

Aus dem Department für Pathobiologie
der Veterinärmedizinischen Universität Wien
Institut/Klinik für Parasitologie
(Leiterin: Univ. Prof. Dr. med. vet. habil. Anja Joachim)

**Equine West Nil Virus Infektionen in Ostösterreich - Eine
Untersuchung von Stechmücken bei in den Vorjahren
betroffenen Pferdkeppeln auf Flaviviren (2022)**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Katrin Samrock

Wien, Mai 2025

Betreuer:

Priv. Doz. Dr. Hans Peter- Fuehrer

Institut für Parasitologie, Veterinärmedizinische Universität Wien

Gutachterin:

Univ.-Prof. Dr.med.vet. Jessika-Maximiliane Cavalleri

Klinische Abteilung für Interne Medizin Pferde, Veterinärmedizinische

Universität Wien

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Diplomarbeit eigenständig und ohne unzulässige Hilfe angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und mich insbesondere keiner nicht offengelegten Hilfe Dritter bedient. Sämtliche Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Arbeiten anderer entnommen wurden, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Wien, den 16.05.2025

Katrin Samrock

„Wir können jederzeit etwas neues Lernen, vorausgesetzt wir glauben, dass wir es können.“

Virgina Satir (1916 - 1988)

Herzlichen Dank an Alle,
die mich dabei unterstützen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	4
2.1	Stechmücken der Gattung <i>Culex pipiens</i> s.l. und <i>Culiseta annulata</i>	4
2.2	<i>Culex pipiens</i> s.l.	4
2.3	<i>Culiseta annulata</i>	6
2.4	West Nil Virus	7
2.5	Virusbiologie	7
2.6	Lebenszyklus von WNV	7
2.7	Übertragung	8
2.8	Diagnostik der West-Nil-Virus-Infektion bei Equiden.....	9
2.9	Antemortem-Diagnostik	10
2.10	Postmortale Diagnostik.....	10
2.11	PCR.....	10
3	Material und Methoden	11
3.1	Sammlung, Konservierung und Identifikation der Stechmücken	11
3.2	Stechmückenfallen.....	11
3.3	Fangorte	12
3.4	Fangtermine	14
3.5	Artbestimmung	14
3.5.1	Bestimmungsschlüssel <i>Culex pipiens/torrentium</i>	17
3.6	Molekulare Analyse	18
3.6.1	Probenaufbereitung.....	18
3.6.2	DNA-Isolierung	19
3.6.3	RNA-Isolierung	19
3.6.4	Flaviviren Nested RT-PCR (NS51 und NS52).....	20
3.6.5	Filarioidea (Nematoden) COI Primer	22
3.6.6	Herstellung des Agarosegels	23
3.6.7	Gelelektrophorese.....	23
3.6.8	Sequenzierung	24
3.7	Datenanalyse	24

4	Ergebnisse	25
4.1	Morphologische- und molekulare Analyse	25
5	Diskussion	26
6	Schlussfolgerung	30
7	Abbildungsverzeichnis	31
8	Tabellenverzeichnis	31
9	Anhang	32
10	Danksagung	37
11	Literatur	38

Abkürzungsverzeichnis

<i>Ae. geniculatus</i>	<i>Aedes geniculatus</i>
<i>Ae. vexans</i>	<i>Aedes vexans</i>
bp	Basenpaar
CO ₂	Kohlendioxid
<i>Cs. annulata</i>	<i>Culiseta annulata</i>
<i>Cx. pipiens</i>	<i>Culex pipiens</i>
<i>D. immitis</i>	<i>Dirofilaria immitis</i>
<i>D. repens</i>	<i>Dirofilaria repens</i>
DNase	Desoxyribonuklease
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
HIT	Hämagglutinations-Hemmtest
IFA	Immunfluoreszenztest
ISFs	Insektenspezifische Flaviviren
MAC-ELISA	IgM-Capture-Enzyme-linked Immunoassays
min.	Minuten
PRNT	Plaque-Reduktions-Neutralisationstest
qRT-PCR	Quantitative RT-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonukleasen
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
s	Sekunden
<i>S. equina</i>	<i>Setaria equina</i>
<i>S. tundra</i>	<i>Setaria tundra</i>
SIE	Superinfektionsausschluss
TBE Puffer	Tris-Borate-EDTA
TCID ₅₀ /mL	Tissue Culture Infectious Dose 50%
UV	Ultraviolett
VNT	Virusneutralisationstest
WNV	West-Nil-Virus

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Studie wurde die Verbreitung von Stechmückenarten im Osten Österreichs und deren potenzielle Rolle bei der Übertragung von Flaviviren, insbesondere des West-Nil-Virus (WNV), untersucht. Im Sommer 2022 wurden über einen Zeitraum von vier Monaten (Juli bis Oktober) Stechmückenfallen an drei Standorten in Pferdeställen aufgestellt: dem Pferdestall der Veterinärmedizinischen Universität in Wien, einem Pferdestall in Gerasdorf und einem Pferdestall in Großmugl. Diese Standorte wurden gewählt, da sie in den Vorjahren positive Fälle von WNV aufwiesen. Ziel war es, die vorkommenden Culiciden-Stechmückenarten zu erfassen und ihre potenzielle Rolle bei der Übertragung von WNV und anderen Flaviviren zu untersuchen.

Insgesamt wurden 902 Stechmücken gefangen, darunter 891 weibliche Exemplare. Die morphologische Bestimmung ergab, dass 98 % der weiblichen Mücken der Art *Culex pipiens/torrentium* zugeordnet werden konnten. In einer Probe (P21) der Art *Culiseta annulata* wurde ein Flavivirus nachgewiesen, welcher eine 98%ige Übereinstimmung mit einem aus Portugal bekannten, insektenspezifischen Flavivirus aufwies. Dieses Flavivirus gehört nicht wie das West Nil Virus zu den Arboviren, sondern ist ein insektenspezifisches Flavivirus das ausschließlich Insekten infiziert und für Menschen und Wirbeltiere ungefährlich ist. Dennoch ist der Nachweis solcher insektenspezifischer Flaviviren von Bedeutung für das WNV-Monitoring, da er zeigt, dass die verwendeten molekularen Nachweismethoden grundsätzlich funktionieren und virale RNA in Stechmücken zuverlässig detektieren können. Das West Nil Virus wurde in keiner Stechmücke nachgewiesen. Die Analyse wurde mittels molekularer Methoden wie PCR und Gelelektrophorese durchgeführt, um das Vorhandensein von Flaviviren und Filarien zu untersuchen. Während im Jahr 2021 an denselben Standorten keine Flaviviren nachgewiesen wurden, konnte in der vorliegenden Arbeit ein insektenspezifisches Flavivirus identifiziert werden. Eine Untersuchung auf Filarien ergab hingegen keine positiven Ergebnisse. Die Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit eines kontinuierlichen Monitorings der Stechmückenpopulationen, um die Dynamik der WNV-Übertragung in Österreich besser zu verstehen.

Summary

As part of this study, the distribution of mosquito species in Eastern Austria and their potential role in the transmission of flaviviruses, particularly West Nile Virus (WNV), was investigated. During the summer of 2022, mosquito traps were deployed over a period of four months (July to October) at three horse stable sites: the horse stable of the University of Veterinary Medicine Vienna, in Gerasdorf, and the horse stable in Großmugl. These locations were selected because positive WNV cases had been reported in previous years. The aim was to identify the present culicid mosquito species and assess their potential role in the transmission of WNV and other flaviviruses.

A total of 902 mosquitoes were captured, including 891 female specimens. Morphological identification revealed that 98% of the female mosquitoes belonged to the species *Culex pipiens/torrentium*. In one sample (P21) from the species *Culiseta annulata*, a flavivirus was

detected, which showed 98% similarity to an insect-specific flavivirus previously identified in Portugal. Unlike West Nile virus, this virus does not belong to the arboviruses but is insect-specific, infecting only insects and posing no risk to humans or vertebrates. Nevertheless, the detection of such insect-specific flaviviruses is relevant for WNV monitoring, as it demonstrates that the molecular detection methods used are generally effective and capable of reliably identifying viral RNA in mosquitoes. WNV was not detected in any of the mosquito samples.

The analysis was conducted using molecular methods such as PCR and gel electrophoresis to detect the presence of flaviviruses and filarial helminths. While no flaviviruses were detected at the same locations in 2021, an insect-specific flavivirus was identified in the present study. However, no positive results were obtained for filarioid helminths. These findings underscore the necessity of continuous mosquito population monitoring to better understand the dynamics of WNV transmission in Austria.

1 Einleitung

Stechmücken (Diptera: Culicidae) sind weltweit verbreitete Insekten, die nicht nur als lästige Blutsauger bekannt sind, sondern auch als bedeutende Vektoren für verschiedene Krankheitserreger fungieren. Innerhalb der Familie Culicidae sind zahlreiche Arten dafür bekannt, Viren, Parasiten und Bakterien zu übertragen, die schwere Krankheiten bei Menschen und Tieren verursachen können. Ein besonders besorgniserregender Krankheitserreger, der durch Stechmücken übertragen wird, ist das West-Nil-Virus (WNV). Dieses Virus, erstmals 1937 bei einem Menschen in Uganda isoliert wurde, hat sich inzwischen global verbreitet. Später wurde der Virus in anderen Wirbeltieren wie Pferden, Fledermäusen, Nagetieren und Hunden gefunden (1).

Die Übertragung des West-Nil-Virus erfolgt hauptsächlich durch Mücken der Gattung *Culex*, aber auch andere Mückengattungen wie *Aedes* können als Vektoren fungieren (1). Die neuroinvasive Form der West-Nil-Virus (WNV)-Infektion stellt die schwerwiegendste Ausprägung der Krankheit dar. Diese Form tritt bei etwa einem Prozent der Infektionen sowohl bei Menschen als auch bei Pferden auf (2). Die Krankheitsverläufe beim Menschen variieren von milden fieberhaften Symptomen bis hin zu schweren neurologischen Erkrankungen wie Enzephalitis und Meningitis, die zu dauerhaften Schäden oder sogar zum Tod führen können. Pferde infizieren sich in der Regel durch den Stich infizierter Stechmücken und können Symptome wie Fieber, Ataxie, Schwäche der Vorder- und Hintergliedmassen, Kreisbewegungen, Tetraplegie, Krämpfe, Zungenlähmung, Miosis, Blindheit, Apathie und Festliegen zeigen (3). Die wachsende Gefahr durch Flavivirusinfektionen verdeutlicht die dringende Notwendigkeit eines nachhaltigen Vektorüberwachungssystems, eines effektiven Tiergesundheitsüberwachungssystems sowie eines angemessenen humanmedizinischen, aber auch pferdebezogenen Überwachungssystems zur frühzeitigen Erkennung von Flavivirusinfektionen. Das humanmedizinische Überwachungssystem umfasst dabei insbesondere die systematische Erfassung und Diagnostik von Infektionen beim Menschen, etwa durch Labortests und Meldepflichten, um Ausbrüche frühzeitig zu erkennen. Die Impfung stellt den zentralen Ansatz zur Prävention von Flavivirusinfektionen dar (4). Darüber hinaus spielen bestimmte Zugvogelarten eine entscheidende Rolle im Übertragungszyklus von Flaviviren, da sie zur Verbreitung dieser Viren über große Entfernungen beitragen können, insbesondere entlang der Zugrouten von Afrika nach Europa. Zu den Langstreckenziehern zählen beispielsweise der Gartenrotschwanz (*Phoenicurus phoenicurus*), der Trauerschnäpper (*Ficedula hypoleuca*) und der Teichrohrsänger (*Acrocephalus scirpaceus*). Sobald diese Viren eingeschleppt sind, können sie durch Kurzstreckenvögel und ortsansässige Vogelarten weiter verbreitet werden, darunter die Amsel (*Turdus merula*), das Rotkehlchen (*Erithacus rubecula*) oder die Mönchsgrasmücke (*Sylvia atricapilla*) (5). Für das FSME-Virus ist ein endemischer Status bei Equiden in Österreich belegt, während beim West Nile Virus serologische Hinweise auf eine beginnende endemische Etablierung vorliegen (6). Im östlichen Teil Österreichs wurde das WNV der Linie zwei erstmals 2008 bei Wildvögeln diagnostiziert und konzentrierte sich hauptsächlich auf Habichte und andere Greifvögel. Es wurden auch infizierte

Mücken/Stechmücken gefunden (7, 8). Die erste dokumentierte Serie von neuroinvasiven West-Nil-Erkrankungen bei Pferden in Österreich umfasst sieben bestätigte Fälle, die im Zeitraum von Sommer und Herbst der Jahre 2016 bis 2018 auftraten, unterstreicht die Notwendigkeit einer verstärkten Überwachung und Diagnostik von WNV-Infektionen bei Equiden. Sie betont zudem die Bedeutung von Pferden als Sentinel-Spezies für die Überwachung von West-Nil-Virus-Infektionen, die sowohl die Human- als auch die Veterinärmedizin betreffen. Pferde können somit zum One-Health-Konzept beitragen, indem sie frühzeitig auf potenzielle Gefahren für die menschliche Gesundheit hinweisen (9). Der Klimawandel und damit verbundene Temperaturschwankungen sowie extreme Wetterereignisse wie Dürreperioden, starke Regenfälle und Überschwemmungen erschweren die Beurteilung der Epidemiologie von WNV erheblich. Diese Umweltfaktoren beeinflussen den Vogelzug, die Population und Dynamik von Vektoren (z.B. *Culex* spp.) sowie die Virusreplikation innerhalb dieser Vektoren (10). Somit haben ökologische Parameter wie Niederschlagsdauer, Sonneneinstrahlung, Lufttemperatur und Donauwasserstand, besonders in Ostösterreich, einen Einfluss auf die saisonale und räumliche Verbreitung des *Culex pipiens*-Komplexes und *Culex torrentium* (11).

Durch die Auswirkungen des Klimawandels und der Globalisierung werden vermehrt nicht – einheimische Stechmückenarten und die von ihnen übertragenen Krankheitserreger, wie Dirofilarien, nach Mitteleuropa eingeschleppt. In Österreich wurden insgesamt 52 Stechmückenarten dokumentiert, von denen vier als nicht indigene Arten gelten. Hierzu zählen die japanische Buschmücke (*Aedes japonicus*), die asiatische Tigermücke (*Aedes albopictus*), *Culiseta longiareolata* und *Anopheles hyrcanus* (12).

