



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Filarioide Nematoden und aviäre Malaria in Stechmücken im Donaudelta sowie Untersuchungen auf die Vektorkompetenz von Stechmücken für Dirofilarien“

verfasst von / submitted by

Victoria Wimmer, BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Master of Science (MSc)

Wien, 2017 / Vienna 2017

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 066 834

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Masterstudium Molekulare Biologie

Betreut von / Supervisor:

Univ.-Prof. Dr.med.vet. Anja Joachim

Inhaltsverzeichnis

1	Fragestellung	1
2	Einleitung	2
	2.1 Stechmücken	2
	2.2 Dirofilarien	6
	2.3 Plasmodien	11
	2.4 <i>Francisella tularensis</i>	13
	2.5 Trypanosomen	14
3	Material und Methoden	15
	3.1 Standorte und Probensammlug	15
	3.2 Morphologische Bestimmung der Stechmücken	16
	3.3 DNA-Isolierung	17
	3.4 Analyse mittels konventioneller und nested PCR	17
	3.5 Gelelektrophorese und Sequenzanalyse	25
	3.6 Etablierung einer neuen qPCR für die Detektion von <i>D. repens</i> , <i>D. immitis</i> und <i>A. reconditum</i>	25
	3.7 Klonierung	28
	3.8 Auswertung	31
4	Ergebnisse	32
	4.1 Stechmücken im Donaudelta/Rumänien	32
	4.2 Allgemeines Screening	34
	4.3 Vektorkompetenzstudie	36
	4.4 Etablierung einer neuen qPCR für die Detektion von <i>D. repens</i> , <i>D. immitis</i> und <i>A. reconditum</i>	39
5	Diskussion	43
	5.1 Stechmücken im Donaudelta/Rumänien	43
	5.2 Allgemeines Screening	44
	5.3 Vektorkompetenzstuie	45
	5.4 Etablierung einer neuen qPCR für die Detektion von <i>D. repens</i> , <i>D. immitis</i> und <i>A. reconditum</i>	48
6	Zusammenfassung	49
7	Abstract	50
8	Abbildungsverzeichnis	51
9	Tabellenverzeichnis	52
10	Literaturverzeichnis	53
11	Anhang	63

Danksagung

Ich möchte mich hiermit aufrichtig bei allen Kollegen und Mitarbeiter des Instituts für Parasitologie an der Vetmeduni Wien bedanken. Ihr habt es mir ermöglicht, Teil eines hervorragenden Teams zu sein. Außerdem habt ihr mir dazu verholfen, bereits mit meinen jungen Jahren an zwei verschiedenen Kongressen teilgenommen zu haben.

Ein großes Dankeschön gilt allen voran Fr. Prof. Dr. Anja Joachim für die Betreuung und die Möglichkeit, meine Masterarbeit am Institut für Parasitologie absolvieren zu können.

Ein weiteres großes Dankeschön gilt vor allem auch Hr. Dr. Hans-Peter Fuehrer, der mich während meiner gesamten Arbeit stets unterstützt und motiviert hat. Überdies versorgte er mich ebenso mit hilfreichen Ratschlägen und Erklärungen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Katja Silbermayr und Angela Monica Ionică, die mir bei der Durchführung meiner Arbeit eine große Hilfe waren.

Weiters bedanke ich mich bei Ing. Barbara Eigner, Mag. Carina Zित्रa und Walpurga Wille-Piazzai für die sowohl theoretischen als auch praktischen Ratschläge und deren Mithilfe.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich durch mein gesamtes Studium hindurch, sowohl auf der Vetmed als auch auf der Hauptuni, stets unterstützt haben. Ich hoffe, dass auch mein Vater meine persönliche Entwicklung und meinen Werdegang gutheißen würde, da er meine Studienzeit nicht mehr miterleben konnte.

Abkürzungsverzeichnis

BGS	BG-Sentinel (Falle)
bp	Basenpaare
CDC	Centers for Disease Control (Falle)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
kDNA	Kinetoplast DNA
ml	Milliliter
mM	Millimolar
µl	Mikroliter
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pmol/µl	Pikomol pro Mikroliter
qPCR	quantitative Polymerase Kettenreaktion
rpm	revolutions per minute/Umdrehungen pro Minute

1 Fragestellung

In den letzten Jahrzehnten haben sich die Filarienarten *Dirofilaria repens* und *Dirofilaria immitis* von den ursprünglichen Gebieten aus immer weiter Richtung Zentraleuropa verbreitet. Zahlreiche Studien beschreiben das Auftreten in Ungarn, Tschechien, Slowakei, Serbien, nördliches Italien, Deutschland und Österreich. Auch in Rumänien treten diese Filarien relativ häufig auf. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist das Vorkommen von kompetenten Vektoren, die für die Verbreitung eines solchen Erregers und somit der einhergehenden Krankheit von Notwendigkeit ist. Jedoch mangelt es an Information, welche Stechmückenart(-en) zum Beispiel *D. repens* oder aviäre Plasmodien übertragen. Die Ausbreitung des Vektors und somit auch des Erregers wird durch die Globalisierung verstärkt. Dazu zählen etwa der internationale Transport von Gütern und der stetig wachsende Tourismus, besonders mit Haustieren. Auch die Klimaerwärmung trägt einen wesentlichen Beitrag dazu. Aufgrund ansteigender Durchschnittstemperaturen haben Arthropodenvektoren die Möglichkeit, sich in weitere Regionen als ihr ursprüngliches Terrain zu verbreiten und zu etablieren.

Diese Arbeit setzt sich aus drei Schwerpunkten zusammen. Der erste Teil bezog sich auf ein allgemeines Screening von gepoolten Stechmücken aus dem Donaudelta. Dabei wurde vor allem auf folgende Erreger eingegangen: Filarioidea, Plasmodiidae, *Francisella tularensis* und Trypanosomatidae. Der zweite Schwerpunkt der Arbeit behandelte eine Vektorkompetenzstudie der rumänischen Stechmücken. Dabei wurden Kopf und Thorax von Abdomen getrennt und separat voneinander auf die oben genannten Pathogene getestet. Im dritten Abschnitt sollte eine neue qPCR etabliert werden, die zugleich *D. repens*, *D. immitis* und *Acanthocheilonema reconditum* identifiziert.

2 Einleitung

2.1 Stechmücken

Stechmücken (Culicidae) gehören zu der Klasse der Insekten. Die zwei Unterfamilien, Anophelinae und Culicinae, fächern sich in 41 Gattungen auf und beherbergen rund 3500 Arten weltweit. Die Stechmücken sind hinsichtlich ihres Habitats sehr anpassungsfähig. So bevölkern sie die meisten aquatischen Lebensräume von permanent bis temporär, gleichgültig ob verschmutzt oder sauber. In vorübergehend gefluteten Arealen entlang von Flüssen oder Seen, entwickeln sich die sogenannten Hochwassermücken, wofür *Aedes vexans* ein bekanntes Beispiel darstellt. Aber auch temporäre Wasseransammlungen wie nach der Schneeschmelze bieten ideale Möglichkeiten zur Entwicklung. Weiters existieren auch halophile Arten, die Salzwasserhabitate bevorzugen (Aspöck 2010; Becker et al., 2010).

Biologie

Für die Entwicklung ist ein aquatischer Lebensraum notwendig, wobei manche Arten ihre Eier auch in feuchten Boden ablegen können (z.B. *Ochlerotatus*). Die meisten Stechmücken sind nicht autogen, das bedeutet, dass für die Fertigstellung der Eier eine Blutmahlzeit notwendig ist. Eine Ausnahme stellt *Culex pipiens* f. *molestus* dar, welche autogen lebt. Ungefähr zwei bis vier Tagen nach der letzten Blutmahlzeit werden zwischen 50 und 500 Eier, entweder einzeln oder in Grüppchen, abgelegt. Die embryonale Entwicklung findet unmittelbar nach der Eiablage statt, welche temperaturabhängig ist. Innerhalb der Entwicklung durchlebt die Stechmücke vier larvale Stadien und ein Puppenstadium. Die vier Larvalstadien leben unter Wasser und atmen durch ein Rohr, genannt Siphon, atmosphärische Luft. Die Ernährung der Larve setzt sich aus Mikroorganismen und Algen zusammen, die mit Hilfe der Mandibeln aufgenommen werden. Zuletzt erfolgt das Puppenstadium, wonach sich die Imago entwickelt (Becker et al., 2010; Zittra 2013).

Morphologie

Ein wichtiges Merkmal, das die Stechmücken von allen anderen Nematocera unterscheidet, ist der lange Stechrüssel, der stets größer als der Thorax ist. Kopf, Thorax und Abdomen sind bedeckt von Schuppen und Borsten, wobei die Ausprägung gattungsspezifisch ist.

Am Kopf befinden sich, wie bei allen geflügelten Insekten, die aus Ringen bestehenden und nach vorne gerichteten Antennen. Das basale Segment, der Scapus, ist kragenartig angeordnet und befindet sich versteckt hinter dem größeren zweiten Segment, dem Pedicellus. Bei den Culicidae ist der Pedicellus vergrößert und beherbergt hoch entwickelte mechanische und akustische Rezeptoren, die zusammen das Johnston's Organ ausmachen. Die restlichen Abschnitte der Antenne ergeben das Flagellum. Das Kopfschild, der Clypeus, befindet sich direkt hinter dem Labium. Außerdem sind seitlich Facettenaugen angeordnet.

Der Thorax besteht aus drei Segmenten, dem Prothorax, Mesothorax und dem Metathorax. Der Prothorax und der Metathorax sind evolutionär reduziert, wogegen der Mesothorax am höchsten entwickelt ist. Die Hinterflügel stellen gyroskopische Organe da, die Halteren genannt werden. Diese sind für die Orientierung im Raum notwendig. Jeder Thoraxabschnitt wird wiederum in vier Regionen eingeteilt: das dorsale Tergum, das ventrale Sternum und zwei laterale Pleurae.

Das Abdomen besteht aus elf Segmenten. Diese sind überlappend angeordnet, wobei der posteriore Teil eines jeden Segments den anterioren Abschnitt des nächsten überdeckt. Dazwischen befinden sich Membranen, die die Segmente miteinander verbinden. Jedes Segment besteht aus sklerotisiertem Tergum und Sternum, die über membranöse Pleurae verbunden sind. Bei vielen Arten treten verschiedenste Reduktionen und Verschmelzungen im Bereich der abdominalen Segmente auf. Die Genitalien leiten sich von modifizierten Anhängen des Abdomen ab und sind für die Paarung und Eiablage zuständig. Am Ende des Abdomen befinden sich Hinterleibsanhänge, die Cerci genannt werden (Aspöck 2010; Becker et al., 2010).

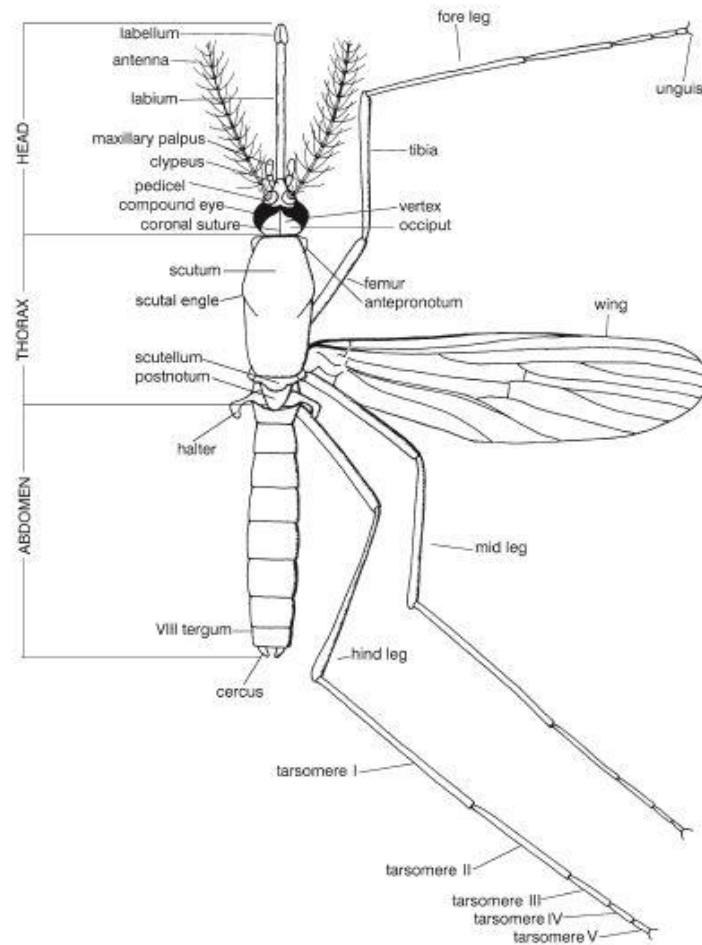


Abb. 1: Skizze zum allgemeinen Aufbau einer weiblichen Stechmücke (Becker et al., 2010)

Wirtssuche

Da die Oogenese nur vollendet werden kann, wenn eine Blutmahlzeit aufgenommen wurde, ist es für Stechmücken essentiell Wirte ausfindig zu machen. Dafür sind komplexe Verhaltensmuster notwendig, welche auf olfaktorischen und thermischen Stimuli basieren. Die Weibchen besitzen zahlreiche Rezeptoren auf ihren Antennen, die auf die Gerüche potenzieller Wirte reagieren. Die wichtigsten Stimuli sind: CO₂, Laktat, Octenol, Aceton, Butanon und phenolische Komponenten.

