

Aus dem Department für Pathobiologie  
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

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

**Blutparasiten und weitere von Vektoren übertragene  
Erreger bei Murmeltieren (*Marmota marmota*) aus  
Westösterreich  
(2018)**

Bachelorarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Ilona Soukup, Bakk.phil.

Wien, im Juli 2020

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

Gutachter: Dipl.Tzt. Dr. Walter Glawischnig  
Institut für Veterinärmedizinische Untersuchungen Innsbruck  
Österr. Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit

### Eidesstattliche Erklärung

Ich, Ilona Soukup, Matrikelnummer 00301910, erkläre hiermit, dass

- für meine Bachelorarbeit keine anderen als die erwähnten Hilfsmittel und Literaturstellen einbezogen wurden,
- die entscheidenden Arbeiten von mir selbst durchgeführt und alle zuarbeitend Tätigen angeführt wurden,
- die Arbeit nicht an anderer Stelle eingereicht oder veröffentlicht wurde.

Wien, am 13.07.2020

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Fragestellung.....	1
1.1	Murmeltiere ( <i>Marmota marmota</i> ) .....	2
1.2	Protozoen .....	3
1.2.1	<i>Babesia</i> .....	5
1.2.2	<i>Theileria</i> .....	6
1.2.3	<i>Hepatozoon</i> .....	6
1.2.4	<i>Leishmania</i> .....	7
1.2.5	<i>Trypanosoma</i> .....	8
1.3	Helminthen .....	9
1.3.1	Nagerfilarien .....	9
1.4	Bakterien .....	10
1.4.1	<i>Anaplasma</i> .....	10
1.4.2	<i>Ehrlichia</i> .....	11
1.4.3	<i>Rickettsia</i> .....	12
2.	Material und Methoden .....	13
2.1	DNA-Extraktion.....	13
2.2	PCR.....	14
2.2.1	Konventionelle PCR.....	14
2.2.2	Nested-PCR .....	18
2.3	Agarose-Gelelektrophorese .....	22
2.4	Sequenzierung .....	23
3.	Ergebnisse.....	24
4.	Diskussion .....	25
5.	Zusammenfassung .....	30
6.	Summary .....	31
7.	Abkürzungsverzeichnis .....	32

8. Literaturverzeichnis.....	33
9. Abbildungsverzeichnis .....	37
10. Tabellenverzeichnis.....	38
11. Anhang.....	39

## 1. Einleitung und Fragestellung

Durch Vektoren übertragene Krankheiten (VBDs, engl. vector-borne diseases) gewinnen auch in Österreich immer mehr an Bedeutung. Sie werden von Erregern wie zum Beispiel Viren, Bakterien und Parasiten (Protozoen und Helminthen) verursacht, die von verschiedenen Arthropoden wie Zecken, Stechmücken, Sand- bzw. Schmetterlingsmücken, Läusen und Flöhen übertragen werden. Klimatische Veränderungen bewirken, dass sich Erreger und ihre Vektoren in bislang nicht endemische Gebiete ausbreiten und dort stabile Populationen etablieren.

Die globale Erwärmung hat einen erheblichen Einfluss auf die Verbreitung von VBDs: Die tendenzielle Erhöhung der Tagesdurchschnittstemperaturen auch im alpinen Bereich wirkt sich in zweierlei Hinsicht aus: Zum einen können die einzelnen parasitären Entwicklungsstadien schneller durchlaufen werden, was für Parasiten einen Vorteil in kurzlebigen Zwischenwirten wie blutsaugenden Insekten bedeutet. Zum anderen begünstigen moderate Wintertemperaturen die Ausbreitung von Zwischenwirtarten sowohl in nördlichere, als auch in höher gelegene Gebiete: „Für die Welt der Parasiten bedeutet dies neben der horizontalen Ausbreitung Richtung Norden auch eine geographisch vertikale Ausbreitung in höher gelegene Gebiete“ (Prosl 2008).

Wildtiere spielen eine wichtige, aber oft unterschätzte Rolle im Zusammenhang mit der Etablierung von VBDs und deren Vektoren (Tomassone et al. 2018). So konnten in den letzten Jahren bereits in verschiedenen Wildtierpopulationen, unter anderem in Rotwild (Cézanne et al. 2017), Rotfüchsen (Hodžić et al. 2018) und diversen Wildwiederkäuern (Messner et al. 2019) Infektionserreger, die von Zecken bzw. Stechmücken übertragen werden, nachgewiesen werden.

Es gibt bislang keine Studie, die Murmeltiere in Tirol und Vorarlberg auf Blutparasiten untersucht hat. Da jedoch bereits Blutparasiten in anderen Tierarten in den betreffenden Regionen nachgewiesen werden konnten, besteht die Möglichkeit, dass diese auch in der Murmeltierpopulation Verbreitung gefunden haben. In dieser Studie wurden daher Murmeltiere aus Tirol und Vorarlberg auf Protozoen (*Babesia/Theileria* und *Leishmania/Trypanosoma*), filarioide Nematoden und Bakterien (*Anaplasma/Ehrlichia* und *Rickettsia*) im Blut untersucht. In der durchgeführten Studie soll geklärt werden, ob die durch die oben genannten Erreger hervorgerufenen VBDs in der Murmeltierpopulation (Stand 2018) nachweisbar sind.

### 1.1 Murmeltiere (*Marmota marmota*)

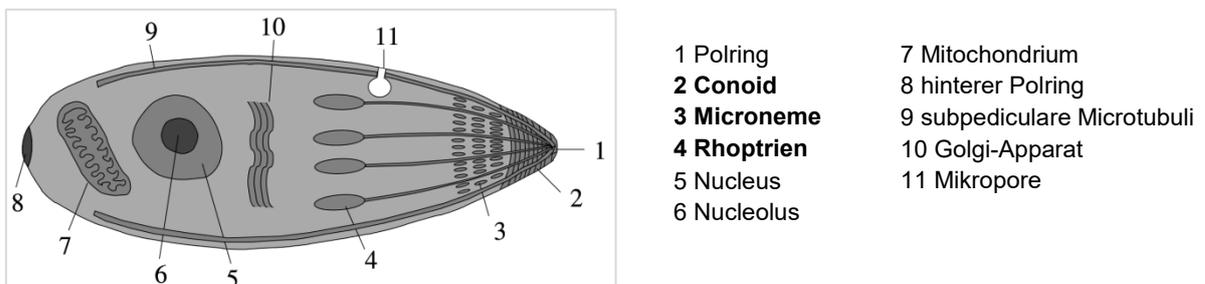
Das Alpenmurmeltier (*Marmota marmota*) ist ein Nagetier, dessen natürliches Verbreitungsgebiet die Zentral- und Westalpen und die Hohe Tatra umfasst. Durch gezielte Aussetzung sind Murmeltiere heute auch in den Ostalpen, den Pyrenäen und im Schwarzwald beheimatet (Arnold 1999).

Alpenmurmeltiere besiedeln verschiedene Höhenlagen, die von der jeweiligen lokalen Baumgrenze bis etwa 200 Höhenmeter darüber reichen. Murmeltiere nutzen auch Rodungsflächen unterhalb der Baumgrenze, wobei sie jedoch bestimmte Höhenlagen nicht unterschreiten und somit erst ab einer Höhe von mindestens 800 Metern zu beobachten sind (Arnold 1999). Da Alpenmurmeltiere gut an extreme alpine Bedingungen angepasst sind, siedeln sie bis an den Fuß von Gletschern und erreichen dabei gelegentlich Höhenlagen von 3000 Metern. Zu den natürlichen Feinden des Murmeltieres zählen vor allem Greifvögel wie der Steinadler, aber auch Baumarder und Füchse.

Von besonderem wissenschaftlichen Interesse war seit Ende des 19. Jahrhunderts die Fähigkeit des Alpenmurmeltieres, Winterschlaf zu halten (Arnold 1999). In diesem Zusammenhang findet sich auch eine der frühesten Erwähnungen von Blutparasiten beim Murmeltier in einem Artikel über die Resistenz von Murmeltieren gegen parasitäre Erkrankungen während des Winterschlafs von Raphael Blanchard und Marc Blatin aus dem Jahr 1907. Sie beobachteten, dass Murmeltiere im Allgemeinen gut für *Trypanosoma* empfänglich seien, im Winterschlaf jedoch unempfindlich für den Erreger wären (Hoffmann 1912).

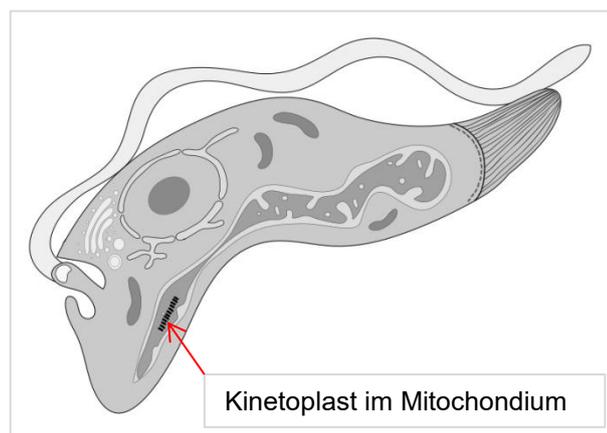
## 1.2 Protozoen

Unter Protozoen versteht man frei oder parasitisch lebende, einzellige, eukaryotische Mikroorganismen von unterschiedlicher Größe (1–300 µm) und Gestalt. Die Protozoenzelle ist prinzipiell gleich aufgebaut wie andere eukaryotische Zellen. Vor allem parasitisch lebende Formen besitzen zudem spezielle Organellen. Dazu gehören zum Beispiel der Apikalkomplex (Abb. 1) – spezifische Organellen, unter anderem Conoid, Rhoptrien, Mikronemen, im Vorderende (Apex) beweglicher Stadien zur Infektion von Wirtszellen und Bildung von parasitophoren Vakuolen innerhalb der befallenen Zelle, oder der Kinetoplast (Abb. 2), eine DNA-haltige Struktur im Mitochondrium, das zum Beispiel bei *Trypanosoma*, dem Erreger der Schlafkrankheit, für das Überleben im wirbellosen Überträger, nicht jedoch im Wirbeltierkörper erforderlich ist (Deplazes et al. 2013).



**Abb. 1:** Schema eines Merozoiten der Apicomplexa

Quelle: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Apicomplexa\\_structure.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Apicomplexa_structure.svg); letzter Zugriff: 14.07.2020



**Abb. 2:** Schema von *Trypanosoma* spp. aus dem Unterstamm der Kinetoplasta

Quelle: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:201704\\_Trypanosoma.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:201704_Trypanosoma.svg); letzter Zugriff: 14.07.2020  
Lizenz: DataBase Center for Life Science (DBCLS) / CC BY  
(<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>)

Während Babesien, Theilerien und *Hepatozoon* wegen ihres Apikalkomplexes zum Unterstamm der Apicomplexa innerhalb des Stammes der Alveolata zugeordnet werden (Tab. 1), zählen Trypanosomen zum Unterstamm der Kinetoplasta innerhalb der Euglenozoa (Tab. 2) (Deplazes et al. 2013).

Die Apicomplexa sind häufig vorkommende Parasiten von Wirbellosen und Wirbeltieren. Zu den zahlreichen Arten in den Klassen Haematozoa und Coccidea gehören Erreger wichtiger Parasitosen von Haus- und Wildtieren, aber auch Menschen, wie zum Beispiel Babesiosen und Hepatozoonosen (Deplazes et al. 2013).

