

Aus dem Department für Wiederkäuermedizin
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Universitätsklinik für Wiederkäuer
(Leiter: Univ.Prof. Dr. Thomas Wittek, Diplomate ECBHM)

**Untersuchung von Rindern in Österreich auf das Vorkommen von
Parafilarien mittels molekularbiologischer Verfahren**

Diplomarbeit zur
Erreichung des akademischen Grades Magister Medicinae Veterinariae
an der
Veterinärmedizinische Universität Wien

Vorgelegt von

Johannes Reithofer

Wien, im August 2021

Betreuerin: Alexandra Hund

Begutachter/In: Hans-Peter Führer

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis	4
2. Einleitung und Fragestellung	5
3. Literaturübersicht	6
3.1. Morphologie.....	6
3.2. Lebenszyklus und Klinik	6
3.3. Verbreitung	11
3.4. Diagnostik	13
3.5. Therapie	14
3.6. Prophylaxe	15
4. Material und Methodik.....	16
4.1. Material	16
4.2. Methodik	16
4.2.1. DNA Extraktion.....	16
4.2.2. PCR.....	17
4.2.2.1. Herstellung des Gels.....	18
4.2.2.2. Gelelektrophorese.....	19
4.2.2.3. Sequenzierung	19
5. Ergebnisse	19
6. Diskussion.....	22
7. Zusammenfassung.....	24
8. Sumary	25
9. Literaturverzeichnis.....	26
10. Abbildungsverzeichnis.....	29
11. Tabellenverzeichnis.....	30
12. Anhang	31
12.1. Fragebogen.....	31
13. Danksagung.....	33

1. Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
DNA	Desoxyribonucleinsäure
et al.	et alii, et aliae (und andere)
ID	Immunodiffusion
Larvenstadien I - III	L I – L III
<i>M. autumnnalis</i>	<i>Musca autumnnalis</i>
µl	Mikroliter
<i>P. bovicola</i>	<i>Parafilaria bovicola</i>
PCR	Polymerase- Kettenreaktion
s.c.	subcutan
sek	Sekunde(n)
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Buffer
TGD	Tiergesundheitsdienst
U/min	Umdrehungen pro Minute

2. Einleitung und Fragestellung

Weltweit spielen parasitäre Erkrankungen bei Nutztieren eine wichtige Rolle. Besonders beim Rind können Parasiten zu gesundheitlichen Problemen und somit zu einer verminderten Leistung führen. Im Zuge der Globalisierung, der Steigerung des Imports und Exports von Tieren und der steigenden Durchschnittstemperaturen, konnten sich zu den allgemein in Mitteleuropa bekannten Lungenwürmern, Leberegeln und Magen-Darmwürmern nicht autochthone Parasiten wie *Parafilaria bovicola* (*P. bovicola*), hinzugesellen (Bech-Nielsen et al. 1983, Pickens 1980).

P. bovicola verursachen bei Rindern und Büffeln die Parafilariose. Dieses Krankheitsbild wurde erstmals von Tubangu 1934 auf den Philippinen beschrieben und trat lange Zeit nur in Südasien und Südafrika auf (Bech-Nielsen et al. 1982a). Seit einigen Jahren ist die Parafilariose in weiten Teilen Europas etabliert. Ausgehend von diesem endemischen Vorkommen scheint sich dieser Parasit zunehmend in weitere Regionen auszubreiten. Sowohl Tiertransporte über weite Strecken als auch die Migration der für die Übertragung notwendigen Vektoren scheinen eine Ausbreitung von *P. bovicola* zu begünstigen (Pickens 1980). Im Jahr 2011 wurde in Österreich erstmals vom Vorkommen der Parafilariose berichtet (Hofer 2011). Seither ist diese Erkrankung in weiten Teilen Kärntens etabliert.

Anlass für diese Arbeit gab ein Bericht von “blutenden Rindern” in einem Ort im Bezirk Hartberg- Fürstenfeld in der Steiermark und eine Beschreibung eines ähnlichen klinischen Bildes von einem Tierarzt in Oberösterreich, welcher sich an die Veterinärmedizinische Universität in Wien gewandt hat. Es wurde klar, dass es kaum Informationen über die Verbreitung von *P. bovicola* in Österreich gibt. Nachforschungen im Heimatort ergaben, dass mehrere Tiere an verschiedenen Betrieben eine ähnliche Symptomatik aufwiesen.

Mehrere Proben von Exsudat welches von den betroffenen “blutenden” Tieren entnommen wurde, wurden an das Institut für Parasitologie an der Veterinärmedizinischen Universität Wien gesendet mit dem Ziel, mithilfe molekularbiologischer Verfahren, *P. bovicola* nachzuweisen. Um weitere Informationen über die Epidemiologie von *P. bovicola* in Österreich zu erlangen, wurde ein österreichweites Projekt gestartet. Hierfür wurden ein Informationsschreiben mit der Beschreibung des klinischen Bildes der Parafilariose und ein Fragebogen erstellt. Beides wurde an die Tiergesundheitsdienste (TGD) in Österreich versandt, um praktizierende Tierärztinnen und Tierärzte auf diese Krankheit aufmerksam zu machen.

3. Literaturübersicht

Parafilaria bovicola ist eine Nematodenart und ist der Auslöser der Parafilariose. Nematoden gehören zum Stamm der Nematozoa (Fadenwürmer), Unterstamm Nematoda (Rundwürmer), Superfamilie Filarioidea, Familie Filariidae, Gattung *Parafilaria* (Eckert et al. 2013).

3.1. Morphologie

Die adulten weiblichen Filarien erreichen eine Größe bis zu 6,5 cm, während die männlichen nur bis zu 3,5 cm lang werden. Sowohl das Männchen als auch das Weibchen haben 500 µm im Durchmesser (Bech-Nielsen et al. 1983).

Das Vorderende ist konisch geformt und weist eine Vielzahl von kleinen Cuticulaverdickungen auf. Die Cuticula ist transversal gestreift. Bei den Weibchen liegt die Mundöffnung direkt neben der Vulva. Der Uterus beinhaltet oft embryonierte Eier, welche dünnchalig und 50x28 µm groß sind. (Eckert et al. 2013, Stevanovic et al. 2014).

3.2. Lebenszyklus und Klinik

Weibliche Parafilarien sind ovovivipar (Borgsteede et al. 2009). In Mitteleuropa befinden sich die geschlechtsreifen Weibchen von März bis Juli in erbsen- bis haselnussgroßen, mit Blut und Exsudat gefüllten Knoten dicht unter der Haut (Abbildung 1) (Boch et al. 2006a, Losson und Saegerman 2009).

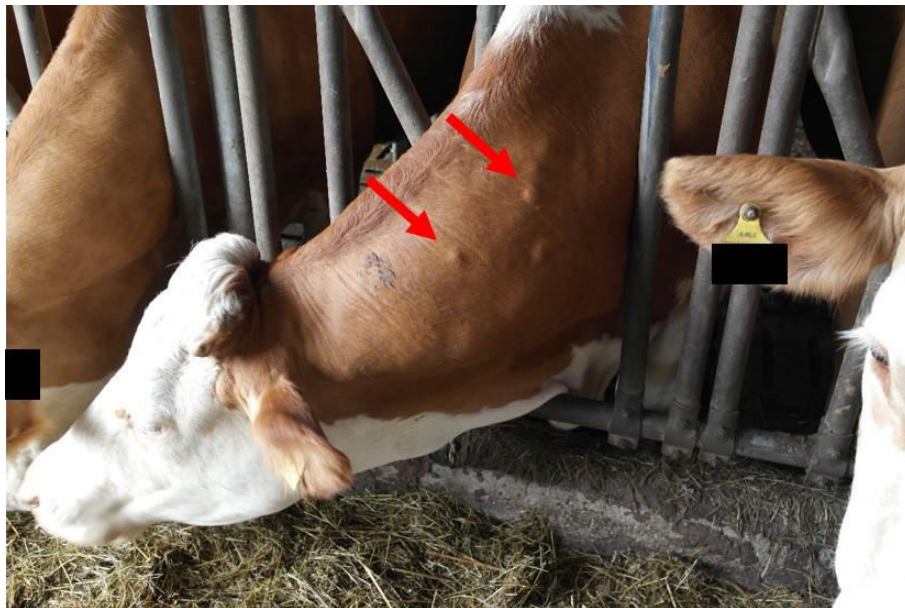


Abbildung 1: Typische Hautknoten und eingetrocknete Blutung am Hals eines Rindes.