Der Ablauf der Wirtssuche kann in drei Phasen eingeteilt werden:

- nicht orientiertes und zufälliges Suchen
- Umstellung auf zielorientiertes Verhalten, sobald ein Stimulus registriert wurde
- Anziehung zum Wirten, sobald sich dieser in unmittelbarer Nähe befindet

Das Flugverhalten ist von Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Beleuchtungsstärke, Windgeschwindigkeit und dem physiologischen Zustand des Weibchens abhängig. Zudem gibt es artspezifische Unterschiede.

Ist nun ein potenzieller Wirt gefunden, nutzt die weibliche Stechmücke den Geruch des Wirtes, um diesen zu lokalisieren. Dies ist aufgrund der geringen Konzentrationsänderungen an CO₂ in Richtung Wirt möglich. Sobald die Stechmücke landet, wird die Haut stichprobenartig geprüft, um eine Kapillare zu finden. Dabei spielen Dicke und Temperatur der Haut eine entscheidende Rolle. Wenn die Haut punktiert ist, wird das Blut durch zwei Pumpen in den Intestinaltrakt transportiert. Um eine Gerinnung des Blutes zu verhindern, sondert die Stechmücke etwas Speichel, der Antikoagulanzen enthält, ab. Dies kann die Immunantwort des Wirtes aktivieren, was eine entzündliche Reaktion zur Folge hat. Dadurch, dass die Wunde irritiert ist, kann das Kratzen des Wirtes eine bakterielle Sekundärinfektion verursachen.

Aufgrund verschiedener Fressverhalten sind Stechmücken folgend einzuteilen: endophile Arten halten sich vorwiegend in Gebäuden auf, wobei exophile sich hauptsächlich im Freiland befinden. Je nach bevorzugtem Wirt unterscheidet man zwischen anthrophilen, zoophilen, mammalophilen und ornithophilen Arten. Nur weibliche Stechmücken benötigen die Blutmahlzeit, um die Oogenese zu vollenden. Beide Geschlechter hingegen ernähren sich von Nektar und Pflanzensäften (Becker et al., 2010; Zittra 2013).

Medizinische Bedeutung

Stechmücken sind für die Übertragung verschiedenster Pathogene verantwortlich. Dazu zählen sowohl humanmedizinisch, als auch veterinärmedizinisch wichtige Krankheitserreger wie Viren (West Nil Virus), Protozoen (*Plasmodium* spp.), Bakterien (*Francisella tularensis*) und Helminthen (filarioide Nematoden). Die Stechmücken tragen als Vektoren wohl den größten Beitrag zur Verbreitung einer von Moskitos übertragenen Krankheit bei. Zudem müssen die Vektoren mit ihren Wirten und dessen Lebensform in enger Beziehung stehen, um sicherzustellen, dass die übertragenen Pathogene proliferieren und sich im Zwischenwirt entwickeln können. Weiters sind für eine erfolgreiche Transmission mehrere Blutmahlzeiten notwendig.

Neben den oben genannten biologischen Faktoren der Übertragung von Krankheitserregern spielen auch andere Komponenten eine wichtige Rolle. So trägt der weltweite Handel und Transport von Konsumgütern, z. B. durch Überseecontainer, einen erheblichen Beitrag bei. Ähnlich dazu verhält sich auch der immer stärker wachsende Tourismus, besonders jener mit Haustieren. Bedeutsam ist außerdem die Erderwärmung und somit der Klimawandel. Aufgrund

von steigenden Durchschnittstemperaturen ist es Stechmücken möglich, auch zuvor nicht besiedelte Regionen und Habitate zu erschließen und sich nach gewisser Zeit zu etablieren. Allein in tropischen und subtropischen Gebieten sind mehr als drei Milliarden Menschen Stechmücken und anderen Arthropodenvektoren ausgesetzt, wodurch Epidemien und Pandemien verschiedenster Krankheiten in der Geschichte nicht unausweichlich waren (Aspöck et al., 2014; Becker et al., 2010).

2.2 Dirofilarien

Innerhalb der Gattung *Dirofilaria* sind die beiden Nematoden *Dirofilaria repens* und *D. immitis* jene Spezies, mit der wohl größten Bedeutung in der Veterinär- und Humanmedizin. Weniger in der Humanmedizin bedeutend sind die Spezies *D. tenuis* (befällt Waschbären), *D. ursi* (Hauptwirt Bär), *D. subdermata* (Vorkommen im Stachelschwein) und *D. striata* (befällt wilde Felidae) (Orihel et al., 1998). *D. repens* verursacht in Hunden und anderen Caniden und in seltenen Fällen sogar in Katzen subkutane Dirofilariose. *D. immitis* ist Erreger der kardiovaskuläre Dirofilariose. In humanen Fällen kann es außerdem auch zum Befall des Auges kommen (okuläre Dirofilariose). Diese Anpassungen an verschiedene Wirte und die unterschiedlichen medizinischen Auswirkungen haben seit der Entdeckung durch Francesco Birago im 17. Jahrhundert großes Interesse an diesen Nematoden erweckt. Zudem stellt die Mitwirkung von Arthropodenvektoren in der Transmission dieser Pathogene einen weiteren wichtigen Aspekt dar. Somit ist sowohl die Verbreitung der Dirofilarien als auch die der Stechmücken durch globale Veränderungen beeinflussbar (Simón et al., 2012).

Lebenszyklus

Der Lebenszyklus von Dirofilarienspezies umfasst einen Wirbeltierwirt und einen Arthropodenvektor. Hauptwirte sind Hunde und andere Canidae, die zugleich auch als natürliches Reservoir dienen. Fehlwirte sind Felidae und Menschen, bei denen sich die Krankheitsverläufe verglichen mit den Hauptwirten deutlich unterscheiden (McCall et al., 2008).

Während der Blutmahlzeit setzt die Stechmücke eine kleine Menge an Hämolymphe, die das infektiöse Larvenstadium L3 von *D. immitis* beinhaltet, in die Wunde ab. Drei bis 12 Tage post infectionem reift L3 zu L4 und die Entwicklung von L4 zum preadulten Wurm findet 50 – 70 Tage post infectionem statt. Preadulte setzen sich in der Pulmonalarterie bzw. im rechten Ventrikel ab und erreichen das adulte Stadium ungefähr 120 Tage nach der Infektion (Manfredi et al., 2007). Die adulten Weibchen produzieren ungefähr ab dem sechsten Monat nach der

Infektion Mikrofilarien (McCall et al., 2008). Adulte Würmer haben eine Lebenserwartung von bis zu sieben Jahren, wohingegen die Mikrofilarien bis zu zwei Jahre im Blut überleben können (Venco et al., 2011). Jedoch besteht auch die Möglichkeit, dass keine Mikrofilarien im Blut des Hauptwirtes vorhanden sind. Dies ist durch das Auftreten von Adulten von nur einem Geschlecht oder durch Immunabwehr des Wirtes möglich (Simón et al., 2000). In Katzen kommt es meist acht Monate post infectionem zur Ausbildung von adulten Wurmern, die meist eine kürzere Lebenserwartung als jene im Hauptwirt aufweisen. Außerdem sind beim Befall einer Katze meist keine Mikrofilarien im Blut vorzufinden (Manfredi et al., 2007; McCall et al., 2008).

D. repens erreicht das adulte Stadium ungefähr zwischen dem sechsten und neunten Monat post infectionem (Manfredi et al., 2007). Die reifen Würmer setzen sich im subkutanen Gewebe und in seltenen Fällen auch in der Bauchhöhle oder in Bindegewebsfaszien ab (Genchi et al., 2011). Außerdem hat man im Blut von Katzen Mikrofilarien von *D. repens* nachgewiesen, das darauf hinweist, dass diese als natürliches Reservoir dienen könnten (Tarello, 2002).

Menschen stellen im Lebenszyklus von Dirofilarien einen Fehlwirt dar. *D. repens* verursacht subkutane Knoten oder setzt sich in der Augenregion ab (Das et al., 2015). Unreife *D. immitis* Würmer verharren in der Pulmonalarterie und lösen eine Entzündungsreaktion hervor, die in manchen Fällen zu Lungenknoten führen kann (Haro et al., 2016; Simón et al., 2005).

Mikrofilarien von *D. repens* und *D. immitis* werden vom Vektor während einer Blutmahlzeit aufgenommen, wo sie innerhalb von 24 Stunden die Malpighischen Gefäße erreichen. Dort entwickeln sie sich innerhalb von zehn Tagen in das zweite larvale Stadium (L2), und anschließend erfolgt die Formation von L3 nach weiteren drei Tagen. Der maßgebliche Faktor für diese Entwicklungsphase ist die Temperatur der Umgebung. Das infektiöse L3 Stadium wandert schließlich in die Mundwerkzeuge, wo es bis zur nächsten Blutmahlzeit verweilt (Manfredi et al., 2007).

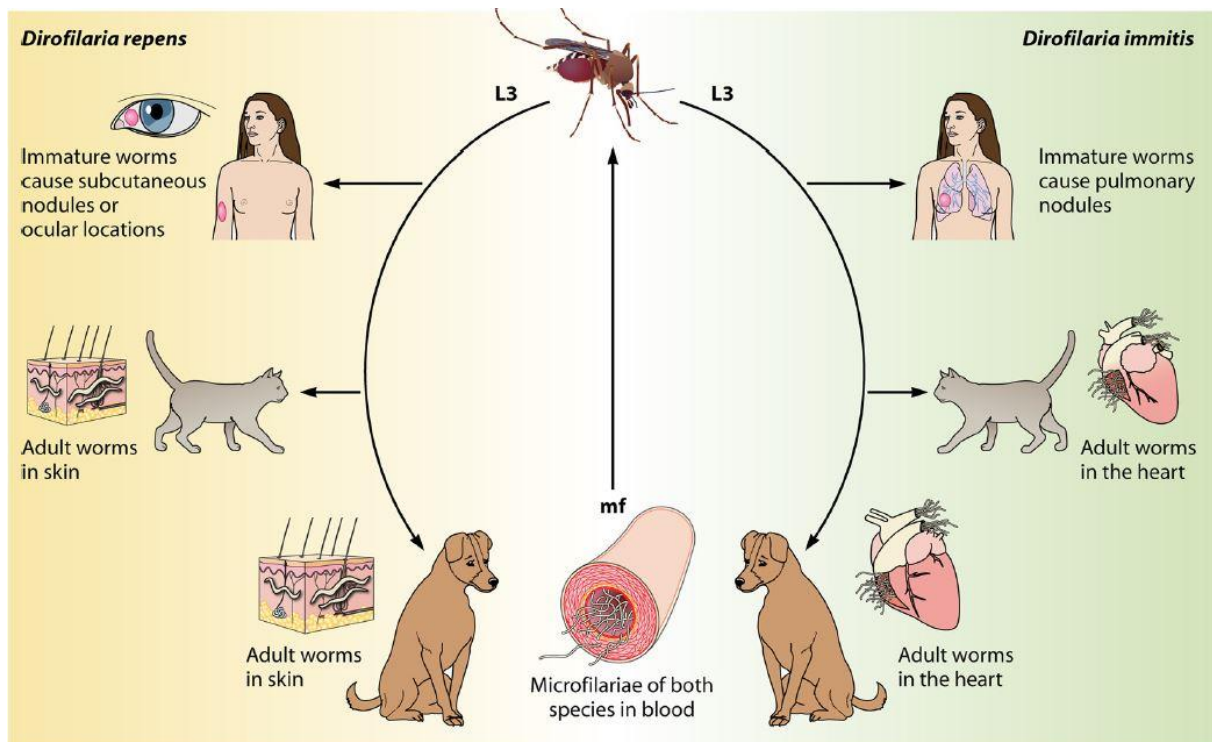


Abb. 2: Lebenszyklus von *Dirofilaria repens*/*D. immitis* (Simón et al., 2012)

Dirofilariose beim Hund

Die kardiovaskuläre Dirofilariose beim Hund zeichnet sich dadurch aus, dass zu Beginn die Pulmonalarterien in Mitleidenschaft gezogen werden. Durch Vergrößerung der Endothelzellen in der Tunica intima kommt es einerseits zur Läsionen, aber andererseits auch zur Verengung der Gefäße. Dadurch vergrößert sich zunehmend auch der interzelluläre Raum und die Zellen beginnen sich zu verformen (Venco et al., 2001). Durch diese pathologischen Vorgänge verändert sich die Elastizität der Gefäßwände (Kaiser et al., 1989). Durch die zerstörten Arterienwände können Albumin, Plasma und Blutzellen ungehindert in den perivaskulären Raum passieren, wodurch die Proliferation von glatten Muskelzellen in der Tunica media angeregt wird. Diese wandern wiederum Richtung Lumen und induzieren die intravaskuläre Ausbildung von Villi (Calvert et al., 1985). Auch andere Proteine und Bestandteile des Blutes, die durch die Gefäßwände hindurch diffundieren, sind dazu in der Lage, Ödeme und Entzündungen im Lungenparenchym auszulösen. Durch die pulmonale Hypertension, verursacht durch Verengung und abnorme Veränderung der Gefäßwände, kommt es zur Überlastung des rechten Herzens, diese hat wiederum Insuffizienz, Hypertrophie und Dilatation zur Folge. Die Ausprägung und Schwere der genannten pathologischen Veränderungen sind abhängig von der Wurmlast, Dauer der Infektion und dem Immunsystems des Wirtes (Simón et al., 2012).