Im Unterstamm der Kinetoplasta sind die Trypanosomatidae mit den Gattungen *Leishmania* und *Trypanosoma* von besonderer Bedeutung (Deplazes et al. 2013). *Leishmania*-Infektionen sind bei Tieren und Menschen in warmen Klimazonen weit verbreitet. Veterinärmedizinische Bedeutung hat in Europa vor allem die Leishmaniose des Hundes. Trypanosoma-Arten verursachen zum Beispiel in Afrika die Nagana der Haustiere und die Schlafkrankheit des Menschen.

**Tab. 1:** Systematik *Babesia* / *Theileria* und *Hepatozoon*

Stamm	Unterstamm	Klasse	Ordnung	Familie	Gattung
Alveolata	Apicomplexa	Haematozoae	Piroplasmida	Babesiidae	<i>Babesia</i> - <i>B. microti</i>
				Theileriidae	<i>Theileria</i>
		Coccidea	Adeleida	Hepatozoidae	<i>Hepatozoon</i>

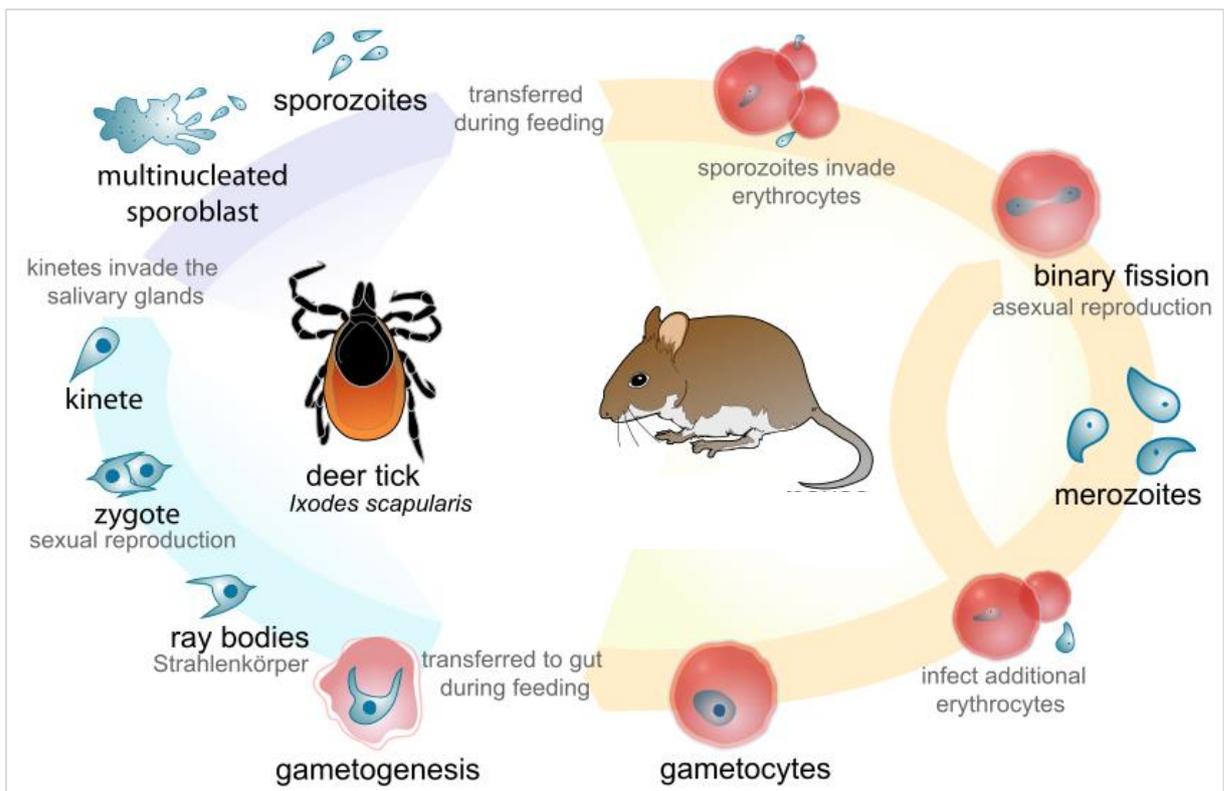
**Tab. 2:** Systematik *Leishmania* und *Trypanosoma*

Stamm	Unterstamm	Klasse	Ordnung	Familie	Gattung
Euglenozoa	Kinetoplasta	Kinetoplastea	Trypanosomatida	Trypanosomatidae	<i>Leishmania</i>
					- <i>L. infantum</i>
					<i>Trypanosoma</i>

### 1.2.1 *Babesia*

Babesien sind Parasiten der Säugetiere; die meisten Arten parasitieren bei Nagern, Carnivoren und Wiederkäuern, wenige Arten auch bei Vögeln (Deplazes et al. 2013).

Die Infektion des Wirtes mit Babesien erfolgt durch den Stich von Schildzecken (Ixodidae): Infizierte Zecken übertragen mit ihrem Speichel Sporozoiten (infektiöses Stadium der Sporozoa) auf den Wirt. Diese befallen anschließend ausschließlich Erythrozyten, in denen sie zunächst als Trophozoiten (vegetative Lebensphase adulter Babesien) verbleiben. Durch äußere Knospung (Exodyogenie) entstehen im Erythrozyten meistens zwei birnen- oder tropfenförmige Merozoiten (ungeschlechtliche Form im Geschlechtszyklus). Nach der Zerstörung des befallenen Erythrozyten werden die Merozoiten freigesetzt und können dann wiederum in neue, noch nicht befallene Erythrozyten eindringen. Mit dem Blut infizierter Wirte nehmen Zeckenweibchen Merozoiten auf, die sich im Darm der Zecke vermehren und sich anschließend als Sporozoiten in den Speicheldrüsen der Zecke festsetzen (Abb. 3).



**Abb. 3:** Entwicklungszyklus *B. microti*

Quelle: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Babesia\\_microti\\_life\\_cycle\\_en.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Babesia_microti_life_cycle_en.svg); letzter Zugriff: 14.07.2020

Während bei den meisten Babesienarten eine vertikale Infektion der Zeckennachkommen durch infizierte Zeckenweibchen (transovariale Infektion) vorherrscht, findet bei einigen (atypischen) *Babesia*-Arten, unter anderem auch Nagerbabesien, die genetisch den Theilerien nahestehen, soweit bekannt, keine transovariale Infektion, sondern lediglich eine Übertragung von Stadium zu Stadium statt (Deplazes et al. 2013). *Babesia microti* wird beispielsweise nur von der Zeckenlarve, die das empfängliche Stadium darstellt, an die Zeckennymphen weitergegeben, die ihrerseits den Sporozoiten an den Wirt übertragen kann. Nach der erfolgten Übertragung der Sporozoiten erlischt die Infektion in der Nymphe. Die nachfolgenden Zeckenstadien sind somit nicht mehr infiziert.

### 1.2.2 *Theileria*

Die eng mit Babesien verwandten Theilerien kommen bei Wiederkäuern und Equiden vor. Sie befallen im Gegensatz zu den Babesien nicht nur die Erythrozyten des Zwischenwirtes, sondern auch seine Leukozyten. Die derzeit als „atypisch“ angesehenen *Babesia*-Arten der Nager, der Katzenartigen und einige kleine Babesien des Hundes könnten zukünftig der Familie Theileriidae zugeordnet werden.

### 1.2.3 *Hepatozoon*

Der bekannteste Vertreter der *Hepatozoon*-Gattung ist *Hepatozoon canis*. Er kommt häufig im Mittelmeergebiet und in anderen warmen Klimazonen als Parasit von Hunden und anderen Caniden (Rotfuchs, Schakal, Hyäne) vor und wird durch die Braune Hundezecke (*Rhipicephalus sanguineus*) übertragen.

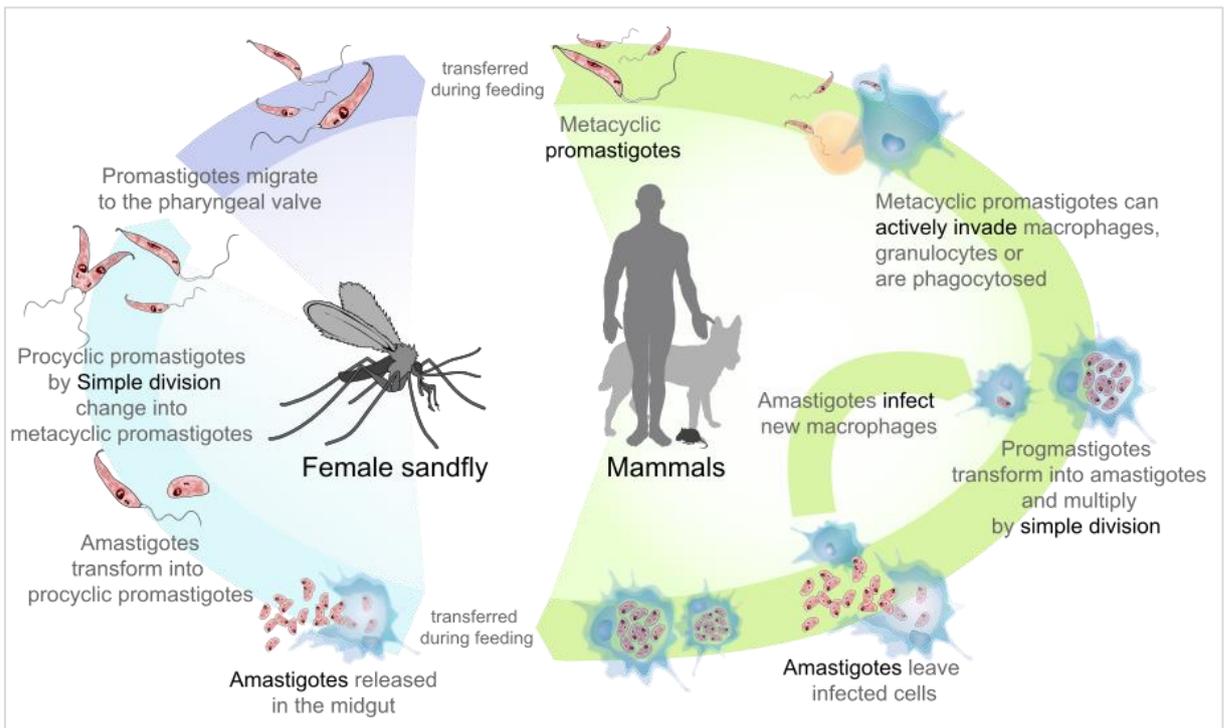
In Mitteleuropa gilt die Hepatozoonose noch als eher seltene Import- und Reisekrankheit. Der Erreger wird durch Zerbeißen infizierter Zecken aufgenommen und wandert über Darmgefäße in verschiedene Organe (Leber, Milz, Lymphknoten, Lunge, Knochenmark, Nieren, Myokard und Muskulatur). Dort findet die Reifung zu Merozoiten statt, die sich in weiterer Folge in neutrophilen Granulozyten und Monozyten zu Gamonten (geschlechtliche Vorstufe im Geschlechtszyklus) entwickeln.

### 1.2.4 *Leishmania*

Leishmanien sind weltweit verbreitet, vor allem jedoch in tropischen und subtropischen Gebieten und auch Südeuropa. Sie können bei zahlreichen Säugetierarten parasitieren.

