethesda, Maryland, U.S.)

	<i>Flavivirus sp.</i>	<i>Culex flavivirus</i>	<i>Flavivirus AV-2011/Spain</i>	<i>Culex decens virus C23-K33</i>	<i>Culex quinquefasciatus</i>	<i>Culex pipiens pallens</i>	<i>Malantous villosus</i>	<i>Cepaea hortensis</i>	<i>Othlus punctulatus</i>
Nr. 3	97,91 %	98,75 %	96,75 %						
Nr. 4 (LB)					95,83%	95,14%			
Nr. 10	99,35%	97,92%	97,20%						
Nr. 11	97,67%	95,35%							

Nr. 12	99,35%	97,92%	97,20%						
Nr. 16	99,55%	97,92%	97,20%						
Nr. 16 (LB)							91,07%	88,68%	88,86%
Nr. 30	98,27%	98,83%	97,13%	76,81%					

Tabelle 7: Detektierte Viren; nach Local Alignment Search Tool - Nucleotide Blast (BLASTn) (National Library of Medicine (NLM), Bethesda, Maryland, U.S.)

Wissenschaftlicher Name	GenBank Zugangsnummer
Falvivirus sp.	LC480779
Culex Flavivirus	KU958176
Flavivirus AV-2011/Spain	JF707859 + JF707860
Culex decens virus C23-K33	EF423171

5. Diskussion

Seit das USUV im Jahr 2001 das erste Mal in immunhistochemischen und PCR positiven verstorbenen Amseln und Bartkäuzen, in Österreich, entdeckt wurde (21), kam es immer wieder zum Auftreten dieses MBV. In den Jahren 2003-2005 wurde ebenfalls bei toten Wildvögeln, wieder vor allem verstorbenen Amseln, mittels IHC, RT-PCR und ISH das USUV nachgewiesen (23). Da in den Jahren nach 2004 die Sterberate der Wildvögel in Österreich drastisch zurückging, wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich in Österreichs Wildvögeln eine Herdenimmunität etabliert haben könnte. Es wurden 224 Blutproben von 55 verschiedenen Vogelarten in den Jahren 2003-2006 entnommen. Am Anfang der Studie waren die Seropositiven Tiere noch gering, jedoch waren es am Ende über 50 % der untersuchten Tiere, die AK gegen das USUV zeigten (41). Zwischen Oktober 2006 und August 2007 wurden im Wiener Zoo Antikörper gegen das USUV in einer Schneeeule (*Bubo scandiacus*), in zwei Habichtskäuzen (*Strix uralensis*), in einem Weißstorch (*Ciconia ciconia*), in einem Schmutzgeier (*Neophron percnopterus*) und in zwei Uhus (*Bubo bubo*). Die Proben der Tiere wurden parallel mittels Hämagglutinationshemmtest und Neutralisationstest getestet (42). Im Jahr 2016 wurde während eines Durchgangs der passiven Überwachung in zwei Amseln das USUV nachgewiesen. Durch eine phylogenetische Studie des gesamten Genoms und des NS5-Protein Gens ergaben, dass die nachgewiesene USUV-Sequenz aus den Organproben der verstorbenen Vögel durch RT-PCR, eine hohe Übereinstimmung mit der 2009-2010 in Italien gefunden USUV-Sequenz (Europa 2) (43). 2017 kam es in Ost-Österreich wieder zu einem Massensterben der Amseln, dies konnte in Zusammenhang mit USUV gebracht werden. Im Jahr 2018 breitete sich das Gebiet, in dem verstorbene Amseln gefunden wurden, nach Süden (Steiermark) und Westen (Oberösterreich) weiter aus. In diesen Gebieten wurde 2018 in 16 Stechmücken Pools, die RNA des USUVs detektiert. Dokumentiert wurde das Virus in Stechmücken des *Cx. pipiens*-Komplex die in Linz und Graz, Österreich gefangen wurden. In den Stechmücken Pool, die in Graz gefangen wurden, wurde in *Ae. japonicus*, eine disseminierte USUV-Infektion nachgewiesen (30). In verschiedenen Stechmückenstudien wurde das USUV in Österreich meist in *Cx. pipiens* und *Ae. japonicus* detektiert (10).

Wie schon beschrieben befinden sich derzeit über 50 verschiedene Stechmückenarten in Österreich. Nach einer Studie aus dem Jahr 2013 wurden in Niederösterreich *Cs. longiareolata*, *Cs. annulata* und der *Cx. pipiens*-Komplex nachgewiesen (44). Weiters wurde 2014-2015 auch *An. claviger s.l.* im Burgenland, Niederösterreich und Wien detektiert (45) aber auch *Ae. japonicus* wurde 2018 in Stechmückenfallen, die in Graz aufgestellt wurden,

gefangen (30). In unseren Fallen in Pferdeställen in der Umgebung von Wien, Niederösterreich, haben wir *Cx. pipiens* s.l., *Cs. annulata* und *An. claviger* s.l. gefangen. Wie schon im Kapitel 'Vektoren' beschrieben, wurde das USUV bisher in acht Arten nachgewiesen, die zu den Gattungen *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Culiseta*, *Ochlerotatus*, *Coquillettidia* und *Mansonia* angehören (16). Diese Arten sind *Ae. albopictus*, *An. maculipennis* s.l., *Cx. perexiguus*, *Cx. pipiens*, *Cx. pipiens* s.l., *Cs. annulata*, *Oc. caspius*, *Oc. detritus*. Vor allem in der Art *Cx. pipiens* kommt das USUV vor (37). Obwohl in den verfügbaren Pools aus Niederösterreich kein USUV nachgewiesen wurde, haben wir in der Region um Wien zwei der Vektoren erfasst, die das USUV verbreiten können. Daher besteht die Möglichkeit, dass sich das USUV auch in unseren Breitengraden etablieren könnte. Stattdessen wurden hingegen Sequenzen von Viren entdeckt, nämlich die Insektenspezifischen Flaviviren (ISF), die bisher weniger erforscht und in Österreich noch nicht beschrieben wurden.