Filarioide Nematoden sind ebenfalls Parasiten von Pferden und kommen in verschiedenen Geweben des Körpers vor. Eine häufige Art, *Setaria equina*, befindet sich typischerweise als adulter Wurm in der Bauchhöhle von Pferden, während Mikrofilarien in peripheren Blut zirkulieren (13).

Infektionen mit *S. equina* verlaufen oft asymptomatisch oder nur mit milden klinischen Erscheinungen. In einer Studie aus Ungarn wiesen 9,2 % der analysierten Pferde Mikrofilarien im Blut auf. Wahrscheinlich gibt es eine Verbindung zwischen der Häufigkeit der Mikrofilarien und dem Vorhandensein von stehenden Gewässern. Diese Parasiten werden hauptsächlich von *Culex* und *Aedes* übertragen (14).

Molekulare Charakterisierungsstudien, wie die Untersuchung des Cytochrom-c-Oxidase-Gens, zeigen, dass *S. equina* eng mit anderen Filarienarten wie *Setaria tundra* verwandt ist. Gemeinsam bilden sie eine monophyletische Gruppe, die auch phylogenetische Verbindungen zu Gattungen wie *Onchocerca* spp. und *Dirofilaria* spp. aufweist (15).

In Österreich gibt es kompetente Vektoren für die Übertragung von *Dirofilaria repens* und *Dirofilaria immitis*, die Teil des heimischen Culicidae-Arteninventars sind. Es wurden mögliche autochthone Fälle von *Dirofilaria repens* bei Hunden und einem Menschen festgestellt, was darauf hindeutet, dass sich dieser Parasit in bestimmten Regionen, wie im Burgenland, bereits etabliert hat. Bei *Dirofilaria immitis* gibt es derzeit noch keine Hinweise auf eine autochthone

Verbreitung in Österreich, allerdings könnten zukünftige Entwicklungen dies ändern. Die am häufigsten vorkommenden Mückenarten, *Aedes vexans* und der *Culex pipiens* Komplex, gelten als potenzielle Vektoren für beide Parasiten. Die Hauptwirte der filarioiden Helminthen sind domestizierte und wildlebende Hundeartige. Beide Arten sind auch als Erreger von Zoonosen bekannt, insbesondere subkutaner (*D. repens*), pulmonaler (*D. immitis*) und okulärer (*D. repens*) Dirofilariose (16).

Beide Formen der Dirofilariose sind in Ungarn endemisch, wobei insbesondere die Herzwurmerkrankung in den östlichen Gebieten des Landes bei einheimischen Haushunden weit verbreitet sind (17).

In dieser Diplomarbeit wird das Risiko von West-Nil-Virus (WNV)-Infektionen in der Nähe von Pferdekoppeln im Osten Österreichs untersucht. Dazu werden Stechmücken sowohl morphologischen als auch molekularen Analysen unterzogen, um das Infektionsrisiko zu bewerten und gleichzeitig einen Überblick über die vorkommenden Mückenarten zu gewinnen. Zudem wird die Prävalenz von Filarien in den Stechmücken ermittelt. Die Auswahl der Standorte basiert auf den gleichen Orten, die bereits in der im Jahr 2021 durchgeführten Diplomarbeit von Julia Wigger untersucht wurden (18). Ziel dieser Arbeit ist es, die Entwicklungen und Ergebnisse im Vergleich zu der vorherigen Studie zu betrachten.

2 Literaturübersicht

2.1 Stechmücken der Gattung *Culex pipiens* s.l. und *Culiseta annulata*

2.2 *Culex pipiens* s.l.

Der *Culex pipiens*-Komplex in Europa umfasst mehrere Arten und Biotypen, darunter *Cx. pipiens pipiens*, *Cx. pipiens molestus*, *Cx. quinquefasciatus*. Obwohl *Cx. torrentium* morphologisch ähnlich ist und in derselben geografischen Region vorkommt, gehört diese Art nicht zum Komplex, sondern stellt eine eigenständige Spezies dar. Diese Mückenarten sind oft schwer anhand ihres Aussehens zu unterscheiden, besonders die Weibchen und Larven. Während früher *Cx. pipiens molestus* als Unterart von *Cx. pipiens pipiens* galt, zeigen neuere genetische Untersuchungen, dass es signifikante Unterschiede zwischen den beiden gibt. *Cx. pipiens pipiens* und *Cx. torrentium* sind genetisch unterschiedliche Arten, die jedoch in manchen Lebensstadien ähnlich aussehen (19). Die Identifizierung von weiblichen *Culex*-Arten, die morphologisch kaum zu unterscheiden sind, ist mit molekularen Methoden möglich. So kann beispielsweise das Gen der mitochondrialen Cytochrom-Oxidase c-Untereinheit I zur Unterscheidung von *Cx. torrentium* und anderen Taxa des *Cx. pipiens*-Komplexes herangezogen werden. Allerdings haben Versuche, Hybride zwischen diesen Taxa über Längenvariationen im Dinukleotid-Mikrosatelliten-Locus CQ11 zu identifizieren, möglicherweise zu fehlerhaften molekularen Bestimmungen von *Cx. torrentium* und *Cx. pipiens*-Formen geführt (11). Bei den männlichen *Culex*-Arten gibt es jedoch einige morphologische Unterschiede, die eine Unterscheidung erleichtern (19). Entweder durch die Struktur des Phallosoms auf dem Hypopygium oder durch die Chaetotaxie. Allerdings sind weder Männchen noch Larven für rein epidemiologische Studien von großem Interesse. Arten des *Culex pipiens*-Komplexes spielen eine zentrale Rolle bei der Übertragung von Krankheitserregern wie filarioiden Helminthen (*Dirofilaria* spp.) und Erregern aviärer Malaria (*Plasmodium* spp.). Sie gelten als Hauptvektoren für das West-Nil-Virus und sind zudem hochkompetente Vektoren für das Usutu-Virus. Darüber hinaus fungieren *Cx. pipiens* f. *pipiens* und *Cx. torrentium*, die als vorwiegend ornithophil gelten, als Vektoren des Sindbis-Virus, wobei sie sich in ihrer Effizienz der Virusübertragung unterscheiden (11).

Morphologie

Culex pipiens ist eine mittelgroße Mückenart (4-10 mm), die durch ihre bräunliche Körperfärbung und das Fehlen auffälliger spezifischer Muster charakterisiert ist. Morphologisch unterscheidet sie sich von anderen Mückenarten, mit Ausnahme der Arten der Untergruppe *pipiens*, durch ihren Rüssel, der auf der Rückseite ausschließlich dunkle Schuppen aufweist, und Beine, die kein auffälliges Ringmuster aus hellen und dunklen Bereichen zeigen. Auf den Rückensegmenten besitzt *Culex pipiens* gelbliche Basalbänder, und der Hinterleib ist abgerundet (20).

Die Weibchen besitzen ein stechend-saugendes Mundwerkzeug mit einem ungegliederten Stechrüssel. Im Gegensatz dazu ist das Mundwerkzeug der Männchen zurückgebildet und nicht zum Blutsaugen geeignet, wie es bei den Weibchen der Fall ist. Die 15-gliedrigen Antennen

der Weibchen mit kurzen Haaren besetzt, während sie bei den Männchen meist stark gefiedert sind (21).



Abbildung 1: Gemeine Stechmücke: *Culex pipiens*. (Quelle: DeVries P., Wikipedia. <https://de.wikipedia.org>, Zugriff am 06.11.2024.

Entwicklung

Nach dem Schlüpfen der Imagines erfolgt die Paarung, wobei der Flügelschlag der Männchen artspezifische Sirrtöne erzeugt, die die Weibchen anlocken. Die meisten Weibchen benötigen zur Eiproduktion eine Blutmahlzeit, mit Ausnahme autogener Arten, die ihre ersten Eier ohne Blutaufnahme ablegen. Die Eier werden in Schüben von 100–150 Eiern entweder einzeln oder in „Gelegeschiffchen“ auf stehende Gewässer gelegt. Die Larven schlüpfen im Wasser, durchlaufen vier Stadien und entwickeln sich zur Puppe, die sich ebenfalls im Wasser bewegt. Die Entwicklungszeit bis zum adulten Stadium variiert je nach Art und Umweltbedingungen zwischen 8 und 21 Tagen. Je nach Gattung überwintern die Eier (*Aedes*), Larven (*Coquillettidia*) oder begattete Weibchen (andere Gattungen).

Habitat und Epidemiologie

Die in Mitteleuropa vorkommenden Stechmückenarten besiedeln spezifische Habitate. *Aedes*-Arten wie *Aedes vexans* und *Ae. sticticus* sind als Überschwemmungsmücken in Auwäldern zu finden, während Waldmücken wie *Ae. cantans* eher in Waldtümpeln vorkommen. Potentiell

invasive Arten wie *Ae. japonicus* entwickeln sich sowohl in künstlichen Wasseransammlungen im Siedlungsbereich als auch in natürlichen Wasseransammlungen im Wald. Gattungen wie *Culex* und *Culiseta* sind vorwiegend als Hausmücken bekannt, während *Anopheles*-Arten teils in der Natur, teils in der Nähe des Menschen vorkommen. Viele Arten überwintern als begattete Weibchen und legen im Frühjahr ihre Eier ab, wobei Aedes-Arten durch Überflutungen zum Schlupf angeregt werden.

Feuchte und warme Sommer begünstigen durch schnellen Generationswechsel die Massenvermehrung von Stechmücken. Einige Arten, wie *Culex pipiens*, können bis zu 6–7 Generationen pro Jahr haben, während andere, wie *Coquillettidia*, nur eine Generation entwickeln. Die meisten Stechmücken sind dämmerungsaktiv, jedoch stechen einige Arten, darunter invasive *Aedes albopictus* und *Ae. japonicus*, auch tagsüber. Weibchen der meisten Arten saugen Blut von verschiedenen Wirbeltieren, wobei einige spezialisierte Präferenzen für bestimmte Wirte wie Vögel oder Säugetiere aufweisen. Viele *Culex*, *Culiseta* und *Anopheles*-Arten dringen zudem häufig in Gebäude ein (21).

2.3 *Culiseta annulata*

Das Weibchen von *Culiseta annulata* ist eine große, dunkelbraune Mücke mit weißlichen Markierungen auf Abdomen und Beinen. Charakteristisch sind der gesprenkelte Rüssel mit hellen und dunklen Schuppen und die subapikalen weißlichen Ringe auf den Beinen. Diese Mückenart ist oft in künstlichen Wasserbehältern wie Regentonnen zu finden und kann Menschen und Tiere tagsüber und nachts stechen. Das Männchen weist weniger auffällige Merkmale auf, jedoch sind die Genitalstrukturen wie der konische Gonocoxit und der lange, schlanke Gonostylus für die Identifikation von Bedeutung. Die Männchen spielen eine Rolle bei der Fortpflanzung, nehmen jedoch kein Blut auf (1).

Biologie

Culiseta. annulata legt Eier in Gelegen von ca. 200 Eiern auf die Wasseroberfläche ab. Die Larven schlüpfen in stehenden Gewässern drei bis fünf Tage nach Eiablage. Die Larven zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, in salzhaltigen oder stark stickstoffhaltigen Gewässern zu überleben. Die Larvenentwicklung hängt von den Temperaturen ab: Bei 20–23°C dauert die Entwicklung etwa 18 Tage, während sie bei 24–27°C rund 16 Tage benötigt. Die Art kann 1–3 Generationen pro Jahr entwickeln und überwintert typischerweise im adulten Stadium. Die ersten Weibchen werden im Frühling aktiv, wenn sie ihre Winterquartiere verlassen. Weibchen stechen sowohl tagsüber als auch nachts und können sowohl Menschen, Tiere als auch Vögel befallen. Sie bevorzugen ruhige, stehende Gewässer, sowohl natürlich als auch künstlich (1).

Die Rolle von *Culiseta annulata* in der Epidemiologie des West-Nil-Virus in Europa

Wie *Culex pipiens* kann auch *Culiseta annulata* WNV übertragen, wenn auch weniger effizient und spielt keine Schlüsselrolle als Vektor für das West-Nil-Virus, obwohl ihre Anwesenheit im Rahmen der Untersuchungen von Bedeutung ist und sie in der Mückenpopulation in Europa vorkommen. Sie spielen jedoch eine Rolle in der Epidemiologie dieser Viren in Europa (22).

2.4 West Nil Virus

Das West-Nil-Virus (WNV) ist ein zoonotisches Flavivirus, das durch Mücken der Gattung *Culex* übertragen wird. Es gehört zum Serokomplex des Japanischen Enzephalitis-Virus und wurde erstmals 1937 in der West-Nil-Provinz Ugandas isoliert. Obwohl das Virus zunächst als wenig bedeutend für den Menschen angesehen wurde, da es meist subklinische Infektionen verursachte, ist es mittlerweile für zahlreiche Morbiditäts- und Mortalitätsfälle bei verschiedenen Tierspezies verantwortlich, darunter Vögel, Pferde, Schafe, Reptilien, Katzen und Nagetiere. In den letzten zwei Jahrzehnten sind die Erkrankungsfälle bei Menschen und Pferden deutlich gestiegen (2). Flaviviren gehören meist zu den Arboviren, die von Arthropoden übertragen werden und sich in diesen vermehren können (23). Aufgrund seiner weiten geografischen Verbreitung gilt das West-Nil-Virus als das weltweit am häufigsten verbreitete Arbovirus (24).

2.5 Virusbiologie

Das West-Nil-Virus (WNV) gehört zu den Flaviviren und hat ein etwa 11 kb langes, positivsträngiges, einzelsträngiges RNA-Genom (ssRNA(+)). Dieses Genom ist von einem umhüllten, ikosaedrischen Nukleokapsid umgeben, wobei die reifen Virionen eine kugelförmige Form mit einem Durchmesser von etwa 50 nm haben. Das Genom kodiert ein Polyprotein, das in Struktur- und Nichtstrukturproteine gespalten wird (2).

2.6 Lebenszyklus von WNV

Flaviviren wechseln nicht immer zwischen Wirbeltieren und Arthropoden. Einige von ihnen besitzen ein wirtsspezifisches Spektrum, das auf Wirbeltiere beschränkt ist, während andere ausschließlich insektenspezifisch sind. Die wirbeltierspezifischen Flaviviren, auch bekannt als NKV-Flaviviren (No Known Vector), lassen sich in zwei Kategorien einteilen: Viren, die nur aus Nagetieren isoliert wurden (z. B. das Modoc-Virus, MODV), und Viren, die ausschließlich aus Fledermäusen stammen (z. B. das Rio-Bravo-Virus) (25).