Von den ca. 20 für Säugetiere pathogenen Leishmanienarten in Südeuropa kommt *Leishmania infantum* die größte veterinärmedizinische Bedeutung zu (Deplazes et al. 2013). Leishmanien werden durch Sandmücken (Phlebotomen) übertragen und verursachen vor allem bei Menschen, Hunden, Katzen und Nagern Erkrankungen (Leishmaniosen).

Sandmücken nehmen mit der Blutmahlzeit die amastigoten Formen des infizierten Wirtes auf. In deren Darm entwickeln sich die amastigoten zu promastigoten Formen und wandern in den Stechrüssel. Die Promastigoten infizieren bei einem erneuten Saugakt den neuen Wirt. Im Wirbeltier parasitieren Leishmanien dann intrazellulär unter anderem in Makrophagen, Monozyten, Langerhanszellen als amastigote Stadien. Diese vermehren sich innerhalb von parasitophoren Vakuolen durch Zweiteilung. Durch den Zerfall der Zelle werden amastigote Formen freigesetzt und können weitere Zellen im Wirt infizieren (Abb. 4).



**Abb. 4:** Entwicklungszyklus *L. infantum*

Quelle: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Leishmaniasis\\_life\\_cycle\\_diagram\\_en.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Leishmaniasis_life_cycle_diagram_en.svg); letzter Zugriff: 14.07.2020

Das Verbreitungsgebiet von *L. infantum* erstreckt sich über das Mittelmeergebiet, den Nahen Osten bis hin zu einigen außereuropäischen Regionen. Hunde gelten als die wichtigsten Reservoirwirte; Füchse, seltener Katzen und Ratten, können ebenfalls Parasitenträger sein. Von Einschleppungen der Leishmaniose durch Hunde aus Endemiegebieten in nichtendemische Regionen nördlich der Alpen wurde bereits öfter berichtet (Deplazes et al. 2013).

Das Krankheitsbild der Leishmaniose tritt etwa 1–3 Monate nach der Infektion auf, teilweise viel später. In symptomatischen Fällen entwickelt sich mit der Zeit ein vielfältiges, chronisches Krankheitsbild, das von geringgradiger generalisierter Lymphknotenschwellung ohne Störungen des Allgemeinbefindens bis hin zur generalisierten viszeralen Erkrankung mit starken Hautveränderungen und Niereninsuffizienz reicht (Deplazes et al. 2013).

#### 1.2.5 *Trypanosoma*

*Trypanosoma* sind wie auch *Leishmania* Protozoen des Unterstammes Kinetoplasta. Ihre infektiösen Stadien werden unter anderem beim Blutsaugen mit dem Speichel der Tsetse-Fliegen auf einen neuen Wirt übertragen und vermehren sich in diesem zunächst durch Zweiteilungen an der Stichstelle in der Gewebeflüssigkeit, bis sie nach 4-8 Tagen in die Lymphe und das Blutplasma übergehen und sich dort weitervermehren. Trypanosomen können auch in den Liquor cerebrospinalis eindringen und sich interzellulär im Gehirn vermehren (Deplazes et al. 2013).

*Trypanosoma* verursachen teils schwerwiegende Infektionskrankheiten wie die Schlafkrankheit beim Menschen und Nagana bei verschiedenen Säugetieren, die im tropischen Afrika seit langer Zeit seuchenartig auftritt und hohe Verluste besonders in Rinderbeständen verursacht (Deplazes et al. 2013).

Die in Europa bei Rind, Schaf und Ziege parasitierenden *Trypanosoma*-Arten schädigen ihre Wirte nach den bisherigen Erkenntnissen nicht (Schnieder et al. 2006).

### 1.3 Helminthen

Der Begriff „Helminthen“ ist eine Kollektivbezeichnung für sehr unterschiedliche, parasitisch lebende Wurmstämme der Plathelminthes (Plattwürmer), Nematoda (Rundwürmer) und Acanthocephalen (Kratzer). Filarien, die zum Stamm der Nematoden zählen, kommen bei allen Klassen von Vertebraten außer bei Fischen vor (Deplazes et al. 2013).

Adulte Filarien (Makrofilarien) sind meist sehr dünne Nematoden, die sich vivipar (lebendgebärend) oder ovovivipar (Ausscheidung von Mikrofilarien oder von larvenhaltigen Eiern) vermehren (Deplazes et al. 2013). Die Mikrofilarien gelangen aus den befallenen Organen in andere Körpergewebe, Blut oder Lymphe der Endwirte. Ihre Reifung erfolgt speziesabhängig entweder in blutsaugenden Zwischenwirten (hämatophage Arthropoden) oder seltener im Endwirt selbst.

#### 1.3.1 Nagerfilarien

In Europa ist vor allem der Herzwurm (*Dirofilaria immitis*) von Hund und Katze veterinärmedizinisch von Relevanz (Deplazes et al. 2013). Derselben Familie (Onchocercidae) wird die für Nager bedeutsame Filariengattung *Acanthocheilonema* aus der Unterfamilie Onchocercinae zugeordnet (Tab. 3). *Acanthocheilonema* tritt weltweit auf und befällt auch Caniden (Deplazes et al. 2013).

Eine besondere Rolle spielt die Gattung *Acanthocheilonema viteae*, die unter Laborbedingungen als Modellsystem für die Filariosen des Menschen verwendet wird (Hiepe und Aspöck 2006).

**Tab. 3:** Systematik *Acanthocheilonema*

Stamm	Klasse	Ordnung	Überfamilie	Familie	Unterfamilie	Gattung
Nematoda	Secernentea	Spirurida	Filarioidea	Onchocercidae	Onchocercinae	<i>Acanthocheilonema</i> - <i>A. viteae</i>

## 1.4 Bakterien

Anaplasmen, Ehrlichien und Rickettsien zählen zu den obligat intrazellulär lebenden Proteobakterien (Tab. 4). Sie nehmen damit eine Sonderstellung ein. Auf Grund ihrer sonstigen Merkmale wie Ausbildung einer Zellwand, Vorkommen von DNA und RNA in einer Zelle, Stoffwechselaktivität, Antibiotikaempfindlichkeit und Zweiteilung werden sie den Bakterien zugeordnet. Ihre Zellwand entspricht dem gramnegativen Typ (Rolle et al. 2007).

Anaplasmen werden gemeinsam mit Ehrlichien und Rickettsien in den Stamm der Proteobacteria eingeordnet, in dem sie der Klasse der Alphaproteobakterien angehören. Alle drei Gattungen zählen zur Ordnung Rickettsiales. Während Anaplasmen und Ehrlichien der Familie der Anaplasmataceae angehören, bilden Rickettsien eine eigene Familie, die der Rickettsiaceae (Tab. 4).

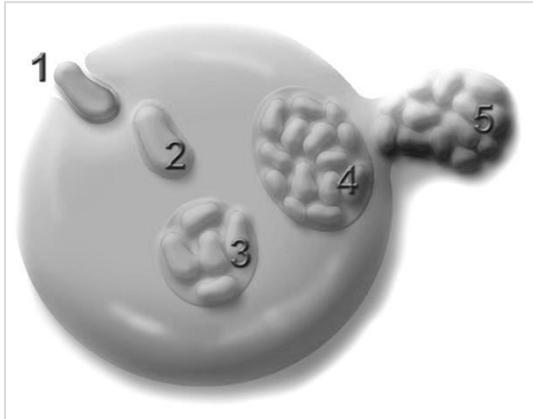
**Tab. 4:** Systematik *Anaplasma*, *Ehrlichia* und *Rickettsia*

Stamm	Klasse	Ordnung	Familie	Gattung
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rickettsiales	Anaplasmataceae	<i>Anaplasma</i> - <i>A. phagocytophilum</i>
				<i>Ehrlichia</i> - <i>E. muris</i>
			Rickettsiaceae	<i>Rickettsia</i> - <i>R. typhi</i> - <i>R. rickettsii</i> - <i>R. conorii</i>

### 1.4.1 *Anaplasma*

Anaplasmen werden gemeinsam mit Ehrlichien zur Familie der Anaplasmataceae gezählt. Sie parasitieren in cytoplasmatischen Vakuolen von reifen und unreifen hämopoetischen Zellen, vor allem Erythrozyten, neutrophilen Granulozyten und myeloiden Zellen von Säugetieren. Als Vektoren dienen Zecken (*Ixodes ricinus*), in denen eine transovariale Übertragung auf die nächste Zeckengeneration stattfindet (Rolle et al. 2007).

Infizierte Zecken übertragen einzelne Anaplas mazellen (Initialkörper) bei der Blutmahlzeit auf ihren Wirt, in dessen Erythrozyten diese dann zu mehrzelligen Elementarkörpern heranreifen (Abb. 5).



- 1: Bakterie befällt Wirtszelle
- 2, 3, 4: Reifung des Initialkörpers durch Morulation im Zytoplasma der Wirtszelle
- 5: Austritt des infektiösen Bakteriums als Elementarkörper aus der Wirtszelle

**Abb. 5:** Infektion einer Zelle durch *Anaplasma/Ehrlichia*

Quelle: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:EhrlichiaDrawing.jpg>; letzter Zugriff: 14.07.2020

Lizenz: Lamiot / CC BY-SA (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0>)

Als Wirte von *Anaplasma phagocytophilum* fungieren neben Hunden auch Menschen, andere Haus- und Nutztiere, Wildtiere und Nagetiere (Rolle et al. 2007).

#### 1.4.2 Ehrlichia

Ehrlichien befallen nach der Übertragung durch infizierte Zecken die Leukozyten des Wirtes und können damit bei verschiedenen Säugetieren und dem Menschen Infektionskrankheiten auslösen. Sie finden sich vornehmlich in Hunden (*E. canis*, *E. chaffeensis*), Pferden (*E. equi* – wird jetzt zu *A. phagocytophilum* gezählt, *E. risticii* bzw. *Neoehrlichia risticii*) und (Wild-) Wiederkäuern (*E. ondiri*, *E. chaffeensis*, *E. ruminantium*).

Die für Nagetiere bedeutsame Gattung ist *E. muris* (Rolle et al. 2007).

### 1.4.3 *Rickettsia*

Die ersten Rickettsien wurden zu Beginn des 20. Jahrhunderts von Howard Taylor Ricketts nachgewiesen. Mehrere Spezies sind humanpathogen und rufen Krankheiten wie Fleckfieber (klassischerweise hervorgerufen durch *Rickettsia prowazekii*), Zeckenbissfieber und Tsutsugamushi-Fieber hervor (Rolle et al. 2007).

Nager fungieren als Reservoirwirte für verschiedene *Rickettsia*-Spezies, die zoonotisches Potential besitzen (Tab. 5). Eine besondere Bedeutung kommt dabei *Rickettsia typhi* zu, dem der Erreger des murinen Typhus. *R. typhi* ist in mediterranen Ländern wie Spanien, Kroatien, Griechenland und Zypern verbreitet. Es gibt jedoch immer wieder Berichte von importierten und sporadischen Fällen in ganz Europa. Reservoirwirt ist in Europa die Ratte (*Rattus norvegicus* und *Rattus rattus*) (Portillo et al. 2015).