Diese Knoten sind etwa 5-10 mm hoch und haben einen Durchmesser von 2-3 cm. In der Palpation sind sie derb und nicht schmerzhaft. Sie sind hauptsächlich am Hals, an der Schulter und im Bereich des Rückens lokalisiert. Sind die Weibchen bereit zur Eiablage, so bohren sie ein Loch, ausgehend von den Umfangsvermehrungen, in denen sie sich vor der Eiablage befinden, und legen ihre Eier in das austretende Blut (Abbildung 2) (Eckert et al. 2013).



Abbildung 2: Beginnende Hautblutung ausgehend von einem Hautknoten am Hals eines Rindes.

Als übertragender Vektor fungiert die Gesichtsflye *Musca autumnalis* (*M. autumnalis*) (Eckert et al. 2013). Adulte weibliche Gesichtsfiegen benötigen für die Produktion ihrer Eier tierische Proteine, welche sie in Tränenflüssigkeit oder Wundflüssigkeit von Rindern finden können (Pickens 1980). Aus diesem Grund nimmt *M. autumnalis* das austretende Exsudat, welches von den Bohrlöchern der weiblichen Parafilarien stammt, auf. In diesem Exsudat befinden sich larvenhaltige Eier und freie Mikrofilarien (Abbildung 3 bis Abbildung 6) (Eckert et al. 2013).

Larvenhaltige Eier und freie Mikrofilarien gelangen über den Proboscis in den Magen und in den Mitteldarm der Fliegen. Spätestens hier schlüpfen aus den Eiern Mikrofilarien und durchbohren den Mitteldarm und gelangen ins Abdomen. Die Weiterentwicklung der Larven zu den Larvenstadien II und L III (L II und L III) geschieht hauptsächlich in den abdominalen Fettkörperzellen. Innerhalb von neun Tagen bis hin zu mehreren Monaten, je nach Temperaturlage, entwickeln sich die Larven zu ansteckungsfähigen L III. Unter schwedischen Bedingungen dauerte es durchschnittlich 20 Tage, um die L III nachzuweisen. In experimentell infizierten Fliegen, welche bei 27°C gehalten wurden, erreichten die L III Larven nach elf Tagen ihre maximale Länge. Diese treten aus den Fettkörperzellen aus und wandern über den Thorax zum Kopf und von dort ausgehend zum Proboscis der *M. autumnalis* (Bech-Nielsen et al. 1982b, Nevill 1975, 1981, 1984).



Abbildung 3: Bild einer eingetrockneten und einer frischen Blutung am Hals.



Abbildung 4: Eine typische frische Blutung im Schulterbereich.



Abbildung 5: Eine frische Blutung an einer untypischen Stelle im Kopfbereich.



Abbildung 6: Eintrocknete Blutung im kaudalen Halsbereich.

Befinden sich ansteckungsfähige L III im Proboscis der Fliege, dann werden sie beim nächsten Kontakt mit einem Wirt auf diesen übertragen. Orbitalschleimhäute und Hautläsionen sind Inokulationsstellen. Im Zuge der Nahrungsaufnahme beraspeln die Fliegen beispielsweise die Konjunktiven eines Rindes. Dies verursacht kleinste Verletzungen und einen erhöhten Sekretfluss (Eckert et al. 2013). Kleinste Blutmengen werden über den Saugrüssel der Fliege aufgenommen und animieren die L III Stadien zum Austreten aus dem Kopf (Nevill 1979).

Nachdem die L III in den Wirt eingedrungen ist, wandern die juvenilen Stadien von der Eintrittspforte aus subkutan (s.c.) oder intramuskulär zum Rumpf des Rindes (Abbildung 7). Hierbei entwickeln sie sich über zwei Häutungen zu adulten Würmern. Zu welchem Zeitpunkt und unter welchen Voraussetzungen die Paarung der geschlechtsreifen weiblichen und männlichen Exemplare stattfindet, ist bisher nicht geklärt (Boch et al. 2006b, 2006a, Eckert et al. 2013).

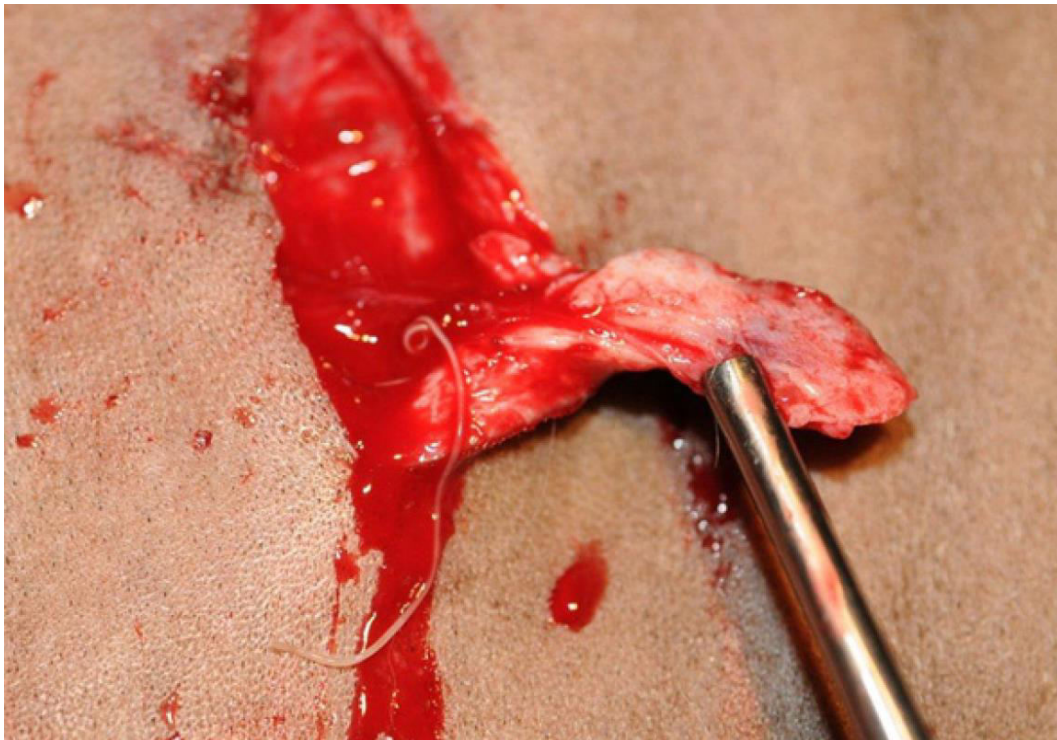


Abbildung 7: Adulter Wurm im subcutanen Bereich eines Hautknotens (Galuppi et al. 2012).

Die Zeitspanne von der künstlichen Infektion mit der infektiösen L III bis zum Auftreten der ersten Blutungen beträgt in 80% der Fälle 279 Tage. Tiere können konjunktival, intravenös, subkutan und über Inzisionen mittels Skalpell infiziert werden, jedoch nicht über die Nasenschleimhäute. Die erfolgreiche intravenöse Infektion mit L III legt nahe, dass die L III über

das Blutssystem durch den Körper wandern kann und aus diesem austreten kann, um in die Subkutis zu gelangen (Nevill 1979, 1984).

Eine jährliche Reinfektion durch infektiöse L III durch *M. autumnalis* als Vektor ist vermutlich notwendig, um den Lebenszyklus aufrecht zu erhalten, sodass es in der nächsten Saison wieder zum Auftreten von Blutungen kommt. In einem Versuch kam es aber bei einem Fall zum Auftreten von Blutungen über zumindest zwei oder sogar drei Saisonen ohne eine Reinfektion der Tiere (Nevill und Viljoen 1984).