Die subkutane Dirofilariose wird beim Hund durch adulte *D. repens* Würmer im subkutanen Gewebe ausgelöst und verursacht Knoten an unterschiedlichen Positionen. In vielen Fällen

verläuft die Infektion symptomlos. Zu diesem Zeitpunkt gibt es kaum Informationen zu den pathologischen Prozessen während einer *D. repens* Infektion (Grandi et al., 2007).

Dirofilariose bei der Katze

In vielen Fällen verläuft die Infektion mit *D. immitis* bei Katzen asymptomatisch oder es zeigen sich untypische klinische Anzeichen. Falls jedoch Symptome auftreten, werden diese meist durch unreife Würmer bzw. durch das Absterben dieser verursacht. Pulmonale intravaskuläre Makrophagen, die im Kapillarbett lokalisiert sind, aktivieren die Immunantwort und lösen akute vaskuläre und parenchymale Entzündungsreaktionen aus (Dillon et al., 2008). Die Lunge reagiert darauf mit eosinophilen Granulozyten, die das Parenchym infiltrieren und so eine Pneumonitis verursachen. Dadurch können Proteine und Plasma frei diffundieren, wodurch die Bildung von Ödemen gefördert wird. Zusätzlich führen Endotoxine der toten Würmer, Cytokine und andere inflammatorische Mediatoren dazu, dass Pneumozyten-Typ-I beschädigt werden und Pneumozyten-Typ-II hyperplasieren (Dillon et al., 2008). Durch die beschädigte Kutikula der Würmer wird eine große Menge an Antigenen frei, die zu einem Schocksyndrom führen kann. Es wurde gezeigt, dass es eine Korrelation zwischen dem Schweregrad der Immunantwort und der Menge an freigesetzten Antigenen besteht (Litster et al., 2008). Bis zu diesem Zeitpunkt gibt es keine Berichte über Herzinsuffizienz aufgrund von *D. immitis* bei Katzen.

Dirofilariose beim Menschen

Die pulmonale Dirofilariose beim Menschen zeichnet sich durch Knoten in der Lunge aus, die durch unreife *D. immitis* Würmer verursacht werden. Diese verweilen in einem Ast der Pulmonalarterie und blockieren den Blutfluss, das wiederum kann zu einer Embolie und Entzündungen führen (Muro et al., 2001). In den meisten Fällen führt das zu einer Fehldiagnose einer malignen Geschwulst (Haro et al., 2016). Ein solcher Knoten besteht aus einem Gerinnsel, in dem sich der Wurm befindet, umgeben von einer fibrinösen Wand. In und/oder um das Gerinnsel befinden sich zahlreiche Entzündungszellen, wie eosinophile Granulozyten, Lymphozyten, Plasmazellen und Histiozyten (Simón et al., 2005).

Die subkutane Dirofilariose wird durch adulte bzw. preadulte *D. repens* Würmer verursacht. In den meisten Fällen zeigt sich eine solche Infektion vorerst als Larva migrans, bis sich der Wurm schließlich im subkutanen Gewebe absetzt. Der Knoten besitzt eine elastische Beschaffenheit und wird mit Juckreiz und in manchen Fällen auch mit Schmerzen wahrgenommen (Tappe et al., 2014). Seltener kommt es zu untypischen Symptomen wie Zellulitis und Ausbil-

dung von Ödemen (Popescu et al., 2012). Histologisch ist der Wurm, ähnlich wie bei der pulmonalen Dirofilariose, von entzündlichen Infiltraten, bestehend aus eosinophilen Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten umgeben. Ein wichtiges Merkmal zur Diagnosestellung sind longitudinale Leisten auf der Wurmoberfläche (Tappe et al., 2014).

Bei der okulären Dirofilariose liegt der Wurm periorbital, subkonjunktival, in der vorderen Augenkammer, im Augenlid oder in selteneren Fällen im Glaskörper (Argy et al., 2011; Das et al., 2015; Genchi et al., 2011). Symptome sind eine Beeinträchtigung der Sehkraft und Schatten im Augenlicht. Nur im Ausnahmefall kommt es zu schweren Komplikationen oder gar zum Verlust des Augenlichtes (Genchi et al., 2011).

Verbreitung von *D. repens* und *D. immitis*

D. repens kommt in der sogenannten „Alten Welt“, also auch in Europa vor, wobei *D. immitis* hingegen in tropischen und gemäßigten Klimazonen weltweit verbreitet ist. In manchen Regionen, wie zum Beispiel in Südeuropa, sind beide Spezies vertreten (Simón et al., 2012).

Zu den endemischen Gebieten in Europa zählen vor allem mediterrane Länder, wie z.B. Italien, wo beide Dirofilarienspezies vorkommen, Griechenland und Spanien (Diakou et al., 2016; Latrofa et al., 2012; Montoya-Alonso et al., 2011). Weiter nördlich wurden bereits erste autochthone Infektionen mit *D. repens* in Frankreich (okuläre Dirofilariose) und Deutschland (subkutane Dirofilariose) publiziert (Argy et al., 2011; Tappe et al., 2014). In Österreich wurde im Jahr 2008 der erste autochthone Fall einer subkutanen Dirofilariose vermerkt, wobei erst 2012 *D. repens* in hiesigen Stechmücken nachgewiesen wurde (Auer et al., 2008; Silbermayr et al., 2014). In der Slowakei wurden 2013 erstmalig Mikrofilarien von *D. repens* in Stechmücken identifiziert, wobei die Infektionsrate in Hunden, je nach Region, zwischen zwei und 25% variiert (Bocková et al., 2013; Miterpáková et al., 2016). Im Nachbarland Tschechien wurde ebenfalls 2013 *D. repens* in *Aedes vexans* zum ersten Mal nachgewiesen. Außerdem sind in Tschechien bisher drei autochthone humane Fälle verzeichnet worden (Matějů et al., 2014; Rudolf et al., 2014). Die Balkanhalbinsel hat sich seit 2000 von einem nicht endemischen zu einem endemischen Gebiet entwickelt, wobei die kaninen und humanen Infektionsraten große Schwankungsbreiten besitzen (Tasić-Otašević et al., 2015). Der erste Nachweis von Dirofilarien in Stechmücken in Weißrussland erfolgte 2016 durch Șuleșco et al. In Polen gab es Berichte über humane Dirofilariose seit 2007, jedoch wurde 2012 der erste autochthone Fall durch *D. repens* dokumentiert (Cielecka et al., 2012).

In Rumänien herrscht eine mäßige bis hohe Infektionsrate sowohl in Haushunden als auch in streunenden Hunden. In einigen Fällen liegen auch Mischinfektionen beider Spezies vor

(Ciucă et al., 2016; Ionică et al., 2015). Zudem wurde gezeigt, dass eine relativ hohe Durchseuchung in Goldschakalen im Süden des Landes vorliegt. Diese spielen somit eine potenziell wichtige Rolle im Lebenszyklus und der Verbreitung der Dirofilarien (Ionică et al., 2016). In Rumänien gibt es bis zu diesem Zeitpunkt nur wenige dokumentierte Fälle von humaner Dirofilariose. Im Jahr 2011 wurde ein Fall von subkutaner Dirofilariose durch *D. repens* beschrieben (Popescu et al., 2012).

Außerhalb Europas sind die Infektionsraten sehr unterschiedlich. In den USA liegt jene von *D. immitis* in Hunden zwischen ein und zwölf Prozent, wobei in Zentral- und Südamerika eine Schwankungsbreite von 20 bis 42% vorliegt. In nördlichen Regionen wie Kanada ist die Prävalenz sehr niedrig (Simón et al., 2012; Slocombe et al., 1993). Im asiatischen Raum sind im Iran und Sri Lanka die höchsten Infektionsraten von zirka 60% durch *D. repens* vorzufinden (Tarello, 2011). In Japan hingegen wurde eine hohe Prävalenz für *D. immitis* beobachtet (Nogami et al., 1997). Die Küsten Australiens gelten als endemische Gebiete, jedoch ist das Vorkommen von *D. immitis* relativ gering (Nguyen et al., 2016).

Acanthocheilonema reconditum

Acanthocheilonema reconditum ist einer der weniger bekannten filarioiden Helminthen und wird durch Flöhe und Läuse übertragen. Das Pathogen befällt die Peritonealhöhle und das Fettgewebe des Wirtes und gilt als wenig pathogen (Lindemann et al., 1983). Außerdem wurde *A. reconditum* auch als Zoonoseerreger beschrieben (Huynh et al., 2001). Studien zu Folge soll *A. reconditum* weltweit verbreitet sein, wobei das größte Vorkommen im Mittelmeerraum, Mittleren Osten, Südafrika und Südamerika zu finden ist (Otranto et al., 2013). 2015 wurde erstmals über die Verbreitung in Rumänien berichtet. Dort ist *A. reconditum* in einem großen Gebiet vorzufinden, wobei die Prävalenz relativ gering ist (Ionică et al., 2015).

2.3 Plasmodien

Zu den aviären Haemosporidien zählen ungefähr 40 Arten der Gattung *Plasmodium*, 130 Arten der Gattung *Haemoproteus* und 35 Arten der Gattung *Leucocytozoon* (Valkiunas 2005). Bisher wurden 900 Stämme (definiert durch Cytochrom b – Sequenzen) innerhalb der Plasmodien in mehr als 600 Vogelspezies identifiziert (Bensch et al., 2009). Der wohl am häufigsten vorkommende Erreger der aviären Malaria ist *Plasmodium relictum*. Andere Pathogene wie *P. gallinaceum* und *P. juxtanucleare* besitzen vermutlich nur wenig Bedeutung in der Veterinärmedizin (Mehlhorn et al., 2008).

Der Lebenszyklus beginnt mit den Sporozoiten, die durch eine infizierte Stechmücke in den Wirt gelangen und sich zu Beginn asexuell im Wirtsgewebe reproduzieren (exoerythrozytäre Phase). Darauf folgt die ebenso asexuelle Vermehrung in den zirkulierenden Erythrozyten (erythrozytäre Phase). Ein Teil dieser Plasmodien entwickeln sich zu Gametozyten, die wiederum vom Vektor über eine Blutmahlzeit aufgenommen werden. In Magen-Darm-Trakt der Stechmücke durchleben diese den nächsten Entwicklungsschritt, wobei sich Mikrogameten und Makrogameten bilden. Die Fertilisation erfolgt durch Verschmelzen der Mikrogamete mit einer Makrogamete, wodurch eine Zygote innerhalb von 24 Stunden gebildet wird. Diese Zygote entwickelt sich zur Oozyste, die erneut eine Phase der asexuellen Reproduktion durchlebt. Bei diesem Vorgang, genannt Sporogonie, entsteht eine große Anzahl von Sporozoiten innerhalb der Oozyste, bis diese schlussendlich platzt und die neu gebildeten Erreger freilässt. Diese wandern in die Speicheldrüse der Stechmücke, um bei der nächsten Blutmahlzeit den nächsten Wirt zu infizieren (Lapointe et al., 2012).

Die Infektion im Wirt beginnt mit einer akuten Phase, in der die Parasitenlast stetig steigt, das kann bis zu zwölf Tagen dauern. Infizierte Individuen leiden meist unter Anämie, Lethargie und Untergewicht. Der Hämatokrit kann außerdem um mehr als 50% vermindert sein (Van Riper et al., 1994). Weitere pathologische Veränderungen sind dünnes bzw. wässriges Blut, Vergrößerung und Verfärbung von Leber und Milz durch Hyperzellularität und der gesteigerten phagozytotischen Aktivität der Makrophagen (Al-Dabagh, 1966). Sobald die akute Phase vorbei ist, erfolgt ein rascher Abfall der Infektion und es kommt zur chronischen Phase, die meist lebenslang andauert. Es kommt zur Produktion von Antikörpern und Zell-vermittelter Immunantworten, welche die Infektion in Schach halten (Van Riper et al., 1994). Chronisch infizierte Vögel stellen somit ein natürliches Reservoir für diese Pathogene dar.

Dennoch verursacht eine solche Infektion je nach Population sehr unterschiedliche Auswirkungen. *P. relictum* verursachte in hawaiianischen Vögeln eine hohe Mortalität und wird so mit dem Rückgang der Population und einer geringeren Verbreitung in der Verbindung gebracht (Warner, 1968). Dementgegen existieren auch Hinweise, dass chronische Infektionen mit diesen Pathogenen nur wenig Einfluss auf die Wirtsfitness besitzen (Lachish et al., 2011). In einem Review, in dem über 5,000 Publikationen behandelt wurden, wird eine durchschnittliche Mortalität von 4% dokumentiert, wobei es sich in den meisten Krankheitsfällen um Haustiere bzw. Vögel in zoologischen Beständen handelt (Bennett et al., 1993).

Die aviäre Malaria ist auf allen Kontinenten, bis auf die Antarktis, verbreitet, wobei in manchen Regionen die Infektionsrate bei 80% liegt (Bichet et al., 2014; Pigeault et al., 2015). Es gibt eine Vielzahl verschiedener Stechmücken, die Plasmodien übertragen. Die am häufigsten vorkommende Gattung ist *Culex*. 2012 wurde erstmalig DNA aviärer Plasmodien in europäischen Stechmücken dokumentiert (Ventim et al., 2012). In Italien wurden diese Pathogene

auch in der invasiven Stechmückenspezies *Aedes albopictus* nachgewiesen (Puente et al., 2015).