**Tab. 5:** Nager als Reservoirwirte für Rickettsiosen des Menschen

Erreger	Krankheit	Verbreitung	Vektoren	Reservoirwirte
<i>R. typhi</i>	murines Fleckfieber	weltweit	Flöhe	Nager
<i>R. rickettsii</i>	Rocky-Mountain-Fleckfieber, Felsengebirgsfieber	westliche Hemisphäre	Zecken	Nager, Hund
<i>R. conorii</i>	Boutonneuse-Fieber	Afrika, Indien, Mittelmeergebiet	Zecken	Nager, Hund
<i>R. sibirica</i>	Sibirisches Zeckenbissfieber	Russland, Mongolei	Zecken	Nager
<i>R. australis</i>	Queensland-Zeckenbissfieber	Australien	Zecken	Nager, Beuteltiere
<i>Orientalis tsutsugamushi</i> (früher <i>R. t.</i> )	Japanisches Fleckfieber, Tsutsugamushi-Fieber	Südostasien, Japan, Nordaustralien	Milben	Nager

## 2. Material und Methoden

Im Zuge der Jagdsaison 2018 sammelten Jäger in Zusammenarbeit mit der Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit Innsbruck (AGES Innsbruck) Blutproben von 148 jagdlich erlegten Murmeltieren im Raum Westösterreich (Tirol, Vorarlberg) (Tab. 6). Diese Blutproben wurden auf Filterpapierstreifen aufgebracht (etwa 50 µl pro Tropfen), getrocknet und dem Institut für Parasitologie anschließend für weiterführende Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

**Tab. 6:** Anzahl und Geschlechtsverteilung der erlegten Murmeltiere je Bezirk

	Männlich	Weiblich	Jungtier	Gesamt
Imst	17	6	1	24
Innsbruck-Land	18	14	2	34
Landeck	15	5	0	20
Lienz	15	5	3	23
Schwaz	0	1	0	1
Bludenz	24	15	1	40
Bregenz	1	3	1	6*
<b>Gesamt</b>	90	49	8	148

\* 1 Tier ohne Angabe des Geschlechts

### 2.1 DNA-Extraktion

Zur Vorbereitung der DNA-Extraktion wurde zunächst mit Hilfe eines Einwegskalpellens aus jedem Filterpapier ein etwa 4x4 mm großes Stück im zentralen Bereich des Blutropfens herausgeschnitten und dieses über Nacht bei 4 °C in einem 1,5 ml Eppendorf-Tube in je 100 µl phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) eingelegt.

Die DNA-Extraktion wurde nach Protokoll (Anhang 1) unter Verwendung des InstaGene™ Matrix-Kits (Fa. Bio-Rad Laboratories, Inc.) durchgeführt und die dadurch erhaltenen DNA-Lösungen bis zur weiteren Analyse auf -20 °C gelagert.

Das im InstaGene™ Matrix-Kit enthaltene Salz verbleibt in der DNA-Lösung und würde die PCR-Reaktionen inhibieren. Deswegen muss das Eppendorff-Tube nach dem Auftauen vor jeder Verwendung kurz zentrifugiert werden und beim Pipettieren darauf geachtet werden, das Sample aus dem oberen, salzfreien Bereich des Überstandes zu entnehmen.

## 2.2 PCR

### 2.2.1 Konventionelle PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl. polymerase chain reaction) dient zur *in vitro* Vervielfältigung von DNA. Dazu werden in einem PCR-Reaktionsgefäß das DNA-Sample mit dem so genannten Mastermix, bestehend aus Wasser, Puffer, Nukleotiden, Polymerase und Primern vermischt. Die Vervielfältigung findet automatisiert in 20–50 Zyklen im Thermocycler in drei sich wiederholenden Schritten statt. Die Produkte der vorangegangenen Reaktion dienen als Ausgangsstoffe für die folgende Reaktion, wodurch eine exponentielle Vervielfältigung erreicht wird. Je nach DNA-Abschnitt und dementsprechend designten Primer variieren die erforderlichen Temperatur- und Zeitangaben.

1. Denaturierung (Melting, Schmelzen):

Die doppelsträngige DNA wird auf 94–96 °C erhitzt, wodurch sich die Stränge durch Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen trennen. Im ersten Zyklus wird die DNA zumeist für längere Zeit erhitzt (Initial denaturation, Initialisierung), um sicherzustellen, dass sich sowohl die Ausgangs-DNA als auch die Primer vollständig voneinander getrennt haben und nur noch als Einzelstränge vorliegen.

2. Primerhybridisierung (Annealing):

Bei einer Temperatur zwischen 40–65 °C (selten höher) findet die spezifische Anlagerung der Primer an die DNA-Einzelstränge statt. Die gewählte Temperatur ist abhängig von der Länge und der Sequenz der eingesetzten Primer.

3. Elongation (Extending, Polymerisation, Verlängerung, Amplifikation):

Die an die Einzelstränge angelagerten Primer bilden den Ausgangspunkt für die Ergänzung der fehlenden Nukleotide durch die DNA-Polymerase, wodurch wieder DNA-Doppelstränge entstehen. Die Temperatur hängt vom Arbeitsoptimum der verwendeten DNA-Polymerase ab und liegt bei 68–72 °C. Die Reaktion wird erneut bei der Denaturierung fortgesetzt.

### Anaplasmatacea 16S – zum Nachweis von u.a. *Anaplasma*, *Ehrlichia*

Als Primer wurden EHR16SD\_for und EHR16SR\_rev verwendet (Tab. 7). Das 16S-rRNA-Gen in Bakterien und Archaeen wird für phylogenetische Studien und zur Identifizierung einzelner Bakterienstämme verwendet, weil es einerseits hochkonservierte Primer-Bindungsstellen besitzt und andererseits hypervariable Regionen besitzt, die eine Identifizierung ermöglichen (Clarridge 2004).

Für die PCR wurden jeweils 20 µl Mastermix (Tab. 8) und 5 µl DNA-Sample in entsprechende PCR-Tubes pipettiert und die PCR nach Protokoll durchgeführt (Tab. 9).

**Tab. 7:** Primer Anaplasmatacea

		Primer	Sequenz	PCR-Produkt
Anaplasmatacea	Fw	EHR16SD_for	5'-GGTACCYACAGAAGAAGTCC-3'	345 bp
	Rv	EHR16SR_rev	5'-TAGCACTCATCGTTTACAGC-3'	

Anmerkung: verschiedene Höhen möglich (350 bp und 550 bp)

**Tab. 8:** Mastermix Anaplasmatacea

	Konz.	Menge (µl)
H <sub>2</sub> O	-	11,175
Green Reaction Buffer	5x	5,000
dNTP-Mix	25 mM	0,200
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1,500
TaqPolymerase (GoTaq)	5 u/µl	0,125
EHR16SD_for	25 pmol/µl	1,000
EHR16SR_rev	25 pmol/µl	1,000

**Tab. 9:** PCR-Protokoll Anaplasmatacea

Temperatur	Zeit	Zyklen
95 °C	2 min	1
94 °C	1 min	35
54 °C	30 sec	
72 °C	30 sec	
72 °C	5 min	1
15 °C	Lagerung	

### Rickettsia ITS – zum Nachweis von *Rickettsia* spp.

Als Primer wurden Ricketts\_ITS\_for und Ricketts\_ITS\_rev verwendet (Tab. 10). Ein Teil der 16S- und 23S-kodierenden Regionen sind speziesspezifisch. Zwischen ihnen befindet sich die ITS-Region (engl. *internally transcribed spacer*), die sich durch ihre Variabilität zur Unterscheidung von nah verwandten Bakterienisolaten eignet (Mims 2018).

Für die PCR wurden jeweils 20 µl Mastermix (Tab. 11) und 5 µl DNA-Sample in entsprechende PCR-Tubes pipettiert und die PCR nach Protokoll durchgeführt (Tab. 12).

**Tab. 10:** Primer *Rickettsia*

		Primer	Sequenz	PCR-Produkt
<i>Rickettsia</i>	Fw	Ricketts_ITS_for	5'-GATAGGTCGGGTGTGGAAG-3'	ca. 400 bp
	Rv	Ricketts_ITS_rev	5'-TCGGGATGGGATCGTGTG-3'	

**Tab. 11:** Mastermix *Rickettsia*

	Konz.	Menge (µl)
H <sub>2</sub> O	-	12,675
Green Reaction Buffer	5x	5,000
dNTP-Mix	25 mM	0,200
TaqPolymerase (GoTaq)	5 u/µl	0,125
Ricketts_ITS_for	1 pmol/µl	1,000
Ricketts_ITS_rev	1 pmol/µl	1,000

**Tab. 12:** PCR-Protokoll *Rickettsia*

Temperatur	Zeit	Zyklen
96 °C	4 min	1
94 °C	1 min	35
52 °C	1 min	
72 °C	2 min	
72 °C	3 min	1
15 °C	Lagerung	

### Filarioidea COI – zum Nachweis von filarioiden Helminthen

Als Primer wurden COLint-F und COLint-R verwendet (Tab. 13). Die mitochondriale Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheit 1 (COI) ist eines der populärsten Marker für molekulare Systematik, weil dieses Gen zwischen verschiedenen Arten stärkere Unterschiede aufweist als die anderen mitochondrialen Gene (Brede und Steinke 2006).

Für die PCR wurden jeweils 23 µl Mastermix (Tab. 14) und 2 µl DNA-Sample in entsprechende PCR-Tubes pipettiert und eine Touchdown-PCR nach Protokoll durchgeführt (Tab. 15).

Die *Touchdown*-PCR stellt eine Sonderform der konventionellen PCR dar. Sie wurde zur Vermeidung der Amplifizierung unspezifischer DNA-Sequenzen entwickelt. Bei dieser Technik wird in den ersten Synthese-Zyklen eine Annealing-Temperatur gewählt, die nur knapp unterhalb der Denaturierungstemperatur liegt, wodurch die Primerbindung und somit auch das Amplifikat höchst spezifisch ausfallen. In den folgenden Zyklen wird die Annealing-Temperatur schrittweise herabgesetzt, bis die herkömmliche Annealing-Temperatur erreicht ist. Diese abgewandelte PCR erlaubt eine starke und sehr spezifische DNA-Amplifikation.

**Tab. 13:** Primer Filarioidea

		Primer	Sequenz	PCR-Produkt
Filarioidea	Fw	COLint-F	5'-TGATTGGTGGTTTTGGTAA-3'	668 bp
	Rv	COLint-R	5'-ATAAGTACGAGTATCAATATC-3'	

**Tab. 14:** Mastermix Filarioidea

	Konz.	Menge (µl)
H <sub>2</sub> O	-	15,675
Green Reaction Buffer	5x	5,000
dNTP-Mix	25 mM	0,200
TaqPolymerase (GoTaq)	5 u/µl	0,125
Ricketts_ITS_for	50 pmol/µl	1,000
Ricketts_ITS_rev	50 pmol/µl	1,000

**Tab. 15:** PCR-Protokoll Filarioidea

Temperatur	Zeit	Zyklen
94 °C	2 min	1
94 °C	45 sec	8 (-0,5 °C je Zyklus)
51 °C	45 sec	
72 °C	90 sec	1
94 °C	45 sec	25
45 °C	45 sec	
72 °C	90 sec	
72 °C	7 min	1
15 °C	Lagerung	

### 2.2.2 Nested-PCR

Unter nested-PCR (verschachtelte PCR) versteht man die Durchführung zweier aufeinander aufbauender PCR-Reaktionen. Sie wird einerseits eingesetzt, wenn nur sehr geringe Mengen der zu amplifizierenden DNA relativ Gesamtprobenmenge an DNA vorhanden sind. Andererseits dient diese Methode zur Anhebung der Spezifität eines PCR-Produkts. Während der ersten PCR kommt es durch unspezifische Bindungen der Primer zur Amplifizierung unerwünschter Sequenzbereiche. Für die zweite PCR werden Primer verwendet, die innerhalb des gewünschten Sequenzbereiches binden, wodurch dieser mit sehr hoher Spezifität und in ausreichender Menge für weitere Analysen generiert wird.