In den letzten Jahren wurden durch Studien neue Viren entdeckt, insbesondere solche, die vermehrt in Stechmückenpopulationen isoliert wurden. Die daraus entstandenen phylogenetischen Studien, das bedeutet die molekulargenetische Analyse eines Virus-Genoms, haben gezeigt, dass sich insektenspezifische Viren (ISV) oder auch insektenspezifische Flaviviren (ISF) von anderen Flaviviren unterscheiden. Bei diesen einzelsträngigen RNA-Viren findet die Vervielfältigung nicht in Wirbeltierzelllinien statt, daher lässt sich schlussfolgern, dass diese Viren nicht mit Krankheiten in Menschen oder Tieren in Verbindung zu bringen sind (46). Die durch Mücken übertragene Viren sollen sich sowohl durch ihre Verwandtschaftsgruppen im NS5-Gen als auch durch ihren Zelltropismus von Arboviren unterscheiden (3). Diese Viren werden vertikal von einem infizierten Weibchen über die Nachkommen übertragen, daraus kann geschlossen werden, dass auch männliche Stechmücken und Stechmücken in allen Stadien infiziert sind. Insektenspezifische Flaviviren (ISF) können wiederum in zwei Gruppen unterteilt werden. Die erste Gruppe, die als klassische ISFs (cISFs) bezeichnet wird, unterscheidet sich phylogenetisch von allen bekannten Flaviviren. Die andere Gruppe wird als Dual-Host-ISFs (dIISFs) bezeichnet, diese ist phylogenetisch mit Mücken-Wirbeltier-Flaviviren assoziiert (47). Der erste Insekten-Flavivirus (ISF) namens Zellfusionsagent-Virus (Cell fusing agent virus, CFAV) wurde 1974 von Stollar und Thomas entdeckt und aus Zellen der *Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*) isoliert (48). Er erhielt den Namen, nachdem er in die Zelllinie von *Ae. albopictus* (Zelllinie C6/36) eingepflanzt wurde und dort eine ausgeprägte Synzytienbildung, Zellfusion, verursacht (49).

Zum jetzigen Zeitpunkt wurden weitere zahlreiche ISFs auf der ganzen Welt in verschiedenen Stechmückenarten isoliert, wie zum Beispiel der Kamiti River Virus (KRV) 1999 aus Afrika (50), der Culex Virus (CxFV) 2003 aus Japan, Indonesien (51), 2006 aus Guatemala (52), 2008 aus Mexico (53), Nordamerika, Trinidad (49) und ein CxFV mit dem Namen Kakiwogo Virus (NAKV) aus Uganda (54). Im Jahr 2019 wurden weitere Studien in Afrika, Kenia durchgeführt, bei denen ein CxFV gefunden wurde, das eine enge Verwandtschaft zum CxFV aus Uganda zeigt. Weiters wurde der Aedes Flavivirus (AEFV) 2003-2004 aus Japan und Indonesien (55), der Quang Binh Virus (QBV) 2002 aus Vietnam (56), der Calbertado Virus (CLBOV) 2003-2005 aus Kanada (57) und 2001-2007 in Spanien der Marisma Mosquito Virus (MMV) (3) isoliert, daraufhin wurde 2011-2012 in nord-west Italien ein weiterer insektenspezifischer Virus gefunden, dieser konnte der MMV-Art zugeordnet werden (58). Diese Studien zeigen die Tendenz, dass sich die ISFs schnell und weltweit ausbreiten (51).

Eine von uns isolierte Virus-Genom Sequenz, mit einer Übereinstimmung, bei allen positiven Pools, von mindestens 97,20 % ist das Flavivirus AV-2011/Spain. Zu ersten Vorkommnissen des von uns detektierten ISFs (JF707859 + JF707860), kam es als Teilsequenz des NS5-Gens im Spanischen Ochlerotatus Flavivirus (SOcFV) und oder dem Spanischen Culex Flavivirus (SCxFV), zwischen den Jahren 2001-2007 vor. Neben dem Virus-Screening mit Stechmückenpools wurde in der Publikation von Vázquez et al. 2012 ein Virusisolationsversuch mit drei verschiedenen Ziellinien, C6/36, Vero (Nervenzellen von grünen Meerkatzen, ein Primatengattung) und BHK-21 (Nierenzellen eines eintägigen Hamsters) unternommen. Über mehrere Tage wurden diese Zelllinien auf zytopathische Effekte (cytopathic effects, CPE), morphologische Veränderungen, die durch eine Virusinfektion in Zellen entsteht, kontrolliert (3). Unter CPE versteht man Veränderung der Zellen in ihrer Morphologie, häufig kommt es zu Abrundung der Zellen, Fusion mit benachbarten Zellen, was man bei CFAVs beobachten kann und das Auftreten von Einschlusskörperchen (59). Aus den Stechmückenpools, wurde wie in unserer Studie, via QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen), die Virale-RNA extrahiert und mittels One-Step RT-PCR kit (Qiagen) und den gleichen Primern eine RT-PCR gemacht. Weiters wurde ein ähnliches Protokoll verfolgt. Einer der isolierten Viren wurde als SCxFV benannt. Die Sequenz wurde vor allem aus *Cx. theileri* und *Cx. pipiens* sequenziert. Taxonomisch geht man davon aus, dass SCxFV ein neues ISF ist, dennoch nahe verwandt mit CFAV, KRV CxFV und AEFV. Zu den von Vázquez et al. 2012 in den Zellen untersuchten Viren wurden in den Vero und BHK-21 Zelllinien keine positiven PCR-Amplifikationen oder Zellaggregation (CPE) gefunden, was wieder unterstreicht, dass sich ISFs nicht in Wirbeltierzelllinien manifestieren. Anhand dieser