2.4 *Francisella tularensis*

Francisella tularensis ist ein gram-negatives, kokkoides Bakterium, welches Tularämie sowohl im Tier als auch im Menschen hervorruft. Insgesamt existieren vier Subspezies: *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* und *novicida* (Forsman et al., 1994). Als natürliche Reservoir gelten Nagetiere und Hasenartige. Menschen werden durch den Kontakt mit Arthropodenvektoren, durch Aufnehmen, Inhalieren oder Handhabung von infektiösem Material durch Aerosole infiziert (Oysten et al., 2004; Santic et al., 2006). Zu den Arthropodenvektoren zählen vor allem Bremsen, Zecken und Stechmücken (Petersen et al., 2009).

Klinisch zeigt die Infektion durch *F. tularensis* im Menschen verschiedene Formen. Dazu zählt die ulcero-glanduläre Form, die durch Zecken in Nordamerika bzw. Zentraleuropa und in nördlichen Ländern durch Stechmücken verbreitet wird. Die oropharyngeale Tularämie wird durch das Aufnehmen von kontaminierter Nahrung und Wasser ausgelöst. Durch das Einatmen von infizierten Aerosolen wird die respiratorische Form hervorgerufen (Oysten et al., 2004; Petersen et al., 2009; Santic et al., 2006). Das Bakterium vermehrt sich an der eingedrungenen Stelle und wandert später in regionale Lymphknoten, Leber und Milz. Die Symptome sind meist unspezifisch und grippeähnlich, wie Kopfschmerzen, Fieber, Schüttelfrost, Übelkeit, Durchfall und gegebenenfalls kommt es zu einer Pneumonie (Oysten et al., 2004; Santic et al., 2006).

Das Verbreitungsgebiet erstreckt sich über weite Teile der nördlichen Hemisphäre, wobei das größte Vorkommen in Finnland und Schweden zu beobachten ist (Eliasson et al., 2002). 1998 wurde zum ersten Mal *F. tularensis* subsp. *tularensis* in kleinen Säugetieren, Zecken, Milben und Flöhen in der Slowakei nachgewiesen (Gurycová, 1998). 2015 wurde ebenfalls in der Slowakei gezeigt, dass eine 4%-ige Seroprävalenz gegen *F. tularensis* in Blutspendern vorliegt (Zácutná et al., 2015). Im östlichen Nachbarland Ukraine wurde ein langjähriger Bestand des Pathogens in Arthropoden, Hasenartigen, Agrarerzeugnissen, im Wasser und sogar sporadisch im Menschen dokumentiert (Hightower et al., 2014). Auch in Polen wurden wenig klinisch manifestierte Fälle im Menschen, die durch Kontakt mit Arthropoden und Kaninchen verursacht wurden, im Zeitraum von 2012 bis 2013 bestätigt (Formińska et al., 2015). Auch in der Schweiz wurde vor Kurzem ein Fall von glandulärer Tularämie beschrieben (Longo et al., 2015).

2.5 Trypanosomen

Trypanosomen gehören zur Ordnung der Kinetoplastiden. Der namensgebende Kinetoplast ist eine Struktur im Mitochondrium, welches aufgewickelte DNA Fragmente enthält. Dieser ist immer mit dem basalen Teil des Flagellums verbunden. Die unterschiedlichen Spezies der Kinetoplastida enthalten entweder ein oder zwei Flagellen. Ein besonderes Charakteristikum der Kinetoplastiden ist die Eigenschaft, in verschiedenen Formen auftreten zu können. Dazu zählen die amastigote, promastigote, epimastigote und trypomastigote Form (Mehlhorn et al., 2008).

Trypanosomen besitzen ein Flagellum mit einer undulierenden Membran und parasitieren die verschiedensten Wirbeltierwirten vom Fisch bis zum Menschen. Bekannte Beispiele dafür sind *Trypanosoma avium* (Vögel), *T. rotatorium* (Amphibien), *T. vivax* (Wiederkäuer, Pferde) und *T. theileri* (Rinder). Die wohl in der (Human-)Medizin am wichtigsten sind *T. brucei gambiense* und *T. cruzi*, welche die Afrikanische Schlafkrankheit und die Chagas-Krankheit verursachen. Die Übertragung erfolgt durch blutsaugende Arthropodenvektoren (Maslov et al., 1996; Mehlhorn et al., 2008).

Die ausgelösten Symptome unterscheiden sich je nach Trypanosomenspezies und Endwirt und umfassen unter anderem Myokarditis, Lymphknotenschwellung, Fieber, Durchfall, Verschluss von Kapillaren und die Ausbildung von Immunkomplexen. Letzteres führt wiederum zu Entzündungen in den Geweben und in weiterer Folge zur Nekrose (Mehlhorn et al., 2008).

Die Verbreitung vieler Trypanosomen erstreckt sich über weite Teile Afrikas, Indien, Australien, Mittel-/Südamerika und Mittelmeerländer. Es gibt jedoch kaum Informationen über das Vorkommen von Trypanosomen in Mitteleuropa. Bestimmte Arten wie *T. theileri* oder *T. melophagium* kommen aber weltweit vor (Mehlhorn et al., 2008).

3 Material und Methoden

3.1 Standorte und Probensammlung

Für das Sammeln von Probenmaterial wurden verschiedene Typen von Fallen verwendet. Die meisten in dieser Arbeit bearbeiteten Stechmücken wurden mit Hilfe von BG-Sentinel Fallen (Biogents, Deutschland) gesammelt. Bei dieser Falle saugt ein kleiner Ventilator, der sich in der Mitte des Konstrukts befindet, Luft durch ein Fangrohr an und zieht sich annähernde Stechmücken in einen kleinen Fangbeutel. Zusätzlich wurden die Fallen mit Kohlenstoffdioxid versorgt, um vorwiegend weibliche Stechmücken zu sammeln. Die Anziehung durch CO₂ hat den Vorteil, dass die Wärmekonvektion von potenziellen Wirten nachgeahmt wird. Weiters wurden CDC Light Traps (The John W. Hock Company, USA) und Aspiratoren (ASP) verwendet.

Für die Vektorkompetenzstudie wurden nur BGS Fallen verwendet, wobei sich diese in unmittelbarer Nähe eines mit *D. repens* und *D. immitis* infizierten Hundes befanden. Durch die kurze Entfernung erhoffte man sich möglichst viel Information zu potenziellen Vektoren zu ermitteln.

Insgesamt wurden an sieben verschiedenen Standorten im Donaudelta in Rumänien Fallen aufgestellt und im Zeitraum vom 09.07.2015 bis 14.07.2015 Material gesammelt (siehe Abb. 3 und Anhang).

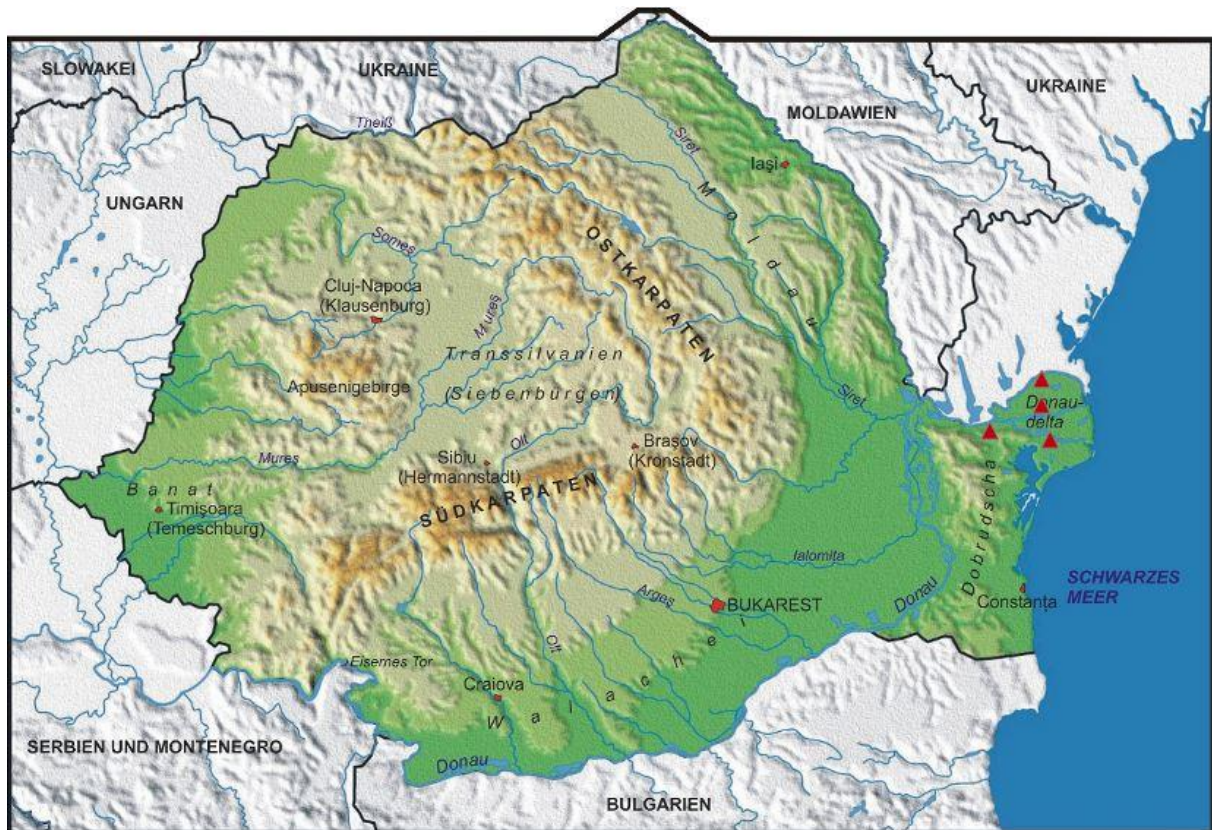


Abb. 3: Überblick Rumänien mit Sammelstandorten (▲)

Für die Etablierung der neuen qPCR wurde Probenmaterial von der University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine in Cluj/Rumänien von Angela Monica Ionică zur Verfügung gestellt. Das Material bestand aus DNA Proben von Mikrofilarien (*D. repens*, *D. immitis*, *A. reconditum*), das aus dem Blut infizierter Hunde extrahiert wurde. Die Mikrofilarien wurde abgezählt und separat aufbewahrt, das wiederum in späterer Folge wichtig für die Etablierung war.

3.2 Morphologische Bestimmung der Stechmücken

Insgesamt wurden über 6,000 Stechmücken gesammelt. Diese wurden mit Hilfe eines Stereomikroskops (Nikon SMZ 10A) und dem Bestimmungsschlüssel nach Becker et al. (2010) klassifiziert. Die Stechmücken für den ersten Teil der Arbeit wurden pro Art, Datum und Fangart zusammengefasst, wobei das Maximum bei 25 Individuen lag. Für die Vektorkompetenzstudie und somit für den zweiten Abschnitt der Arbeit erfolgte die Einteilung ebenfalls nach Art, wobei Kopf und Thorax vom Abdomen getrennt und separat aufbewahrt wurden. Das Probenmaterial

wurde bis zur DNA-Isolierung bei -20°C gelagert. Die Bestimmung erfolgte durch die Entomologin Mag. Carina Zittra.

3.3 DNA-Isolierung

DNA-Isolierung mittels innuPREP DNA Mini Kit

Für das Screening der gepoolten Stechmücken wurde mit dem innuPREP DNA Mini Kit (Analytik Jena AG, Jena, Deutschland) laut Herstellerprotokoll gearbeitet. Pro Tube wurden zwei Keramikugeln mit einer Größe von 1,4 mm (Precelly Ceramic Kit, Peqlab, Erlangen, Deutschland) zu dem Material und einem Lysispuffer des Kits hinzugegeben und mit einem Tissue Lyser II (Qiagen, Hilden, Deutschland) für zwei mal drei Minuten homogenisiert. Folgend wurden 25 µl Proteinase K hinzugefügt und bei 50°C über Nacht inkubiert. Die Extraktion am Folgetag wurde laut Protokoll weiter durchgeführt. Lediglich der letzte Schritt wurde abgeändert. Statt 200 µl Elutionspuffer wurden jeweils 100 µl für A- und B-Proben aufgetragen. Die A-Proben wurden für darauffolgende Analysen verwendet und die B-Proben dienten als Backup. Die fertigen DNA Proben wurden bis zu weiteren Analysen bei -20°C gelagert.

DNA-Isolierung mittels ZR-Duet™ DNA/RNA MiniPrep

Für die Vektorkompetenzstudie wurde mit Hilfe des ZR-Duet™ DNA/RNA MiniPrep Kits (Zymo Research, Freiburg, Deutschland) gearbeitet, wobei das Herstellerprotokoll nur für die DNA-Isolierung verwendet wurde. Wie bereits oben erwähnt wurden auch bei diesem Kit Keramikugeln und ein Tissue Lyser II verwendet. Nach dem Homogenisieren wurden die Proben in einen Shredder überführt (QIAshredder, Qiagen, Hilden, Deutschland). Weiters wurde nach Herstellerprotokoll gearbeitet. Bei diesem Kit wurde ebenso der letzte Schritt in der Extraktion variiert. Auch hier wurden A- und B-Proben hergestellt und die DNA im Elutionspuffer AE eluiert (Buffer AE, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die fertigen DNA Proben wurden bis zu weiteren Analysen bei -20°C gelagert.

3.4 Analyse mittels konventioneller und nested PCR

Für sämtliche Analysen mittels dem PCR Verfahren wurden sowohl Negativ-, als auch Positivkontrollen miteinbezogen. Um die Möglichkeit einer Kontamination so gering wie möglich zu halten, stand für die Zusammensetzung des Mastermixes ein eigener Raum zur Verfügung.