Im Zuge der Entwicklung der L III Larve bis hin zum adulten Exemplar kann es zu Läsionen in der Subkutis und oberflächlich an der Muskulatur kommen. Typische Läsionen sind hauptsächlich am Nacken, Hals und Rücken des Schlachtkörpers zu sehen. Die Entwicklungszeit von der Exposition bis zum Nachweis im Gewebe dauert zwischen sieben und neun Monaten. Unter schwedischen Bedingungen beginnen die Blutungen im Dezember und kommen zum Höhepunkt im Juni. Von Jänner bis Juni musste in den Schlachthöfen am häufigsten Fleisch rund um die Läsionen verworfen werden (Bech-Nielsen et al. 1982a).

Die Läsionen am Schlachtkörper verändern ihre Farbe im Zuge des Infektionsverlaufes. Die meisten pathohistologischen Veränderungen können in der Entwicklungsperiode vom Zeitpunkt der Infektion bis hin zum adulten Wurm beobachtet werden. Nach der experimentellen Infektion und der darauffolgenden Entwicklung der Larven erscheinen die Läsionen gelblich - grünlich. Diese Veränderungen waren während der ersten 20 Tage nach der Infektion am prominentesten. Die grüne Farbe entsteht aufgrund von massenhaftem Vorkommen von eosinophilen Granulozyten. Rund um adulte Würmer sind gelblich - bräunliche Läsionen zu sehen. Braun aussehende Veränderungen entstehen durch eine massive Ansammlung von Hämosiderin in den Makrophagen. Die Subkutis ist mit einer Vielzahl von Lymphozyten infiltriert. Auch Plasma - und Mastzellen sind vorhanden. Beide Arten von Läsionen beinhalten gelbe Komponenten, vermutlich durch ödematöse Flüssigkeit in den betroffenen Geweben (Viljoen und Coetzer 1982).

Im Bereich des Kopfes und des Halses sind kleine gelblich erscheinende Ödeme in der Subkutis oder blutige Streifen in der Muskulatur zu erkennen. Es kann zu Blutungen in den Muskel, Muskeldegenerationen und zu einer fokalen Myositis kommen (Boch et al. 2006a).

Ab Juni/Juli konnten in einem schwedischen Schlachthof nur noch sterile und/oder kalzifizierte adulte Würmer und L IV Stadien in den heilenden oder verheilten Wunden festgestellt werden. Der Anteil an betroffenen Tieren, welche im Vorjahr auf der Weide waren, war signifikant höher als jener Anteil an Tieren, welche ganzjährig im Stall gehalten wurden (Bech-Nielsen et al. 1982a).

3.3. Verbreitung

DeJesus gelang es 1934 erstmals Parafilarien bei einem Rind auf den Philippinen nachzuweisen. Es gelang ihm, zwei weibliche Exemplare aus blutenden Knoten in der Haut des Tieres zu isolieren. Tubangui beschrieb sie in weiterer Folge genauer (Nevill 1975).

In den Niederlanden wurde ein Zuchtstier mit Blutungen, ausgehend von Knoten in der Haut im Schulter, Hals- und Rückenbereich, beobachtet. Dieser wurde 2006 aus Frankreich importiert. Während der Sektion fand man in der Subcutis Würmer, welche als weibliche *Parafilaria bovicola* identifiziert wurden (Borgsteede et al. 2009).

Im April 2008 wurden in Belgien im Sediment von ausgetretenem Exsudat mikroskopisch embryonierte Eier von *P. bovicola* nachgewiesen. Tierärztinnen und Tierärzte berichteten von punktuellen Blutungen an Hals, Schulter und Widerrist, welche ihnen schon vor mehreren Jahren aufgefallen waren. Die Verwechslung mit Bremsenbissen/-stichen oder Verletzungen könnten Gründe dafür sein, dass diese parasitäre Erkrankung mehrere Jahre unentdeckt blieb (Losson und Saegerman 2009). In Bosnien und Herzegowina gelang es 2014 erstmals, sowohl in aufgefangenem Exsudat als auch in entnommenen Hautbiopsien *P. bovicola* nachzuweisen. Schon 2013 wurden typische Hautläsionen bei Rindern beobachtet (Stevanovic et al. 2014)

Als direktes Nachbarland Österreichs wurde in Deutschland die Symptomatik der Parafilariose 2008 erstmals beschrieben. An einem Schlachthof in Niederbayern wurden an einem Schlachtkörper eines White Galloway Rindes in grünlich- gelben Veränderungen im subkutanen Bindegewebe adulte Filarien gefunden und als *P. bovicola* spezifiziert (Hamel et al. 2010). In Italien wurde das Vorkommen von *P. bovicola* 2012 zum ersten Mal in Norditalien aufgezeigt. Typische Hautblutungen wurden bei zwei von drei betroffenen Betrieben schon 1-2 Jahre zuvor beobachtet. Sowohl in entnommenen Biopsien als auch im beprobten Exsudat konnte *P. bovicola* nachgewiesen werden (Galuppi et al. 2012).

In Österreich fielen im Frühjahr 2009 in Kärnten und in der Steiermark insgesamt 13 Kühe aufgrund von blutenden Stellen auf. Es wurden keine klinischen Veränderungen beobachtet, auffallend war jedoch eine Irritation durch vermehrte Fliegenbelästigung. Auch in Salzburg wurden im Frühsommer die gleichen Krankheitserscheinungen festgestellt. Zur Diagnose wurde eingetrocknetes oder frisch ausgetretenes Blut mit Wasser vermenget und zentrifugiert. Das Sediment wurde anschließend unter dem Mikroskop untersucht (Hofer 2011).

Sowohl Tiertransporte über weite Strecken als auch die Migration der für die Übertragung notwendigen Vektoren scheinen eine Ausbreitung von *P. bovicola* zu begünstigen. *M. autumnalis* ist in der Lage, Flugstrecken von bis zu 11 km pro Tag zurückzulegen (Pickens 1980).

Retrospektiv kann angenommen werden, dass sich die Parafilariose jährlich um ca. 50 km ausbreiten wird (Bech-Nielsen et al. 1983).

3.4. Diagnostik

Anhand des klinischen Bildes der Parafilariose kann bereits eine Verdachtsdiagnose gestellt werden. Zu den typischen Symptomen zählen in der Palpation derbe Knoten in der Haut und blutiges Exsudat, welches aus diesen austritt. Die typischen Exsudationsstellen sind am Kopf, Hals, Schulter, Rücken und an der seitlichen Brust- und Bauchwand lokalisiert. Unter Umständen können Blutungen aufgrund von Verletzungen hiermit verwechselt werden (Losson und Saegerman 2009).

Aufgefangenes Exsudat kann mikroskopisch untersucht werden, um embryonierte Eier oder Mikrofilarien nachzuweisen. Anhand der Form und Größe können sowohl Eier als auch Mikrofilarien diagnostiziert werden. Exsudat wird aufgefangen, mit Wasser vermengt und unter dem Mikroskop betrachtet (Nevill 1979) oder anschließend zentrifugiert und das Sediment mikroskopisch untersucht (Niilo 1968). Auch Abklatschpräparate, welche einer Giemsa-Färbung unterzogen werden, können die Anwesenheit von embryonierten Eiern und Mikrofilarien bestätigen (Viljoen und Boomker 1977).

In Blutproben von infizierten Tieren ist oftmals eine Eosinophilie zu erkennen. Diese kann aber auch aufgrund von anderen parasitären Erkrankungen auftreten und ist daher nicht beweisend (Bech-Nielsen et al. 1982b). Auch Biopsien sind für die Diagnose geeignet (Bech-Nielsen et al. 1982b, Borgsteede et al. 2009). Doch nicht immer sind in den Hautknoten adulte Würmer zu finden. Pathohistologische Veränderungen in oder rund um die Knoten können Hinweise für Parafilariose sein, bestätigen diese aber nicht. Das Gewebe ist gekennzeichnet durch Ödematisierung und ist mit eosinophilen Granulozyten, Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen infiltriert. Es können auch perivaskuläre Infiltrate durch Entzündungszellen und Ablagerungen von Hämosiderin vorliegen (Galuppi et al. 2012). Bei Schlachtkörpern aufgefundene adulte Filarien können aufgrund ihrer Morphologie als *P. bovicola* diagnostiziert werden (Hamel et al. 2010).