Studie kann gesagt werden, dass spezifische ISFs bestimmte Stechmückenarten bevorzugen. Außerdem wurden zwei neue Flaviviren auf DNA-Basis charakterisiert, die Tatsache, dass kein viraler RNA-Nachweis vorlag und dass eine der Gruppen Codon-Stopps enthielt, deutet darauf hin, dass sie im Genom der Mücken integriert sein könnten. Daher könnte sich die Ansteckung mit Insekten-Flaviviren oder das Vorhandensein von integrierten Flavivirus-Sequenzen in Mücken auf die Infektion, Replikation und Verbreitung von durch Mücken übertragenen Flaviviren auswirken. Dies könnte bereits einen selektiven Druck auf die Anfälligkeit von Viren und/oder die Kompetenz der Mücken als Überträger ausgeübt haben (3). Weiters ist jedoch zu sagen, dass Flaviviren im Gegensatz zu den Retroviren, wie das humane Immundefizienz-Virus (HIV), sich im Zytoplasma vermehren und nicht im Zellkern. Retroviren in der RNA-Form binden sich zuerst an Zellen, wie Monozyten oder T-Lymphozyten, die einen CD4-Rezeptor besitzen, und dringen in die Zelle ein. In der Zelle wird aus der Virus-RNA durch Virusenzym Reverse Transkriptase eine Virus-DNA. Diese Virus-DNA kann nun durch das Virusenzym Integrase vom Zytoplasma der Zelle in ihren Kern. Dort wird die Virus-DNA dann in die DNA der Wirtszelle eingebaut werden (60). Wenn man davon ausgeht, dass sich Viren nur dann in die Wirtszellen-DNA einbauen könne, wenn sie sich im Zellkern dieser befindet und das Enzym für die Reverse Transkriptase besitzen, dann würde das bedeuten, dass dies für Flaviviren nicht möglich ist. Man könnte nun in zukünftigen Studien eventuell versuchen, das neu gefundene Virus in Mückenzellen anzuzüchten und zuschauen, ob dieses wirklich ein Flavivirus ist.

Der 2018 in Süd-Portugal gefundene Flavivirus sp. (LC480779) wurde auf molekular Sicht als NS5-Flavivirus oder COI (mitochondriale Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheit-I (COI) - Sequenzen) sequenziert. Hier wurden die Flavivirus-specific amplicons in verschiedenen Stechmückenarten entdeckt, unter anderem auch in *Cs. annulata*. In den *Cs. annulata* Stechmücken wurde unter anderem auch eine hohe Übereinstimmung mit KU958176, einer in der Türkei identifizierten viralen Sequenz, beschrieben. Auch wurden in Portugal Übereinstimmungen mit den Sequenzen von JF707859 + JF707860 gefunden, was bedeutet, dass wir ebenso die gleiche Zusammensetzung wie in Portugal gefunden haben (61). Die dritte detektierte ISF-Sequenz (KU958176), die in der Türkei im Jahr 2014-2015 entdeckt wurde, wurde genauso in *Cs. annulata* gefunden. Es zeigt ebenso eine gleiche hohe Ähnlichkeit der Nukleotide wie zu den in Spanien gefundenen NS5-Sequenzen aus Flavivirus AV-2011 (62).

Die bis dato beschriebenen Studien sprechen sich für eine eingeschränkte Replikationskapazität, beziehungsweise keine Vervielfältigung in Wirbeltierzellen, aus. Es kann nach

Berücksichtigung der Studien davon ausgegangen werden, dass ISFs das Potenzial besitzen, die Übertragung von Flaviviren aufgrund von Superinfektionsausschluss oder Wechselwirkung zu unterdrücken. Der Superinfektionsausschluss ist der Prozess, indem die Wirtszelle durch einen Virus infiziert wurde und danach diese die Replikation eines weiteren Virus nicht mehr unterstützt (47). Jedoch bedarf es weiterer Erforschung der Viren aufgrund ihrer genetischen Diversität, der Pathogenese und den Vektor-Wirt Anforderungen, um effektive Vorhersagen zu treffen (46). Auch bedarf es weiterer Forschungen, ob es die bis jetzt vorhandenen pathogenen Flaviviren wie WNV oder USUV verdrängt oder deren Virulenz amplifiziert. Beschrieben wurde einerseits bei einer vorherigen Infektion mit Palm Creek Virus (PCV), auch ein cISF das 2010 in Australien entdeckt wurde, dass die Replikation von WNV und Murray Valley Enzephalitis Virus (Murray Valley encephalitis virus, MVEV) in C6/36-Zellen signifikant reduziert wurde (63). Im Gegensatz dazu hatte eine vorherige Exposition gegenüber CxFV keinen Einfluss auf die WNV-Replikation in C6/36-Zellen (64). In einer weiteren Studie waren die WNV-Titer in CxFV-infizierten C6/36-Zellen im Vergleich zu nicht infizierten C6/36-Zellen zu anfangs signifikant niedriger, jedoch nicht zu einem späteren Zeitpunkt. Neben der in vitro Studie wurde in derselben von Boilling et al. 2012 auch eine in vitro Studie durchgeführt. Hier kam es zu einer signifikanten Unterdrückung der Replikation des WNV durch den CxFV in den Mücken. Mechanismen zur Unterdrückung könnten die Aktivierung der angeborenen Immunantwort der Stechmücke oder der Wettbewerb um entscheidende zelluläre Ressourcen sein (65). Da sich USUV ähnlich wie das WNV verhält, könnte man erwarten, dass auch die Unterdrückung der Replikation des Virus oder die unveränderte Einwirkung durch ISFs gleich verhält.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nach unserem Kenntnisstand im Rahmen vorangegangener Studien bisher keine Vektorüberwachungsstudien durchgeführt wurden, die den Fokus auf die Untersuchung von Stechmücken in der Nähe von Pferdeställen gelegt hat. Obwohl kein USUV identifiziert wurde, konnten vier Abstammungslinien von cISF in *Cs. annulata* nachgewiesen werden. Der Fund von ISFs in *Cs. annulata* ist besonders auffallend, da alle von uns entdeckten insektenspezifischen Virus Sequenzen ausschließlich bei *Cs. annulata* auftraten. Die gefundenen Flaviviren, die als ISFs bezeichnet werden, besitzen, soweit erforscht, keine Auswirkungen auf Säugetiere wie Pferde jedoch ist eine gegenseitige Beeinflussung mehrere Flaviviren in einer Mücke beschrieben worden. Die kleine Zahl an vorhandenen Studien beschreiben ein positiveres Bild, dass ISFs eventuell andere pathogene Flaviviren, wie WNV und USUV, in den Stechmücken verdrängen können und somit für uns

Menschen und unsere Pferde die Möglichkeit besteht, dass der Infektionsdruck durch pathogene Flaviviren zurückgeht.