Der Lebenszyklus des West-Nil-Virus (WNV) umfasst verschiedene Akteure: Virusreservoirs, Moskitovektoren und End- oder Zwischenwirte. Vögel fungieren häufig als Reservoirs und beherbergen das Virus, oft ohne klinische Symptome zu zeigen. Moskitos unterstützen die Virusreplikation und dienen als Vektoren. End-, wie z. B. Pferde und Menschen, werden hauptsächlich während der Blutmahlzeit der Mücke infiziert, wenn der Virusgehalt im Speichel der Mücke 10^4 TCID₅₀/mL (Tissue Culture Infectious Dose 50%) übersteigt. Diese Wirte können dann klinische Symptome der Krankheit entwickeln. Endwirte sind im Allgemeinen Sackgassenwirte für das West-Nil-Virus (WNV), da sie das Virus nicht weiterverbreiten können. Eine Ausnahme bilden Krokodile, die das Virus auch amplifizieren können (2). Kompetente Mückenvektoren nehmen das Virus während einer Blutmahlzeit von einem virämischen Wirbeltierwirt auf. Nach der Aufnahme gelangt das WNV in den Mitteldarm der Mücke, wo es sich vermehrt und sich anschließend auf die Speicheldrüsen ausbreitet. Bei der nächsten Blutmahlzeit kann die Mücke das Virus dann auf den Endwirt übertragen (2).

Virusfreisetzung

Die neu gebildeten Virionen knospen ins ER und reifen entlang des Sekretionswegs, bevor sie die Zelle verlassen. Cholesterin und Fettsäuren unterstützen die durch WNV induzierten Membranumlagerungen. Zudem spielt die Proteasomaktivität eine wichtige Rolle bei der viralen Replikation und der Unterdrückung der angeborenen Immunantwort durch Eingriffe in den Interferon-Signalweg (3).

Zelluläre Reaktionen

Die Ansammlung von viraler RNA und NS-Proteinen im ER führt zu ER-Stress, aktiviert die ungefaltete Proteinantwort und fördert die Apoptose der infizierten Zellen. Diese Prozesse sind entscheidend für die virale Pathogenese und die Übertragung des WNV (3).

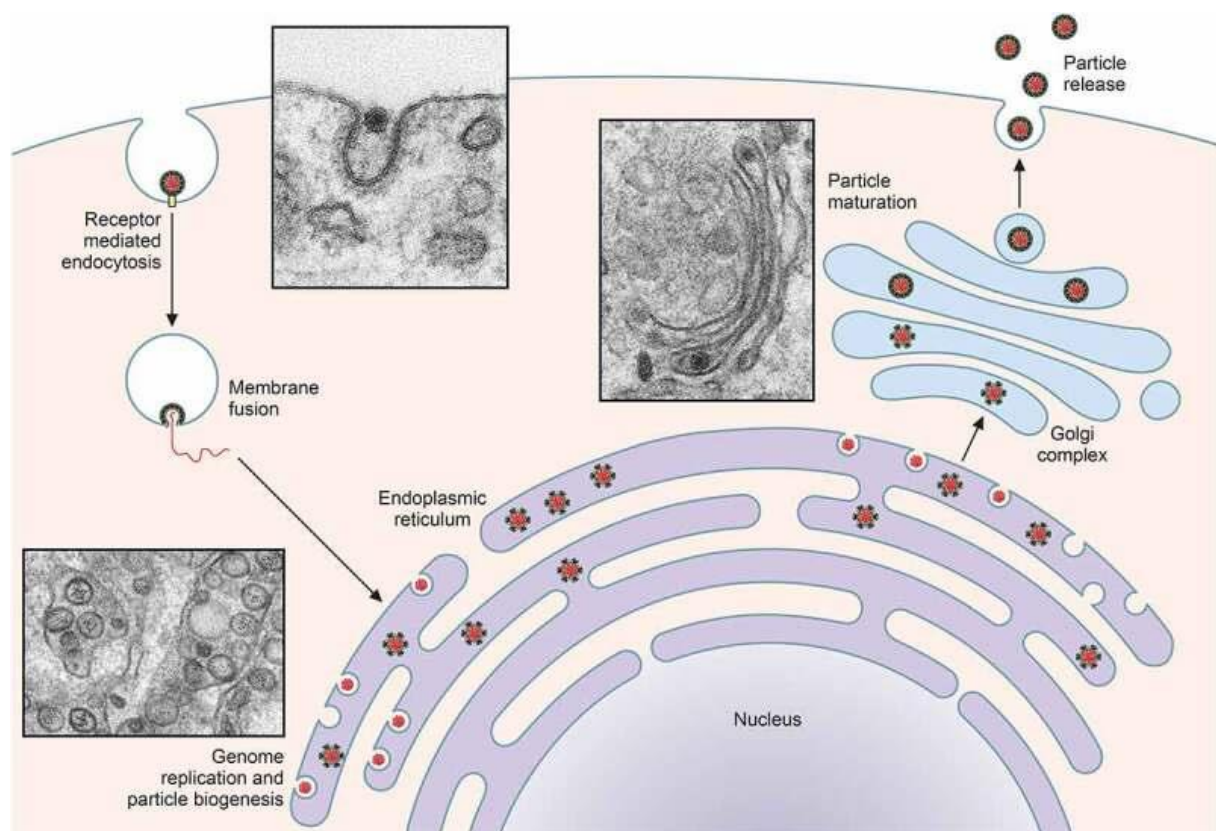


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Infektionszyklus des WNV (3).

2.8 Diagnostik der West-Nil-Virus-Infektion bei Equiden

Die Diagnostik einer WNV-Infektion bei Pferden stützt sich auf klinische, geografische, saisonale und labordiagnostische Parameter. Der Verdacht ergibt sich in der Regel bei neurologischen Symptomen im Spätsommer oder Herbst bei ungeimpften oder unzureichend geimpften Pferden in bekannten WNV-Endemiegebieten. Differentialdiagnostisch müssen

andere neurotrope Erreger wie Tick-Borne Encephalitis Virus (TBEV), Usutu-Virus (USUV), Equine Herpesvirus Typ 1 (EHV-1), Bornavirus, Tollwut sowie toxische und traumatische Ursachen berücksichtigt werden (26).

2.9 Antemortem-Diagnostik

Ein zuverlässiger direkter Erregernachweis per RT-PCR aus Blut oder Liquor cerebrospinalis (CSF) gelingt nur selten, da die Virämie bei Pferden schwach ausgeprägt und kurzzeitig ist. Deshalb sind serologische Verfahren derzeit das wichtigste diagnostische Instrument. Der Nachweis von IgM-Antikörpern gegen WNV mittels MAC-ELISA gilt im europäischen Kontext als sensitiv und spezifisch zur antemortalen Diagnostik, sowohl im Serum als auch in der Zerebrospinalflüssigkeit (Liquor). Diese Antikörper lassen sich in der Regel zwischen dem vierten und sechsten Tag nach Krankheitsbeginn nachweisen und können bis zu sechs Wochen persistieren. Allerdings kann auch IgM nach einer Impfung sowohl rekombinant als auch mit inaktivierten Impfstoffen bis zu 52 Tage lang nachgewiesen werden, was die Interpretation erschwert. Als besonders aussagekräftig gilt der Nachweis von IgM im Liquor, sofern keine Blutkontamination vorliegt. Dieser intrathekale Antikörpernachweis spricht für eine zentralnervöse Infektion mit WNV. Zum Bestätigungstest dient der Plaque-Reduktions-Neutralisationstest (PRNT) oder der Serumneutralisationstest (SN). Der PRNT gilt als Goldstandard, insbesondere bei ungeimpften Pferden. Bei geimpften Tieren ist die Interpretation erschwert, da auch die Impfung neutralisierende Antikörper induziert. Eine vierfache Titerveränderung in gepaarten Serumproben (akut vs. rekonvaleszent) ist diagnostisch beweisend. Kreuzreaktionen mit anderen Flaviviren (z. B. TBEV, USUV, JEV) sind möglich, insbesondere bei IgG-Tests. Zusätzlich können komplettes Blutbild, klinisch-chemische Parameter sowie eine CSF-Analyse Hinweise auf alternative Ursachen oder systemische Effekte liefern. Typische Befunde bei WNV-infizierten Pferden sind u. a. eine milde Lymphopenie oder eine mononukleäre Pleozytose im Liquor. (26).

2.10 Postmortale Diagnostik

Die Diagnose kann post mortem durch den Nachweis des Virus in Gehirn- oder Rückenmarksgewebe bestätigt werden. Die sensibelste Methode ist die RT-PCR auf frischem oder formalinfixiertem Nervengewebe. WNV-RNA findet sich bevorzugt im Thalamus, Hypothalamus, der Medulla oblongata und im Rückenmark, wobei die höchste RNA-Konzentration typischerweise in der Medulla gefunden wird. Weitere Nachweismethoden sind Virusisolierung aus Gehirngewebe in Zellkultur oder durch Inokulation bei neugeborenen Mäusen oder Immunhistochemie (IHC) und In-situ-Hybridisierung (ISH), diese Verfahren sind jedoch bei WNV weniger sensitiv als bei anderen Enzephalitiden, da die Viruslast im Gehirn oft gering ist. Für eine aussagekräftige postmortale Diagnostik wird empfohlen, mehrere Hirnregionen und das Rückenmark zu untersuchen, um die Nachweiswahrscheinlichkeit zu erhöhen. (26).

2.11 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode der modernen molekularen Klonierung, die es ermöglicht, eine bestimmte DNA-Sequenz in einer komplexen und großen

DNA-Probe, wie z.B. einem Säugetiergenom, schnell und gezielt zu vervielfältigen. Die Technik ist einfach, kostengünstig und erfordert lediglich Kenntnisse über die Nukleotidsequenz des Zielabschnitts. PCR zeichnet sich durch Robustheit, Schnelligkeit, Flexibilität und hohe Empfindlichkeit aus. Seit ihrer Entwicklung in den 1980er Jahren wurde die PCR für viele Anwendungen in der Molekularbiologie angepasst, darunter DNA-Sequenzierung, in vitro Mutagenese, Mutationserkennung und Klonierung von cDNA und genomischer DNA. Das Verfahren basiert auf einem Temperaturzyklus, der DNA-Synthese durch hitzestabile DNA-Polymerasen ermöglicht.

Jeder Zyklus besteht aus drei Phasen: Denaturierung der Template-DNA durch Hitze (meist $> 90^{\circ}\text{C}$), Anlagerung von Oligonukleotid-Primer an die denaturierte Template-DNA (Der Primer ist üblicherweise 20-25 Nukleotide lang) und Verlängerung der Primer durch Polymerase an den 3'-Enden (Die Verlängerung der Primer erfolgt bei Temperaturen zwischen 55°C und 70°C). Dieser Zyklus wird etwa 25 bis 35 Mal in einem Thermocycler wiederholt, wobei die Zielsequenz in jeder Runde verdoppelt wird. Die Effizienz der PCR kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden, wie z.B. Inhibitoren, die Beschaffenheit der DNA-Polymerase und die Qualität der Vorlage-DNA (27).

3 Material und Methoden

3.1 Sammlung, Konservierung und Identifikation der Stechmücken

Die Sammlung der Stechmücken erfolgte im Sommer 2022 über einen Zeitraum von vier Monaten (Juli bis Oktober). Die gefangenen Stechmücken wurden anschließend ins Labor transportiert und dort bei -80°C eingefroren. Durch das Einfrieren wurde sichergestellt, dass die Stechmücken vor dem Öffnen der Fangnetze flugunfähig und tot waren. Im Labor wurden die Stechmücken taxonomisch auf Art und Gattung bestimmt. Detaillierte Informationen zur Artenbestimmung sind im Kapitel 3.5 beschrieben. Nach der taxonomischen Bestimmung wurden die Stechmücken für molekularbiologische Analysen aufbereitet.

3.2 Stechmückenfallen

Für die Stechmückenfallen wurde das Model BG-Sentinel und das Model BG-Sentinel 2 der Firma Biogents verwendet (DE, Regensburg). Die Stechmückenfallen bestehen aus zusammenfaltbaren Stoffbehälter mit einem weißen Deckel, dessen Öffnung mit Löchern versehen ist. Der Fangbeutel liegt über dem Ventilator und konnte problemlos entnommen werden. Der Lüfter an der Basis der Falle saugt die angelockten Stechmückenpopulationen in den Fangbeutel. Der Kontrast zwischen heller Oberfläche und dunklem Zentrum stellt für Stechmücken einen attraktiven Reiz dar. Um die Fangleistung zu erhöhen ist dem Luftstrom zusätzlich ein Lockstoff aus Kohlendioxid (CO_2) zugeführt worden. Der Lockstoff besteht aus zwei Liter warmen Wasser (38°C), 500g Zucker und Biogents BG- CO_2 Pulver (20 g). In dem BG- CO_2 -Pulver sind verschiedene Hefestämme und Nährstoffe enthalten. Somit konnte eine CO_2 Produktion für 24h gewährleistet werden. Der Lockstoff wurde in dem Mischbeutel von Biosgents vermengt und in die vorgesehene Tragetasche gegeben. Diese wurde anschließend mittels eines Schlauchs mit der Stechmückenfalle verbunden. Durch das Gegenstromprinzip werden die Stechmücken in die Fallen gezogen und bleiben in den Fangbeutel hängen. Somit

ergibt sich eine Fangmethode aus einer Kombination von chemischen, physikalischen und optischen Reizen. Als Stromquelle für den Ventilator wurden Autobatterien verwendet. Diese wurden durch einen Eimer vor Regen geschützt. Auch die Stechmückenfallen wurden an regnerischen Tagen durch ein Plastikdach geschützt.

Die Stechmückenfallen wurden vormittags aufgestellt und am Folgetag, nach 24 Stunden, wieder abgebaut. Die gefangenen Stechmücken wurden anschließend ins Labor der Parasitologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien gebracht und dort für mindestens zwei Stunden bei -80°C eingefroren. Dabei war es wichtig, dass die Stechmücken unverseht transportiert werden, um ein Abbrechen der Flügel und der Beine zu verhindern. Zuerst wurden die drei Fallen an dem Standort PF1 (Veterinärmedizinische Universität Wien) aufgestellt und im Anschluss die Standorte PF2 und PF3. Die Entnahme der Fangbeutel mit den darin enthaltenen Stechmücken erfolgte bei laufendem Ventilator, um ein Entweichen der gefangenen Exemplare zu verhindern. Anschließend wurde jede Probe in Plastikbehälter gegeben um diese vor dem Transport zu schützen. Die Proben wurden jeweils mit dem Datum der Abholung, Abkürzung für den jeweiligen Pferdestall und Standortbezeichnung beschriftet. Beispiel für die Bezeichnung im Pferdestall PF1: BG_PF1_01_20220701.