Da in Schweden die Parafilariose endemisch ist und die Gefahr einer Verschleppung durch Zukäufe groß ist, erhoffte man sich mit der Entwicklung serodiagnostischer Tests infizierte Rinder zu identifizieren. Ein enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) wurde 1987 entwickelt. Ein Antigen, welches von einem adulten Wurm am Schlachthof gewonnen wurde, wurde für diese Zwecke verwendet. Theoretisch sollte jedes an Parafilariose erkrankte Rind Antikörper gegen die Parasiten entwickeln, welche eine positive Reaktion mit dem im ELISA enthaltenen Antigen verursachen. Kreuzreaktionen mit *Onchocerca lienalis*, *Dictyocaulus*

viviparus, *Ostertagia ostertagi* konnten ausgeschlossen werden. Bei Kälbern erfolgte vier Monate nach der Infektion ein positiver Antikörpernachweis mittels ELISA. Der ELISA kann als serologisches Verfahren für die Diagnose der Parafilariose und die darauffolgende gezielte Behandlung herangezogen werden (Sundquist et al. 1988). Laut (Borgsteede et al. 2009) ist dieses Verfahren derzeit nicht mehr verfügbar.

Mithilfe von molekularbiologischen Verfahren (PCR) können sowohl in frischem als auch eingetrocknetem Exsudat, in Hautbiopsien, infizierten Fliegen und in Larven oder Würmern, DNA von *P. bovicola* nachgewiesen werden (Oehm et al. 2019).

3.5. Therapie

Die Therapie von mit *P. bovicola* infizierten Rindern soll Verluste am Schlachtkörper verhindern bzw. minimieren, indem sowohl adulte Würmer als auch juvenile Stadien abgetötet werden. Weiters kann eine erfolgreiche Behandlung die Übertragung auf andere Tiere verhindern, indem Hautblutungen und somit die Eiablage unterbunden wird (Nevill et al. 1987).

P. bovicola ist eine Nematodenart, demzufolge ist eine Therapie mit makrozyklischen Laktonen indiziert (Boch et al. 2006b). Avermectine und Milbemycin gehören zu dieser Wirkstoffgruppe der Anthelmintika. Zu den Avermectinen zählen beispielsweise Ivermectin und Eprinomectin, zu den Milbemycinen gehört z.B. Moxidectin.

In einer schwedischen Studie konnte durch die Behandlung mit Ivermectin in einer Dosis von 200 µg/kg Körpergewicht die Anzahl an Blutungen im Beobachtungszeitraum von zehn Monaten stark reduziert werden. Unglücklicherweise reichten die übrig gebliebenen blutenden Läsionen mit den darin enthaltenen Eiern und Mikrofilarien aus, um die Kontrollgruppe, welche keiner Behandlung unterzogen wurde, zu infizieren. Dadurch wurde in dieser Studie zwar bewiesen, dass Ivermectin zumindest eine Wirksamkeit gegen adulte weibliche *P. bovicola* aufweist, trotzdem reichen wenige blutende Tiere aus, um weitere Tiere zu infizieren (Nevill et al. 1987).

Im Jahr 2007 wurde ein infizierter Zuchtstier in den Niederlanden ohne Erfolg mit Moxidectin Pour-on (0,5 mg/kg Körpergewicht) therapiert. Eine s.c. Injektion von Ivermectin (0,2 mg/kg Körpergewicht) stoppte die Blutungen (Borgsteede et al. 2009).

An Parafilariose erkrankte Rinder wurden mit Levamisol (12 mg/kg Körpergewicht), einem Anthelmintikum aus der Gruppe der Imidazothiazole, behandelt. Die Art und die Anzahl der Läsionen an den Schlachtkörpern war ausschlaggebend für die Bewertung der Effektivität der applizierten Anthelmintika. Die Rinder wurden 4x im Abstand von einem Tag behandelt. In weiterer Folge wurden die infizierten Tiere im Intervall von einer Woche geschlachtet. Die Blutungen sistierten nach 1- 4 Wochen, nach neun Wochen waren alle Läsionen an den

Schlachtkörpern abgeheilt. Aufgrund dieser Resultate wurde empfohlen, behandelte Rinder frühestens neun Wochen nach der Therapie zu schlachten, um den Läsionen Zeit zum Abheilen zu geben und somit wirtschaftliche Verluste zu vermeiden (Viljoen und Boomker 1977).

3.6. Prophylaxe

Musca sp. ist der übertragende Vektor der Parafilariose (Pickens 1980). Reduziert man den Bestand der Fliegen in endemischen Gebieten, so wird auch das Risiko einer Übertragung von infektiösen Larvenstadien auf Rinder minimiert. Nevill et al. 1987 setzten 2,5% Deltamethrin, ein Insektizid aus der Gruppe der Pyrethroide, ein. Das Insektizid wurde wöchentlich bzw. im Abstand von 14 Tagen mittels Spray auf die Rinder aufgetragen. Es erfolgte eine regelmäßige Fliegenzählung im Kopfbereich. Die Anzahl der Fliegen pro Kopf sank von zwölf auf unter eins. Der Mangel an Vektoren führte zu einer starken Abnahme der Übertragungsrate. Nur ein kleiner Bruchteil zeigte Blutungen. Ein Jahr nach den Behandlungen stieg die Inzidenz wieder sehr stark an. Dies könnte der Beweis sein, dass adulte Würmer länger als ein Jahr im Wirt überleben. Daher sollte man mindestens zwei Jahre lang den Vektoren entgegenwirken (Nevill et al. 1987).

4. Material und Methodik

4.1. Material

Der Klinik für Wiederkäuer an der Veterinärmedizinischen Universität in Wien wurden innerhalb kurzer Zeit mehrere Fälle von punktuellen Blutungen der Haut bei Rindern berichtet. Anhand der Fallberichte und des klinischen Bildes wurde vermutet, dass es sich um die Parafilariose handeln könnte. Um mehr über die Epidemiologie dieser parasitären Erkrankung in Österreich zu erfahren, wurde ein Informationsschreiben erstellt, welches an die TGDs und in weiterer Folge an die Tierärztinnen und Tierärzte weitergeleitet wurde. Dieses Informationsschreiben enthielt neben Bildern von betroffenen Tieren auch einen Fragebogen, welcher sich im Anhang befindet. Die praktizierenden Tierärztinnen und Tierärzte wurden gebeten, Berichte von klinischen Fällen und Proben von Exsudat von typischen Läsionen der Haut zu sammeln und bei -20°C einzufrieren. Die gesammelten Proben wurden von einem Medizinlogistikunternehmen (medlog) zum Institut für Parasitologie an der Veterinärmedizinischen Universität in Wien zur Analyse transportiert.

4.2. Methodik

4.2.1. DNA Extraktion

Das DNeasy[®] Blood & Tissue Kit der Marke QIAGEN[®] wurde zur DNA Extraktion verwendet. Das Probenmaterial, welches bis zu diesem Zeitpunkt bei -20°C gelagert wurde, wurde in ein Eppendorf Tube pipettiert. Anschließend wurde 180 μl Buffer ATL und 20 μl Proteinkinase K hinzugegeben. Der gesamte Inhalt wurde danach für 10 sek mit einem Vortexer durchmischt und im Eppendorf ThermoMixer[®] bei 56°C für 24 Stunden inkubiert.

Nach der Inkubation wurde der Inhalt wieder für 10 bis 15 sek mit dem Vortexer durchmischt und im Anschluss bei 8000 U/min für 60 sek zentrifugiert. Danach wurden sowohl 200 μl Buffer AL als auch 200 μl 99,9%iges Ethanol hinzugegeben und der Inhalt zwischen den beiden Zugaben jeweils für 10 sek mit dem Vortexer durchmischt. Der gesamte Inhalt eines Tubes wurde anschließend in ein spezielles Filtergefäß, dem DNeasy[®] Minispin column, hinein pipettiert und bei 8000 U/min für 60 sek zentrifugiert. Der Unterteil dieses Gefäßes diente als Sammelgefäß und wurde mit der darin enthaltenen Flüssigkeit verworfen. Dem Filtergefäß wurde ein neues Sammelgefäß aufgesteckt, 500 μl Buffer AW1 hinzupipettiert und danach wurde es mit derselben Einstellung zentrifugiert. Das Sammelgefäß wurde wieder verworfen und durch ein neues ersetzt. In weiterer Folge wurde 500 μl Buffer AW2 hinzugefügt und 3 min lang bei 14000 U/min zentrifugiert.