Für das Procedere wurde ein Eppendorf Mastercycler® gradient S (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) verwendet.

konventionelle PCR Analyse zur Detektion von Filarioidea

Für den Nachweis von filarioiden Nematoden wurde nach dem Protokoll von Josef Harl gearbeitet, der dieses für ein anderes Projekt im Jahr 2014 etabliert hat. Anhand des Protokolls sind folgende Gattungen nachweisbar: *Dirofilaria*, *Wuchereria*, *Brugia*, *Loa*, *Onchocerca*, *Setaria*, *Acanthocheilonema*, *Chandlerella*, *Spirocerca*, *Habronema* und *Cycliospirura*. Spezifische Primer (H14FilaCOIFw: 5'- GCCTATTTTGATTGGTGGTTTTGG -3'; H14FilaCOIRv: 5'- AGCAATAATCATAGTAGCAGCACTAA -3') wurden dafür in der Konzentration von 10 pmol/µl verwendet. Die Länge des Amplifikats beträgt zirka 700 bp. Die Zusammensetzung des Mastermixes ist in Tabelle 1 und das Temperaturprofil in Tabelle 2 aufgelistet.

Tab. 1: Zusammensetzung des Mastermixes für den Nachweis von Filarioidea

Reagenz	Menge/Reaktion
destilliertes Wasser	14,375 µl
5x Green Taq® Reaction Buffer	5,000 µl
dNTP's (0,2 mM)	0,500 µl
GoTaq® Polymerase Promega (1,25 U)	0,125 µl
Primer H14FilaCOIFw (10 pmol/µl)	2,000 µl
Primer H14FilaCOIRv (10 pmol/µl)	2,000 µl
DNA	1,000 µl
Gesamtmenge	25,000 µl

Tab. 2: Temperaturprofil zur Amplifikation von Filarioidea

95°C	2 min		initial Denaturation
95°C	1 min	30 – 35 x	Denaturation
53°C	1 min		Annealing
72°C	1 min		Elongation
72°C	5 min		final Elongation

nested PCR Analyse zur Detektion von Plasmodiidae

Für das Identifizieren von Plasmodiidae wurden nach dem Protokoll von Hellgren et al. (2004) gearbeitet. Mit jenem sind folgende Gattungen nachweisbar: *Haemoproteus*, *Plasmodium* und *Leucocytozoon*. Beide spezifischen Primerpaare wurden in einer Konzentration von 100 pmol/µl verwendet (Primerpaar nest 1: Haem NF1: 5'- CATATATTAAGAGAA5TATGGAG -3', Haem NR3: 5'- ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC -3'; Primerpaar nest 2: Haem F: 5'- AT-GGTGCTTTCGATATATGCATG -3', Haem R2: 5'- GCATTATCTGGATGTGATAATGGT -3'). Das Amplifikat ist zirka 500 bp groß. Die Zusammensetzung der beiden Mastermixe und das Temperaturprofil sind den Tabellen 3 bis 5 zu entnehmen.

Tab. 3: Zusammensetzung des nest 1 Mastermixes für den Nachweis von Plasmodiidae

Reagenz	Menge/Reaktion
destilliertes Wasser	15,080 µl
5x Green Taq® Reaction Buffer	5,000 µl
dNTP's (0,2 mM)	0,500 µl
GoTaq® Polymerase Promega (1,25 U)	0,125 µl
Primer Haem NF1 (100 pmol/µl)	0,150 µl
Primer Haem NR3 (100 pmol/µl)	0,150 µl
DNA	4,000 µl
Gesamtmenge	25,000 µl

Tab. 4: Zusammensetzung des nest 2 Mastermixes für den Nachweis von Plasmodiidae

Reagenz	Menge/Reaktion
destilliertes Wasser	17,080 µl
5x Green Taq® Reaction Buffer	5,000 µl
dNTP's (0,2mM)	0,500 µl
GoTaq® Polymerase Promega (1,25 U)	0,125 µl
Primer Haem F (100 pmol/µl)	0,150 µl
Primer Haem R2 (100 pmol/µl)	0,150 µl
DNA	2,000 µl
Gesamtmenge	25,000 µl

Tab. 5: Temperaturprofil zur Amplifikation von Plasmodiidae

95°C	2 min		initial Denaturation
95°C	45 sec	35 x	Denaturation
50°C	45 sec		Annealing
72°C	1 min		Elongation
72°C	5 min		final Elongation

konventionelle PCR Analyse zur Detektion von *Francisella tularensis*

Um das Bakterium *Francisella tularensis* zu detektieren, wurde das Protokoll von Sjöstedt et al. (1997) verwendet. Spezifische Primer (TUL4-435: 5'- GCTGTATCATCATT-TAATAAACTGCTG -3', TUL4-863: 5'- TTGGGAAGCTTGTATCATGGCACT -3') wurden in einer Konzentration von 10 pmol/µl eingesetzt. Die Länge des Amplifikats beträgt ungefähr 400 bp. Die Zusammensetzung des Mastermixes und das Temperaturprofil sind in Tabelle 6 und 7 aufgelistet.

Tab. 6: Zusammensetzung des Mastermixes zum Nachweis von *Francisella tularensis*

Reagenz	Menge/Reaktion
destilliertes Wasser	16,375 µl
5x Green Taq® Reaction Buffer	5,000 µl
dNTP's (0,2 mM)	0,500 µl
GoTaq® Polymerase Promega (1,25 U)	0,125 µl
Primer TUL4-435 (10 pmol/µl)	1,000 µl
Primer TUL4-863 (10 pmol/µl)	1,000 µl
DNA	1,000 µl
Gesamtmenge	25,000 µl

Tab. 7.: Temperaturprofil zur Amplifikation von *Francisella tularensis*

94°C	5 min		initial Denaturation
94°C	1 min	35 – 40x	Denaturation
51°C	1 min		Annealing
72°C	1 min		Elongation
72°C	10 min		final Elongation

nested PCR Analyse zur Detektion von Trypanosomatidae

Für den Nachweis von Trypanosomatidae wurden spezifische Primer (Primerpaar nest 1: S762F: 5'- GACTTTTGCTTCCTCTA(A/T)TG -3', S763R: 5'-CATATGCTTGTTTCAAGGAC -

3'; Primerpaar nest 2: TRnSSU-F2: 5'- GARTCTGCGCATGGCTCATTACATCAGA -3', TrnSSU-R2 5'- CRCAGTTTGATGAGCTGCGCCT -3') mit einer Konzentration von 10 pmol/μl verwendet. Das amplifizierte Produkt ist zirka 2,000 bp groß. Die Zusammensetzung der beiden Mastermixe und das Temperaturprofil sind in Tabelle 8 bis 10 aufgelistet.

Tab. 8: Zusammensetzung des nest 1 Mastermixes für den Nachweis von Trypanosomatidae

Reagenz	Menge/Reaktion
destilliertes Wasser	14,375 μl
5x Green Taq® Reaction Buffer	5,000 μl
dNTP's (0,2 mM)	0,500 μl
GoTaq® Polymerase Promega (1,25 U)	0,125 μl
Primer TRnSSU-F2 (10 pmol/μl)	2,000 μl
Primer TRnSSU-R2 (10 pmol/μl)	2,000 μl
DNA	1,000 μl
Gesamtmenge	25,000 μl

Tab. 9: Zusammensetzung des nest 2 Mastermixes für den Nachweis von Trypanosomatidae

Reagenz	Menge/Reaktion
destilliertes Wasser	14,375 µl
5x Green Taq® Reaction Buffer	5,000 µl
dNTP's (0,2 mM)	0,500 µl
GoTaq® Polymerase Promega (1,25 U)	0,125 µl
Primer S762F (10 pmol/µl)	2,000 µl
Primer S763R (10 pmol/µl)	2,000 µl
DNA	1,000 µl
Gesamtmenge	25,000 µl

Tab. 10: Temperaturprofil zur Amplifikation von Trypanosomatidae

94°C	5 min		initial Denaturation
94°C	1 min	30x	Denaturation
64°C	1,5 min		Annealing
72°C	1,5 min		Elongation
72°C	5 min		final Elongation

3.5 Gelelektrophorese und Sequenzanalyse

Zur Identifizierung der amplifizierten DNA Produkte wurde ein 2%-iges Agarosegel hergestellt. Die Färbung des Gels erfolgte durch Midori Green (Biozym Diagnostik GmbH, Deutschland). Die PCR Produkte wurden in einer Elektrophoresekammer (Biozym Scientific GmbH, Deutschland) bei 120V für zirka 45 – 65 Minuten, je nach Erreger, aufgetrennt. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte durch einen UV Licht Scanner (LumiBIS geneXpress®, DNR Bio-Imaging System Ltd.) und der GelCapture Software 5.0 (DNR Bio-Imaging System Ltd.)

Positive PCR Produkte wurden zum Sequenzieren zur Firma LGC Genomics geschickt. Die Sequenzen wurden in ein FASTA-Format konvertiert, wobei das Programm Chromas Lite verwendet wurde. Die Analyse erfolgte mit dem Programm GeneDoc. Die bearbeiteten Sequenzen wurden mit der NCBI Datenbank verglichen.

3.6 Etablierung einer neuen qPCR für die Detektion von *D. repens*, *D. immitis* und *A. reconditum*

Primer Test

Es wurde eine PCR angesetzt, in der spezifische Primer (GPD_Barker_2010_F: 5'- TCAACG-GATTTGGCCGTATTGG -3', GPD_Barker_2010_R: 5'- TGAAGGGGTCATTGATGGCG -3'; F5-F_Wongkamchai_2014: 5'- TTAAACCGAAAAATATTGACTGAC -3', R5-R_Wongkamchai_2014: 5'- AAWAACWAAACAATCATACATGYGCC -3') für die Detektion von *D. repens*, *D. immitis* und *A. reconditum* getestet wurden. Die GPD-Primer (Barker et al., 2010) dienen als interne Kontrolle, wobei die Wongkamchai-Primer (Wongkamchai et al., 2014) nur die Pathogene binden sollen. Die Zusammensetzung des Mastermixes und das Temperaturprofil sind den Tabellen 11 und 12 zu entnehmen.

Tab. 11: Zusammensetzung des Mastermixes für den Primer Test

Reagenz	Menge/Reaktion
destilliertes Wasser	14,375 µl
5x Green Taq® Reaction Buffer	5,000 µl
dNTP's (0,2 mM)	0,500 µl
GoTaq® Polymerase Promega (1,25 U)	0,125 µl
Primer GPD_Barker_2010_F/ F5-F_Wongkamchai_2014 (10 pmol/µl)	2,000 µl
Primer GPD_Barker_2010_R/ R5-R_Wongkamchai_2014 (10 pmol/µl)	2,000 µl
DNA	1,000 µl
Gesamtmenge	25,000 µl

Tab. 12: Temperaturprofil für den Primer Test

95°C	2 min		initial Denaturation
95°C	1 min	35x	Denaturation
57°C, 58°C, 59°C, 60°C	1,5 min		Annealing
72°C	1 min		Elongation
72°C	5 min		final Elongation

Erprobung der Sonden

Nach der erfolgreichen Überprüfung der Primer wurden für die Etablierung der qPCR die Sonden getestet. In diesem Schritt wurden selbstentworfenene (Silbermayr_2016) und eine bereits publizierte Sonde (Barker et al., 2010) verwendet. Die selbst designten Sonden (D. immitis-P (5'-3')_Silbermayr_2016: FAM-TTTTTGGAGAGCCCTCTTTTA-BHQ1, D. repens-P (5'-3')_Silbermayr_2016: HEX-TGTGTTTTTGGAGAGCCCTCTTT-BHQ1, A. reconditum-P (5'-3')_Silbermayr_2016: Cy5-GGAATATTGTTTAGGAGAGCCCTCC-BHQ2) und die publizierte Sonde (GPD-Canine-P (5'-3')_Barker_2010: ROX- CAGGGCTGCTTTTAACTCTGGCAAAGTGGA-BHQ-2), die als interne Kontrolle gehandhabt wurde, wurden in einer Konzentration von 10 pmol/µl verwendet. Sämtliche qPCRs wurden mit einem MxPro 3000 qPCR Systems Cycler (Stratagene, Agilent Technologies GmbH) durchgeführt. Die Zusammensetzung des Mastermixes und das Temperaturprofil sind in den Tabellen 13 und 14 aufgelistet.

Tab. 13: Zusammensetzung des Mastermixes für die Testung der Sonden

Reagenz	Menge/Reaktion
destilliertes Wasser	6,50 µl
SsoAdvanced™ Universal Probes Supermix (Bio-Rad)	10,00 µl
Sonde D. immitis-P_Silbermayr_2016/D. repens-P_Silbermayr_2016/A. reconditum-P_Silbermayr_2016/GPD-Canine-P_Barker_2010 (10 pmol/µl)	0,50 µl
Primer GPD_Barker_2010_F/ F5-F_Wongkamchai_2014 (10 pmol/µl)	0,50 µl
Primer GPD_Barker_2010_R/ R5-R_Wongkamchai_2014 (10 pmol/µl)	0,50 µl
DNA	2,00 µl
Gesamtmenge	20,00 µl

Tab. 14: Temperaturprofil für die Testung der Sonden

95°C	5 min		initial Denaturation
95°C	20 sec	45x	Denaturation
59°C	1 min		Annealing
72°C	1 min		Elongation
95°C	1 min		
59°C	30 sec		Melting Curve
95°C	30 sec		

Um die Spezifität der Sonden zu erhöhen, wurde in nachfolgenden Versuchen die eingesetzte Menge der Sonden zwischen 0,1 und 0,5 µl variiert. Zusätzlich wurde die Temperatur in 1,0°C-Schritten zwischen 59°C und 63°C abgeändert.