#### Piroplasmida BTH – zum Nachweis von *Babesia*, *Theileria*, *Hepatozoon* – Nest 1

Als Primer für Nest 1 wurden BTH-1F und BTH-1R verwendet (Tab. 16).

Für die PCR wurden im ersten Durchgang jeweils 20 µl Mastermix (Tab. 17) und 5 µl DNA-Sample in entsprechende PCR-Tubes pipettiert und die PCR nach Protokoll durchgeführt (Tab. 18).

**Tab. 16:** Primer Piroplasmida – Nest 1

		Primer	Sequenz	PCR-Produkt
Piroplasmida	Fw	BTH-1F	5'-CCTGAGAAACGGCTACCACATCT-3'	700 bp
	Rv	BTH-1R	5'-TTGCGACCATACTCCCCCCA-3'	

**Tab. 17:** Mastermix Piroplasmida – Nest 1

	Konz.	Menge (µl)
H <sub>2</sub> O	-	14,175
Green Reaction Buffer	5x	5,000
dNTP-Mix	25 mM	0,200
TaqPolymerase (GoTaq)	5 u/µl	0,125
BTH-1F	100 pmol/µl	0,250
BTH-1R	100 pmol/µl	0,250

**Tab. 18:** PCR-Protokoll Piroplasmida – Nest 1

Temperatur	Zeit	Zyklen
94 °C	2 min	1
95 °C	30 sec	40
68 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	1
15 °C	Lagerung	

### Piroplasmida BTH – zum Nachweis von *Babesia*, *Theileria*, *Hepatozoon* – Nest 2

Als Primer für Nest 2 wurden G-2\_for und G-2\_rev verwendet (Tab. 19).

Für die PCR wurden im zweiten Durchgang jeweils 20 µl Mastermix (Tab. 20) und 5 µl DNA-Sample aus Nest 1 in entsprechende PCR-Tubes pipettiert und die PCR nach Protokoll durchgeführt (Tab. 21).

**Tab. 19:** Primer Piroplasmida – Nest 2

		Primer	Sequenz	PCR-Produkt
Piroplasmida	Fw	G-2_for	5'-GTCTTGTAATTGGAATGATGG-3'	561 bp
	Rv	G-2_rev	5'-CCAAAGACTTTGATTTCTCTC-3'	

**Tab. 20:** Mastermix Piroplasmida – Nest 2

	Konz.	Menge (µl)
H <sub>2</sub> O	-	13,675
Green Reaction Buffer	5x	5,000
dNTP-Mix	25 mM	0,200
TaqPolymerase (GoTaq)	5 u/µl	0,125
G-2_for	100 pmol/µl	0,500
G-2_rev	100 pmol/µl	0,500

**Tab. 21:** PCR-Protokoll Piroplasmida – Nest 2

Temperatur	Zeit	Zyklen
94 °C	2 min	1
95 °C	30 sec	40
60 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	1
15 °C	Lagerung	

### Trypanosomatida 18S – zum Nachweis von Trypanosomatida (*Leishmania*, *Trypanosoma*) – Nest 1

Als Primer für Nest 1 wurden S762F und S763R verwendet (Tab. 22).

Für die PCR wurden im ersten Durchgang jeweils 24 µl Mastermix (Tab. 23) und 1 µl DNA-Sample in entsprechende PCR-Tubes pipettiert und die PCR nach Protokoll durchgeführt (Tab. 24).

**Tab. 22:** Primer Trypanosomatida – Nest 1

		Primer	Sequenz	PCR-Produkt
Trypanosomatida	Fw	S762F	5'-GACTTTTGCTTCCTCTA(A/T)TG-3'	ca. 2000 bp
	Rv	S763R	5'-CATATGCTTGTTC AAGGAC-3'	

**Tab. 23:** Mastermix Trypanosomatida – Nest 1

	Konz.	Menge (µl)
H <sub>2</sub> O	-	14,675
Green Reaction Buffer	5x	5,000
dNTP-Mix	25 mM	0,200
TaqPolymerase (GoTaq)	5 u/µl	0,125
S762F	10 pmol/µl	2,000
S763R	10 pmol/µl	2,000

**Tab. 24:** PCR-Protokoll Trypanosomatida – Nest 1

Temperatur	Zeit	Zyklen
94 °C	5 min	1
94 °C	1 min	30
64 °C	90 sec	
72 °C	90 sec	
72 °C	5 min	1
15 °C	Lagerung	

### Trypanosomatida 18S – zum Nachweis von Trypanosomatida (*Leishmania*, *Trypanosoma*) – Nest 2

Als Primer für Nest 2 wurden S755 und S823 verwendet (Tab. 25).

Für die PCR wurden im zweiten Durchgang jeweils 24 µl Mastermix (Tab. 26) und 1 µl DNA in entsprechende PCR-Tubes pipettiert und die PCR nach Protokoll durchgeführt (Tab. 27).

**Tab. 25:** Primer Trypanosomatida – Nest 2

		Primer	Sequenz	PCR-Produkt
Trypanosomatida	Fw	S755	5'-CATATGCTTGTTTCAAGGAC-3'	326 bp
	Rv	S823	5'-CGAAYAACTGCTATCAGC-3'	

**Tab. 26:** Mastermix Trypanosomatida – Nest 2

	Konz.	Menge (µl)
H <sub>2</sub> O	-	14,675
Green Reaction Buffer	5x	5,000
dNTP-Mix	25 mM	0,200
TaqPolymerase (GoTaq)	5 u/µl	0,125
S755	10 pmol/µl	2,000
S823	10 pmol/µl	2,000

**Tab. 27:** PCR-Protokoll Trypanosomatida – Nest 2

Temperatur	Zeit	Zyklen
96 °C	3 min	1
94 °C	30 sec	35
58 °C	1 min	
72 °C	30 sec	
72 °C	7 min	1
15 °C	Lagerung	

### 2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Art der Gelelektrophorese und dient zur Auftrennung von PCR-Produkten und Proteinen im elektrischen Feld abhängig von ihrer Größe.

Die für die Herstellung verwendete Agarose ist ein Polysaccharid, das aus der roten Meeresalge gewonnen wird. Durch Aufkochen der Agarose in Pufferlösung bilden die unverzweigten Ketten ein Netzwerk aus. Beim Erkalten entsteht dadurch ein festes Gel mit Poren. Die Porengröße ist abhängig von der Agarose-Konzentration – ja höherprozentig der Agaroseanteil umso feinporiger wird das Gel.

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden die PCR-Produkte auf das Gel aufgetragen. Hierfür werden beim Gießen des Gels Taschen ausgespart und diese dann mit den Samples befüllt. Zusätzlich werden pro Gel eine Negativkontrolle und pro Reihe am Gel eine Positivkontrolle und eine DNA-Ladder (DNA-Leiter, die Banden in spezifischen Höhen ausbildet und als Referenz dient) befüllt.

Die PCR-Produkte werden in der Elektrophoresekammer mit Hilfe eines elektrischen Feldes aufgetrennt. Nukleinsäuren sind durch ihre Phosphatgruppen negativ geladen, so dass sie zur Anode wandern. Da jede Base eine Phosphatgruppe enthält, ist das Verhältnis zwischen Größe und Ladung der Moleküle direkt proportional. Je kleiner ein Molekül ist, desto schneller wandert es durch das Gel.

Bei allen durchgeführten Gelelektrophoresen wurde eine 100 bp DNA-Leiter (Fa. Promega) eingesetzt. Da im verwendeten PCR-Mastermix kein Nukleinsäurefarbstoff zur Visualisierung enthalten war, wurde den Samples vor Befüllen des Gels der Farbstoff Midori Green Advance (Fa. Biozym Scientific GmbH) zugesetzt. Nach einer Laufzeit von ca. 45 Minuten bei 120 Volt in der Elektrophoresekammer wurden von jedem Gel Aufnahmen mittels UV-Detektion, die die aufgetrennten Banden sichtbar macht, angefertigt und mit einer speziellen Software am PC ausgewertet.

## 2.4 Sequenzierung

Samples, die in der Elektrophorese Banden in den fraglichen Höhen ausgebildet haben, wurden zur Bestimmung der Sequenzen mittels Sanger-Sequenzierung bzw. Didesoxymethode nach Sanger an LGC Genomics GmbH gesendet.

Die Sequenzierungsmethode nach Sanger beruht in ihrem Ablauf auf der konventionellen PCR. Zusätzlich zu den natürlichen Nukleotiden (dNTPs, Desoxyribonukleosid-Triphosphate) werden fluoreszenzmarkierte Didesoxiribonukleosid-Triphosphate (ddNTPs) zugesetzt. DdNTPs sind wie dNTPs aufgebaut, besitzen jedoch keine Hydroxygruppe am 3'-Kohlenstoff-Atom, an der bei der Polymerisation das nächste Nukleotid angehängt wird.

Wird während der DNA-Replikation ein ddNTP anstelle eines dNTPs eingebaut, kommt es zum Kettenabbruch. Es entsteht somit ein Gemisch unterschiedlich langer Stücke des zu sequenzierenden DNA-Abschnitts. In einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden die verschiedenen Fragmente ihrer Länge nach aufgetrennt und die genaue Abfolge der Basen anhand der fluoreszenzmarkierten ddNTPs am jeweiligen Kettenende abgelesen.

Die Sequenzierungsergebnisse der fraglichen Samples wurden mit DNA-Sequenzen in der Genbank von NCBI (National Center for Biotechnology Information) abgeglichen.

### 3. Ergebnisse

Insgesamt wurden Blutproben von 148 erlegten Murmeltieren aus Westösterreich (Tirol, Vorarlberg) aus der Jagdsaison 2018 auf das Vorhandensein von Protozoen (*Babesia* spp. und andere Piroplasmen, *Hepatozoon* spp., *Trypanosoma* spp.), filarioide Nematoden und Bakterien (*Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Rickettsia* spp.) untersucht.

Nach Analyse aller Blutproben mittels PCR und anschließender Gelelektrophorese wurden insgesamt 31 Samples zur Sequenzierung an ein Fremdlabor (LGC Genomics GmbH) geschickt, da sie Banden in entsprechender Höhe ausgebildet hatten.

Die molekularbiologischen Analysen waren durchgehend negativ (Tab. 28). Lediglich Protozoen aus dem Boden konnten vereinzelt nachgewiesen werden.

Die in 2018 erlegten Murmeltiere scheinen den Ergebnissen nach frei von den oben angeführten Infektionserregern zu sein. Die Bandenbildung bei der Gelelektrophorese kann auf mögliche Fehlbindungen an den DNA-Samples während der PCR bzw. auf eine Verunreinigung des Filterpapiers bei der Probennahme zurückzuführen sein.