Das Filtergefäß wurde danach in ein 1,5 ml Eppendorf Tube überführt und 100 µl Buffer AE hinzupipettiert. Es folgte eine Inkubationszeit von einer Minute, nach welcher mit 8000 U/min 60 sek lang zentrifugiert wurde. Anschließend wurde das Filtergefäß entfernt und der Vorgang wurde wiederholt. Im letzten Schritt wurden die Filtergefäße entsorgt und die Eppendorf Tubes mit der extrahierten DNA bei -20 °C bis zur Durchführung der PCR aufbewahrt.

4.2.2. PCR

Nukleinsäurebestandteile einer DNA (Desoxyribonukleinsäure) können mithilfe der PCR (Polymerasekettenreaktion) amplifiziert werden. Für diesen Vorgang muss die DNA aus dem Untersuchungsmaterial extrahiert und mit dem Mastermix vermengt werden. Der Mastermix besteht aus einem Buffer, einer DNA- Polymerase, welche hitzestabil ist, einem Forward- und einem Reverse Primer und den vier DNA- Nukleotiden (Tabelle 1).

Die PCR lässt sich in drei Phasen unterteilen. Als Erstes wird die doppelsträngige DNA auf 95°C erhitzt, wodurch die Doppelbindungen aufgelöst werden, um zwei Einzelstrang- Matrizen zu erhalten. Durch Abkühlen wird ein Binden der Primer erzielt. Sind die Primer gebunden, kann die letzte Zyklusphase starten. In 5' → 3'- Richtung wird während der Elongation mithilfe von Trinukleotiden ein neuer Doppelstrang erzeugt. Wiederholt man diesen Vorgang beliebig oft, so entsteht eine Vielzahl an identen DNA- Doppelsträngen. Im letzten Schritt können die Makromoleküle mit der Gelelektrophorese anhand ihrer physikochemischen Eigenschaften aufgetrennt werden (Graw 2015). Die PCRs wurden im Rahmen dieser Studie mit einem Thermocycler der Marke Eppendorf Mastercycler® Pro durchgeführt.

Zum Nachweis von Parafilarien wurde ein angepasstes PCR- Protokoll spezifisch für Filarien verwendet. Die Mengen in µl sind sowohl für eine als auch für zehn Proben angegeben. Tabelle 2 stellt die Temperaturkurve dar.

Verwendete Primer:

Forward Primer:

H14FilaCOIFw: 5'- GCCTATTTTGATTGGTGGTTTTGG -3' 10 pmol/µl

Reverse Primer:

H14FilaCOIRv: 5'- AGCAATAATCATAGTAGCAGCACTAA -3' 10 pmol/µl

Erwartetes Produkt: ca. 724 bp.

Tabelle 1: Mastermix Rezept

Reagens	Menge (μl)	
	1 Probe	10 Proben
H ₂ O	10,675 μl	106,75 μl
5X Green Reaction Buffer	5 μl	50,0 μl
dNTP's (25mM)	0,2 μl	2 μl
TaqPolymerase (GoTaq) 5u/ μl	0,125 μl	1,25 μl
Primer (10pmol/ μl)	2 μl	20,0 μl
Primer (10pmol/ μl)	2 μl	20,0 μl
Template	5 μl	50 μl
Gesamt	25	250

Tabelle 2: Auflistung der verschiedenen Temperaturen und der Länge der einzelnen Schritte der PCR.

Temperatur	Dauer	
95°C	2 min	Initiale Denaturierung
95°C	1 min	
53°C	1 min	30x - 35x
72°C	1 min	
72°C	5 min	Finale Elongation
4°C	Lagerung	

4.2.2.1. Herstellung des Gels

In einem Gefäß wurden 1,8g Agarose in 35 ml destilliertem Wasser und 100 ml TRIS-Borat-EDTA-Buffer (TBE) gelöst. Der Agar wurde anschließend für zehn Minuten in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Danach wurde der Agar auf ca. 40°C abgekühlt und 4,2 μl Midori Green

hinzupipettiert und anschließend miteinander vermischt. Das Gel wurde in die vorbereitete Gelkammer gegossen und für 45 min darin belassen. Kunststoffkämme wurden in die Gelkammer eingesetzt, um Taschen zu bilden, in welche die Proben später hineinpipettiert werden. Nach dem Verfestigen der Gelplatte wurde diese aus der Form entfernt und im Kühlschrank bis zur Durchführung der Gelelektrophorese aufbewahrt.

4.2.2.2. Gelelektrophorese

Die Elektrophoresekammer wird mit TBE- Pufferlösung befüllt und die Gelplatte wird hinein gegeben. Auf einem Streifen Parafilm wurden 9 µl destilliertes Wasser, 3 µl Promega 100 bp und 3 µl Bluemarker vermischt und anschließend in die erste Tasche jeder Reihe der Gelplatte pipettiert. Von der jeweiligen Probe wurden je 5 µl der Reihe nach in die Taschen hinzugegeben. Als Negativkontrolle diente die letzte Tasche. Bei einer Spannung von 120 Volt betrug die Laufzeit eine Dreiviertelstunde.

Nach Ende der Laufzeit wurde die Platte aus der Kammer gegeben und mit ultraviolettem Licht beleuchtet, welches die Banden sichtbar macht. Die Bestimmung der Anzahl der Basenpaare ist mithilfe der Ladder möglich. Durch Anwendung eines UV-Lichtscanners (ChemiBIS genXpress®, DNR Bio-Imaging Systems Ltd) und der Gelcapture Software Version 5.0 konnten die Ergebnisse digitalisiert werden.

4.2.2.3. Sequenzierung

Jene Proben, welche nach der Gelelektrophorese entsprechende Banden ergaben, wurden zur Sequenzierung nach Berlin, Deutschland zu LGC Genomics geschickt. Mit Hilfe der Datenbanken BOLD und GenBank® wurden die generierten DNA- Barcodes abgeglichen.

5. Ergebnisse

Insgesamt wurden 86 Proben von 62 Tieren aus Niederösterreich (23 Tiere), der Steiermark (15 Tiere), Salzburg (11 Tiere), Oberösterreich (8 Tiere), Kärnten (3 Tiere) und Tirol (2 Tiere) an das Institut für Parasitologie an der Veterinärmedizinischen Universität in Wien gesendet. Aus den Bezirken Lilienfeld in Niederösterreich (18 Tiere) und Hartberg- Fürstenfeld in der Steiermark (11 Tiere) stammten die meisten Proben.

Alle Proben wurden mittels PCR auf das Vorkommen von ribosomaler RNA von *P. bovicola* getestet. Bei 57 Proben von 41 Tieren konnte *P. bovicola* nachgewiesen werden. Eine Probe enthielt zu wenig Material um eine PCR durchzuführen. Von 15 Tieren wurden mehrere Proben eingesendet. Bei allen außer zwei Tieren waren diese Proben entweder alle positiv oder alle negativ. Nach der Sequenzierung konnten 54 Proben vier Genotypen zugeordnet werden (n = 43

Genotyp 1, n = 4 Genotyp 2, n = 1 Genotyp 3, n = 6 Genotyp 4). Bei vier Tieren wurden jeweils zwei verschiedene Genotypen festgestellt (Genotyp 1 und 2 (2x), Genotyp 2 und 4, Genotyp 2 und 3). Genotyp 2 konnte bei zwei weiteren Tieren in jeweils einer Probe identifiziert werden, bei der weiteren positiven Probe vom selben Tier konnte jedoch kein Genotyp festgestellt werden.