Testung der neuen Sonden

Da die Spezifität nicht ausreichend war, wurden neue Sonden designt (D. immitis-P_NEU (5'-3') Silbermayr_2016: FAM-GTTTTTTTGGAGAGCCCTCTTTTATA-BHQ1, D. repens-P_NEU (5'-3')_Silbermayr_2016: HEX-GTTTTTTTGGAGAGCCCTCTTTTTTGGT-BHQ1). Es wurden mehrere Versuche durchgeführt, wobei erneut der Einsatz an Sonden (0,1 – 05 µl) und Temperatur (59°C, 62°C, 63°C, 65°C) variiert wurde. Der Mastermix und das Temperaturprofil entsprachen jenen in Tabelle 13 und 14.

3.7 Klonierung

Gelaufreinigung

Von ausgewählten Proben wurde eine PCR angesetzt und darauffolgend eine Gelelektrophorese durchgeführt. Die Bande wurde mit einem Skalpell unter UV-Licht herausgeschnitten und die Aufreinigung erfolgte mittels dem Monarch® DNA Gel Extraction Kit (New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland).

Ligation

In diesem Schritt wurden Vektor und Insert zusammengefügt. Die Zusammensetzung des Ligation ist der Tabelle 11 zu entnehmen. Die Inkubation erfolgte ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur, anschließend wurde die Ligation für die Transformation auf Eis gestellt.

Tab. 15: Zusammensetzung der Ligation

Reagenz	Menge/Reaktion
destilliertes Wasser	5,0 µl
10x Ligasepuffer (NEB)	1,0 µl
pGEM®-T Vector (Promega)	1,0 µl
Insert	3,0 µl
T4-DNA-Ligase (NEB)	0,5 µl
Gesamt	10,0 µl

Transformation

Für die Transformation wurden kompetente HB101 *E. coli* Bakterien auf Eis für 30 Minuten bis zu maximal einer Stunde aufgetaut. 50 µl der aufgetauten Bakterien wurden zur Ligation hinzugefügt. Dies stand für 20 bis 30 Minuten auf Eis. Für einen Hitzeschock wurde das Gemisch für exakte 1,5 Minuten bei 37°C inkubiert, darauf folgten zwei bis drei Minuten erneut auf dem Eis. 450 µl LB-Medium ohne Ampicillin wurden hinzugefügt und folglich wurden die Bakterien für 20 bis 30 Minuten mit 700 rpm bei 37°C im Heizblock geschüttelt. Nun wurden 200 µl der transformierten Zellen auf LB-Ampicillin-Platten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

Plasmidpräparation – Minipreps

Die Minipreps dienen dazu, um möglichst viele Klone mit wenig Aufwand zu testen. Dazu wurde eine Bakterienkolonie von der LB-Ampicillin-Platte mit einer kleinen Pipettenspitze aufgenommen und in ein Glasröhrchen mit 2,5 ml LB-Medium (+ Ampicillin) abgeworfen. Die Klone wuchsen im Anschluss bei 37°C zirka 12 Stunden lang. Danach wurden 2 ml Bakterienkultur aus dem Glasröhrchen in ein 2 ml Tube gekippt, welches bei 13,000 rpm und Raumtemperatur für eine Minute zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde mit einer Vakuumpumpe abgesaugt. Nun wurden 200 µl Resuspendierungspuffer (50 mM Tris, 0,1 mg/ml RNase A, pH = 8,0) hinzugefügt und gevortext. Danach wurden 200 µl Lysepuffer (0,2 M NaOH, 1% SDS) zugegeben und vorsichtig geschwenkt. Das Tube stand für fünf Minuten bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von 200 µl Neutralisationspuffer (2,55 M KaAc, pH = 5,5) wurde das Tube wieder vorsichtig bewegt. Folglich wurden die Proben mit 13,000 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und zu 500 µl Isopropanol hinzugegeben und durchmischt. Es folgte wieder ein Zentrifugationsschritt bei 13,000 rpm für eine Minute. Der Überstand wurde abgenommen und zum Pellet 100 µl 70 % Ethanol hinzugefügt. Erneut folgte eine Zentrifugation bei 13,000 rpm für eine Minute. Der Überstand wurde abgesaugt und die Proben standen ein paar Minuten mit offenem Deckel in einem Thermomixer bis der restliche Ethanol verdampft war. Zum Pellet wurden 25 µl Aqua dest. hinzugegeben und für 10 Minuten mit 700 rpm bei 37°C im Thermomixer geschüttelt. Die fertigen Proben wurden gevortext und bei -20°C gelagert.

Plasmidpräparation – Midipreps

Die Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA aus den Bakterien erfolgte mittels dem PeqGOLD Plasmid Miniprep Kit II (PepLab, Erlangen, Deutschland).

Testverdau

Für den Testverdau wurden Puffer von New England Biolabs (Frankfurt, Deutschland) verwendet, die auf die verwendeten Restriktionsenzyme abgestimmt sind. Ein Mastermix wurde hergestellt (siehe Tabelle 12), der zusammen mit dem Proben auf eine 96-well Platte pipettiert wurde. Für sechs bis acht Proben wurden 1 µl Enzym verwendet. Die verwendeten Wells wurden mit Klebestreifen abgedeckt und die Platte wurde für ungefähr 45 Minuten bei 37°C in eine Wärmekammer gestellt. Folgend wurden die Proben auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch bei 100V für 20 bis 30 Minuten aufgetrennt. Positive Klone wurden zur Kontrolle zum Sequenzieren geschickt.

Tab. 16: Zusammensetzung des Mastermixes für 12 Proben für den Testverdau

Reagenz	Menge insgesamt
destilliertes Wasser	93,5 µl
10x Puffer NEB	13,0 µl
Restriktionsenzym 1	2,0 µl
Restriktionsenzym 2	2,0 µl
Plasmid-DNA	19,5 µl
Gesamtmenge	130,0 µl

3.8 Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Excel (Excel 2010 Version 14.0, Microsoft Cooperation).

4 Ergebnisse

4.1 Stechmücken im Donaudelta/Rumänien

Im Juli 2015 wurden im Donaudelta in Rumänien insgesamt über 6,000 Stechmücken gesammelt. Für das allgemeine Screening und für die Vektorkompetenzstudie wurden jeweils 5,855 und 300 Individuen untersucht. Darunter befinden sich Stechmücken der Gattungen *Aedes*, *Anopheles*, *Coquilleltidia*, *Culiseta*, *Culex* und *Ochlerotatus*. Der überwiegende Teil der Moskitos gehören den Gattungen *Aedes*, *Culex* und *Coquilleltidia* an. Die genaue Auflistung der gesammelten Proben ist Tabelle 17 und die Gesamtheit Abbildung 4 zu entnehmen.

Tab. 17: Auflistung der gesammelten Stechmückenspezies

Allgemeines Screening		
Gattung	Spezies	Anzahl
<i>Aedes</i>	<i>Aedes</i> sp.	253
	<i>Ae. vexans</i>	2774
<i>Anopheles</i>	<i>An. claviger</i>	5
	<i>An. hyrcanus</i>	2
	<i>An. maculipennis</i> -Komplex	37
	<i>An. plumbeus</i>	29
	<i>Anopheles</i> sp.	79
<i>Coquilleltidia</i>	<i>Cq. richiardii</i>	1725
<i>Culiseta</i>	<i>Cs. annulata</i>	1
<i>Culex</i>	<i>Cx. martinii</i>	44
	<i>Cx. modestus</i>	14

	<i>Cx. pipiens</i> -Komplex	752
	<i>Culex</i> sp.	32
<i>Ochlerotatus</i>	<i>Oc. caspius</i>	108
Vektorkompetenzstudie		
<i>Aedes</i>	<i>Ae. vexans</i>	75
<i>Anopheles</i>	<i>An. hyrcanus</i>	1
	<i>An. plumbeus</i>	1
	<i>Anopheles</i> . sp.	8
<i>Coquillettidia</i>	<i>Cq. richiardii</i>	139
<i>Culex</i>	<i>Cx. pipiens</i> -Komplex	67
<i>Ochlerotatus</i>	<i>Oc. caspius</i>	9

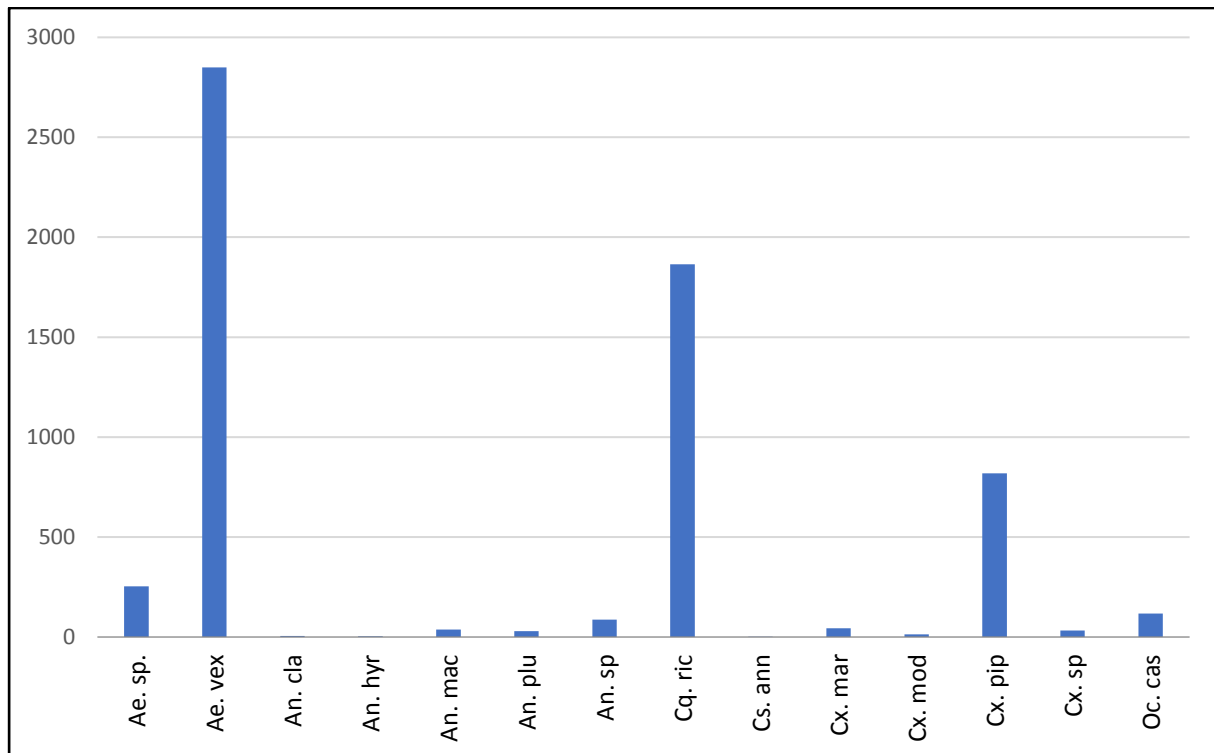


Abb. 4: Grafik zur Darstellung aller gesammelten Stechmückenspezies (*Aedes* sp. = Ae. sp., *Ae. vexans* = Ae. vex, *An. claviger* = An. cla, *An. hyrcanus* = An. hydr, *An. maculipennis*-Komplex = An. mac, *An. plumbeus* = An. plu, *Anopheles* sp. = An. sp, *Coquillettidia richiardii* = Cq. ric, *Culiseta annulata* = Cs. ann, *Culex martinii* = Cx. mar, *Cx. modestus* = Cx. mod, *Cx. pipiens*-Komplex = Cx. pip, *Culex* sp. = Cx. sp, *Ochlerotatus caspius* = Oc. cas)

4.2 Allgemeines Screening

Das Screening der gepoolten Stechmücken zeigte insgesamt wenige Banden nach erfolgter Gelelektrophorese. Positive PCR Produkte ergaben nach Sequenzanalysen exakt zwei positive Ergebnisse.

In einem Pool, bestehend aus zwei *Cx. modestus* Individuen, konnte *Plasmodium* sp. DNA nachgewiesen werden. Die Stechmücken wurden am 11.07.2015 mittels Aspiratoren gesammelt. Weiters wurde *Trypanosoma theileri* DNA in *Ae. vexans* detektiert. Der dafür untersuchte Pool beinhaltete eine Stechmücke. Die genannte Stechmücke wurde am 12.07.2015 durch eine CDC Falle eingefangen.

Das Screening auf DNA von filarioiden Helminthen und *F. tularensis* verlief negativ.

Tab. 18: Ergebnisse des allgemeinen Screenings

Pathogen	Vektor	Poolgröße	Fallentypus	Datum
aviäre Malaria				
<i>Plasmodium</i> sp.	<i>Cx. modestus</i>	2	ASP	11.07.2015
Trypanosomen				
<i>T. theileri</i>	<i>Ae. vexans</i>	1	CDC	12.07.2015

Teilsequenz von *Plasmodium* sp.