6. Literaturverzeichnis

1. Nikolay B, Diallo M, Boye CSB, Sall AA. Usutu virus in Africa. Bd. 11, Vector-Borne and Zoonotic Diseases. 2011. S. 1417–23.
2. Becker N., Petrić D., Zgomba M., Boase C., Madon M. B., Dahl C., u. a. Mosquitoes: Identification, Ecology and Control. Bd. 3, Fascinating Life Sciences Series. Springer International Publishing AG; 2020.
3. Vázquez A, Sánchez-Seco MP, Palacios G, Molero F, Reyes N, Ruiz S, u. a. Novel flaviviruses detected in different species of mosquitoes in Spain. Vector-Borne and Zoonotic Diseases. 1. März 2012;12(3):223–9.
4. Bosch S. Zersaust, gerupft oder glatzköpfig: Gefiederauffälligkeiten bei Amseln *Turdus merula* infolge einer Infektion mit Usutu-Viren?
5. Manarolla G, Bakonyi T, Gallazzi D, Crosta L, Weissenböck H, Dorrestein GM, u. a. Usutu virus in wild birds in northern Italy. *Vet Microbiol.* 2010;(2):141.
6. Pierson TC, Diamond MS. The continued threat of emerging flaviviruses. Bd. 5, *Nature Microbiology.* Nature Research; 2020. S. 796–812.
7. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the Flavivirus life cycle. Bd. 3, *Nature Reviews Microbiology.* 2005. S. 13–22.
8. Weidinger P, Kolodziejek J, Bakonyi T, Brunthaler R, Erdélyi K, Weissenböck H, u. a. Different dynamics of Usutu virus infections in Austria and Hungary, 2017–2018. *Transbound Emerg Dis.* 1. Jänner 2020;67(1):298–307.

9. Vilibic-Cavlek T, Petrovic T, Savic V, Barbic L, Tabain I, Stevanovic V, u. a. Epidemiology of Usutu Virus: The European Scenario. *Pathogens*. 2020;9(9).
10. Angeloni G, Bertola M, Lazzaro E, Morini M, Masi G, Sinigaglia A, u. a. Epidemiology, surveillance and diagnosis of Usutu virus infection in the EU/EEA, 2012 to 2021. *Eurosurveillance*. 17. August 2023;28(33).
11. Magallanes S, Llorente F, Ruiz-López MJ, Martínez-de la Puente J, Soriguer R, Calderon J, u. a. Long-term serological surveillance for West Nile and Usutu virus in horses in south-West Spain. *One Health*. 1. Dezember 2023;17.
12. Gothe LMR, Ganzenberg S, Ziegler U, Obiegala A, Lohmann KL, Sieg M, u. a. Horses as Sentinels for the Circulation of Flaviviruses in Eastern–Central Germany. *Viruses*. 1. Mai 2023;15(5).
13. Simmonds P, Becher P, Bukh J, Gould EA, Meyers G, Monath T, u. a. ICTV virus taxonomy profile: Flaviviridae. *Journal of General Virology*. 1. Jänner 2017;98(1):2–3.
14. Alber G., Selbitz H. J., Truyen U., Valentin-Weigand P., Amtsberg G., Bauer J., u. a. Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 11. Auflage. 2023. 634–648 S.
15. Bakonyi T, Gould EA, Kolodziejek J, Weissenböck H, Nowotny N. Complete genome analysis and molecular characterization of Usutu virus that emerged in Austria in 2001: Comparison with the South African Strain SAAR-1776 and other flaviviruses. *Virology*. 25. Oktober 2004;328(2):301–10.

16. Gaibani P, Rossini G. An overview of Usutu virus. *Microbes Infect.* 2017;19(7):382–7.
17. Davidson AD. Chapter 2 New Insights into Flavivirus Nonstructural Protein 5. In *Academic Press*; 2009. S. 41–101. (Advances in Virus Research; Bd. 74).
18. Ferrero DS, Albentosa-González L, Mas A, Verdaguer N. Structure and function of the NS5 methyltransferase domain from Usutu virus. *Antiviral Res.* 2022;208:105460.
19. Ayers M, Adachi D, Johnson G, Andonova M, Drebot M, Tellier R. A single tube RT-PCR assay for the detection of mosquito-borne flaviviruses. *J Virol Methods.* August 2006;135(2):235–9.
20. Bosch S, Schmidt-Chanasit J, Fiedler W. Das Usutu-Virus als Ursache von Massensterben bei Amseln *Turdus merula* und anderen Vogelarten in Europa: Erfahrungen aus fünf Ausbrüchen zwischen 2001 und 2011. *Vogelwarte - Zeitschrift für Vogelkunde.* 2012;50:109–22.
21. Weissenböck H, Kolodziejek J, Fragner K, Kuhn R, Pfeffer M, Nowotny N. Usutu virus activity in Austria, 2001-2002. *Microbes Infect.* 2003;5(12):1132–6.
22. Weissenböck H, Kolodziejek J, Url A, Lussy H, Rebel-Bauder B, Nowotny N. Emergence of Usutu virus, an African Mosquito-Borne Flavivirus of the Japanese Encephalitis Virus Group, Central Europe. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(7):652–6.
23. Chvala S, Bakonyi T, Bukovsky C, Meister T, Brugger K, Rubel F, u. a. Monitoring of Usutu virus activity and spread by using dead bird surveillance in Austria, 2003–2005. *Vet Microbiol.* 2007;122(3):237–45.

24. Bakonyi T, Erdélyi K, Ursu K, Ferenczi E, Csörgö T, Lussy H, u. a. Emergence of usutu virus in Hungary. *J Clin Microbiol.* Dezember 2007;45(12):3870–4.
25. Busquets N, Alba A, Allepuz A, Aranda C, Nuñez JI. Usutu Virus Sequences in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae), Spain. *Emerg Infect Dis.* Mai 2008;14(5):861–3.
26. Steinmetz HW, Bakonyi T, Weissenböck H, Hatt JM, Eulenberger U, Robert N, u. a. Emergence and establishment of Usutu virus infection in wild and captive avian species in and around Zurich, Switzerland-Genomic and pathologic comparison to other central European outbreaks. *Vet Microbiol.* 24. März 2011;148(2–4):207–12.
27. Jöst H, Bialonski A, Maus D, Sambri V, Eiden M, Groschup MH, u. a. Isolation of Usutu virus in Germany. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* September 2011;85(3):551–3.
28. Klobucar A, Savic V, Posavec MC, Petrinic S, Kuhar U, Toplak I, u. a. Screening of mosquitoes for west nile virus and usutu virus in Croatia, 2015–2020. *Trop Med Infect Dis.* 2021;6(2).
29. Lecollinet S, Blanchard Y, Manson C, Lowenski S, Laloy E, Quenault H, u. a. Dual Emergence of Usutu Virus in Common Blackbirds, Eastern France, 2015. *Emerg Infect Dis.* Dezember 2016;22(12):2225–2225.
30. Camp J V., Kolodziejek J, Nowotny N. Targeted surveillance reveals native and invasive mosquito species infected with Usutu virus. *Parasit Vectors.* 21. Jänner 2019;12(1).