3.3 Fangorte

Die Standorte der Fallen wurden weitgehend vom Vorjahr übernommen. Diese Standorte wurden zum Schutz vor etwaigen Wetterverhältnissen ausgewählt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Fallen im Schatten stehen, um übermäßiges Aufheizen der isolierten Taschen zu verhindern.

Insgesamt wurden drei Pferdeställe ausgewählt, bei denen jeweils in den Vorjahren positive Fälle von WNV dokumentiert worden sind (PLZ: 1010, 2201 und 2002). In jedem Stall wurden drei Fallen an drei unterschiedlichen Standorten ausgewählt, die jeweils genügend Distanz zueinander hatten. Das ergibt neun Lokalisationen mit insgesamt neun Fallen und Proben. Die Pferdeställe wurden mit folgendem Schema nummeriert: Jeder Pferdestall wurde mit einer Abkürzung (PF) und einer eigenen Nummer versehen. Die Abkürzung PF bedeutet Pferdeprojekt. Die Veterinärmedizinische Universität in Wien: PF1, der Pferdestall in Gerasdorf bei Wien: PF2 und der Pferdestall in Großmugl : PF3. Bei jedem Pferdestall wurden den drei Standorten jeweils noch eine Nummer 01, 02 und 03 hinzugefügt. Nummerierung und Bilder zu den Standorten sind unter der Tabelle 1 zu entnehmen. Eine Übersicht über die Standorte ist in der Abbildung vier zu sehen.

Tabelle 1: Übersicht der aufgestellten Fallen und Standorte nach der Postleitzahl

Kürzel des Standorte	Beschreibung des Standortes und PLZ	Bild der Falle am Standort
PF1_01	1010 Neben Pferdestall	
PF1_02	1010 Neben den Haflinger	
PF1_03	1010 Neben den Schafen	
PF2_01	2201 hinter der Longierhalle	
PF2_02	2201 neben den Stallgebäuden	
PF2_03	2201 neben der Hütte an der Reitbahn	
PF3_01	2002 neben Mitsthaufen	
PF3_02	2002 neben der Koppel	
PF3_03	2002 Hinter der Koppel	

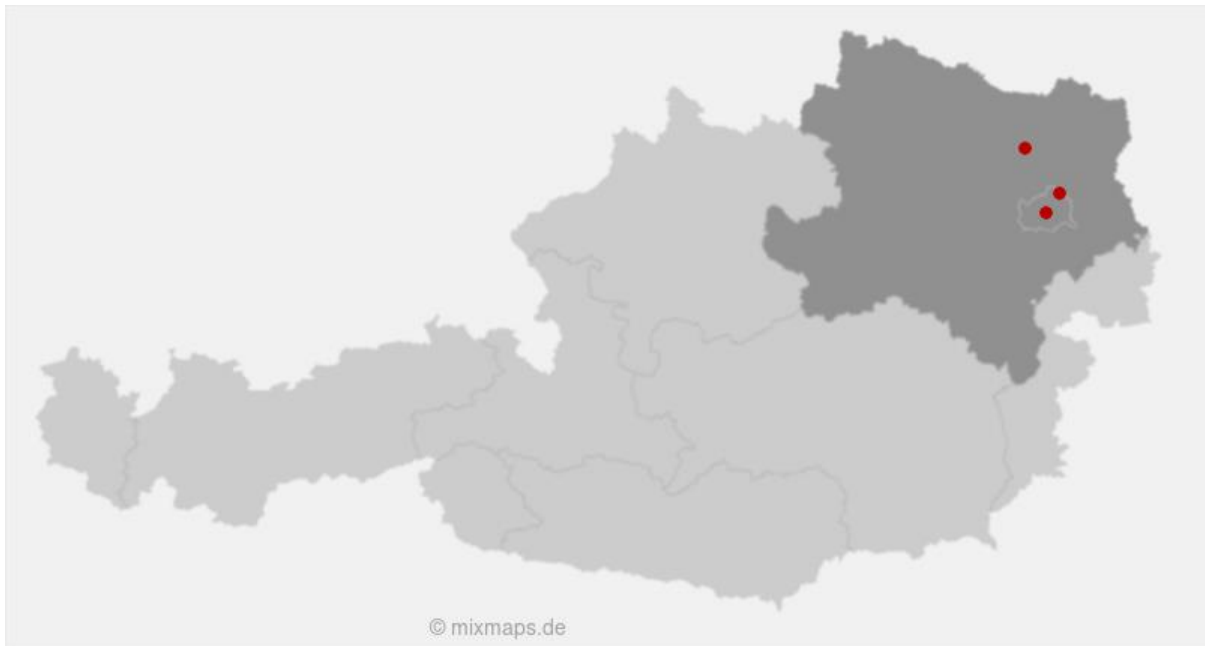


Abbildung 4: Karte der Standorte Wien und Niederösterreich

3.4 Fangtermine

Die Probennahme erfolgte zwischen Juli und Oktober 2022 mit jeweils zwei Fallenaufstellungen pro Monat. Die erste Aufstellung erfolgte am 01.07.2022, die letzte Probenentnahme am 27.10.2022. Eine Übersicht der genauen Fangtermine befindet sich in Tabelle acht im Anhang.

3.5 Artbestimmung

Die bereits eingefrorenen Beutel mit den darin enthaltenen Stechmücken wurden unmittelbar vor der Bestimmung mit dem Stereomikroskop des Modells SMZ1270 der Marke Nikon aus dem Tiefkühler genommen. Die Beutel wurden geöffnet und die dort enthaltenen Populationen wurden in eine durchsichtige Petrischale überführt. Auf der Petrischale wurden die Stechmücken von dem Beifang getrennt. Als Beifang wurde jedes Individuum bezeichnet, das nicht zur Familie der Stechmücken gehört, wie beispielsweise Schnecken oder Fliegen. In einigen Beuteln waren Schnecken enthalten, was zu Verklebungen führte. Dies trat nicht auf, wenn die Schnecken direkt nach Entnahme aus dem Tiefkühler entfernt wurden. Die Schnecken wurden direkt nach der Entnahme entsorgt.

Jede einzelne Stechmücke wurde mittels einer Sonde und einer Federpinzette bestimmt. Zur genaueren Identifizierung auf Art und Gattung wurde der Bestimmungsschlüssel aus „Mosquitoes: Identification, Keys; Morphology“ verwendet (28). So konnten die Individuen präzise identifiziert werden. Die weiblichen Stechmücken wurden auf Artniveau bestimmt, da sie für die Übertragung von Filarien und WNV von Interesse sind. Die männlichen

Stechmücken wurden lediglich auf Gattungsniveau bestimmt und nicht weiter berücksichtigt, da sie nicht blutsaugend sind und somit für die molekulare Analyse in dieser Arbeit keine Relevanz hatten.

Eine Übersicht der morphologischen Strukturen stellt die Abbildung 11 dar.

Zuerst wurde zwischen männlichen und weiblichen Stechmücken unterschieden. Männliche Stechmücken haben buschige Antennen im Gegensatz zu den weiblichen Stechmücken. Anschließend wurden anhand des Bestimmungsschlüssels die genauen Genera bestimmt. Besondere Merkmale zur Erkennung der Art *Culex pipiens/torrentium* sind unter 3.5.1. zu entnehmen. Da diese beiden Arten morphologisch nicht unterschieden werden konnten, wurden sie gemeinsam in ein Probenbehältnis gesammelt. Bilder einiger gefangener Stechmücken sind unter den Abbildungen 5,6,7,8,9 und 10 zu entnehmen. Diese wurden während der Bestimmung mit dem Stereomikroskop aufgenommen und gespeichert. Die nach dem Bestimmungsschlüssel identifizierten Stechmücken wurden jeweils in ein Eppendorfgefäße überführt. Pro Gefäß konnten bis zu 50 Exemplare derselben Art, die am selben Standort gefangen wurden, platziert werden. Die Eppendorfgefäße wurden jeweils mit der Standortbezeichnung und Datum beschriftet. Die Anzahl der gefangenen Stechmücken pro Standort wurde im Laborbuch dokumentiert. Nach der Bestimmung der Stechmücken, wurden die Proben bei -80 °C eingefroren. Der Beifang wurde ebenfalls beschriftet und für andere Projekte eingefroren.



Abbildung 5: Männliche Stechmücke *Culex pipiens*.



Abbildung 6: weibliche *Culex pipiens/torrentium* Seitenansicht.



Abbildung 7: *Culiseta annulata* Seitenansicht.



Abbildung 8: *Culiseta annulata* Draufsicht.



Abbildung 9: *Aedes vexans* Seitenansicht.



Abbildung 10: *Anopheles mancipennis* Complex Draufsicht.

3.5.1 Bestimmungsschlüssel *Culex pipiens/torrentium*

Die Arten *Culex pipiens/torrentium* können durch verschiedene Merkmale beschrieben werden. Zum einen besitzen sie eine dichte Beschuppung an den abdominalen Terga und die Analader ist gleichmäßig gebogen. Bei den Vorderbeinen ist der Tarsomer eins gewöhnlich kürzer als die Tarsomere zwei bis fünf zusammen. Der Tarsomer vier der Vorderbeine ist nicht verkürzt, und deutlich länger als breit. Die präspirakuläre Behaarung fehlt. Die Klauen sind einfach und ohne subbasalen Zahn. Das Abdomen ist apikal abgerundet und die Cerci sind kurz. Die Pulvilli sind vorhanden und die Flügelschuppen sind schmal.

Der Tarsomere eins vom Hinterbein ist gleich lang oder länger als die Tibia. Die Flügel besitzen dünne Flügelschuppen. Die dorsale Aufsicht des Abdomens zeigt basale Streifen mit gelblichen Schuppen. Die Streifen sind an der Seite manchmal reduziert. Die Tibia ist ohne blasse Längsstreifen (28).

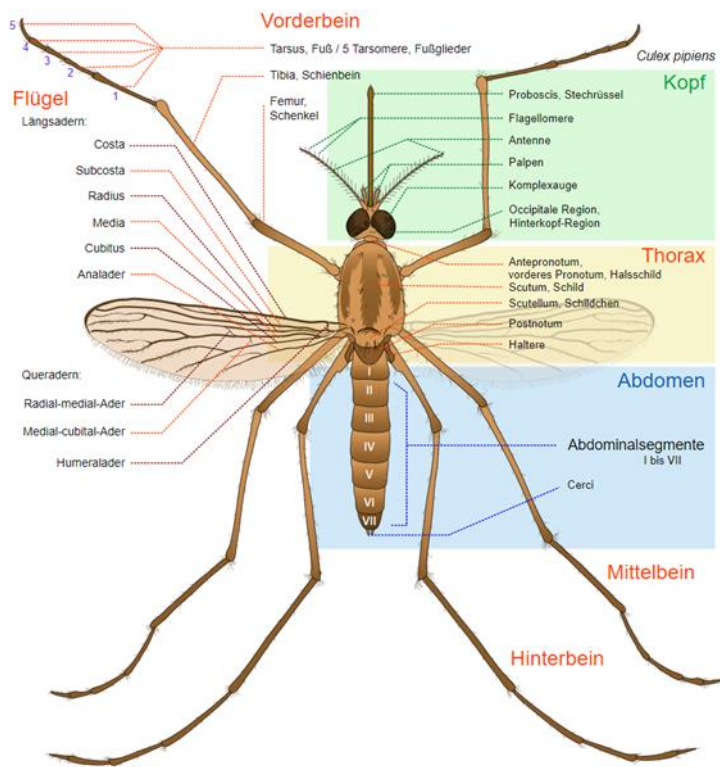


Abbildung 11: Schematische Abbildung einer weiblichen *Culex pipiens* (Quelle: Ruiz Villarreal, Wikipedia. <https://de.wikipedia.org>, Zugriff: 06.11.2024).

3.6 Molekulare Analyse

3.6.1 Probenaufbereitung

In diesem Abschnitt wird die Vorbereitung der Proben vor der eigentlichen Analyse beschrieben. Für die RNA- und DNA-Extraktion kam das DR-Duet™ DNA/RNA Mini Prep Kit zum Einsatz. Um die Probe gemäß dem Protokoll vorzubereiten, wurden 200 µl Reinstwasser (MQH₂O) und zwei Keramikperlen mit einem Durchmesser von 2,8 mm zugegeben. Die Homogenisierung der Probe erfolgte anschließend für drei Minuten bei einer Frequenz von 30 Hertz (Hz) mit dem TissueLyser II von Qiagen. Nach der Homogenisierung ruhte das Gemisch für zehn Minuten. Das ZR-Duet™ DNA/RNA Mini Prep Kit enthält 24 ml DNA/RNA Wash Buffer Konzentrat, das vor der Verwendung mit 96 ml 100%igem Ethanol gemischt werden muss.

100 µl der homogenisierten Probe wurden in eine Säule mit Auffangröhrchen pipettiert und mit 300 µl DNA/RNA Lysis Buffer versetzt. Danach wurde die Mischung für zwei Minuten bei 13.000 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert. Ein Teil der homogenisierten Probe (50 µl) wurde bei -80 °C für spätere Analysen gelagert. Der Durchfluss im Auffangröhrchen wurde in eine neue Zymo-Spin IIC-Säule überführt und erneut bei mindestens 12.000 Erdbeschleunigung (g) für eine Minute zentrifugiert. Der entstandene Durchfluss wurde für die

RNA-Isolierung in einem weißen Röhrchen aufbewahrt, während der Inhalt der Säule für die DNA-Isolierung im Kühlschrank gelagert wurde.

3.6.2 DNA-Isolierung

Die zuvor im Kühlschrank gelagerte grüne Zymo-SpinTM IIC-Säule wurde in ein frisches Auffangröhrchen gesetzt. Anschließend wurden 400 µl DNA Prep Buffer in die Säule gegeben und bei mindestens 12.000 g für eine Minute zentrifugiert. Der entstehende Flow-through wurde entsorgt. Daraufhin wurden 700 µl DNA Wash Buffer in die Säule gefüllt und erneut bei mindestens 12.000 g für 30 Sekunden zentrifugiert, wobei der Durchfluss ebenfalls verworfen wurde. Dieser Waschschrift wurde mit 400 µl Wash Buffer wiederholt.