**Tab. 28:** Untersuchungsergebnisse je Bezirk

	Protozoen		Helminthen	Bakterien	
	Piroplasmida	Trypanosomatida	Filarioidea	Anaplasmataceae	Rickettsiaceae
Imst	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24
Innsbruck-Land	0/34	0/34	0/34	0/34	0/34
Landeck	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20
Lienz	0/23	0/23	0/23	0/23	0/23
Schwaz	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
Bludenz	0/40	0/40	0/40	0/40	0/40
Bregenz	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
<b>Gesamt</b>	0/148	0/148	0/148	0/148	0/148

#### 4. Diskussion

Die voranschreitenden klimatischen Veränderungen begünstigten die Verbreitung von Vektoren wie Zecken und Stechmücken, die Überträger verschiedener Infektionserreger darstellen, sowohl in nördlichere Gebiete als auch in größere Höhenlagen (Prosl 2008). Studien der letzten Jahre zeigen bereits, dass in Österreich lebende Wildtierpopulationen von Rotfüchsen, Rotwild und anderen Wildwiederkäuern von vektorenübertragenen Infektionskrankheiten, wie zum Beispiel Babesiose oder Anaplasmose, befallen sind (Cézanne et al. 2017; Messner et al. 2019).

Parasitosen des Alpenmurmeltieres sind bis jetzt nur mäßig erforscht und entsprechende Studien beschränken sich zumeist auf den Befall mit Endoparasiten und *Toxoplasma* (Preleuthner et al. 1999).

Eine der frühesten Erwähnungen von Blutparasiten beim Murmeltier findet sich 1907 in einem Artikel über die Resistenz von Murmeltieren gegen parasitäre Erkrankungen während des Winterschlafs von Raphael Blanchard und Marc Blatin („Immunité de la marmotte en hibernation à l'égard des maladies parasitaires“): „Sehr bemerkenswert ist die von Blanchard und Blatin gemachte Beobachtung, dass Murmeltiere, die im allgemeinen für *Trypanosoma Brucei*, *gambiense* und *evansi* gut empfänglich sind, im tiefen Winterschlaf völlig unempfindlich dafür sind. Gleich nach dem Erwachen aus dem Winterschlaf tritt die Empfänglichkeit wieder auf.“ (Hoffmann 1912).

Bislang wurde keine Studie zur Untersuchung von Murmeltieren in Österreich auf den Befall mit Blutparasiten und weiteren von Vektoren übertragenen Krankheitserregern hin veröffentlicht. Vorangegangene Studien beschäftigten sich mit dem Befall von Murmeltieren mit Endoparasiten wie Bandwürmern und Fadenwürmern, aber auch *Toxoplasma gondii*. In diesem Zusammenhang gehen WissenschaftlerInnen davon aus, dass Murmeltiere durch die physiologischen Veränderungen während des Winterschlafs (Absenkung der Körpertemperatur, Verlangsamung des Stoffwechsels) ein ungünstiges Reservoir für Parasiten darstellen (Calderola et al. 1999). Zudem ist es auf Grund ihrer Siedlungsgebiete in großen Höhenlagen unwahrscheinlicher, dass sie mit entsprechenden Vektoren von Infektionskrankheiten, zum Beispiel der Schildzecke *Ixodes ricinus* (Gemeiner Holzbock) in Kontakt kommen (Boehnke et al. 2015).

Nichtsdestotrotz belegen Studien der letzten Jahre, dass andere Wildtierarten in denselben Siedlungsgebieten bereits Infektionen mit vektorenübertragenen Infektionskrankheiten

aufweisen (Cézanne et al. 2017; Hodžić et al. 2018; Messner et al. 2019). Durch klimatische Veränderungen und die Verbreitung entsprechender Vektoren in nördlichere und höhergelegene Gebiete, scheint eine Übertragung von VBDs auf Murmeltierpopulationen möglich.

Studien zur Infektion von Schildzecken (*Ixodes ricinus*) in Österreich belegen die Verbreitung von *Babesia* spp. österreichweit in unterschiedlichem Ausmaß (Blaschitz et al. 2008). Zudem konnten bereits Infektionen von Rotwild in Westösterreich mit *Babesia divergens* (Cézanne et al. 2017) und Infektionen mit *Babesia capreoli* bei Wildwiederkäuern in Tirol (Messner et al. 2019) nachgewiesen werden, was für das Vorhandensein adäquater Vektoren in den betreffenden Gebieten spricht. Für eine mögliche Infektion von Murmeltieren mit *Babesia microti* sprechen Studien aus Kanada, in denen *B. microti* in Schildzecken (*Ixodes cookei*) des Waldmurmeltieres (*Marmota monax*) nachgewiesen werden konnten (Scott et al. 2019; Smith et al. 2019).

In Westösterreich konnte bereits die Infektion von Rotfüchsen mit *Hepatozoon canis* nachgewiesen werden, wobei der Nachweis im Milzgewebe bessere Resultate erzielte als im Blut. Die geringe genetische Diversität der entdeckten *H. canis*-Erreger lässt darauf schließen, dass sich diese erst vor kurzer Zeit im untersuchten Gebiet verbreiten konnten (Hodžić et al. 2018). Für die generelle Empfänglichkeit von Murmeltieren für *Hepatozoon* spricht eine Studie aus den USA, in der in Blutproben eines Waldmurmeltieres eine neue *Hepatozoon*-Art nachgewiesen werden konnte (Allen et al. 2011). Im Rahmen dieser Studie konnten allerdings weder Babesien noch Hepatozoen nachgewiesen werden.

Leishmaniosen nördlich der Alpen galten bis vor wenigen Jahren als ausschließlich eingeschleppte Erkrankungen. Durch den Nachweis eines potentiellen Vektors für *L. infantum*, der Sandmücke *Phlebotomus mascittii*, in Ostösterreich und dem gleichzeitigen Nachweis einer Infektion einer der Mücken mit *L. infantum*, kann eine Verbreitung der Leishmaniose auch in Gebieten nördlich der Alpen nicht mehr gänzlich ausgeschlossen werden (Obwaller et al. 2016). Studien in Spanien haben zudem ergeben, dass Nager (in diesem Falle Mäuse, Ratten und Waldmäuse) ein mögliches Erregerreservoir und nicht nur irrelevante Fehlwirte für *L. infantum* sein könnten. Demnach sollte der klassische Übertragungsweg Hund–Sandfliege–Mensch hinterfragt werden (Navea-Pérez et al. 2015). Ob die klimatischen Bedingungen der Siedlungsgebiete und die physischen Auswirkungen

des Winterschlafs der Murmeltiere deren nachhaltige Infektion mit *L. infantum* zulassen, ist fraglich.

*Trypanosoma* parasitiert in diversen Tierarten – auch im alpinen Bereich, was anhand von Untersuchungen an Kleinnagern (Waldmäusen, Rötelmäusen und Kleinwühlmäusen) in Tirol nachgewiesen werden konnte (Mahnert 1970). Bereits 1907 wurde in einem Artikel von Raphael Blanchard und Marc Blatin die Resistenz des Alpenmurmeltieres gegen verschiedene Spezies von *Trypanosoma* während des Winterschlafs beschrieben (Hoffmann 1912); nähere Angaben zum Untersuchungsort werden in der Zitation von Hoffmann 1912 jedoch nicht gemacht. Die Verbreitung von *Trypanosoma* spp. (*Trypanosoma theileri/cervi*, *T. culicavium* und *T. avium*) in Ostösterreich und deren Verbreitung durch verschiedene Stechmücken wurde 2018 bestätigt (Schoener et al. 2018). Hippoboscidae (Lausfliegen) werden ebenfalls als kompetente Vektoren beschrieben.

Obwohl diverse Nagerfilarien bekannt sind, besonders die Filariengattung *Acanthocheilonema viteae* aus der Unterfamilie Onchocercinae, die als Modellsystem für die Filariosen des Menschen verwendet wird (Hiepe und Aspöck 2006), konzentrieren sich Feldforschungen auf Grund ihres zoonotischen Potentials auf *Dirofilaria repens* und *Dirofilaria immitis*. Im Rahmen dieser Studie konnte allerdings der Nachweis von DNA von Mikrofilarien filarioider Helminthen nicht erbracht werden.

In den letzten Jahren konnten in Westösterreich Infektionen mit *Anaplasma phagocytophilum* in Rotwild (Cézanne et al. 2017), Rotfüchsen (Hodžić et al. 2018) und diversen Wildwiederkäuern (Messner et al. 2019) nachgewiesen werden. Eine 2017 in Italien durchgeführte Untersuchung von alpinen Nagern belegt die Infektion von Rötelmäusen (*Myodes glareolus*) und Gelbhalsmäusen (*Apodemus flavicollis*) mit *A. phagocytophilum* (Rosso et al. 2017). Die vorangegangenen Untersuchungsergebnisse lassen darauf schließen, dass eine Infektion von Murmeltieren in Österreich mit *A. phagocytophilum* möglich ist, weil der Erreger einerseits bereits in den betreffenden Gebieten und andererseits bei alpinen Nagern nachgewiesen werden konnte.

Zwar konnte eine Infektion von Nagern (Gelbhalsmäusen) mit *Ehrlichia muris* 2008 in der Zentralslowakei nachgewiesen werden (Spitalská et al. 2008), da es aber weder Veröffentlichungen zu Infektionen von Wildnagern mit *E. muris* in Österreich, noch von Murmeltieren generell gibt, erscheint eine Übertragung auf das österreichische Alpenmurmeltier fraglich.

Nager fungieren als Reservoirwirte für verschiedene *Rickettsia*-Spezies, die zoonotisches Potential besitzen (Rolle et al. 2007). Eine besondere Bedeutung kommt dabei *Rickettsia typhi* zu, dem der Erreger des murinen Typhus. *R. typhi* ist in mediterranen Ländern wie Spanien, Kroatien, Griechenland und Zypern verbreitet. Es gibt jedoch immer wieder Berichte von importierten und sporadischen Fällen in ganz Europa. Reservoirwirt ist in Europa die Ratte (*Rattus norvegicus* und *Rattus rattus*) (Portillo et al. 2015). Da in amerikanischen Studien *R. typhi* auch in Läusen und Flöhen des Waldmurmeltieres (*Marmota monax*) nachgewiesen werden konnte (Reeves et al. 2005), ist auch hierzulande eine Übertragung auf das Alpenmurmeltier bei entsprechenden klimatischen Bedingungen für dessen Vektoren nicht ausgeschlossen.

Die Untersuchung der Blutproben von 148 erlegten Murmeltieren aus der Jagdsaison 2018 konnte keine Infektionen mit den oben erläuterten Protozoen (*Babesia* spp., *Theileria* spp., *Hepatozoon* spp., *Trypanosoma* spp.), filarioiden Nematoden oder Bakterien (*Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Rickettsia* spp.) nachweisen. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die in Westösterreich heimischen Murmeltierpopulationen zum Zeitpunkt der Probennahme noch frei von vektorenübertragenen Infektionskrankheiten waren.

Die Erhöhung der Tagesdurchschnittstemperaturen im alpinen Bereich wirkt sich jedoch günstig auf die Verbreitung von vektorenübertragenen Infektionskrankheiten aus: Einerseits können die einzelnen Entwicklungsstadien schneller durchlaufen werden, was für Parasiten einen Vorteil in kurzlebigen Zwischenwirten wie blutsaugenden Insekten bedeutet. Andererseits begünstigen die moderaten Temperaturen im Winter die Ausbreitung von Zwischenwirtarten wie Zecken und Mücken (Prosl 2008).