31. Zannoli S, Sambri V. West nile virus and usutu virus co-circulation in europe: Epidemiology and implications. Bd. 7, Microorganisms. MDPI AG; 2019.
32. Cavalleri JMV, Korbacska-Kutasi O, Leblond A, Paillot R, Pusterla N, Steinmann E, u. a. European College of Equine Internal Medicine consensus statement on equine flaviviridae infections in Europe. J Vet Intern Med. 1. November 2022;36(6):1858–71.
33. Vázquez A, Jiménez-Clavero MA, Franco L, Donoso-Mantke O, Sambri V, Niedrig M, u. a. Usutu virus-potential risk of human disease in Europe. 2011.
34. Barbic L, Vilibic-Cavlek T, Listes E, Stevanovic V, Gjenero-Margan I, Ljubin-Sternak S, u. a. Demonstration of Usutu virus antibodies in horses, Croatia. Vector-Borne and Zoonotic Diseases. 1. Oktober 2013;13(10):772–4.
35. Bażanów B, Jansen van Vuren P, Szymański P, Stygar D, Frącka A, Twardoń J, u. a. A survey on West Nile and Usutu viruses in horses and birds in Poland. Viruses. 17. Februar 2018;10(2).
36. Zittra C, Joachim A, Führer H-P. Stechmücken und Dirofilarien in Österreich. Ein Überblick über die derzeitige Situation von neobiotischen Culiciden und Dirofilarien. Tierärztliche Umschau. 2015;70(4):126–31.
37. Nikolay B. A review of West Nile and Usutu virus co-circulation in Europe: How much do transmission cycles overlap? Trans R Soc Trop Med Hyg. 23. Juni 2015;109(10):609–18.

38. Führer H-P., Bakran-Lebl K. Stechmückenmonitoring und Pathogenscreening im Burgenland Einleitung, Jahresbericht 2021. 2022.
39. Eckert J. Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin: 112 Tabellen. Bd. 2., überarb. Aufl. Stuttgart: Enke; 2008.
40. Paris V, Hardy C, Hoffmann AA, Ross PA. How often are male mosquitoes attracted to humans? R Soc Open Sci [Internet]. 2023;10(10):230921. Verfügbar unter: <https://royalsocietypublishing.org/doi/abs/10.1098/rsos.230921>
41. Meister T, Lussy H, Bakonyi T, Šikutová S, Rudolf I, Vogl W, u. a. Serological evidence of continuing high Usutu virus (Flaviviridae) activity and establishment of herd immunity in wild birds in Austria. Vet Microbiol. 2008;127(3):237–48.
42. Buchebner N, Zenker W, Wenker C, Steinmetz HW, Sós E, Lussy H, u. a. Low Usutu virusseroprevalence in four zoological gardens in central Europe. BMC Vet Res. 6. Dezember 2013;9(1):153.
43. Bakonyi T, Erdélyi K, Brunthaler R, Dán Á, Weissenböck H, Nowotny N. Usutu virus, Austria and Hungary, 2010-2016. Bd. 6, Emerging Microbes and Infections. 2017.
44. Zittra C, Waringer J, Werblow A, Melaun C, Fuehrer HP. Reconfirmation of *Culiseta (Allotheobaldia) longiareolata* (Macquart 1838) (Diptera: Culicidae) in Austria. The first sequence-confirmed findings in northeastern Austria. Bd. 150, Acta ZooBot Austria. 2014.

45. Zittra C, Vitecek S, Obwaller AG, Rossiter H, Eigner B, Zechmeister T, u. a. Landscape structure affects distribution of potential disease vectors (Diptera: Culicidae). *Parasit Vectors*. 26. April 2017;10(1).
46. Calzolari M, Zé-Zé L, Vázquez A, Sánchez Seco MP, Amaro F, Dottori M. Insect-specific flaviviruses, a worldwide widespread group of viruses only detected in insects. *Infection, Genetics and Evolution*. 2016;40:381–8.
47. Blitvich BJ, Firth AE. Insect-specific flaviviruses: A systematic review of their discovery, host range, mode of transmission, superinfection exclusion potential and genomic organization. Bd. 7, *Viruses*. MDPI AG; 2015. S. 1927–59.
48. Stollar V, Thomas VL. An agent in the *Aedes aegypti* cell line (Peleg) which causes fusion of *Aedes albopictus* cells. *Virology* [Internet]. 1975;64(2):367–77.
49. Kim DY, Guzman H, Bueno R, Dennett JA, Auguste AJ, Carrington CVF, u. a. Characterization of *Culex* Flavivirus (Flaviviridae) strains isolated from mosquitoes in the United States and Trinidad. *Virology*. 30. März 2009;386(1):154–9.
50. Sang RC, Gichogo A, Gachoya J, Dunster MD, Ofula V, Hunt AR, u. a. Isolation of a new flavivirus related to Cell fusing agent virus (CFAV) from field-collected flood-water *Aedes* mosquitoes sampled from a dambo in central Kenya. *Arch Virol*. 1. Mai 2003;148(6):1085–93.
51. Hoshino K, Isawa H, Tsuda Y, Yano K, Sasaki T, Yuda M, u. a. Genetic characterization of a new insect flavivirus isolated from *Culex pipiens* mosquito in Japan. *Virology*. 15. März 2007;359(2):405–14.

52. Morales-Betoulle ME, Pineda MLM, Sosa SM, Panella N, López B MR, Córdón-Rosales C, u. a. *Culex flavivirus* isolates from mosquitoes in Guatemala. *J Med Entomol*. November 2008;45(6):1187–90.