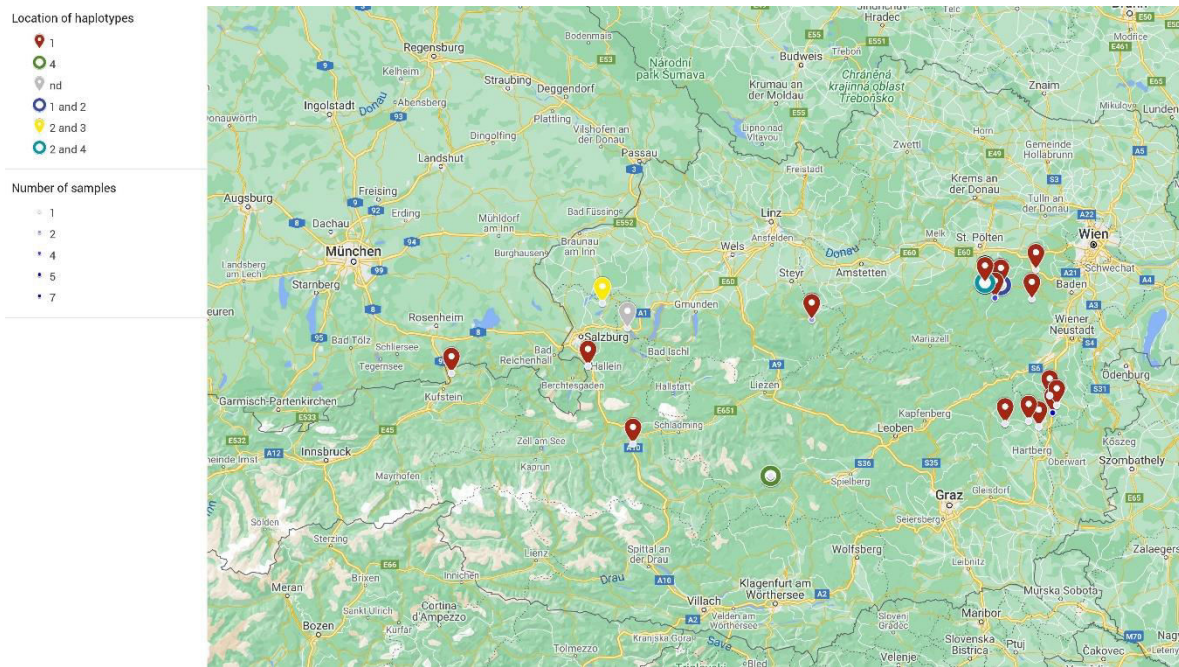


Abbildung 8: Lokalisation der Genotypen und Anzahl der positiven Proben.
 Link zur interaktiven Karte: <https://www.google.com/maps/d/edit?mid=1zjFBOwKYfcNieR0q0vtOLkYcYkbKObSy&usp=sharing>

Tabelle 3: Anzahl der positiv und negativ getesteten Tiere in den einzelnen Bezirken.

Bezirk	Anzahl negativer Tiere	Anzahl positiver Tiere
Baden	-	2
Hallein	1	1
Hartberg-Fürstenfeld	2	9
Innsbruck-Land	1	-
Kufstein	-	1
Lilienfeld	-	18
Murau	-	3
Murtal	1	-
Neunkirchen	-	2
Salzburg-Umgebung	6	1
Spittal an der Drau	3	-
Steyr-Land	6	2
St.Johann im Pongau	1	1
Wienerneustadt-Land	1	-
Vöcklabruck	-	1
Summe:	22	41

Proben von insgesamt 41 Betrieben wurden zur Untersuchung eingesandt, davon waren 53 Proben von 34 verschiedenen Milchbetrieben und acht Proben aus sechs Mutterkuhbetrieben. Zu einem Tier gab es keine weiteren Informationen. An den Betrieben wurden zwischen 2 und 95 Rinder gehalten (Mittelwert: 43,5, Median: 35 Rinder). Von den Landwirtinnen und Landwirten wurde angegeben, dass zwischen einem und acht Rinder am Betrieb Blutungen aus der Haut auftraten, welche für das klinische Bild der Parafilariose sprechen. Die betroffenen Tiere waren zwischen sieben Monate und zehn Jahre alt mit einem mittlerem Alter von 52 und einem Median von 47 Monaten. Nur zwei der beprobten Tiere waren männlich. Den Zugang zu einer Weide hatten 54 Tiere, die übrigen acht Tiere hatten entweder keinen Weidezugang oder es gab keine Angabe dazu. In 34 Betrieben wurden Fliegen in den Ställen bekämpft.

Ein Betrieb gab an, dass die somatische Zellzahl in der Milch eines Tieres im Zuge einer Infektion mit *P. bovicola* angestiegen ist. Eine Landwirtin/ ein Landwirt berichtete, dass ein betroffenes Tier ein Kalb sechs Wochen vor dem berechneten Geburtstermin abortierte, dies wurde jedoch nicht in Zusammenhang mit den Hautblutungen gebracht. Bei beiden Tieren konnte kein genetisches Material in den Proben nachgewiesen werden.

6. Diskussion

Das Ziel dieser Diplomarbeit war, die Parafilariose beim Rind mittels molekularbiologischer Verfahren zu diagnostizieren. In 66 % der eingesendeten Proben konnte genetisches Material von *P. bovicola* nachgewiesen werden. Bei den übrigen 34 % der Proben kann die Parafilariose jedoch nicht ausgeschlossen werden. Ein negatives PCR Ergebnis besagt nur, dass kein genetisches Material von *P. bovicola* nachweisbar war. Negative Ergebnisse können durch ungeeignete Probengefäße, unzureichende Kühlung oder auf das Fehlen von genetischem Material von *P. bovicola* zurückgeführt werden. In den Bezirken Lilienfeld in Niederösterreich und Hartberg- Fürstenfeld in der Steiermark wurde *P. bovicola* am häufigsten nachgewiesen. Diese Ergebnisse lassen ein endemisches Vorkommen in diesen Gebieten zwar vermuten, sind aber aufgrund vom besonderen Engagement von Tierärztinnen/Tierärzten, Landwirtinnen/Landwirten in diesen Bezirken und den im oben genannten steirischen Bezirk wohnhaften Verfasser dieser Arbeit zustande gekommen.

In der im Punkt 5 dargestellten Karte Österreichs sind jene Orte markiert, in welchen *P. bovicola* nachgewiesen wurde. Im Umkehrschluss kann daraus aber nicht geschlossen werden, dass in den übrigen Teilen Österreichs *P. bovicola* nicht vorkommt, sondern nur, dass es bis zum jetzigen Zeitpunkt entweder keine Untersuchungen oder keine positiven Nachweise in diesen Gebieten gab.

Ab dem Jahr 2009 gibt es stetig Berichte, welche das Vorkommen von *P. bovicola* in einzelnen Staaten Europas bestätigten (Borgsteede et al. 2009, Galuppi et al. 2012, Hamel et al. 2010, Hofer 2011, Losson und Saegerman 2009, Stevanovic et al. 2014). Im Zuge der Sequenzierung positiver PCR Produkte konnten in Österreich erstmals vier Genotypen festgestellt werden. Diese lassen vier verschiedene Eintragsquellen von Parafilarien nach Österreich vermuten.

Besonders aufgefallen sind jene Tiere, bei welchen bei vier Proben vom selben Tier, zwei verschiedene Genotypen festgestellt wurden. Zwei Tiere trugen Genotyp 1 und 2 in sich und bei jeweils einem Tier wurden Genotyp 2 und 3 und Genotyp 2 und 4 nachgewiesen. Es kann nur spekuliert werden, wie es zu diesen Ergebnissen gekommen ist. Infizierte Tiere können bis zu drei Saisonen lang adulte Würmer in sich tragen und Hautblutungen zeigen (Nevill und Viljoen 1984). Kommt es in dieser Zeitspanne zu einer erneuten Infektion mit einem anderen Genotyp, so kann das Tier zwei verschiedene Genotypen in sich tragen. Eine weitere wichtige Rolle könnte der übertragende Vektor *M. autumnalis* spielen. Im Zuge der Nahrungsaufnahme und Migration kann *M. autumnalis* Flugstrecken von bis zu 11 km pro Tag zurücklegen. Auf diesem Weg kann der Vektor von mehreren Tieren Exsudat und darin enthaltene embryonierte Eier oder Mikrofilarien aufnehmen und somit verschiedene Genotypen in sich tragen und diese übertragen (Pickens 1980).