Nach der zweiten Waschung wurde die Zymo-SpinTM IIC-Säule in das leere Auffangröhrchen gesetzt und bei mindestens 12.000 g für zwei Minuten zentrifugiert, um überschüssige Flüssigkeit zu entfernen. Danach wurde die Säule in ein neues, sauberes Mikrozentrifugenröhrchen (Eppendorfröhrchen) übertragen. Zur Eluierung der DNA wurden mindestens 50 µl des Buffer AE von der Firma QIAGEN direkt auf die Matrix der Säule pipettiert und für zwei bis fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die so eluierte DNA (Probe A) wurde bei -20°C gelagert. Dieser Eluationsvorgang wurde für die zweite Probe (Probe B) wiederholt.

3.6.3 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolation wurde in einer RNase-freien Umgebung durchgeführt. Dem Filtrat wurden 320 µl Ethanol (95-100 %) zugegeben und das Gemisch durch sorgfältiges Pipettieren gut vermischt. Anschließend wurde die Lösung in eine beschriftete Zymo-SpinTM IIC-Säule in einem neuen Auffangröhrchen überführt und bei mindestens 12.000 g für eine Minute zentrifugiert. Der entstandene Durchfluss wurde verworfen. Danach wurden 400 µl RNA Prep Buffer zur Säule hinzugefügt und erneut bei mindestens 12.000 g für eine Minute zentrifugiert, wobei der Durchfluss wiederum verworfen wurde. Es folgte ein Waschschrift mit 700 µl RNA Wash Buffer, gefolgt von einer Zentrifugation bei 12.000 g für 30 Sekunden, nach der der Flow-through ebenfalls verworfen wurde. Dieser Waschschrift wurde mit 400 µl RNA Wash Buffer wiederholt.

Nach der zweiten Waschung wurde die Zymo-SpinTM IIC-Säule in das leere Auffangröhrchen gesetzt und bei mindestens 12.000 g für zwei Minuten zentrifugiert, um eventuelle Rückstände zu entfernen. Die Säule wurde dann in ein neues, RNase-freies Eppendorf-Röhrchen überführt. Daraufhin wurden mindestens 25 µl DNase/RNase-freies Wasser direkt auf die Säulenmatrix gegeben und die Probe für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurde das Gemisch bei 10.000 g für 30 Sekunden zentrifugiert, um die RNA zu eluieren. Die gewonnene RNA wurde sofort bei -80 °C zur Aufbewahrung gelagert.

3.6.4 Flaviviren Nested RT-PCR (NS51 und NS52)

Die nested PCR ist eine spezielle Form der Polymerase-Kettenreaktion, bei der die Amplifikation in zwei aufeinanderfolgenden Runden erfolgt. Dabei wird ein Teilprodukt aus der ersten PCR-Reaktion (Nest 1) als Template für eine zweite PCR (Nest 2) verwendet. Die in der zweiten Runde eingesetzten Primer binden innerhalb der ursprünglich amplifizierten Zielsequenz (interne Primer), wodurch ein kürzeres, aber spezifischeres Amplicon erzeugt wird. Diese geschachtelte Strategie erhöht sowohl die Sensitivität – durch die zweifache Amplifikation – als auch die Spezifität, da unspezifische Produkte aus der ersten PCR in der zweiten Reaktion nicht weiter amplifiziert werden (23).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Pan-Flavivirus nested RT-PCR durchgeführt, um konservierte Regionen des NS5-Gens verschiedener Flaviviren – darunter West-Nil-Virus (WNV), Usutu-Virus, Dengue-Virus, Zika-Virus und Gelbfieber-Virus – zu detektieren. Für die erste PCR-Runde (Nest 1) wurde das OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Deutschland) verwendet. Die Primer NS51+ und NS51– amplifizierten ein Produkt mit einer Länge von 1111 Basenpaaren (bp). Für die zweite Runde (Nest 2) wurde das GoTaq® G2 Hot Start Green Master Mix Kit (Promega, Deutschland) verwendet. Hier kamen die internen Primer NS52+ und NS52– zum Einsatz, mit einem erwarteten Produkt von 1010 bp. Die verwendeten Primer sowie deren Konzentration sind in Tabelle zwei aufgeführt. Als positive Kontrolle wurde eine 1:1000 verdünnte RNA-Impfstofflösung gegen das Gelbfieberevirus verwendet, bereitgestellt vom Institut für Parasitologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien. Die Reagenzien für Nest 1 wurden auf Eis gehalten und entsprechend dem in Tabelle drei beschriebenen Mastermix zusammengestellt.

Tabelle 2: Primerpaare

Nest 1			Konzentration
Forward Primer:	NS51+	5'-GCATCTAYAWCAYNATGGG-3'	100 pmol/μl
Reverse Primer:	NS51-	5'-CCANACNYNRTCCANAC-3'	100 pmol/μl
Nest 2			
Forward-Primer	NS52+	5'-GCNATNTGGTWTYATGTGG-3'	100 pmol/μl
Reverse Primer	NS52-	5'-CATRTCTTCNGTNGTCATCC-3'	100 pmol/μl

Tabelle 3: Zusammensetzung des Mastermix für die Flaviviren-Nest 1

Reagenz	Menge pro Tube (μl)	Menge pro 10 Tubes (μl)
Wasser	14,9	149,0
5 X Buffer (OneStep RT PCR)	5,0	50,0
dNTP-Mix (Nukleotide)	1,0	10,0
OneStep RT-PCR Enzymmix	1,0	10,0
NS51+	0,3	3,0
NS51-	0,3	3,0
Isolierte RNA	2,5	25,0
Gesamt	25,0	250,0

Im nächsten Schritt wurden 2,5 µl der isolierten RNA mit 22,5 µl des vorbereiteten Mastermix vermischt und in den Thermocycler überführt. Die PCR lief dabei nach dem in Tabelle 4 dargestellten Temperaturprofil ab. Zu Beginn erfolgt die sogenannte Reverse Transkription: Dabei wird die RNA mithilfe einer reversen Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, da die PCR ausschließlich DNA amplifizieren kann. Anschließend wird die entstandene doppelsträngige DNA durch Erhitzen (94–98 °C) denaturiert, also in Einzelstränge getrennt. In der darauffolgenden Annealing-Phase (bei etwa 50–65 °C) lagern sich die spezifischen Primer an die entsprechenden Sequenzbereiche der Einzelstränge an. Danach kommt es zur Elongation bei 72 °C, bei der eine DNA-Polymerase neue Nukleotide an die Primer anfügt und so einen neuen DNA-Doppelstrang synthetisiert. Dieser Zyklus aus Denaturierung, Annealing und Elongation wird mehrfach wiederholt, wodurch eine exponentielle Vervielfältigung der Ziel-DNA-Sequenz erreicht wird (23).

Tabelle 4: Temperaturprofil für die Flaviviren Nest 1 .

Schritt	Temperatur	Zeit	Bemerkung
Reverse Transkription	50°C	45 Minuten	
Initiale Denaturierung	94°C	15 Minuten	
Denaturierung (Zyklus)	94°C	1 Minute	40 Zyklen
Annealing	54°C	4 Minuten	
Elongation	72°C	1 Minute 15	
Finale Elongation	72°C	5 Minuten	
Lagerung	4°C	unbestimmt	

Die zweite PCR-Runde (Nest 2) wurde nach einem vergleichbaren Prinzip durchgeführt. Dafür wurde ein separater Mastermix gemäß Tabelle 5 vorbereitet. Jeweils 24 µl dieses Mixes wurden mit 1 µl des PCR-Produkts aus Nest 1 versetzt.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Mastermix für die Flaviviren Nest 2.

Reagenz	Menge pro 1 Tube (µl)	Menge pro 10 Tubes (µl)
Wasser	14,675	146,750
5X Buffer (Green)	5,0	50,0
dNTP-Mix (Nukleotide)	0,2	2,0
Go Taq-Mix –Polymerase	0,125	1,25
NS52+	2,0	20,0
NS52-	2,0	20,0
Nest 1 Amplicon	1,0	10,0
Gesamt	25,0	250,0

Die Reaktionen wurden anschließend in den Thermocycler überführt und nach dem in Tabelle 6 dargestellten Temperaturprofil durchgeführt. Eine reverse Transkription war in diesem Schritt nicht mehr erforderlich, da das eingesetzte Ausgangsmaterial bereits als DNA vorlag und somit kein vorheriger Umschreibevorgang von RNA in DNA notwendig war.

Tabelle 6: Temperaturprofil für die Flaviviren NS52 Nest 2

Schritt	Temperatur	Zeit	Bemerkung
Initiale Denaturierung	94°C	5 Minuten	
Denaturierung (Zyklus)	94°C	1 Minute	40 Zyklen
Annealing	50°C	3 Minuten	
Elongation	72°C	1 Minute	
Finale Elongation	72°C	5 Minuten	
Lagerung	15°C	unbestimmt	

3.6.5 Filarioidea (Nematoden) COI Primer

Um die DNA verschiedener Filarien wie *S. tundra*, *S. equina*, *D. immitis* und *D. repens* nachzuweisen, wird dieses Protokoll verwendet. Zunächst wird der Mastermix in PCR-Tubes (PCR-Single Cap 8er Soft strips 0,2 ml, farblos) gemischt. Insgesamt werden dafür 77 Tubes verwendet, darunter eine Negativ- und eine positivkontrolle. Der Mastermix besteht aus der Primersequenz COLint_F und COLint_R, wobei F für forward und R für reverse steht, einem dNTP-Mix (zum Aufbauen der Sequenz), Wasser (zum Auffüllen von Volumen), Polymerase, Buffer (Green). In jede Probe werden 20 µl vom Mastermix pipettiert. In die Negativkontrolle werden zusätzlich 5 µl Wasser und in die Positivkontrolle 3 µl Wasser pipettiert. Anschließend werden jeweils 5 µl der extrahierten DNA aus den gesammelten Proben hinzugefügt. Die Produktgröße beträgt insgesamt 668 bp. Primerpaar:

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

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

Für das Temperaturprofil wird der Eppendorf Mastercycler verwendet, um die Mischung zu erhitzen. Die Temperatur wird dabei an die Primer und die Polymerasen angepasst, da diese nur bei bestimmten Temperaturen binden. Insgesamt läuft das Gerät 2 Stunden und 35 min. Das genaue Temperaturprofil kann der beigegeführten Tabelle entnommen werden.

Tabelle 7: Anleitung zur Herstellung vom Mastermix: Buffer Green, Go Taq.

Reagenz	Mastermix gesamt	Mastermix pro Tube
COLint_F	158,0 µl	2,0 µl
COLint_R	158,0 µl	2,0 µl
5x Buffer (Green)	395,0 µl	5,0 µl
dNTP Mix	15,80 µl	0,20 µl
Go Taq Polymerase	9,875 µl	0,125 µl
Wasser	843,33 µl	10,675 µl
DNA		5 µl
Gesamt	1580 µl	25,0 µl

Tabelle 8: Temperaturprofile Filarien, Go Taq.

Temperaturprofile		
94 °C	2 min	Initiale Denaturierung
95 °C	45 s	8 x pro Zyklus um um 0,5 °C reduziert
51 °C	45 s	
72 °C	1,5 min	
94 °C	45 s	
45 °C	45s	25 x
72 °C	1,5	
72 °C	7 min	
15 °C	Pause	Finale Elongation

3.6.6 Herstellung des Agarosegels

Zur Herstellung des Agarosegels wurden 1,8 g Agarose in 100 ml 1×TBE-Puffer in einem Erlenmeyerkolben suspendiert. Die Mischung wurde in der Mikrowelle für insgesamt 3 Minuten auf höchster Stufe erhitzt und dabei zweimal unterbrochen, um den Kolben zu schwenken und Klumpenbildung zu vermeiden. Nach vollständigem Auflösen der Agarose wurde die klare Lösung mit 4,2 µl Midori Green Advance DNA-Stain versetzt, einem UV-beständigen Farbstoff zur Visualisierung von DNA oder RNA. Die Lösung wurde etwa eine Minute durch Schwenken homogenisiert und anschließend in einen Gelträger gegossen. Dabei wurde darauf geachtet, keine Luftblasen einzuschließen. Zur Bildung der Probestaschen wurden drei Kämme eingesetzt. Nach einer Aushärtungszeit von ca. 45 Minuten wurde das fertige Gel luftdicht mit Frischhaltefolie verpackt und bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank gelagert.

3.6.7 Gelelektrophorese

Für die Durchführung der Gelelektrophorese wurde die Gelplatte zunächst aus dem Kühlschrank entnommen und in eine Elektrophoresekammer eingesetzt. Zuvor wurde die Kammer mit TBE-Pufferlösung gefüllt. Auf einem Parafilmstreifen wurden 9 µl destilliertes Wasser, 3 µl Promega 100 bp und 3 µl Bluemarker gemischt, um die Ladder zu erzeugen. Diese Mischung wurde in die erste Tasche jeder Reihe der Gelplatte pipettiert. In jede der restlichen Taschen wurden jeweils 5 µl der entsprechenden Probe pipettiert, mit Ausnahme der letzten Reihe, die eine Negativkontrolle enthielt. Die Gelelektrophorese wurde 45 Minuten lang bei einer Spannung von 120 Volt durchgeführt.

Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Agaroseplatte aus der Kammer genommen und unter UV-Licht betrachtet. Dank des in das Gel integrierten Farbstoffs Midori Green wurden die DNA-Banden unter ultraviolettem Licht sichtbar gemacht. Die Ladder ermöglichte die Quantifizierung der Basenpaare. Zusätzlich wurden die Ergebnisse digital erfasst und analysiert, indem die Gelplatte mit einem UV-Lichtscanner (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) gescannt wurde. Bei der Gelelektrophorese wurde in der Probe P21 eine positive Bande festgestellt. Diese Bande wurde mithilfe des Imaging-Systems (ChemiBIS genXpress®, DNR Bio-Imaging Systems Ltd, Neve Yamin, Israel) sichtbar gemacht. Die Gelelektrophorese wurde zu verschiedenen Zeitpunkten beobachtet, um die Wanderung der DNA-Fragmente zu verfolgen. Erste Beobachtungen wurden bereits nach 7 Sekunden und erneut nach 10 Sekunden gemacht, um die initiale Bewegung der Fragmente zu dokumentieren.