53. Farfan-Ale JA, Loroño-Pino MA, Garcia-Rejon JE, Soto V, Lin M, Staley M, u. a. Detection of Flaviviruses and Orthobunyaviruses in Mosquitoes in the Yucatan Peninsula of Mexico in 2008. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. Oktober 2010;10(8):777–83.

54. Cook S, Moureau G, Harbach RE, Mukwaya L, Goodger K, Ssenfuka F, u. a. Isolation of a novel species of flavivirus and a new strain of *Culex flavivirus* (Flaviviridae) from a natural mosquito population in Uganda. *Journal of General Virology*. 2009;90(11):2669–78.

55. Hoshino K, Isawa H, Tsuda Y, Sawabe K, Kobayashi M. Isolation and characterization of a new insect flavivirus from *Aedes albopictus* and *Aedes flavopictus* mosquitoes in Japan. *Virology*. 15. August 2009;391(1):119–29.

56. Crabtree MB, Nga PT, Miller BR. Isolation and characterization of a new mosquito flavivirus, Quang Binh virus, from Vietnam. *Arch Virol*. 5. Mai 2009;154(5):857–60.

57. Pabbaraju K, Ho KCY, Wong S, Fox JD, Kaplen B, Tyler S, u. a. Surveillance of Mosquito-Borne Viruses in Alberta Using Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction With Generic Primers. *J Med Entomol*. 1. Mai 2009;46(3):640–8.

58. Rizzo F, Cerutti F, Ballardini M, Mosca A, Vitale N, Radaelli MC, u. a. Molecular characterization of flaviviruses from field-collected mosquitoes in northwestern Italy, 2011–2012. *Parasit Vectors*. 26. Dezember 2014;7(1):395.

59. Albrecht T, Fons M, Boldogh I, Rabson AS. Effects on Cells. 1996
60. von Braun A, Günthard HF. HIV-Infektion und antiretrovirale Therapie: Grundsätze der Behandlung und Einflüsse auf andere Therapien. Praxis. 1. Jänner 2013;102(1):5–15.
61. Silva M, Morais P, Maia C, de Sousa CB, de Almeida APG, Parreira R. A diverse assemblage of RNA and DNA viruses found in mosquitoes collected in southern Portugal. Virus Res. 1. Dezember 2019;274.
62. Ergünay K, Litzba N, Brinkmann A, Günay F, Sarıkaya Y, Kar S, u. a. Co-circulation of West Nile virus and distinct insect-specific flaviviruses in Turkey. Parasit Vectors. 20. März 2017;10(1):1–14.
63. Hobson-Peters J, Yam AWY, Lu JWF, Setoh YX, May FJ, Kurucz N, u. a. A New Insect-Specific Flavivirus from Northern Australia Suppresses Replication of West Nile Virus and Murray Valley Encephalitis Virus in Co-infected Mosquito Cells. PLoS One. 27. Februar 2013;8(2).
64. Kent RJ, Crabtree MB, Miller BR. Transmission of West Nile virus by *Culex quinquefasciatus* say infected with *Culex flavivirus* izabal. PLoS Negl Trop Dis. Mai 2010;4(5).
65. Bolling BG, Olea-Popelka FJ, Eisen L, Moore CG, Blair CD. Transmission dynamics of an insect-specific flavivirus in a naturally infected *Culex pipiens* laboratory colony and effects of co-infection on vector competence for West Nile virus. Virology. 5. Juni 2012;427(2):90–7.

7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Taxonomische Einordnung des Flavivirus; Abbildung gemäß Artikel 'ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae'	5
Abbildung 2: Übertragungsweg des Usutu-Viruses; Abbildung gemäß Artikel 'Targeted surveillance reveals native and invasive mosquito species infected with Usutu virus' mit Shilhouetten von Vecteezy	8
Abbildung 3: Taxonomie; Abbildung gemäß Band 3 des Buches 'Mosquitoes: Identification, Ecology and Control'	10
Abbildung 4: Weibchen einer <i>Cx. pipiens</i> s. l.; Isabella Lässer und Maria Rummerstorfer - Abteilung: Parasitologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien.....	12
Abbildung 5: Weibchen einer <i>Cs. annulata</i> ; Isabella Lässer und Maria Rummerstorfer - Abteilung: Parasitologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien.....	12
Abbildung 6: Weibchen einer <i>An. claviger</i> s. l.; Isabella Lässer und Maria Rummerstorfer - Abteilung: Parasitologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien.....	13
Abbildung 7: BG-Sentinel 2 CO ₂ Mückenfalle von Biogents und andere Materialien; Isabella Lässer und Maria Rummerstorfer	15
Abbildung 8: Zusammengebaute BG-Sentinel 2 CO ₂ Mückenfalle; Isabella Lässer und Maria Rummerstorfer.....	15
Abbildung 9: Stechmücken nach Häufigkeit ihrer Art; Isabella Lässer	23
Abbildung 10: gefangene Stechmücken im Sommer 2023; Isabella Lässer.....	23
Abbildung 11: Stechmücken in den Pferdeställen; Isabella Lässer	24
Abbildung 12: Ergebnisse PCR; Isabella Lässer und Maria Rummerstorfer Abteilung: Klinisches Zentrum für Pferde der Veterinärmedizinischen Universität Wien.....	25

Abbildung 13: Tabelle der Proben: Rot = positive Pools; Isabella Lässer	46
Tabelle 1: Mastermix NS51; Informationen der Tabelle entnommen aus der Anleitung von Qiagen (Hilden, Deutschland).....	18
Tabelle 2: Cycle-Bedingungen für den Thermocycler NS51; Informationen der Tabelle entnommen aus der Anleitung von Qiagen (Hilden, Deutschland).....	19
Tabelle 3: Mastermix NS52; Informationen der Tabelle entnommen aus der Anleitung von Qiagen (Hilden, Deutschland).....	20
Tabelle 4: Cycle-Bedingungen für den Thermocycler NS52; Informationen der Tabelle entnommen aus der Anleitung von Qiagen (Hilden, Deutschland).....	20
Tabelle 5: Gelelektrophorese-Positive Pferdeställe; Isabella Lässer.....	25
Tabelle 6: Ergebnisse der Sequenzierung; nach Local Alignment Search Tool - Nucleotide Blast (BLASTn) (National Library of Medicine (NLM), Bethesda, Maryland, U.S.)	27
Tabelle 7: Detektierte Viren; nach Local Alignment Search Tool - Nucleotide Blast (BLASTn) (National Library of Medicine (NLM), Bethesda, Maryland, U.S.)	28