Wann und wie sich die Parafilariose hierzulande etabliert hat, ist weiterhin unklar. Es kann angenommen werden, dass *P. bovicola* schon Jahre zuvor in Mitteleuropa vorgekommen ist, aber aufgrund der Ähnlichkeit mit kleinen Verletzungen oder der Verwechslung mit Bremsenbissen/-stichen unentdeckt geblieben ist (Losson und Saegerman 2009). Das Durchschnittsalter von infizierten Rindern betrug 52 Monate. Theoretisch wäre eine Infektion mit *P. bovicola* und dadurch bedingte Hautblutungen schon mit einem Alter von etwa neun Monaten möglich (Nevill 1984).

Die in Österreich etablierte Weidehaltung von Rindern in den Sommer- und Herbstmonaten scheint eine Weiterverbreitung von *P. bovicola* zu begünstigen (Bech-Nielsen et al. 1982a). Retrospektiv kann angenommen werden, dass sich die Parafilariose jährlich um ca. 50 km ausbreiten wird (Bech-Nielsen et al. 1983).

Zunehmende Fallberichte von Rindern mit Hautblutungen an den für die Parafilariose typischen Lokalisationen lassen vermuten, dass sich diese Parasitose in Österreich etabliert hat, mit der Tendenz zur weiteren Ausbreitung. Im Zuge dieser Arbeit wurden viele Tierärztinnen/ Tierärzte und Landwirtinnen/Landwirte auf diese Parasitose aufmerksam gemacht und es kann angenommen werden, dass das klinische Bild der Parafilariose nun weniger häufig mit Hautblutungen anderer Genese verwechselt werden wird.

7. Zusammenfassung

Nicht nur weltweit steigende Durchschnittstemperaturen und die dadurch bedingte Verbreitung des Vektors *M. autumnalis*, sondern auch Tiertransporte quer durch Europa und darüber hinaus, begünstigen die Ausbreitung der Parafilariose, ausgelöst durch *P. bovicola*. Im Zeitraum von Mai bis Ende September 2020 wurden insgesamt 86 Proben von 62 Tieren aus den Bundesländern Niederösterreich, Oberösterreich, der Steiermark, Kärnten, Salzburg und Tirol mittels molekularbiologischer Verfahren am Institut für Parasitologie an der Veterinärmedizinischen Universität in Wien auf das Vorkommen von Parafilarien untersucht.

Ein Informationsschreiben, welches das klinische Bild der Parafilariose beschrieb und ein Fragebogen wurden an die Tiergesundheitsdienste und in weiterer Folge an alle Nutztierpraktikerinnen und Nutztierpraktiker in Österreich gesendet. Zahlreiche Tierärztinnen und Tierärzte meldeten sich in diesem Zeitraum und schickten Proben von frischem oder eingetrocknetem Exsudat, welches von Knoten in der Haut ihren Ausgang nahm, mit einem Medizinlogistikunternehmen (Medlog) zur Untersuchung an die Veterinärmedizinische Universität in Wien.

Die eingelangten Proben wurden am Institut für Parasitologie entgegen genommen und bis zur molekularbiologische Untersuchung bei -20°C aufbewahrt. Von den 86 eingesendeten Proben konnten in 57 Proben von 41 Tieren genetisches Material von *P. bovicola* nachgewiesen werden. Bei der darauffolgenden Sequenzierung von positiven PCR Produkten konnten 54 Proben vier Genotypen zugeordnet werden (n = 43 Genotyp 1, n = 4 Genotyp 2, n = 1 Genotyp 3, n = 6 Genotyp 4). Bei zwei Tieren wurden jeweils zwei verschiedene Genotypen festgestellt (Genotyp 2 und 4, Genotyp 2 und 3). Ein negatives PCR Ergebnis kann nicht für einen Ausschluss dieser Parasitose herangezogen werden, da im Exsudat zum Zeitpunkt der Probenentnahme nicht immer genetisches Material von *P. bovicola* vorhanden ist.

Abschließend kann gesagt werden, dass diese Diplomarbeit einen ersten Überblick über das Vorkommen der Parafilariose in Österreich gibt. Dieser Überblick bestätigt, dass sich in einigen Teilen Österreichs *P. bovicola* bereits etabliert hat. In den nächsten Jahren wird es vermutlich zu einer Weiterverbreitung von *P. bovicola* in den heimischen Rinderbeständen kommen.

8. Summary

Not only the increasing global average temperature, which is facilitate the distribution of the vector *M. autumnalis*, but also the high number of animal transported cross Europe and beyond have an enormous influence of the spreading of parafilariosis, caused by *P. bovicola*. From May to June 2020, 86 samples of 62 animals from Lower Austria, Upper Austria, Styria, Carinthia, Salzburg and Tyrol were examined for parafilariosis with a molecular biological analyzing method by the institute for Parasitology at the University for Veterinary Medicine in Vienna.

An information letter, including the clinical symptoms of parafilariosis and a questionnaire were sent out by the „Tiergesundheitsdienst“ to every rural veterinarian in Austria. Numerous veterinarians reached out during that period of time and sent samples to the University of Veterinary Medicine in Vienna containing fresh or dried up exudate from subcutaneous nodes.

The samples were frozen in at -20°C at the Institute for Parasitology until they were examined. In 57 samples of 41 animals, out of a total number of 87 samples from 62 animals, the genetic material of *P. bovicola* was detected. Subsequent sequencing classified 54 samples into four genotypes (n = 43 genotype 1, n = 4 genotype 2, n = 1 genotype 3, n = 6 genotype 4). In two animals two different genotypes were spotted (genotype 2 and 4, genotyp 2 and 3). In cases with a negative PCR- result an infection with *P. bovicola* cannot be entirely excluded, since there is no permanent presence of genetic material of *P. bovicola* in the exsudate.

This diploma thesis gives a first overview of the spreading of the parafilariosis in Austria. This overview confirms the occurrence of *P. bovicola* in some areas of Austria. In the following years, the spread of *P. bovicola* across the cattle population in Austria is expected.

9. Literaturverzeichnis

- Bech-Nielsen S, Bornstein S, Christensson D, Wailgren T-B, Zakrisson G, Chirico J. 1982b. Parafilaria bovicola (Tubangui 1934) in cattle: Epizootiology- Vector studies and experimental transmission of Parafilaria bovicola to cattle. Preventive Veterinary Medicine: 303–320.
- Bech-Nielsen S, Hugoson G, Wold-Troell M. 1983. Economic evaluation of several control programs for the cattle nematode Parafilaria bovicola using benefit cost analysis. Preventive Veterinary Medicine: 303–320.
- Bech-Nielsen S, Sjogren U, Lundquist H. 1982a. Parafilaria bovicola (Tubangui 1934) in cattle: Epizootiology- Disease occurrence. Preventive Veterinary Medicine.
- Boch J, Supper R, Schnieder T. 2006a. Veterinärmedizinische Parasitologie. In: Boch J, Supper R, Schnieder T, Hrsg. Veterinärmedizinische Parasitologie. : Parey Verlag, 230-231; 274-275.
- Boch J, Supper R, Schnieder T, Hrsg. 2006b. Veterinärmedizinische Parasitologie. Parey Verlag.
- Borgsteede FHM, van Wuijckhuise L, Peutz J, Roumen T, Kock P. 2009. Import of Parafilaria bovicola in the Netherlands. Veterinary Parasitology, 161 (1-2): 146–149. DOI 10.1016/j.vetpar.2008.11.026.
- Eckert J, Deplazes P, von Samson- Himmelstjerna, Zahner H. 2013. Lehrbuch der Parasitologie für die Veterinärmedizin. In: Eckert J, Deplazes P, Samson-Himmelstjerna G von, Zahner H, Hrsg. Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. : Enke Verlag, 155; 335-336.
- Galuppi R, Militerno G, Bassi P, Nanni A, Testoni S, Tampieri MP, Gentile A. 2012. Evidence for bovine parafilariosis in Italy: first isolation of Parafilaria bovicola (Tubangui, 1934) from autochthonous cattle. Research in Veterinary Science, 184 (1): 88–91. DOI 10.1016/j.vetpar.2011.08.005.