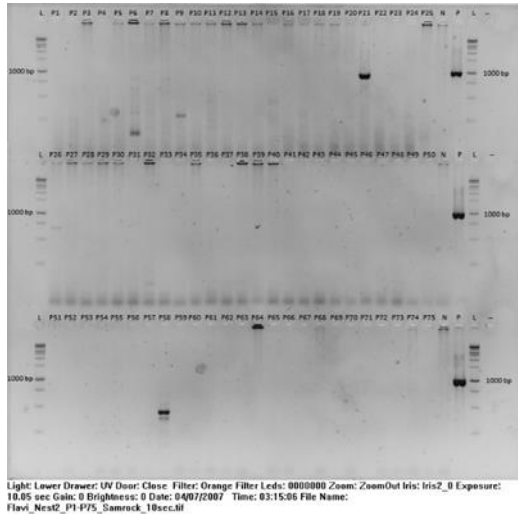


Abbildung 12: Ergebnisse PCR, Agarose Gelelektrophorese unter UV-Licht.

3.6.8 Sequenzierung

Die Sequenzierung erlaubt eine detaillierte Analyse der genetischen Informationen der Proben, was zur Bestimmung der spezifischen Virusstämme und zur Identifizierung potenzieller genetischer Variationen beiträgt. Nach der Gelelektrophorese werden alle positiven Proben zur weiteren Sequenzierung an LGC Genomics GmbH (Deutschland) geschickt. In diesem Fall wurde das PCR-Produkt der Probe P21, in der RNA eines Flavivirus detektiert wurde, mittels Sanger-Methode weiter sequenziert. (29). Eine weitere Untersuchung auf Filarien wurde nicht durchgeführt, da keine positiven Proben vorlagen.

3.7 Datenanalyse

Zur Berechnung des prozentualen Anteils einzelner Mückenarten an der Gesamtpopulation wurde folgende Formel verwendet:

Formel zur Berechnung von Prozentanteilen:

$$\text{Prozentanteil} = \left(\frac{\text{Anzahl der betrachteten Individuen}}{\text{Gesamtzahl der Individuen}} \right) \times 100$$

4 Ergebnisse

4.1 Morphologische- und molekulare Analyse

Zwischen Juli und Oktober wurden insgesamt 902 Stechmücken gefangen, davon 891 weibliche und 11 männliche Individuen. Die überwiegende Mehrheit der weiblichen Stechmücken ($n = 835$; 93,72 %) gehörte zur Artengruppe *Culex pipiens/torrentium*. *Culiseta annulata* war mit nur zwei weiblichen Exemplaren vertreten (0,22 %). Eine vollständige Übersicht der identifizierten Arten und Gattungen ist in Tabelle 10 (Anhang) zu finden. Das Verhältnis von weiblichen zu männlichen Individuen ist in Abbildung 13 dargestellt. Die 11 männlichen Stechmücken wurden nicht molekular untersucht.

Alle weiblichen Stechmücken wurden mittels nested-PCR auf das Vorhandensein von Flaviviren untersucht. In einer Probe (P21) konnte virale RNA der Familie *Flaviviridae* nachgewiesen werden. Die positive Probe stammte von einem Individuum der Art *Cs. annulata*.

Die virale RNA aus Probe P21 wurde sequenziert. Der detektierte Flavivirus zeigte eine 98 %ige Übereinstimmung mit einem bekannten Flavivirus aus Portugal (Accession-Nummer: LC480779) (30). Die vollständige Nukleotidsequenz befindet sich im Anhang (Tabelle 11).

Die PCR-Untersuchung auf Filarien der Arten *Setaria tundra/equina* sowie *Dirofilaria immitis/repens* ergab bei allen 891 getesteten weiblichen Stechmücken ein negatives Ergebnis. Ein weiterer molekularer Nachweis (z. B. durch Sequenzierung oder Gelelektrophorese) war daher nicht erforderlich.

In dieser Diplomarbeit wird ausschließlich auf die Veröffentlichung der Daten von Equiden und Vögel eingegangen. Abbildung 15 veranschaulicht die gemeldeten Fälle bei Equiden und Vögel im Jahr 2022. Im Gegensatz zu den Vorjahresergebnissen, konnte in meinen Proben ein



Abbildung 13: Graphische Darstellung der Anzahl männlicher und weiblicher Stechmücken.

Flavivirus nachgewiesen werden. Laut den ECDC-Daten wurde zudem ein von WNV in Osten Österreichs registriert. Diese Ergebnisse werden im folgenden Kapitel (Diskussion) detailliert analysiert und mit den Befunden dieser Diplomarbeit verglichen.

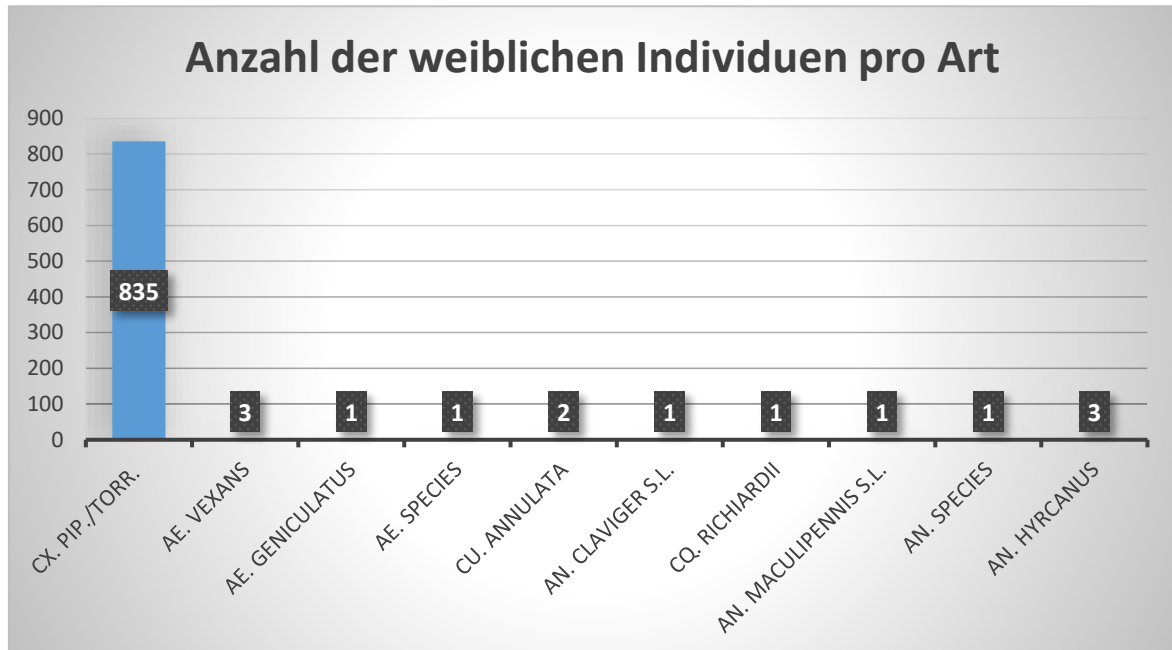


Abbildung 14: graphische Darstellung der Anzahl der weiblichen Stechmücken pro Art.

5 Diskussion

Ziel dieser Diplomarbeit war es, das Vorkommen von Flaviviren bei Stechmücken auf Pferdekoppeln in Ostösterreich zu untersuchen, an denen in den Vorjahren WNV-Infektionen bei Pferden dokumentiert worden waren. Aufbauend auf der Diplomarbeit von Julia Wigger (2021) wurde im Zeitraum von Juli bis Oktober 2022 an denselben Standorten erneut Stechmückenfallen aufgestellt. Die Stechmücken wurden morphologisch auf Gattung und Art bestimmt, weibliche Stechmücken wurden anschließend mittels molekularbiologischer Verfahren auf Flaviviren sowie auf das Vorhandensein von Filarien-DNA untersucht.

Für die morphologische Bestimmung der Stechmücken wurde ein etablierter Bestimmungsschlüssel verwendet. Anschließend erfolgten molekulare Analysen (PCR und Gelelektrophorese) zur Detektion von Flaviviren und Filarien-DNA in weiblichen Stechmücken. In einer Probe (P21, *Culiseta annulata*) vom Standort Großmugl konnte ein insektenspezifisches Flavivirus detektiert werden, das eine 98%ige Sequenzübereinstimmung mit einem Flavivirus aus Portugal zeigte (Sanger-Sequenzierung, Deutschland). Ein Nachweis von West-Nil-Virus oder Filarien erfolgte nicht. Die häufigste Art war *Cx. pipiens s.l./Cx. torrentium* mit einem Anteil von 93,72 %; *Cs. annulata* war mit 0,22 % vertreten.

In der vorliegenden Untersuchung dominierten *Culex pipiens/torrentium*, während *Culiseta annulata* nur in geringer Zahl nachgewiesen wurde. Dieses Populationsverhältnis stimmt mit den Ergebnissen früherer Studien in Ostösterreich überein. So war auch in der Diplomarbeit von Julia Wigger aus dem Jahr 2021 *Culex pipiens s.l./Cx. torrentium* mit einem Anteil von 93,2 % die häufigste Art. Insgesamt wurden damals 811 Stechmücken gefangen, 91 Exemplare weniger als im Jahr 2022. In dieser früheren Arbeit konnte jedoch keine RNA von Flaviviren nachgewiesen werden, während in der vorliegenden Untersuchung in einer *Cs. annulata*-Probe ein insektenspezifisches Flavivirus identifiziert wurde. Umgekehrt konnten 2021 zwei positive Nachweise für Filarien der Art *Setaria tundra* verzeichnet werden – einmal in *Aedes vexans* (P083) und einmal in *Aedes geniculatus* (P002). Im Gegensatz dazu zeigte die PCR-Untersuchung im Jahr 2022 bei allen 891 untersuchten weiblichen Stechmücken ein negatives Ergebnis hinsichtlich Filarien-DNA (18).

Auch Rummerstorfer (2024) bestätigt die weite Verbreitung von *Culex pipiens* in Niederösterreich mit einem Anteil von 86,2 % gefolgt von *Culiseta annulata* (8,54 %) und *Anopheles claviger* (0,75 %). Letztere trat im Jahr 2021 laut Wigger (2022) überhaupt nicht auf. In der Studie von Rummerstorfer wurden zudem drei verschiedene insektenspezifische Flaviviren nachgewiesen. Sechs von zehn positiven Pools stammten von *Culiseta annulata*, je zwei von *Culex pipiens* sowie Vertretern der Unterfamilie *Culicinae*. Auch hier handelte es sich ausschließlich um insektenspezifische Flaviviren (31). Die vorliegende Arbeit liefert somit ergänzende Hinweise auf die potenzielle epidemiologische Bedeutung von *Culiseta annulata*. Obwohl diese Art zahlenmäßig deutlich seltener war, konnte ausgerechnet in einer Probe (P21) ein Flavivirus nachgewiesen werden. Dies entspricht den Ergebnissen von Rummerstorfer (2024), wo *Cs. annulata* überproportional oft an positiven Virusnachweisen beteiligt war (31). Damit könnte *Culiseta annulata*, trotz ihrer geringen Anzahl, eine größere Rolle als Vektor spielen, als bislang angenommen.

Auch die Ergebnisse einer anderen Studie in Wien unterstreichen die Dominanz des *Cx. pipiens*-Komplexes, der mit einem Anteil von 78,8 % als mit Abstand häufigste Art nachgewiesen wurde (Sammlung der Mücken von 2012-2014). Die Autoren heben hervor, dass dieser Komplex nicht nur als Hauptvektor für WNV in Europa gilt, sondern auch potenziell für die Übertragung weiterer Pathogene wie USUV, TAHV, SINV, *Dirofilaria repens* und *Plasmodium* spp. relevant ist. Angesichts dieser Vektorkompetenz bestätigt die hohe Präsenz von *Cx. pipiens/torrentium* in der vorliegenden Untersuchung das potenzielle Risiko für eine Viruszirkulation in der Region Ostösterreich (32). Ergänzend liefert die Studie von Zittra wertvolle ökologische Einblicke. Sie zeigte, dass die Zusammensetzung von Mückenpopulationen maßgeblich von Landschaftsstruktur, Habitatverfügbarkeit und klimatischen Parametern beeinflusst wird. Besonders *Cx. pipiens/torrentium* wurde mit urbanen Gebieten assoziiert und als ökologisch sehr anpassungsfähig beschrieben. Auch *Culiseta annulata* wurde in dieser Studie in Ostösterreich regelmäßig, wenn auch in geringer Zahl, nachgewiesen. Die Arbeit betont die Notwendigkeit, Umwelt- und Klimafaktoren bei der Einschätzung von Vektorrisiken künftig stärker zu berücksichtigen (33). Ein Aspekt, der auch für die vorliegende Arbeit von Bedeutung ist.

Vergleichbar mit der Langzeitstudie zu überwinternden WNV-infizierten Mücken in Mitteleuropa, bestätigte sich auch hier, dass *Cx. pipiens* die größte Population darstellte, während *Culiseta annulata* nur vereinzelt auftrat, aber zunehmend virologisch auffällig wurde (34). Dieses Populationsverhältnis spiegelt sich sowohl in den Vorjahresdaten als auch in der aktuellen Untersuchung wider.

Wie *Culex pipiens* kann auch *Culiseta annulata* WNV übertragen, wenn auch weniger effizient. Sie spielen zwar keine Schlüsselrolle bei der Übertragung des WNV, jedoch eine Rolle in der Epidemiologie dieser Viren in Europa und Ostösterreich (6). Die Untersuchung von *Culex pipiens* und *Culiseta annulata* im Kontext der Verbreitung des West-Nil-Virus in Ostösterreich ist von großer Bedeutung, um die Dynamik der Virusübertragung besser zu verstehen und Präventionsmaßnahmen zu entwickeln. Diese Mückenarten sind Schlüsselvektoren, deren Verhalten, Lebensräume und Interaktionen mit ihren Wirten genauestens untersucht werden sollten, um effektive Kontrollstrategien zu etablieren.