Internationale Studien belegen, dass Murmeltiere als Reservoir und Endwirte für verschiedene von Vektoren übertragenen Infektionskrankheiten dienen können: Bereits 1907 wurde von den französischen Wissenschaftlern Blanchard und Blatin die Infektion von Murmeltieren mit *Trypanosoma* spp. erwähnt (Hoffmann 1912). Für eine mögliche Infektion von Murmeltieren mit *Babesia microti* sprechen Studien aus Kanada, in denen *B. microti* in Schildzecken (*Ixodes cookei*) des Waldmurmeltieres (*Marmota monax*) nachgewiesen werden konnten (Scott et al. 2019; Smith et al. 2019). In Blutproben eines Waldmurmeltieres konnte 2011 eine neue Art von *Hepatozoon* spp. nachgewiesen werden (Allen et al. 2011). Darüber hinaus wurde in den USA *Rickettsia typhi*, der Erreger des auch in Europa verbreiteten murinen Typhus, in Waldmurmeltieren nachgewiesen (Reeves et al. 2005).

Waldmurmeltiere bewohnen im Gegensatz zum europäischen Alpenmurmeltier das Flachland Nordamerikas (USA, Kanada), halten jedoch ebenfalls Winterschlaf. Da im Flachland die Vektordichte höher ist als im alpinen Bereich (Boehnke et al. 2015), kommen diese somit eher in Kontakt mit Vektoren. Durch die nachgewiesene Empfänglichkeit für die oben genannten Erreger besteht eine erhöhte Infektionsgefahr für das heimische Alpenmurmeltier, weil entsprechende Vektoren in deren Lebensraum bereits nachgewiesen werden konnten (Messner et al. 2019).

Durch die voranschreitende Erwärmung im alpinen Bereich und die damit einhergehende Verbreitung von potentiellen Vektoren wie Zecken und Stechmücken in nördlichere Bereiche und größere Höhenlagen kann davon ausgegangen werden, dass VBDs in Zukunft möglicherweise auch in der österreichischen Murmeltierpopulation Einzug halten werden. So ist eine Infektion von österreichischen Murmeltieren mit *Anaplasma phagocytophilum* denkbar, weil der Erreger bereits bei alpinen Nagern in Italien nachgewiesen werden konnte (Rosso et al. 2017).

Im Hinblick auf die Diagnosemöglichkeiten verschiedener vektorenübertragenen Infektionserkrankungen finden sich in Schnieder et al. (2006) Empfehlungen (Tab. 29).

**Tab. 29:** Empfehlung zu diagnostischen Methoden einzelner Parasiten/Erreger

Parasit/Erreger	Diagnostische Methode
Blutprotozoen, Mikrofilarien	Blutprobe
Trypanosoma, Theileria	Lymphknotenpunktat
Leishmania	Milz-, Leber- und Knochenmarkpunktate oder Abklatschpräparate von Geschwürrändern

Für den Nachweis einer *Trypanosoma*-Infektion weist Deplazes et al. (2013) ebenfalls darauf hin, dass die Erreger besonders zahlreich in den Lymphknoten des Wirtes anzutreffen sind. Eine weiterführende Untersuchung von Gewebeproben (Lymphknoten, Milz, etc.) könnte Aufschluss geben. Auch ist eine Wiederholung der Blutanalysen zur Verlaufskontrolle denkbar.

## 5. Zusammenfassung

Bislang wurden nur wenige Studien zu Parasitosen des österreichischen Alpenmurmeltieren (*Marmota marmota*) veröffentlicht. Diese befassen sich mit dem Befall von Murmeltieren mit Endoparasiten wie Bandwürmern und Fadenwürmern, aber auch *Toxoplasma gondii*. Es wurde noch keine Studie zur Untersuchung von Murmeltieren in Österreich auf den Befall mit Blutparasiten und weiteren von Vektoren übertragenen Krankheitserregern hin veröffentlicht.

Die voranschreitenden klimatischen Veränderungen begünstigten die Verbreitung von Vektoren wie Zecken und Stechmücken, die Überträger verschiedener Infektionserreger darstellen, sowohl in nördlichere Gebiete als auch in größere Höhenlagen. Studien der letzten Jahre zeigen bereits, dass in Österreich lebende Wildtierpopulationen von Rotfüchsen, Rotwild und anderen Wildwiederkäuern von vektorenübertragenen Infektionskrankheiten, wie zum Beispiel Babesiose oder Anaplasmosen, befallen sind.

Auf Grund der geographischen Nähe und der sich verändernden klimatischen Bedingungen in den natürlichen Habitaten des Murmeltieres scheint eine Übertragung von VBDs auf Murmeltierpopulationen möglich.

Eine Untersuchung von Blutproben von 148 erlegten Murmeltieren aus der Jagdsaison 2018 mittels PCR, Agarose-Gelelektrophorese und anschließender Sequenzierung nach Sanger konnte keine Infektionen mit Protozoen (*Babesia* spp. und andere Piroplasmen, *Hepatozoon* spp., *Trypanosoma* spp.), filarioide Nematoden oder Bakterien (*Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Rickettsia* spp.) nachweisen. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die in Westösterreich heimischen Murmeltierpopulationen zum Zeitpunkt der Probennahme noch frei von vektorenübertragenen Infektionskrankheiten waren.

Da Studien belegen, dass amerikanische Murmeltiere und andere Nager als Reservoir und Endwirte für verschiedene von Vektoren übertragenen Infektionskrankheiten dienen können und durch die weitere Verbreitung von potentiellen Vektoren in nördlichere Bereiche und größere Höhenlagen kann jedoch davon ausgegangen werden, dass VBDs in Zukunft möglicherweise auch in der österreichischen Murmeltierpopulation Einzug halten werden. Eine Wiederholung der Blutanalysen in einigen Jahren kann dazu Aufschluss geben.

## 6. Summary

So far, only a few studies have been published focusing on parasites of the Austrian Alpine marmot (*Marmota marmota*). These mainly focus on infestations of marmots with endoparasites such as tapeworms and roundworms, but also *Toxoplasma gondii*. No study has yet been published to investigate marmots in Austria for infestation with blood parasites and other vector-borne pathogens.

The advancing climate changes favour the spread of vectors such as ticks and mosquitoes, which are carriers of various infectious agents, both in northern regions and at higher altitudes. Studies in recent years have already shown that wild animal populations of red foxes, red deer and other wild ruminants in Austria are affected by vector-borne infectious diseases, such as babesiosis or anaplasmosis.

Due to the geographical proximity and the changing climatic conditions in the natural habitat of the marmot, it seems possible to transfer VBDs to marmot populations.

Examination of blood samples from 148 marmots from the 2018 hunting season using PCR, agarose gel electrophoresis and subsequent Sanger sequencing showed no infection with protozoa (*Babesia* spp. and other piroplasms, *Hepatozoon* spp., *Trypanosoma* spp.), filarioide nematodes or bacteria (*Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Rickettsia* spp.). It can therefore be assumed that the marmot populations in western Austria were still free of vector-borne infectious diseases at the time of sampling.

However, since studies show that American marmots and other rodents can serve as reservoirs and hosts for various vector-borne infectious diseases and due to the further spread of potential vectors to more northern areas and higher altitudes, it can be assumed that in the future VBDs may also be found in Austrian marmot populations. Repeating the blood tests (and various tissues) in a few years can provide further information.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaar
ddNTP	Didesoxiribonukleosid-Triphosphat
dNTP	Desoxiribonukleosid-Triphosphat
Fw	Forward
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
mM	millimolar
μl	Mikroliter
PBS	phosphatgepufferter Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i> )
pmol	Pikomol
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>revolutions per minute</i> )
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i> )
Rv	Reverse
u	Einheit der Enzymaktivität
VBD	Vektorenübertragene Krankheit (engl. <i>vector-borne disease</i> )

## 8. Literaturverzeichnis

Allen, Kelly E.; Yabsley, Michael J.; Johnson, Eileen M.; Reichard, Mason V.; Panciera, Roger J.; Ewing, Sidney A.; Little, Susan E. (2011): Novel *Hepatozoon* in vertebrates from the southern United States. In: *The Journal of parasitology* 97 (4), S. 648–653. DOI: 10.1645/GE-2672.1.

Arnold, Walter (1999): Allgemeine Biologie und Lebensweise des Alpenmurmeltieres (*Marmota marmota*). In: Monika Preleuthner (Hg.): Murmeltiere. Ausstellung im Biologiezentrum des OÖ. Landesmuseums, Linz, vom 22. Oktober 1999 bis 31. März 2000 ; Hrsg.: Biologiezentrum des OÖ. Landesmuseums. Linz: Landesmuseum (Kataloge des OÖ. Landesmuseums, N.F. 146), S. 1–20. Online verfügbar unter [https://www.researchgate.net/publication/239575021\\_Allgemeine\\_Biologie\\_und\\_Lebensweise\\_des\\_Alpenmurmeltieres\\_Marmota\\_marmota](https://www.researchgate.net/publication/239575021_Allgemeine_Biologie_und_Lebensweise_des_Alpenmurmeltieres_Marmota_marmota).

Blaschitz, Marion; Narodoslavsky-Gföller, Melanie; Kanzler, Michaela; Stanek, Gerold; Walochnik, Julia (2008): *Babesia* species occurring in Austrian *Ixodes ricinus* ticks. In: *Applied and environmental microbiology* 74 (15), S. 4841–4846. DOI: 10.1128/AEM.00035-08.

Boehnke, Denise; Brugger, Katharina; Pfäffle, Miriam; Sebastian, Patrick; Norra, Stefan; Petney, Trevor et al. (2015): Estimating *Ixodes ricinus* densities on the landscape scale. In: *International journal of health geographics* 14, S. 23. DOI: 10.1186/s12942-015-0015-7.

Brede, Nora; Steinke, Dirk (2006): DNA-Barcoding. Taxonomie des 21. Jahrhunderts. In: *Biol. Unserer Zeit* 36 (1), S. 40–46. DOI: 10.1002/biuz.200410302.

Calderola, Sonia; Preleuthner, Monika; Prosl, Heinrich; Lanfranchi, Paolo (1999): Parasiten und Winterschlaf: bibliographischer Überblick und derzeitiger Wissenstand beim Alpenmurmeltier (*Marmota marmota*). *Stapfia* 63 (146). Online verfügbar unter [https://www.zobodat.at/pdf/STAPFIA\\_0063\\_0093-0102.pdf](https://www.zobodat.at/pdf/STAPFIA_0063_0093-0102.pdf) <https://www.zobodat.at/search.php?q=murmeltier>, zuletzt geprüft am 12.07.2020.

Cézanne, Rita; Mrowietz, Naïke; Eigner, Barbara; Duscher, Georg Gerhard; Glawischnig, Walter; Fuehrer, Hans-Peter (2017): Molecular analysis of *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia divergens* in red deer (*Cervus elaphus*) in Western Austria. In: *Molecular and cellular probes* 31, S. 55–58. DOI: 10.1016/j.mcp.2016.07.003.

Clarridge, Jill E. (2004): Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. In: *Clinical Microbiology Reviews* 17 (4), 840-62, table of contents. DOI: 10.1128/CMR.17.4.840-862.2004.

Deplazes, Peter; Eckert, Johannes; Samson-Himmelstjerna, Georg von; Zahner, Horst (2013): Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. 3., überarbeitete Auflage. Stuttgart: Enke Verlag.

Hiepe, Theodor; Aspöck, Horst (Hg.) (2006): Allgemeine Parasitologie. Mit den Grundzügen der Immunbiologie, Diagnostik und Bekämpfung ; 34 Tabellen. 1. Aufl. Stuttgart: Parey.