8. Anhang

ID_Catch	Date_Start	Date_End	Days	Position	Trap	Trap_statu	Stage_Catch	Name_Catch	Noti	ID_Sample	Stage_Sample	Number	Property	Storage	Storage_Loc	Species_Morph	Sex	Bloodf	Quality_Mo	Name_Morph	Date_Morph
BG_WOL_01_20230706	06.07.23	07.07.23	1	WOL_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer		23N001	Adults	25	Vetmeduni	-80°C	Pferdeklinik	Cx. pipiens/torrentia F				Rummerstorfer/ Lässer	06.09.23
BG_WOL_01_20230706	06.07.23	07.07.23	1	WOL_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer		23N002	Adults	1	Vetmeduni	-80°C	Pferdeklinik	Culicinae	F			Rummerstorfer/ Lässer	06.09.23
BG_OLG_01_20230706	05.07.23	06.07.23	1	OLG_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer		23N003	Adults	4	Vetmeduni	-80°C	Pferdeklinik	Cs. annulata	F			Rummerstorfer/ Lässer	06.09.23
BG_HAT_01_20230803	03.08.23	04.08.23	1	HAT_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer												Usa Schlamadinger	08.09.23
BG_HAR_01_20230803	03.08.23	04.08.23	1	HAR_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer		23N004	Adults	1	Vetmeduni	-80°C	Pferdeklinik	Culicinae	F			Usa Schlamadinger	08.09.23
BG_HOL_01_20230705	05.07.23	06.07.23	1	HOL_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer												Usa Schlamadinger	08.09.23
BG_HOL_01_20230803	03.08.23	04.08.23	1	HOL_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer												Usa Schlamadinger	08.09.23
BG_HAR_01_20230705	05.07.23	06.07.23	1	HAR_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer		23N005	Adults	1	Vetmeduni	-80°C	Pferdeklinik	Cx. pipiens/torrentia F				Usa Schlamadinger	08.09.23
BG_GOE_01_20230706	06.07.23	07.07.23	1	GOE_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer		23N006	Adults	48	Vetmeduni	-80°C	Pferdeklinik	Cx. pipiens/torrentia F				Usa Schlamadinger	08.09.23
BG_GOE_01_20230706	06.07.23	07.07.23	1	GOE_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer		23N007	Adults	3	Vetmeduni	-80°C	Pferdeklinik	Culicinae	M			Usa Schlamadinger	08.09.23
BG_GOE_01_20230706	06.07.23	07.07.23	1	GOE_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer		23N008	Adults	1	Vetmeduni	-80°C	Pferdeklinik	Cx. pipiens/torrentia F	yes			Usa Schlamadinger	08.09.23
BG_GOE_01_20230706	06.07.23	07.07.23	1	GOE_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer		23N009	Adults	1	Vetmeduni	-80°C	Pferdeklinik	Culicinae	F			Usa Schlamadinger	08.09.23
BG_OLG_01_20230803	03.08.23	04.08.23	1	OLG_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer		23N010	Adults	23	Vetmeduni	-80°C	Pferdeklinik	Cs. annulata	F			Usa Schlamadinger	08.09.23
BG_OLG_01_20230803	03.08.23	04.08.23	1	OLG_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer		23N011	Adults	2	Vetmeduni	-80°C	Pferdeklinik	Cs. annulata	F	yes		Usa Schlamadinger	08.09.23
BG_OLG_01_20230803	03.08.23	04.08.23	1	OLG_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer		23N012	Adults	1	Vetmeduni	-80°C	Pferdeklinik	Culicinae	F			Usa Schlamadinger	08.09.23
BG_HAT_01_20230705	05.07.23	06.07.23	1	HAT_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer		23N013	Adults	1	Vetmeduni	-80°C	Pferdeklinik	Cx. pipiens/torrentia F				Usa Schlamadinger	08.09.23
BG_HAT_01_20230705	05.07.23	06.07.23	1	HAT_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer		23N014	Adults	1	Vetmeduni	-80°C	Pferdeklinik	An. claviger s.l.	F			Usa Schlamadinger	08.09.23
BG_MAI_01_20230705	05.07.23	06.07.23	1	MAI_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer		23N015	Adults	2	Vetmeduni	-80°C	Pferdeklinik	Cx. pipiens/torrentia F				Usa Schlamadinger	08.09.23
BG_OLG_01_20230904	04.09.23	05.09.23	1	OLG_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer		23N016	Adults	2	Vetmeduni	-80°C	Pferdeklinik	Cs. annulata	F			Rummerstorfer/ Lässer	08.10.23
BG_OLG_01_20230904	04.09.23	05.09.23	1	OLG_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer		23N017	Adults	1	Vetmeduni	-80°C	Pferdeklinik	An. claviger s.l.	F			Rummerstorfer/ Lässer	08.10.23
BG_WOL_01_20230905	05.09.23	06.09.23	1	WOL_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer		23N018	Adults	16	Vetmeduni	-80°C	Pferdeklinik	Cx. pipiens/torrentia F				Rummerstorfer/ Lässer	08.10.23
BG_WOL_01_20230905	05.09.23	06.09.23	1	WOL_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer		23N019	Adults	1	Vetmeduni	-80°C	Pferdeklinik	Cs. annulata	F			Rummerstorfer/ Lässer	08.10.23
BG_HAR_01_20230904	04.09.23	05.09.23	1	HAR_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer		23N020	Adults	1	Vetmeduni	-80°C	Pferdeklinik	Cx. pipiens/torrentia F				Rummerstorfer/ Lässer	08.10.23
BG_HAT_01_20230904	04.09.23	05.09.23	1	HAT_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer												Rummerstorfer/ Lässer	08.10.23
BG_WOL_01_20230805	05.08.23	06.08.23	1	WOL_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer												Rummerstorfer/ Lässer	08.10.23
BG_MAI_01_20230904	04.09.23	05.09.23	1	MAI_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer												Rummerstorfer/ Lässer	08.10.23
BG_HOL_01_20230904	04.09.23	05.09.23	1	HOL_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer		23N021	Adults	2	Vetmeduni	-80°C	Pferdeklinik	Cx. pipiens/torrentia F				Rummerstorfer/ Lässer	08.10.23
BG_MAI_01_20230803	03.08.23	04.08.23	1	MAI_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer		23N022	Adults	3	Vetmeduni	-80°C	Pferdeklinik	Cx. pipiens/torrentia F				Rummerstorfer/ Lässer	08.10.23
BG_GOE_01_20230905	05.09.23	06.09.23	1	GOE_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer		23N023	Adults	4	Vetmeduni	-80°C	Pferdeklinik	Culicinae	M			Rummerstorfer/ Lässer	08.10.23
BG_GOE_01_20230905	05.09.23	06.09.23	1	GOE_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer		23N024	Adults	38	Vetmeduni	-80°C	Pferdeklinik	Cx. pipiens/torrentia F				Rummerstorfer/ Lässer	08.10.23
BG_GOE_01_20230805	05.08.23	06.08.23	1	GOE_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer		23N025	Adults	6	Vetmeduni	-80°C	Pferdeklinik	Culicinae	M			Usa Schlamadinger	08.10.23
BG_GOE_01_20230805	05.08.23	06.08.23	1	GOE_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer		23N026	Adults	50	Vetmeduni	-80°C	Pferdeklinik	Cx. pipiens/torrentia F				Usa Schlamadinger	08.10.23
BG_GOE_01_20230805	05.08.23	06.08.23	1	GOE_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer		23N027	Adults	21	Vetmeduni	-80°C	Pferdeklinik	Cx. pipiens/torrentia F				Usa Schlamadinger	08.10.23
BG_GOE_01_20230805	05.08.23	06.08.23	1	GOE_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer		23N028	Adults	3	Vetmeduni	-80°C	Pferdeklinik	Cx. pipiens/torrentia F	yes			Usa Schlamadinger	08.10.23
BG_OLG_01_20231007	07.10.23	08.10.23	1	OLG_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer		23N029	Adults	2	Vetmeduni	-80°C	Pferdeklinik	Cx. pipiens/torrentia F				Maria Rummerstorfer	10.10.23
BG_OLG_01_20231007	07.10.23	08.10.23	1	OLG_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer		23N030	Adults	2	Vetmeduni	-80°C	Pferdeklinik	Cs. annulata	F			Maria Rummerstorfer	10.10.23
BG_HAR_01_20231007	07.10.23	08.10.23	1	HAR_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer												Maria Rummerstorfer	10.10.23
BG_HOL_01_20231007	07.10.23	08.10.23	1	HOL_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer												Maria Rummerstorfer	10.10.23
BG_MAI_01_20231007	07.10.23	08.10.23	1	MAI_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer												Maria Rummerstorfer	10.10.23
BG_HAT_01_20231007	07.10.23	08.10.23	1	HAT_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer		23N031	Adults	5	Vetmeduni	-80°C	Pferdeklinik	Cx. pipiens/torrentia F				Maria Rummerstorfer	10.10.23
BG_HAT_01_20231007	07.10.23	08.10.23	1	HAT_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer		23N032	Adults	1	Vetmeduni	-80°C	Pferdeklinik	An. claviger s.l.	F			Maria Rummerstorfer	10.10.23
BG_WOL_01_20231008	08.10.23	09.10.23	1	WOL_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer		23N033	Adults	10	Vetmeduni	-80°C	Pferdeklinik	Cx. pipiens/torrentia F				Maria Rummerstorfer	10.10.23
BG_GOE_01_20231008	08.10.23	09.10.23	1	GOE_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer		23N034	Adults	50	Vetmeduni	-80°C	Pferdeklinik	Cx. pipiens/torrentia F				Maria Rummerstorfer	10.10.23
BG_GOE_01_20231008	08.10.23	09.10.23	1	GOE_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer		23N035	Adults	1	Vetmeduni	-80°C	Pferdeklinik	Culicinae	M			Maria Rummerstorfer	10.10.23
BG_GOE_01_20231008	08.10.23	09.10.23	1	GOE_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer		23N036	Adults	2	Vetmeduni	-80°C	Pferdeklinik	Cx. pipiens/torrentia F	yes			Maria Rummerstorfer	10.10.23
BG_GOE_01_20231008	08.10.23	09.10.23	1	GOE_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer		23N037	Adults	50	Vetmeduni	-80°C	Pferdeklinik	Cx. pipiens/torrentia F				Maria Rummerstorfer	10.10.23
BG_GOE_01_20231008	08.10.23	09.10.23	1	GOE_01	BG	ok	Adults	Rummerstorfer/Lässer		23N038	Adults	12	Vetmeduni	-80°C	Pferdeklinik	Cx. pipiens/torrentia F				Maria Rummerstorfer	10.10.23