ATTATTCATATTCATACTTACCTTTATCATGGATATCAGGATTAATGATATTTTAAATTCTAGTT
ACAGCTTTTATGGGTTATGTATTACCTTGGGGTCAAATGAGTTTCTGGGGTGCAACTGTTA
TCACTAATTTATTATATTTTATCCCTGGACTTGTTTCATGGATTTGTGGTGGATATCTTGTA
GTGACCCAACTTTAAAAAGATTCTTTGTATTACATTTTACA

Sequenz von *T. theileri*

TGCGGTTTCCGCACATTGGATAACTTGGCGAAACGCCAAGCTAATACATGAACCAAAGG
GACGTTCTCTGTTCCGGCGGTGGGGCAACTCACTGTTCATGGGGCGTCCAGCGAATGAA
TGAAATTAACCAATGCCTTCACCGGCAGTAACACCCAGAAGTGTTGACTCAATTCATT
CCGTGCGAAAGCTGGATTTCTTATCCGGCGTCTTTTGACGAACAACTGCCCTATCAGCCA
GTGATGGCCGTGTAGTGGACTGCCATGGCGTTGACGGGAGCGGGGGATTAGGGTTCTGA
TTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAATAGCTACCACTTCTACGGAGGGCAGCAGGCGCGCA
AATTGCCCAATGTCAAAAAAAAAACGATGAGGCAGCGAAAAGAAATAGAGCCGACAGTGC
CTAGTGCATTGTCGTTTTCAATGGGGGATATTTAAACCCATCCAAAATCGAGTAACAATTG
GAGGACAAGTCTGGTGCCAGCACCCGCGGTAATTCCAGCTCCAAAAGCGTATATTAATG
CTGTTGCTGTAAAGGGTTCGTAGTTGAATTGAGGGCCTTTGAGGCGCAATGGTTTGTC
CCGTCCACCTCGGATTGGTGACCCATGCCCTTGAGGTCCGTGAACATTCAGAAACAAGA
AACACGGGAGCGGTTCCCTTCCTGATTTTCGCATGTCATGCCAGGGGGGCGTCCGT
GATTTTTACTGTGACTAAAAAGTGTGACCAAAGCAGTCATTGCACTTGAATTAGAAAGCA
TGGGATAACAAAGGAGCAGCCTATGGGGCCACCGTTTCGGCTTTTGTTGGTTTTAAAGT
CCATTGGAAGATTATGGCGTCGTGCGACAGGCGTCTGGGTGATTCCCCTTTTGGGGCGC

CCGGTCGCCTTTGCGGGAAAATCCGTGTCGGTGTTGAATGAGCTTCGGCCCCATCTCTG CGGGGGCCTTCCCGTGACTCA
--

4.3 Vektorkompetenzstudie

Die Vektorkompetenzstudie ergab einige interessante Ergebnisse. Es wurden Pathogene der Spezies *Dirofilaria repens*, *Setaria labiatopapillosa*, *Plasmodium relictum*, *Trypanosoma* sp. und *Paratrypanosoma* detektiert. Die dafür untersuchten Stechmücken wurden am 11. und 12.07.2015 mittels einer BGS Falle gefangen. Jedoch unterscheiden sich die Parasiten in der Lokalisation innerhalb des Vektors. Die Ergebnisse sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Das Screening auf DNA von *F. tularensis* verlief negativ.

Tab. 19: Ergebnisse der Vektorkompetenzstudie

Pathogen	Vektor	Lokalisation	Fallentypus	Datum
filarioide Helminthen				
<i>D. repens</i>	<i>Ae. vexans</i>	Abdomen	BGS	11.07.2015
<i>S. labiatopapillosa</i>	<i>Ae. vexans</i>	Kopf/Thorax	BGS	12.07.2015
aviäre Malaria				
<i>P. relictum</i>	<i>Cx. pipiens</i>	Kopf/Thorax	BGS	11.07.2015
<i>P. relictum</i>	<i>Cx. pipiens</i>	Kopf/Thorax	BGS	12.07.2015
Trypanosomen				
<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Cx. pipiens</i>	Abdomen	BGS	11.07.2015
<i>Paratrypanosoma</i>	<i>Cx. pipiens</i>	Abdomen	BGS	11.07.2015

Teilsequenz von *D. repens*

GAGATGGCGTTTCCTCGTGTTAATGCTTTGTCCTTTTGGTTTACTTTTGTTGCTTTGTTAAT
GGTTTATCAATCTTTTTTTATTGGTGGTGGACCTGGTAGTAGTTGAACTTTTATCCTCCTT
TAAGTGTTGATGGTCAACCTGAATTATCTTTGGATAGTATAATTTTGGGTTTACATACTGTA
GGTATTGGTTCTTTGTTGGGTGCTATTAATTTTATGGTTACTACTCAGAATATGCGTTCTAC
TGCTGTTACTTTAGATCAGATTAGTATGTTTGTTTGAACCTTCTTATTTGACTTCTTTTCTTTT
AGTTTTATCTGTTCCCTGTTTTAGCTGGTTCTTTGTTGTTTTTGTATTAGATCGTAATTTTAA
TACTTCTTTTTATGATACTAAAAAGGGGGGTAATCCTTTGTTGTATCAGCATTTGTTTTGATT
TTTTGGTCATCCTGAGGTTTATGTTATTATTTGCCTGTTTTTGGTATTATTAGTGAATGTGT
TTTGTTTTTGACTGATAAGGATCGT

Sequenz von *S. labiatopapillosa*

TAATTGGATATTGCCAGTAATGCTTGGTGCTCCTGAGATAGCGTTTCCTCGTGTTAATGCT
TTGTCTTTTTGATTTACTTTTGTGGCTTTGATTATGGTTTATCAATCTTTTTTTATTGGTGGA
GGTCCTGGTAGTAGTTGGACTCTTTATCCCCCTTTGAGAGTTGAGGGTCAGCCAGAGTT
ATCTCTTGATACTATAATTCTTGGTCTCCATACTGTTGGGATTGGTTCTTTGTTGGGTGCTA
TTAATTTTATAGTTACTACTCAGAATATGCGTTCTGTAGCTGTTACTTTGGACCAAGCTAGT
ATATTTGTTTGGACTATTTATTTAACTTCTTTTTTGTAGTTTTATCTGTTCCCTGTTTTAGCTG
GTTCTTTGTTATTTCTTTTGTGGATCGTAATTTAATACTTCATTTTATGATACTAGAAAGG
GTGGTAATCCATTATTGTATCAGCATTTGTTTTGGTTTTTGGTCATCCTGAGGTTTATGTT
ATTATTTTACCTGTTTTTGGTATTATTAGGGAAGCTGTTTTGTTTTTAACTGATAAGGATCGT
TTGTTTGGTCAGACTAGTATAACTTTTGCTTCTATTTGGATTGCTGTTTTGCAGGAAGGG

Sequenz von *P. relictum*

CAACTGGTGCTTCATTTGATTTATTTAACTTATTTACATATTTTAAAGAGGATTAAATTATTC
ATATTCATATTTACCTTTATCATGGATATCTGGATTAATAATATTTTAAATATCTATAGTAACAG
CTTTTATGGGTACGTATTACCTTGGGGTCAAATGAGTTTCTGGGGTGCTACCGTAATAAC
TAATTTATTATATTTTATACCTGGACTAGTTTCATGGATATGTGGTGGATATCTTGTAAGTGA
CCCAACCTTAAAAAGATTCTTTGTACTACATTTTACATTTCTTTTATAGCTTTATGTATTGTA
TTTATACATATATTCTTTCTACATTTACAAGGTAGCACAAATCCTTTAGGGTATGATACAGCT
TTAAAAATACCCTTCTATCCAAATCTTTTAAAGTCTTGATATTAAAGGATTTAATAATGTATTAG
TACTATTTTATAGCACAAAGTTTATTTGGAATACT

Sequenz von *Trypanosoma* sp.

TGCGCAAATATTGCGGTTTCCGCAACATTGGATAACTTGGCGAAACGCCAAGCTAATACA
TGAACCAAAGGGACGCTCTCTGTTCCGGCGGTGGGGCAACTCACCGCCATGGGACGTC
CAGCGAATGAATGAAAGTAAAATCAATGCCTTAACCGGCAGTAACACCCAGAAGTGTTGA
CTCAATTCATTCCGTGCGAAAGCCGGGTTTTACCCGGCGTCTTTTGACGAACAACTGCC
CTATCAGCCAGTGATGGCCGTGTAGTGGACTGCCATGGCGTTGACGGGAGCGGGGGAT
TAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAATAGCTACCACTTCTACGGAGGGCAGC
AGGCGCGCAAATTGCCCAATGTCAAAAAAAAAACGATGAGGCAGCGAAAAGAAATAGAGC
CGACGGTGCCTAGTGCAATTGTCGTATTCAATGGGGGATATTTAAACCCATCCAAAATCGA
GTAACAATTGGAGGACAAGTCTGGTGCCAGCACCCGCGGTAATTCCAGCTCCAAAAGCG
TATATNAATGCTGTTGCTGTTAAAGGGTTCGTAGTTGAATTGAGGGCCTTTGAGGCGCAA
TGGTTTGTCCCGTCCACTTCGGATTGGTGACCCATGCCCTTGAGGTCCGTGAACACTCA
GAAACAAGAAACACGGGAGTGGTACCTTTCCTGATTACGCATGTCATGCATGCCAGGG
GGCGCCCGTGATTTTTACTGTGACTAAAAAGTGTGACCAAAGCAGTCATTGACTTGAA
TTAGAAAGCATGGGATAACAAAGGAGCAGCCTATGGGCCACCGTTTTCGGCTTTTGTTGG
TTTTAAAGTCCATTGGAGATTATGGGGCTGTGCGACAAGCGGCTGGGTGTATTCCCCTT
TACTGGGGGCACCCGTCGCCTTTGTGAGAAATCCGTGGCGTTAATTGTATAGGCTTCGG
TTTATCAATTCGTCGCCTTCTCGCAACTCGCGGCATCCAGGAATGAAGGAGGGTAGTTC
GGGGGAGAACGTACTGGTTGCGTCGAAGGTGAAATTCTTAGACCGCACCAAGACGAAC
TACAGCGAAGGCATTCTTCAGGGATACCTTCCTCAATCAAGAACCAAAGTGTGGGGGAT
CGAAGATGATANAAGACCATTGGTAGTCCACCCTGCCAACCAATGACCCCATGGATTGG
GGGAGTTTTTGGGCCGTAGGCAAGGACCGGTTCCATCCCCCTCCTTGTGTGCGCAAAG
TTAATACAATTT

Sequenz von *Paratrypanosoma*

CGGTTTCGCGTAATTGGATACCTTGGCGAAAAGCCAAGCTAATACATGAACCAACCGGAT
GCCTTCCTGTCAACCCCGGGCGTCGTTTAGCGTGTTTGGTCACGCGGCGGCGTTTCGGG
TGGAAGCGTCCAGCGAATGAATGAAAGTAAACCAATGCCGCGAACGCGGCAGTAACAC
GAGCAGTGTTGAATCAATTCATTCCGTGCGTAAGCTGACTTGTTTCAGCGTCTTTTGACG
AACAACTGCCCTATCAGCCAATGATGGCCGTGTAGTGGACTGCCATGGCGTTGACGGGA
GCGGGGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAATAGCTACCACTTCTACG
GGAGGCAGCAGGCGCGCAAATTGCCCAATGTCAAAACAAAACGATGAGGCAGCGAAAA
GAAATAGAGCCGCCAGTCCCCTTTAAATGGATTGGCGGTCACAATGGGGGATATTTAAAC
CCATCCAATATCGAGTATCAATTGGAGGACAAGTCTGGTGCCAGCACCCGCGGTAATTCC
AGCTCCAAAAGCGTATATTAACGCTGTTGCTGTTAAAGGGTTCGTAGTTGAATTGTGGGC

```
CGTTCGAGATGATCCTGGCTAGGTCCCGTCTATTCCTGACCTTGGTGACCCCAGCGCTC
GCGGCTCGTGAACACATCCAAGAAACAAAAACACGGGAGTGGTTCCTTTCCTGACTCA
CGCATGTCATGCATGCCAGGGGGCGCCCGTGATTTTTTACTGTGACTAAAGAAGTGCGA
CCAAAGCAGTCCGTTTCGACTTGAATTAGAAAGCATGGGATAACAATGAAGCAACCTATGG
TACTACCGTTTCGGCTTTTGTGGTTTTAAAGTCTGTGGGGAGATTATGGGGCTGTGCG
ACCAGCGTGGGGGGGGGGGGCCTCGCGGCCTCTTCGCCGCGCCTTCGGGGTTGGTTT
CTCTTCCTTTCGGGCGGGCCTTCCTCGAACTCACGGCATCCAG
```

4.4 Etablierung einer neuen qPCR für die Detektion von *D. repens*, *D. immitis* und *A. reconditum*

Nach dem Durchlaufen der variierenden Protokolle war es nicht möglich, zugleich *D. repens*, *D. immitis* und *A. reconditum* zu detektieren. Aufgrund dieser Tatsache wurden zwei verschiedene qPCR Verfahren erarbeitet.

Im ersten Schritt (1) wird zwischen Dirofilarien allgemein und *A. reconditum* unterschieden. Sind in diesem ersten Verfahren positive Ergebnisse für Dirofilarien zu sehen, wird im zweiten Durchgang (2) zwischen *D. repens* und *D. immitis* differenziert.