- Graw J. 2015. In: Graw J, Hrsg. Genetik. Sechste., überarbeitete und aktualisierte Auflage. Berlin: Springer Spektrum, 89–90.
- Hamel D, Axt H, Pfister K. 2010. First report on *Parafilaria bovicola* (Nematoda: Filaroidea) in Germany. *Research in Veterinary Science*, 89 (2): 209–211. DOI 10.1016/j.rvsc.2010.02.018.
- Hofer J. 2011. *Parafilaria bovicola* beim Rind – eine neu auftretende Parasitose in Österreich. *Klauentierpraxis*.
- Losson B, Saegerman C. 2009. First isolation of *Parafilaria bovicola* from clinically affected cattle in Belgium. *The Veterinary Record*, 164 (20): 623–626. DOI 10.1136/vr.164.20.623.
- Nevill EM. 1975. Preliminary report on the transmission of *Parafilaria bovicola* in South Africa. *Veterinary Research Institute, Onderstepoort*.
- Nevill EM. 1979. The experimental transmission of *parafilaria bovicola* to cattle in South Africa using *musca*. *Veterinary Research Institute, Onderstepoort*.
- Nevill EM. 1981. The development of *Parafilaria bovicola* in *Musca xanthomelas* and *Musca lusoria*. *Veterinary Parasitology*.
- Nevill EM. 1984. Seasonal abundance and distribution of *Parafilaria bovicola* ovipositional blood spots on cattle in South Africa. *Veterinary Research Institute, Onderstepoort*.
- Nevill EM, Viljoen JH. 1984. The longevity of adult *Parafilaria bovicola* and the persistence of their associated carcass lesions in cattle in South-Africa. *Veterinary Research Institute, Onderstepoort*.
- Nevill EM, Wilikns CA, Zakrisson G. 1987. The control of *Parafilaria bovicola* transmission in South Africa. *Veterinary Research Institute, Onderstepoort*.

- Niilo L. 1968. Bovine hemorrhagic Filariasis in cattle imported into Canada *Parafilariabovicola*. *Can.Vet.Jour.*
- Oehm AW, Stoll A, Silaghi C, Pfitzner-Friedrich A, Knubben-Schweizer G, Strube C. 2019. Diagnosing bovine parafilariosis: utility of the cytochrome c oxidase subunit 1 gene and internal transcribed spacer region for PCR detection of *Parafilaria bovicola* in skin biopsies and serohemorrhagic exudates of cattle. *Parasites & Vectors*, 12 (1): 580. DOI 10.1186/s13071-019-3838-4.
- Pickens LG. 1980. Biology and control of the face fly, *Musca autumnalis* DeGeer, with studies on transmission of the bacterium, *Moraxella bovis* Hauduroy. *Journal of Medical Entomology*.
- Stevanovic O, Babic R, Nedic D, Dimitric R, Borcovic M, Paras S. 2014. First record of bovine parafilariosis in Bosnia and Herzegovina, Western Balkans. *Revue de Medicine Veterinaire*.
- Sundquist B, Zakrisson G, Bech-Nielsen S, Bianco AE. 1988. Preparation and evaluation of the specificity of *Parafilaria bovicola* antigen for detection of specific antibodies by ELISA. *Veterinary Parasitology*: 223–235.
- Viljoen JH, Boomker JDF. 1977. Studies on *Parafilaria bovicola* Tubanguui, 1934 2. Chemotherapy and pathology. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*.
- Viljoen JH, Coetzer JAW. 1982. Studies on *Parafilaria bovicola* Tubanguui, 1934 III. pathological changes in infested calves. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*.

10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Typische Hautknoten und eingetrocknete Blutung am Hals eines Rindes.	6
.....	
Abbildung 2: Beginnende Hautblutung ausgehend von einem Hautknoten am Hals eines Rindes.	7
.....	
Abbildung 3: Bild einer eingetrockneten und einer frischen Blutung am Hals.	8
.....	
Abbildung 4: Eine typische frische Blutung im Schulterbereich.	8
.....	
Abbildung 5: Eine frische Blutung an einer untypischen Stelle im Kopfbereich.	9
.....	
Abbildung 6: Eingetrocknete Blutung im kaudalen Halsbereich.	9
.....	
Abbildung 7: Adulter Wurm im subcutanen Bereich eines Hautknotens (Galuppi et al. 2012).	10
.....	
Abbildung 8: Lokalisation der Genotypen und Anzahl der positiven Proben.	20
.....	

11. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mastermix Rezept.....	18
Tabelle 2: Auflistung der Temperaturen und der Länge der einzelnen Schritte der PCR.....	18
Tabelle 3: Anzahl der positiv und negativ getesteten Tiere in den einzelnen Bezirken.....	21

12. Anhang

12.1. Fragebogen

An das
 Institut für Parasitologie
 Veterinärmedizinische Universität Wien
 Veterinärplatz 1
 1210 Wien
 z. Hdn. Dr. Hans-Peter Fuehrer

Institut für Parasitologie
 Universitätsklinik für Wiederkäuer

**Studie „Nachweis von Parafilarien bei Rindern in Österreich“ –
 Begleitschreiben zur Probeneinsendung**

Tierarzt <input type="checkbox"/> Einsender*	Tierhalter <input type="checkbox"/> Einsender*
Name: _____	Name: _____
Adresse: _____ _____	Adresse: _____ _____
Telefon: _____	Telefon: _____
E-Mail*: _____	E-Mail*: _____
* zutreffendes Feld bitte ankreuzen! Ihre persönlichen Daten werden vertraulich behandelt und nicht an Dritte weitergegeben. Ich möchte per E-Mail über die Ergebnisse der Untersuchung informiert werden: ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/>	

Anamnese
Art des Betriebs: <input type="checkbox"/> Milchvieh <input type="checkbox"/> Mutterkuh <input type="checkbox"/> Mast
Wie viele Rinder werden auf dem betroffenen Betrieb gehalten? _____
Wie viele Rinder zeigen die für einen Parafilarien-Befall typische Symptomatik?

Haben die betroffenen Tiere Weidegang? <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
Ist Ihnen die in beschriebene Symptomatik bereits in der Vergangenheit aufgefallen? <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein Wenn JA, seit wann? _____
Wird eine Fliegenbekämpfung am Betrieb durchgeführt? <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein Wenn JA, womit? _____
Werden Arzneimittel zur Entwurmung der Tiere angewandt? <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein Wenn JA, welche? _____
Wurden schon Proben zur Diagnostik eingesandt? <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein Wenn JA, welche? _____ Was war das Ergebnis der Untersuchung? _____

Hiermit bestätige ich, dass ich damit einverstanden bin, dass die Proben in das Eigentum der Veterinärmedizinischen Universität übergehen.
_____ Person, die berechtigt ist, über die Proben zu verfügen (Tierhalter, Schlachthofbetreiber)
Datum und Unterschrift
Einsender
_____ Datum und Unterschrift

13. Danksagung

Hiermit möchte ich mich herzlichst bei meiner Diplomarbeitsbetreuerin Dr. Alexandra Hund bedanken, die sich jederzeit für Fragen Zeit nahm und mir immer weitergeholfen hat. Vom ersten Moment an gelang es ihr, mich für dieses Thema zu begeistern und ihre motivierenden Zusprüche halfen mir, das Ziel nicht aus den Augen zu verlieren.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Hans- Peter Führer, dessen Expertise auf dem Gebiet der Parasitologie mir bei Unklarheiten weitergeholfen hat.

Auf diesem Wege möchte ich mich auch bei Frau Bitra Shahi Barogh für die hervorragende Kommunikation im Zuge der Probenannahme und Diagnostik bedanken.

Ein herzliches Dankeschön richte ich bei dieser Gelegenheit auch an meine Familie und an meine Freunde, welche mich im Laufe meines Studiums in jeglicher Form unterstützt haben. Durch sowohl finanzielle als auch seelische Unterstützung haben sie mir diesen Kindheitstraum ermöglicht.