Trotz des Ausbleibens eines WNV Nachweises in dieser Studie ist die Relevanz der untersuchten Arten für die Epidemiologie des Virus unbestritten. *Cx. pipiens* ist als Hauptvektor anerkannt, während *Cx. annulata* potenziell eine Rolle im Infektionsgeschehen spielt, insbesondere bei der Überwinterung von Viren. Besonders hervorzuheben ist das Phänomen des Superinfektionsausschlusses (SIE). Wenn eine Mücke bereits mit einem Insektenspezifischen Flavivirus infiziert ist, kann es schwieriger für ein anderes Virus wie WNV, Zika oder Dengue sein, die Mücke ebenfalls zu infizieren. Dieser Effekt wird als Superinfektionsausschluss bezeichnet. Das bedeutet, dass Insektenspezifische Flaviviren (ISFs) die Mücke weniger anfällig für weitere Virusinfektionen machen könnte. Allerdings hängt es davon ab ob die Infektion akut oder dauerhaft ist und ob die Zellen oder Mücken eine funktionierende Abwehr haben (35). Der Nachweis eines ISF in *Cs. annulata* könnte somit Auswirkungen auf ihre Rolle als Vektor haben, was in zukünftigen Studien weiter untersucht werden sollte.

Laut den Daten des European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) kam es 2022 (siehe Abbildung 15) in Ostösterreich zu einem Anstieg von WNV-Fällen im Vergleich zu 2021, wo keine Fälle dokumentiert wurden. Obwohl in der vorliegenden Untersuchung kein WNV nachgewiesen wurde, unterstreichen die ECDC-Daten die Notwendigkeit eines kontinuierlichen Monitorings. Der genaue Ort der WNV-Fälle in der ECDC-Darstellung bleibt jedoch unklar, sodass keine direkte Verbindung zu den hier untersuchten Standorten hergestellt werden kann. Daten zur Prävalenz des West-Nil-Virus (WNV) in Europa umfassen sowohl menschliche Fälle als auch Infektionen bei Equiden und Vögel.

Die Untersuchung im Vergleich zum Vorjahr zeigt, wie wichtig es ist, ein kontinuierliches Monitoring durchzuführen, um die Verbreitung des WNV zu überprüfen. Denn mittlerweile gibt es Hinweise auf beginnende endemische Etablierung des WNV in Ostösterreich (6). Es ist daher nicht überraschend, dass das WNV in Ostösterreich mittlerweile als beginnend endemisch gilt, da seit 2008 in Ungarn kontinuierliche Ausbrüche unter Equiden gemeldet

wurden und zwischen 2016 und 2018 die ersten klinischen Fälle von West-Nil-neuroinvasiver Erkrankungen bei Pferden in Österreich auftraten (22, 36).

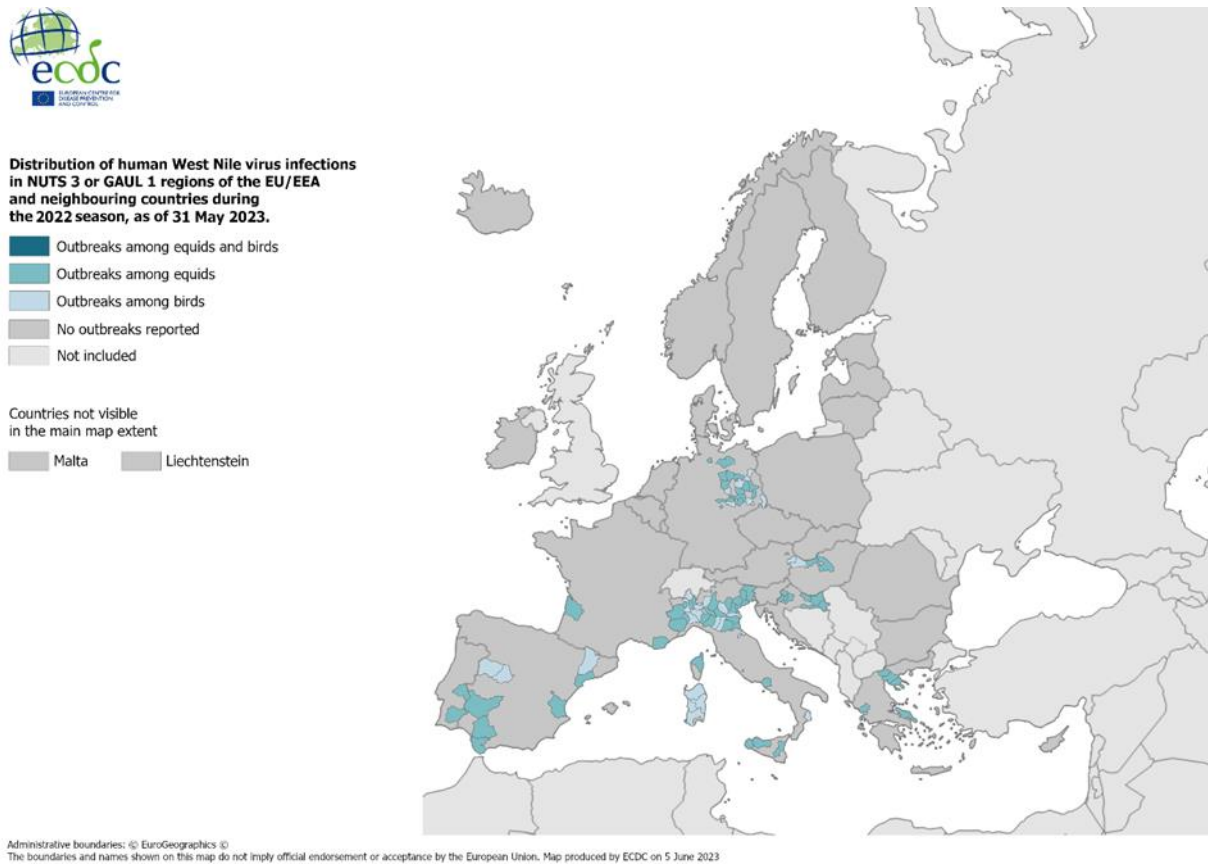


Abbildung 15: WNV Ausbrüche bei Equiden und Vögel in Europa im Jahr 2022 bis 31.März. 2023 (European Centre for Disease Prevention and Control (European Centre for Disease Prevention and Control 2023)) Zugriff am 03.10.2024.

6 Schlussfolgerung

Die vorliegende Diplomarbeit zeigt, dass *Culex pipiens/Cx. torrentium* mit einem Anteil von 93,72% die dominierende Stechmückenart in Ostösterreich ist, was durch frühere Studien aus der Region bestätigt wird. *Culiseta annulata* wurde hingegen nur in geringem Umfang (0,22 %) nachgewiesen. In einer dieser Proben (P21) konnte ein insektenspezifisches Flavivirus mit 98 % Sequenzübereinstimmung zu einem bekannten portugiesischen Isolat detektiert werden. Dabei handelt es sich nicht um ein human- oder veterinärpathogenes Arbovirus, sondern um ein Flavivirus mit Wirtsbindung auf Insekten.

Im Vergleich zur Diplomarbeit von Julia Wigger (2021), in der keine Flaviviren nachgewiesen wurden, stellt dieser Fund eine neue Erkenntnis dar. Gleichzeitig wurde in keiner der untersuchten Proben RNA von WNV oder Filarien detektiert, was auf ein geringes Infektionsrisiko in den untersuchten Regionen im Jahr 2022 hinweist. Die Ergebnisse korrespondieren mit weiteren Studien, wie jener von Rummerstorfer (2024), und unterstreichen die epidemiologische Relevanz von *Cx. pipiens* als Schlüsselvektor für WNV in Ostösterreich. Gleichzeitig könnte *Cs. annulata*, obwohl zahlenmäßig unterrepräsentiert, eine bislang unterschätzte Rolle als Vektor spielen, insbesondere im Zusammenhang mit der Überwinterung von Viren. Die Detektion eines insektenspezifischen Flavivirus wirft zudem Fragen zur Interaktion mit anderen pathogenen Viren wie WNV auf. Der sogenannte Superinfektionsausschluss (SIE) könnte dabei eine Rolle spielen, indem ISFs die Infektion mit weiteren Viren in derselben Mücke hemmen. Diese möglichen Wechselwirkungen sind bislang kaum untersucht und sollten im Rahmen zukünftiger Studien berücksichtigt werden.

Insgesamt zeigt die Arbeit, wie wichtig ein kontinuierliches und molekular gestütztes Monitoring der Stechmückenpopulationen ist, um das Verbreitungsrisiko von WNV und anderen Pathogenen frühzeitig zu erkennen und geeignete Präventionsstrategien entwickeln zu können. Langfristige Untersuchungen sind notwendig, um die komplexen ökologischen und virologischen Zusammenhänge besser zu verstehen.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gemeine Stechmücke: <i>Culex pipiens</i> . (Quelle: DeVries P., Wikipedia. https://de.wikipedia.org , Zugriff am 06.11.2024).....	5
Abbildung 2: Übertragungszyklus des West-Nil-Virus (Quelle: https://eu.biogents.com/west-nil-virus/?lang=de , Zugriff 06.11.2024).....	8
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Infektionszyklus des WNV (Saiz et al. 2021)....	9
Abbildung 4: Karte der Standorte Wien und Niederösterreich.....	14
Abbildung 5: Männliche Stechmücke <i>Culex pipiens</i>	15
Abbildung 6: weibliche <i>Culex pipiens/torrentium</i> Seitenansicht.....	16
Abbildung 7: <i>Culiseta annulata</i> Seitenansicht.....	16
Abbildung 8: <i>Culiseta annulata</i> Draufsicht.....	16
Abbildung 9: <i>Aedes vexans</i> Seitenansicht.....	17
Abbildung 10: <i>Anopheles maculipennis</i> Complex Draufsicht.....	17
Abbildung 11: Schematische Abbildung einer weiblichen <i>Culex pipiens</i> (Quelle: Ruiz Villarreal, Wikipedia. https://de.wikipedia.org , Zugriff: 06.11.2024).....	18
Abbildung 12: Ergebnisse PCR, Agarose Gelelektrophorese unter UV-Licht.....	24
Abbildung 13: Graphische Darstellung der Anzahl männlicher und weiblicher Stechmücken.	25
Abbildung 14: graphische Darstellung der Anzahl der weiblichen Stechmücken pro Art.	26
Abbildung 15: WNV Ausbrüche bei Equiden und Vögel in Europa im Jahr 2022 bis 31.März. 2023 (European Centre for Disease Prevention and Control (European Centre for Disease Prevention and Control 2023)) Zugriff am 03.10.2024.....	29

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der aufgestellten Fallen und Standorte nach der Postleitzahl	13
Tabelle 2: Primerpaare.....	20
Tabelle 3: Zusammensetzung des Mastermix für die Flaviviren-Nest 1	20
Tabelle 4: Temperaturprofil für die Flaviviren Nest 1	21
Tabelle 5: Zusammensetzung des Mastermix für die Flaviviren Nest 2.	21
Tabelle 6: Temperaturprofil für die Flaviviren NS52 Nest 2	22
Tabelle 7: Anleitung zur Herstellung vom Mastermix: Buffer Green, Go Taq.....	22
Tabelle 8: Temperaturprofile Filarien, Go Taq.	23
Tabelle 9: Zusammenfassende Tabelle der Daten zu Installation und Einsammlung der Fallen.	32
Tabelle 10: Erfassung der Individuenzahlen je Art und Falle.	34
Tabelle 11: Nukleotidsequenz der Probe P21.....	36

9 Anhang

Tabelle 9: Zusammenfassende Tabelle der Daten zu Installation und Einsammlung der Fallen.

Fallenbezeichnung	Datum des Aufstellens	Datum der Abholung
BG_PF1_01_20220701	01.07.2022	02.07.2022
BG_PF1_02_20220701		
BG_PF1_03_20220701		
BG_PF2_01_20220701		
BG_PF2_02_20220701		
BG_PF2_03_20220701		
BG_PF3_01_20220701		
BG_PF3_02_20220701		
BG_PF3_03_20220701		
BG_PF1_01_20220720	20.07.2022	21.07.2022
BG_PF1_02_20220720		
BG_PF1_03_20220720		
BG_PF2_01_20220720		
BG_PF2_02_20220720		
BG_PF2_03_20220720		
BG_PF3_01_20220720		
BG_PF3_02_20220720		
BG_PF3_03_20220720		
BG_PF1_01_20220810	10.08.2022	11.08.2022
BG_PF1_02_20220810		
BG_PF1_03_20220810		
BG_PF2_01_20220810		
BG_PF2_02_20220810		
BG_PF2_03_20220810		
BG_PF3_01_20220810		
BG_PF3_02_20220810		
BG_PF3_03_20220810		
BG_PF1_01_20220825	25.08.2022	26.08.2022
BG_PF1_02_20220825		
BG_PF1_03_20220825		
BG_PF2_01_20220825		
BG_PF2_02_20220825		
BG_PF2_03_20220825		

BG_PF3_01_20220825		
BG_PF3_02_20220825		
BG_PF3_03_20220825		
BG_PF1_01_20220810	10.09.2022	11.09.2022
BG_PF1_02_20220810		
BG_PF1_03_20220810		
BG_PF2_01_20220810		
BG_PF2_02_20220810		
BG_PF2_03_20220810		
BG_PF3_01_20220810		
BG_PF3_02_20220810		
BG_PF3_03_20220810		
BG_PF1_01_20220922	22.09.2022	23.09.2022
BG_PF1_02_20220922		
BG_PF1_03_20220922		
BG_PF2_01_20220922		
BG_PF2_01_20220922		
BG_PF2_01_20220922		
BG_PF3_01_20220922		
BG_PF3_02_20220922		
BG_PF3_03_20220922		
BG_PF1_01_20220910	21.10.2022	22.10.2022
BG_PF1_02_20220910		
BG_PF1_03_20220910		
BG_PF2_01_20220910		
BG_PF2_02_20220910		
BG_PF2_03_20220910		
BG_PF3_01_20220910		
BG_PF3_02_20220910		
BG_PF3_03_20220910		
BG_PF1_01_20221008	27.10.2022	28.10.2022
BG_PF1_02_20221008		
BG_PF1_03_20221008		
BG_PF2_01_20221008		
BG_PF2_02_20221008		
BG_PF2_03_20221008		
BG_PF3_01_20221008		
BG_PF3_02_20221008		
BG_PF3_03_20221008		

Tabelle 10: Erfassung der Individuenzahlen je Art und Falle.