Abbildung 103: Tabelle der Proben: Rot = positive Pools; Isabella Lässer

Danksagung

Ein großer Dank gilt Dr. med. vet. Phebe de Heus DVM Dipl. ECEIM für die Betreuung über die gesamte Diplomarbeit hinweg und die sowohl hilfreichen theoretischen als auch praktischen Ratschläge.

Auch gilt mein Dank Dr. rer. nat. Hans-Peter Führer für die Möglichkeit meine Diplomarbeit in einem Interessanten Bereich zu schreiben, die Unterstützung und das Bereitstellen der Studentischen Mitarbeiterin Lisa Schlamadinger die meine Kollegin und mich tatkräftig bei der Identifikation und Differenzierung der Stechmücken unterstützt hat.

Weiters möchte ich mich bei Mag. rer. nat. Irina Preining für die tatkräftige Unterstützung im Labor bedanken.

Abschließend möchte mich außerdem bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, im Besonderen bei meinem verstorbenen Vater, Ing. Hans-Jörg Lässer (1959-2023), der mir alles in meinem bisherigen Leben ermöglicht hat. Ich hoffe, dass mein Vater, obwohl er das Ende meine Studienzeit nicht mehr miterleben konnte, meine persönliche Entwicklung gutheißen würde. Ich widme diese Arbeit meine Mutter Gisela Lässer-Dörner und meinem Vater Hans-Jörg Lässer.

DANKE euch allen!