Hodžić, Adnan; Mrowietz, Naïke; Cézanne, Rita; Bruckschwaiger, Pia; Punz, Sylvia; Habler, Verena Elisabeth et al. (2018): Occurrence and diversity of arthropod-transmitted pathogens in red foxes (*Vulpes vulpes*) in western Austria, and possible vertical (transplacental) transmission of *Hepatozoon canis*. In: *Parasitology* 145 (3), S. 335–344. DOI: 10.1017/S0031182017001536.

Hoffmann, W. H. (1912): Über Wesen und Ursache der afrikanischen Schlafkrankheit. Munich, s.l.: J.F. Bergmann-Verlag (Handbuch der Allgemeinen Pathologie und der Pathologischen Anatomie des Kindesalters, 1). Online verfügbar unter <https://books.google.at/books?id=JGe0BgAAQBAJ>, zuletzt geprüft am 12.07.2020.

Mahnert, Volker (1970): Trypanosomen aus alpinen Kleinsäugetieren Tirols (Österreich). Berichte des Naturwissenschaftlich-medizinischen Vereins in Innsbruck. Innsbruck (58). Online verfügbar unter [https://www.zobodat.at/pdf/BERI\\_58\\_0131-0142.pdf](https://www.zobodat.at/pdf/BERI_58_0131-0142.pdf), zuletzt geprüft am 15.07.2020.

Messner, Martina; Kayikci, Feodora Natalie; Shahi-Barogh, Bitia; Harl, Josef; Messner, Christian; Fuehrer, Hans-Peter (2019): Screening of wild ruminants from the Kaunertal and other alpine regions of Tyrol (Austria) for vector-borne pathogens. In: *Parasitology research* 118 (9), S. 2735–2740. DOI: 10.1007/s00436-019-06412-9.

Mims, Cedric A. (2018): Mims' medical microbiology and immunology. Sixth edition. Hg. v. Richard V. Goering, Hazel Dockrell, Mark Zuckerman und Peter L. Chiodini. Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St. Louis, Sydney, Toronto: Elsevier.

Navea-Pérez, H. M.; Díaz-Sáez, V.; Corpas-López, V.; Merino-Espinosa, G.; Morillas-Márquez, F.; Martín-Sánchez, J. (2015): *Leishmania infantum* in wild rodents: reservoirs or

just irrelevant incidental hosts? In: *Parasitology research* 114 (6), S. 2363–2370. DOI: 10.1007/s00436-015-4434-y.

Obwaller, Adelheid G.; Karakus, Mehmet; Poepl, Wolfgang; Töz, Seray; Özbel, Yusuf; Aspöck, Horst; Walochnik, Julia (2016): Could *Phlebotomus mascittii* play a role as a natural vector for *Leishmania infantum*? New data. In: *Parasites & Vectors* 9, S. 458. DOI: 10.1186/s13071-016-1750-8.

Portillo, Aránzazu; Santibáñez, Sonia; García-Álvarez, Lara; Palomar, Ana M.; Oteo, José A. (2015): Rickettsioses in Europe. In: *Microbes and infection* 17 (11-12), S. 834–838. DOI: 10.1016/j.micinf.2015.09.009.

Preleuthner, Monika; Calderola, Sonia; Lanfranchi, Paolo; Prosl, Heinrich (1999): Parasiten des Alpenmurmeltieres (*Marmota marmota*): Systematik, Entwicklung, Verbreitung. *Stapfia* 63 (146). Online verfügbar unter [https://www.zobodat.at/pdf/STAPFIA\\_0063\\_0077-0092.pdf](https://www.zobodat.at/pdf/STAPFIA_0063_0077-0092.pdf), zuletzt geprüft am 12.07.2020.

Prosl, Heinrich (2008): Parasiten und Klimawandel. Parasitologische Fachgespräche – Parasitosen im Alpenraum. Innsbruck, Alpenzoo. Online verfügbar unter [http://www.oegtpm.at/wp/wp-content/uploads/Fachgespraeche\\_2008.pdf](http://www.oegtpm.at/wp/wp-content/uploads/Fachgespraeche_2008.pdf), zuletzt geprüft am 11.07.2020.

Reeves, Will K.; Nelder, Mark P.; Korecki, James A. (2005): *Bartonella* and *Rickettsia* in fleas and lice from mammals in South Carolina, U.S.A. In: *Journal of vector ecology : journal of the Society for Vector Ecology* 30 (2), S. 310–315.

Rolle, Michael; Mayr, Anton; Büttner, Mathias (2007): Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 127 Tabellen. 8., überarb. Aufl. Stuttgart: Enke. Online verfügbar unter [http://www.thieme.de/ebooklibrary/nutzungsrechte\\_vel.html?3830410607/index.php](http://www.thieme.de/ebooklibrary/nutzungsrechte_vel.html?3830410607/index.php).

Rosso, Fausta; Tagliapietra, Valentina; Baráková, Ivana; Derdáková, Marketa; Konečný, Adam; Hauffe, Heidi Christine; Rizzoli, Annapaola (2017): Prevalence and genetic variability of *Anaplasma phagocytophilum* in wild rodents from the Italian alps. In: *Parasites & Vectors* 10 (1), S. 293. DOI: 10.1186/s13071-017-2221-6.

Schnieder, Thomas; Boch, Josef; Supperer, Rudolf; Bauer, Christian (2006): Veterinärmedizinische Parasitologie. 6., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Parey. Online verfügbar unter [http://www.thieme.de/ebooklibrary/nutzungsrechte\\_vel.html?3830441359/index.php](http://www.thieme.de/ebooklibrary/nutzungsrechte_vel.html?3830441359/index.php).

Schoener, Ellen; Uebleis, Sarah Susanne; Cuk, Claudia; Nawratil, Michaela; Obwaller, Adelheid G.; Zechmeister, Thomas et al. (2018): Trypanosomatid parasites in Austrian mosquitoes. In: *PloS one* 13 (4), e0196052. DOI: 10.1371/journal.pone.0196052.

Scott, John D.; Clark, Kerry L.; Coble, Nikki M.; Ballantyne, Taylor R. (2019): Detection and Transstadial Passage of *Babesia* Species and *Borrelia burgdorferi Sensu Lato* in Ticks Collected from Avian and Mammalian Hosts in Canada. In: *Healthcare (Basel, Switzerland)* 7 (4). DOI: 10.3390/healthcare7040155.

Smith, Kathryn A.; Oesterle, Paul T.; Jardine, Claire M.; Dibernardo, Antonia; Huynh, Chris; Lindsay, Robbin et al. (2019): Tick infestations of wildlife and companion animals in Ontario, Canada, with detection of human pathogens in *Ixodes scapularis* ticks. In: *Ticks and tick-borne diseases* 10 (1), S. 72–76. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2018.08.018.

Spitalská, E.; Boldis, V.; Kostanová, Z.; Kocianová, E.; Stefanidesová, K. (2008): Incidence of various tick-borne microorganisms in rodents and ticks of central Slovakia. In: *Acta virologica* 52 (3), S. 175–179. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18999892/>.

Tomassone, Laura; Berriatua, Eduardo; Sousa, Rita de; Duscher, Gerhard Georg; Mihalca, Andrei Daniel; Silaghi, Cornelia et al. (2018): Neglected vector-borne zoonoses in Europe: Into the wild. In: *Veterinary parasitology* 251, S. 17–26. DOI: 10.1016/j.vetpar.2017.12.018.

**9. Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Schema eines Merozoiten der Apicomplexa .....	3
Abb. 2: Schema von <i>Trypanosoma</i> spp. aus dem Unterstamm der Kinetoplasta .....	3
Abb. 3: Entwicklungszyklus <i>B. microti</i> .....	5
Abb. 4: Entwicklungszyklus <i>L. infantum</i> .....	7
Abb. 5: Infektion einer Zelle durch <i>Anaplasma/Ehrlichia</i> .....	11

## 10. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Systematik <i>Babesia</i> / <i>Theileria</i> und <i>Hepatozoon</i> .....	4
Tab. 2: Systematik <i>Leishmania</i> und <i>Trypanosoma</i> .....	4
Tab. 3: Systematik <i>Dirofilaria</i> und <i>Setaria</i> .....	9
Tab. 4: Systematik <i>Anaplasma</i> , <i>Ehrlichia</i> und <i>Rickettsia</i> .....	10
Tab. 5: Nager als Reservoirwirte für Rickettsiosen des Menschen.....	12
Tab. 6: Primer Anaplasmatacea.....	15
Tab. 7: Mastermix Anaplasmatacea.....	15
Tab. 8: PCR-Protokoll Anaplasmatacea.....	15
Tab. 9: Primer <i>Rickettsia</i> .....	16
Tab. 10: Mastermix <i>Rickettsia</i> .....	16
Tab. 11: PCR-Protokoll <i>Rickettsia</i> .....	16
Tab. 12: Primer Filarioidea .....	17
Tab. 13: Mastermix Filarioidea.....	17
Tab. 14: PCR-Protokoll Filarioidea.....	17
Tab. 15: Primer Piroplasmida – Nest 1 .....	18
Tab. 16: Mastermix Piroplasmida – Nest 1.....	18
Tab. 17: PCR-Protokoll Piroplasmida – Nest 1.....	18
Tab. 18: Primer Piroplasmida – Nest 2 .....	19
Tab. 19: Mastermix Piroplasmida – Nest 2.....	19
Tab. 20: PCR-Protokoll Piroplasmida – Nest 2.....	19
Tab. 21: Primer Trypanosomatida – Nest 1.....	20
Tab. 22: Mastermix Trypanosomatida – Nest 1.....	20
Tab. 23: PCR-Protokoll Trypanosomatida – Nest 1.....	20
Tab. 24: Primer Trypanosomatida – Nest 2.....	21
Tab. 25: Mastermix Trypanosomatida – Nest 2.....	21
Tab. 26: PCR-Protokoll Trypanosomatida – Nest 2.....	21

## 11. Anhang

### Anhang 1 - Protokoll zur DNA-Purifikation aus Blutstropfen auf Filterpapier

1. Blutgetränktes Filterpapier (4x4 mm) ausschneiden und in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube geben
2. Mit 100 µl PBS versetzen und über Nacht bei 4 °C stehen lassen!
3. 2 Thermomixer auf 70 °C und 98 °C vorbereiten
4. Tubes bei 13.000 rpm für 3 min zentrifugieren – auf Pellet aufpassen
5. Überstand mit Pipette abnehmen und verwerfen! Auf Pellet achtgeben!
6. 100 µl PBS wieder hinzufügen
7. Bei 13.000 rpm für 2 min zentrifugieren. (Pellet waschen)
8. Überstand abnehmen und verwerfen

Achtung: InstaGene™ Matrix (Fa. BioRad) auf einem Magnetrührer rühren lassen – 30 sec lang (Sand muss aufgerührt sein!)

9. DNA Extraktion mit InstaGene™ Matrix:
  - a. 60 µl InstaGene™ Matrix zum Pellet geben (Filterpapier ist noch immer im Tube!)
  - b. Bei 70 °C für 8 min inkubieren
  - c. 15 sec vortexen
  - d. Bei 98 °C für 4 min inkubieren
  - e. 15 sec vortexen
  - f. Bei 13.000 rpm für 1 min zentrifugieren
10. Jetzt wird der Überstand in ein neues Tube überführt! (Tube mit Filterpapierblättchen bleibt zurück → verwerfen!)
11. Mit dem Tube Anleitung von Punkt „a“ bis „f“ wiederholen!

(Zur Verfügung gestellt von Dr.rer.nat. Priv.-Doz. Hans-Peter Führer und Bitra Shahi Barogh, Institut für Parasitologie, Veterinärmedizinische Universität Wien)