P1	Adults	50	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P2	Adults	50	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P3	Adults	35	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P4	Adults	14	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx.</i>	M
P5	Adults	37	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P6	Adults	1	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Ae. vexans</i>	F
P7	Adults	1	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Ae. geniculatus</i>	F
P8	Adults	50	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P9	Adults	11	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx.</i>	M
P10	Adults	48	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P11	Adults	1	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Ae.</i>	F
P12	Adults	2	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P13	Adults	50	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P14	Adults	11	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P15	Adults	4	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx.</i>	M
P16	Adults	19	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P17	Adults	4	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx.</i>	M
P18	Adults	1	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P19	Adults	1	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P20	Adults	1	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P21	Adults	1	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cs. annulata</i>	F
P22	Adults	50	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P23	Adults	3	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P24	Adults	19	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P25	Adults	8	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P26	Adults	2	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P27	Adults	50	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P28	Adults	9	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx.</i>	M
P29	Adults	24	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P30	Adults	2	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P31	Adults	49	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P32	Adults	1	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P33	Adults	9	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P34	Adults	5	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx.</i>	M
P35	Adults	5	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P36	Adults	16	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P37	Adults	13	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P38	Adults	1	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx.</i>	M
P39	Adults	16	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P40	Adults	1	Vetmed	-80	Turm 5	<i>An. claviger s.l.</i>	F

P41	Adults	1	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Ae. vexans</i>	F
P42	Adults	2	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P43	Adults	19	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P44	Adults	5	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P45	Adults	2	Vetmed	-80	Turm 5	<i>An. hyrcanus</i>	F
P46	Adults	14	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P47	Adults	25	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P48	Adults	2	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx.</i>	M
P49	Adults	1	Vetmed	-80	Turm 5		M
P50	Adults	6	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P51	Adults	18	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P52	Adults	36	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P53	Adults	50	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P54	Adults	1	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cq. richiardii</i>	F
P55	Adults	1	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P56	Adults	1	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx.</i>	M
P57	Adults	3	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P58	Adults	1	Vetmed	-80	Turm 5	<i>An. maculipennis s.l.</i>	F
P59	Adults	2	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P60	Adults	2	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P61	Adults	1	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P62	Adults	1	Vetmed	-80	Turm 5	<i>An.</i>	F
P63	Adults	1	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P64	Adults	2	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P65	Adults	1	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P66	Adults	2	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P67	Adults	3	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P68	Adults	1	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Ae. vexans</i>	F
P69	Adults	6	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P70	Adults	1	Vetmed	-80	Turm 5	<i>An. hyrcanus</i>	F
P71	Adults	9	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P72	Adults	3	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F
P73	Adults	1	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cs. annulata</i>	F
P74	Adults	1	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx.</i>	M
P75	Adults	2	Vetmed	-80	Turm 5	<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	F

Tabelle 11: Nukleotidsequenz der Probe P21.

```

CTAGGAAGTCGTTATCTCGAAGGCCAGGCCAGGAAGAATTTTCCATGTGGAGT
TGGTGGA
GTTGGAGTCAACTATTTTCGTATATTACCAGCAAGAGATCTCAAAGAAAGGGTC
GCTAGAT
CATAGCCGATGACGTTGCCGGATGGGACACAAAGATCACAGAAGCCGACCTAG
AAGACGA
ATATCACAGGAAATTTATAAGAGCAGTGTACAAAACGGCTTACCAAAACATCG
TGGCGTT
GTTTCCAAGGAACCATCCTAAGTACCGCAGCGGAAGTGTATTGGATGTGCTATC
CCGAAC
TGACCATCGAGGATCTGGACACGTAAGTACGTATTCTATGAACACAGTTACCAA
TGGGAA
AAACCAGGTTGGGCGAATGCTTGAAGCCGAGGGCCTGTTGGATGCCTCCTTGG
AAGTCAT
GGAGGCATGGTTGGACGCCCATCTAGAAGAGATTCTATCGGCCATGGTGGTTTC
CGGAGA
CGACGTGGTTGTAGCCACAAACAACGCGGCTTCCGAACAAGTCTACGGTACA
TAAACGC
CACATCAAAGATAAGGAAGAATTTGAAAATTGACGAACCAACACCACAGTTTG
AAAGCTG
GGAAGAAGTGGAGTTTTGCTCCCATCACTTCCATCCACTAACTTTAGCAGATGG
AAGAAC
ACTTATAGCCCCATGAAGAGACCAGAATGAAATTATTGGAAGGGACAGAATCC
AGAAAGG
GGGAAATGTTGACATGTAGGCCGCTGGTTGTTTGGCCAAAGCGCATGCTCAAA
TGTGGGC
ATTGTACTTTTTCCACAGACGTGATTTACGCCTAGGATTCGCAGCCATAACTGC
CATTGT
GCCGAAAACATGGGTCCCTACAGGAAGGATCTCTTGGTCTATGCACCAGAACT
GTGAAT

```

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Priv.-Doz. Dr. Hans-Peter-Fuehrer, der mich während der gesamten Arbeit mit Rat und Tat unterstützt hat und stets ein offenes Ohr für meine Anliegen hatte.

Gerne möchte ich auch Frau Dr. Maria Unterköfler meinen Dank aussprechen. Sie hat mir eine hervorragende Einführung in das Mikroskopieren gegeben und stand mir stets unterstützend zur Seite, insbesondere bei der morphologischen Bestimmung der Stechmücken.

Mein besonderer Dank gilt auch den Besitzerinnen des Equine Centre Austria und des Weinhappelhofs 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. Ihre wertvolle Zusammenarbeit hat es ermöglicht, die Mückenfallen an diesen für das Projekt wichtigen Standorten aufzustellen, wofür ich sehr dankbar bin.

Meinen Dank gilt auch meiner Familie, insbesondere meinem Freund, der mich während des gesamten Studiums und auch bei dieser Diplomarbeit großartig seelisch unterstützt hat und immer für mich da war.

11 Literatur

1. Becker N, Petrić D, Zgomba M, Boase C, Madon MB, Dahl C et al. Mosquitoes : Identification, Ecology and Control. Cham, SWITZERLAND: Springer International Publishing AG; 2020. Verfügbar unter: <http://ebookcentral.proquest.com/lib/vetmeduni-ebooks/detail.action?docID=6362087>.
2. Habarugira G, Suen WW, Hobson-Peters J, Hall RA, Bielefeldt-Ohmann H. West Nile Virus: An Update on Pathobiology, Epidemiology, Diagnostics, Control and "One Health" Implications. *Pathogens* 2020; 9(7). doi: 10.3390/pathogens9070589.
3. Saiz J-C, Martín-Acebes MA, Blázquez AB, Escribano-Romero E, Poderoso T, Jiménez de Oya N. Pathogenicity and virulence of West Nile virus revisited eight decades after its first isolation. *Virulence* 2021; 12(1):1145–73. doi: 10.1080/21505594.2021.1908740.
4. Kaaijk P, Luytjes W. Are we prepared for emerging flaviviruses in Europe? Challenges for vaccination. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 2018; 14(2):337–44. doi: 10.1080/21645515.2017.1389363.
5. Grisenti M, Arnoldi D, Rizzolli F, Giacobini M, Bertolotti L, Rizzoli A. Lack of identification of Flaviviruses in oral and cloacal swabs from long- and short-distance migratory birds in Trentino-Alto Adige (North-eastern Italy). *Virol J* 2013; 10(1):1–9. Verfügbar unter: <https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-10-306#citeas>.
6. de Heus Pd, Kolodziejek J, Hubálek Z, Dimmel K, Racher V, Nowotny N et al. West Nile Virus and Tick-Borne Encephalitis Virus Are Endemic in Equids in Eastern Austria. *Viruses* 2021; 13(9). doi: 10.3390/v13091873.
7. Bakonyi T, Ferenczi E, Erdélyi K, Kutasi O, Csörgő T, Seidel B et al. Explosive spread of a neuroinvasive lineage 2 West Nile virus in Central Europe, 2008/2009. *Vet Microbiol* 2013; 165(1-2):61–70. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.03.005.
8. Wodak E, Richter S, Bagó Z, Revilla-Fernández S, Weissenböck H, Nowotny N et al. Detection and molecular analysis of West Nile virus infections in birds of prey in the eastern part of Austria in 2008 and 2009. *Vet Microbiol* 2011; 149(3-4):358–66. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.12.012.
9. de Heus P, Jolanta Kolodziejek, Jeremy V. Camp, Katharina Dimmel, Zoltán Bagó, Zdenek Hubálek et al. 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* 2020; 67(3):1189. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7317211/#tbed13452-bib-0002>.

10. Simonin Y. Circulation of West Nile Virus and Usutu Virus in Europe: Overview and Challenges. *Viruses* 2024; 16(4):599. Verfügbar unter: <https://www.mdpi.com/1999-4915/16/4/599>.
11. Zittra C, Flechl E, Kothmayer M, Vitecek S, Rossiter H, Zechmeister T et al. Ecological characterization and molecular differentiation of *Culex pipiens* complex taxa and *Culex torrentium* in eastern Austria. *Parasit Vectors* 2016; 9:197. doi: 10.1186/s13071-016-1495-4.
12. Zittra C, Joachim A, Fuehrer H-P. Stechmücken und Dirofilarien in Österreich: Überblick über die derzeitige Situation von neobiotischen Culiciden und Dirofilarien. *Tierärztl. Umschau* 2015; (70):126–31.
13. Coleman SU, Klei TR, French DD. Prevalence of *Setaria equina* (Nematode: Onchocercidae) in southeastern Louisiana horses. *The Journal of parasitology* 1985; 71(4). Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4032153/>.
14. Hornok S, Genchi C, Bazzocchi C, Fok E, Farkas R. Prevalence of *Setaria equina* microfilaraemia in horses in Hungary. *The Veterinary record* 2007; 161(24). Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18083980/>.
15. Devi A, Sudan V, Shanker D. Phylogenetic characterization of *Setaria equina* and its association with other filarids. *Parasitology research* 2020; 119(12). Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33079270/>.
16. Fuehrer HP, Auer H, Leschnik M, Silbermayr K, Duscher G, Joachim A. *Dirofilaria* in Humans, Dogs, and Vectors in Austria (1978-2014)-From Imported Pathogens to the Endemicity of *Dirofilaria repens*. *PLoS neglected tropical diseases* 2016; 10(5). Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27196049/>.
17. Farkas R, Mag V, Gyurkovszky M, Takács N, Vörös K, Solymosi N. The current situation of canine dirofilariosis in Hungary. *Parasitology research* 2020; 119(1). Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31754854/>.
18. Wigger Julia. West-Nil Virus bei Pferden in Österreich - Eine Untersuchung von Stechmücken auf Flaviviren bei in den Vorjahren betroffenen Pferdekoppeln [Diplomarbeit]; 2022.
19. Becker N, Jöst A, Weitzel T. The *Culex pipiens* complex in Europe. *Journal of the American Mosquito Control Association* 2012; 28(4 Suppl). Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23401944/>.
20. European Centre for Disease Prevention and Control. *Culex pipiens* - Factsheet for experts; 2020 [Stand: 01.10.2024.128Z]. Verfügbar unter: <https://www.ecdc.europa.eu/en/infectious-disease-topics/related-public-health-topics/disease-vectors/facts/mosquito-factsheets/culex-pipiens>.

21. Deplazes P, Joachim A, Mathis A, Strube C, Taubert A, Samson-Himmelstjerna G von et al. *Parasitologie für die Tiermedizin*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2021.
22. de Heus Pd, Kolodziejek J, Camp JV, Dimmel K, Bagó Z, Hubálek Z et al. 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* 2020; 67(3):1189–97. doi: 10.1111/tbed.13452.
23. Selbitz H-J, Truyen U, Valentin-Weigand P, Hrsg. *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. 11., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage: Georg Thieme Verlag KG; 2023.
24. Ciota AT. West Nile virus and its vectors. *Curr Opin Insect Sci* 2017; 22:28–36. doi: 10.1016/j.cois.2017.05.002.
25. Blitvich BJ, Firth AE. Insect-specific flaviviruses: a systematic review of their discovery, host range, mode of transmission, superinfection exclusion potential and genomic organization. *Viruses* 2015; 7(4):1927–59. doi: 10.3390/v7041927.
26. Jessika-M. V. Cavalleri, Orsolya Korbacska-Kutasi, Agnès Leblond, Romain Paillot, Nicola Pusterla, Eike Steinmann et al. European College of Equine Internal Medicine consensus statement on equine flaviviridae infections in Europe. *Journal of Veterinary Internal Medicine*; Nov 2022:1847–2551. doi: 10.1111/jvim.16581.
27. Green MR, Sambrook J. Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harb Protoc* 2019; 2019(6). doi: 10.1101/pdb.top095109.
28. Becker Norbert. *Mosquitoes and Their Control*. Second Edition: Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2003, 2010; 2003, 2010.
29. Biosearch Technologies Genomic Analysis by LGC. LGC Genomics; 2023.000Z [Stand: 05.07.2023.031Z]. Verfügbar unter: <https://shop.lgcgenomics.com/>.
30. National Library of Medicine. NCBI Blast:Nucleotide Sequence; 2023.000Z [Stand: 05.07.2023.656Z]. Verfügbar unter: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
31. Rummerstorfer Maria. *West Nil Virus in Stechmücken aus Niederösterreich in der Nähe von Pferdestallungen (2023): Diplomarbeit*. Veterinärmedizinische Universität Wien; 2024.
32. Lebl K, Zittra C, Silbermayr K, Obwaller A, Berer D, Brugger K et al. Mosquitoes (Diptera: Culicidae) and their relevance as disease vectors in the city of Vienna, Austria. *Parasitology research* 2015; 114(2). Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25468380/>.
33. Zittra C, Moog O, Christian E, Fuehrer H-P. DNA-aided identification of *Culex* mosquitoes (Diptera: Culicidae) reveals unexpected diversity in underground cavities in Austria. *Parasitology research* 2019; 118(5):1385–91. doi: 10.1007/s00436-019-06277-y.

34. Rudolf I, Betášová L, Blažejová H, Venclíková K, Straková P, Šebesta O et al. West Nile virus in overwintering mosquitoes, central Europe. *Parasit Vectors* 2017; 10(1). Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28969685/>.
35. Willemsen W, Helmes N, Overheul GJ, Henkens M, Spruijt R, van Rij RP et al. Differential effect of acute versus persistent insect-specific flavivirus infection on superinfection exclusion of West Nile, Zika and chikungunya viruses in RNAi-competent and -deficient mosquito cells. *One Health* 2025; 20:100960. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352771424002866>.
36. Nagy A, Mezei E, Nagy O, Bakonyi T, Csonka N, Kaposi M et al. Extraordinary increase in West Nile virus cases and first confirmed human Usutu virus infection in Hungary, 2018. *Euro Surveill* 2019; 24(28). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.28.1900038.