Tab. 20: Zusammensetzung des Mastermixes für qPCR (1)

Reagenz	Menge/Reaktion
destilliertes Wasser	6,00 µl
SsoAdvanced™ Universal Probes Supermix (Bio-Rad)	10,00 µl
Sonde D. immitis-P_Silbermayr_2016 (10 pmol/µl)	0,50 µl
Sonde A. reconditum-P_Silbermayr_2016 (10 pmol/µl)	0,50 µl
F5-F_Wongkamchai_2014 (10 pmol/µl)	0,50 µl
R5-R_Wongkamchai_2014 (10 pmol/µl)	0,50 µl
DNA	2,00 µl
Gesamtmenge	20,00 µl

Tab. 21: Temperaturprofil für qPCR (1)

95°C	5 min		initial Denaturation
95°C	20 sec	45x	Denaturation
59°C	1 min		Annealing
72°C	1 min		Elongation
95°C	1 min		
59°C	30 sec		Melting Curve
95°C	30 sec		

Tab. 22: Zusammensetzung des Mastermixes für qPCR (2)

Reagenz	Menge/Reaktion
destilliertes Wasser	6,00 µl
SsoAdvanced™ Universal Probes Supermix (Bio-Rad)	10,00 µl
Sonde D. immitis-P_NEU_Silbermayr_2016 (10 pmol/µl)	0,50 µl
Sonde D. repens-P_NEU_Silbermayr_2016 (10 pmol/µl)	0,50 µl
F5-F_Wongkamchai_2014 (10 pmol/µl)	0,50 µl
R5-R_Wongkamchai_2014 (10 pmol/µl)	0,50 µl
DNA	2,00 µl
Gesamtmenge	20,00 µl

Tab. 23: Temperaturprofil für qPCR (2)

95°C	5 min		initial Denaturation
95°C	20 sec	45x	Denaturation
63°C	1 min		Annealing
72°C	1 min		Elongation
95°C	1 min		
63°C	30 sec		Melting Curve
95°C	30 sec		

Nach Berechnen der Ct-Werte ergeben sich folgende Mittelwerte für das jeweilige Pathogen:

- *D. repens*: 28,33
- *D. immitis*: 23,43
- *A. reconditum*: 29,12

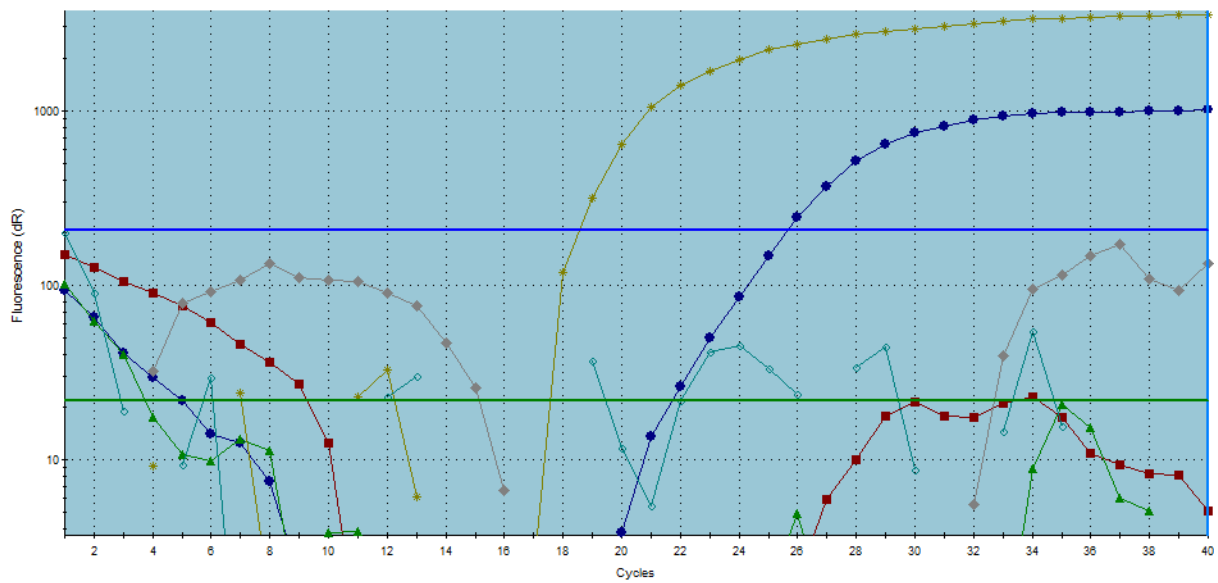


Abb. 5: Kurven von *D. immitis* (gelb) und *D. repens* (blau)

5 Diskussion

5.1 Stechmücken im Donaudelta/Rumänien

Innerhalb dieser Arbeit wurden über 6,000 Stechmücken auf verschiedene Pathogene untersucht, wobei die Mehrheit den Gattungen *Aedes* und *Coquilleltidia*, gefolgt von *Culex*, angehören. Die Quantität an *Coquilleltidia* im Donaudelta ist nicht überraschend, verglichen mit einer aktuellen Studie, in der 75% der gesammelten Stechmücken dieser Gattung angehören (Török et al., 2016). In besagter Publikation wurden außerdem zum ersten Mal *Anopheles algeriensis* und *Aedes hungaricus* in Rumänien nachgewiesen. Zu diesem Zeitpunkt scheint es keine weiteren Hinweise für das Auftreten anderer neuer Vektoren zu geben.

Das Vorkommen und die Verbreitung von Arthropodenvektoren und damit assoziierten Pathogenen sind jedoch von vielen Faktoren abhängig. Dafür werden im Allgemeinen drei Aspekte zusammengefasst (Beugnet et al., 2013):

- Vektorkompetenz: Möglichkeit zur Vervollendung des Lebenszyklus des Pathogens im Vektor und folglich die Transmission
- klimatische Bedingungen: einerseits günstige Bedingungen für die Entwicklung des Pathogens und andererseits für den Lebenszyklus und Vorkommen des Vektors
- Präsenz von Pathogen und mindestens einem Reservoir

Das Thema klimatische Bedingungen und Veränderungen stellt womöglich eines der kritischsten Faktoren dar. Globale Klimaerwärmung wird durch interkontinentalen Transport, Tourismus und Reisen vor allem mit Haustieren und Abholzung der Wälder gefördert (Harrus et al., 2005). Mit steigenden Temperaturen eröffnen sich sowohl den Vektoren als auch den Pathogenen Zugang zu nicht endemischen Gebieten. Sind die Bedingungen günstig für die Etablierung einer Spezies, ist es nur eine Frage der Zeit bis sich diese tatsächlich ausbreitet. In den vergangenen 100 Jahren gab es einen Anstieg der weltweiten Durchschnittstemperatur von 0,74°C (Semenza et al., 2009). Dies zeichnet sich auf der nördlichen Hemisphäre sowohl durch milde Winter, weniger kalte Tage, als auch durch den Anstieg des Niederschlags aus. Im Mittelmeerraum hingegen treten häufigere Trockenperioden während der Sommermonate auf.

Zu den invasiven Vektoren zählen unter anderem *Ae. albopictus*. Diese Spezies wurde bereits in mehr als 25 europäischen Ländern nachgewiesen (Vonesch et al., 2016). Stechmücken

scheinen sehr anfällig für klimatische Veränderungen und den damit verbundenen Konsequenzen zu sein. Sie sind wahrscheinlich am empfänglichsten für globale Klimaveränderungen, da sie von Verfügbarkeit und Qualität des Wassers abhängig sind. Die Entwicklung und somit auch die Verbreitung sind durch solche Abweichungen definiert.

Auch filarioide Helminthen wie Dirofilarien sind auf dem Vormarsch in nicht endemische Gebiete. Ein Vorhersagemodell beschreibt, dass aktuelle Temperaturen im Sommer ausreichend sind, damit sich diese Nematoden in weiten Teilen Europas prinzipiell etablieren können. Andere wichtige Faktoren für die Verbreitung von Dirofilarien sind durch folgende Aspekte charakterisiert (Genchi et al., 2009):

- Anstieg in der Prävalenz in endemischen Gebieten
- Entwicklung von nicht endemischen Regionen in endemische
- Miteinbeziehung von *Ae. albopictus* als potenziellen, kompetenten Vektor, der sich in den Norden Europas verbreiten könnte

5.2 Allgemeines Screening

Für die DNA Isolierung wurden für das allgemeine Screening und die Vektorkompetenzstudie jeweils verschiedene Kits verwendet. In der Praxis wurde mit dem Kit von Analytik Jena AG für das allgemeine Screening begonnen. Parallel arbeitete eine Kollegin mit dem Kit von Zymo Research, wobei sich bei der Gelelektrophorese schönere und eine höhere Anzahl von Banden, verglichen mit den Proben extrahiert durch den Kit von Analytik Jena AG, zeigten. Aus diesem Grund wurde für die Vektorkompetenzstudie auf das Kit von Zymo Research gewechselt.

Das Screening der gepoolten Stechmücken ergab keine positiven Ergebnisse für filarioide Helminthen. Dies ist vermutlich darauf zurück zu führen, dass das Sammeln der Proben in einem sehr kurzen Zeitfenster stattgefunden hat. Das allgemeine Screening auf aviäre Malaria zeigte ein positives Ergebnis für *Plasmodium* sp. Die DNA des Erregers wurde in *Cx. modestus* nachgewiesen. Während der Sequenzanalyse war keine genauere Spezifizierung möglich.

Außerdem wurde keine bakterielle DNA von *F. tularensis* detektiert. Studien zeigen, dass für die Transmission von *F. tularensis* Bremsen, Stechmücken und Zecken am bedeutendsten sind. Als natürlich infizierte Vektoren unter den Stechmücken zählen die beiden Spezies *Ae. cinereus* und *Oc. excrucians*. Auch Larven könnten durch kontaminiertes Wasser infiziert werden, dennoch gibt es zu dieser Annahme nicht genügend Information (Petersen et al., 2009).

Tatsächlich jedoch tragen Bremsen und Moskitos nur einen kleinen Teil zur Verbreitung bei (Brown et al., 2005). Die Übertragung durch diese Arthropoden erfolgt mechanisch durch kontaminierte Mundwerkzeuge. Aufgrund dessen spielen Stechmücken und Bremsen nur eine kleine Rolle als natürliches Reservoir, da weder die Vermehrung in den Stechmücken selbst, noch die Bakterien in den Eiern von Stechmücken vorzufinden sind (Philip et al., 1932). Stechmücken machen somit nur einen geringen Teil der Vektoren aus und spielen nur eine geringfügige Rolle in der Verbreitung und im Vorkommen von *F. tularensis*. Daraus folgend ist es nicht überraschend, dass keine bakterielle DNA nachgewiesen wurde.

Zudem wurde im allgemeinen Screening der gepoolten Stechmücken *Trypanosoma theileri*-like DNA in *Ae. vexans* nachgewiesen. *T. theileri* ist ein Parasit der Untergattung *Megatrypanum*, der hauptsächlich Rinder befällt (Hoare 1972). Im Normalfall verläuft eine Infektion mit *T. theileri* unauffällig, da der Erreger als nicht pathogen gilt. Kommt es dennoch zu klinischen Symptomen, wird dies meist durch Coinfektionen mit *Babesia*, *Theileria* und *Anaplasma* oder anderen Faktoren wie Stress, Mangelernährung und Trächtigkeit verursacht (Braun et al., 2002; Sood et al., 2011, Wells 1976). Die Verbreitung von *T. theileri* erstreckt sich über weite Teile der Erde, wobei die Prävalenz sehr unterschiedlich ist (Hoare 1972; Wells 1976). In Europa wurde der Parasit bereits in Irland, Belgien, Italien und Spanien nachgewiesen (Doherty et al., 1993; Greco et al., 2000; Verloo et al., 2000; Villa et al., 2008). Auch in Australien, Amerika und Asien gibt es Belege für das Auftreten dieser Trypanosomenspezies (Farrar et al., 1990; Lee et al., 2010; Thompson et al., 2014). Zu den Vektoren, die *T. theileri* übertragen, gehören großteils Bremsen und Zecken (Böse et al., 1993; Latif et al., 2004). Zu diesem Zeitpunkt gibt es keine Hinweise darauf, dass Stechmücken *T. theileri* übertragen können. Die Literatur bietet diesbezüglich Informationen dazu, dass Stechmücken der Gattung *Culex* bloß aviäre Trypanosomen übertragen (Svobodová et al., 2015).

5.3 Vektorkompetenzstudie

Die Vektorkompetenzstudie erbrachte bezüglich der filarioiden Helminthen überraschende Ergebnisse. In *Ae. vexans* wurde jeweils *D. repens* und *Setaria labiatopapillosa* DNA identifiziert. Das interessante dabei ist, dass *D. repens* im Abdomen und *S. labiatopapillosa* im Kopf/Thorax der Stechmücken lokalisiert waren. Somit weist *Ae. vexans* potenzielle Vektorkompetenz für diese Setariaspezies auf.

S. labiatopapillosa ist eine Nematode, die üblicherweise in der Bauchhöhle von Rindern und anderen Huftieren, wie Büffeln, vorkommt. Der adulte Wurm zählt als nicht pathogen, wobei

das Larvenstadium L3 durch Stechmücken übertragen und als infektiös bezeichnet wird (Pietrobelli et al., 1998). In Fehlwirten wie Schafen, Ziegen oder Pferden kann die Nematode den Lebenszyklus nicht vollenden, wodurch die unreife L3 entlang des zentralen Nervensystems des Fehlwirtes wandert und cerebrospinale Setariose verursacht (Wijesundera et al., 1996). Das Vorkommen von *S. labiatopapillosa* wird als weltweit beschrieben, wobei die Prävalenz eher niedrig zu sein scheint (Becklund et al., 1969; Khedri et al., 2014; Ndao et al., 1995; Pietrobelli et al., 1998).

Im Jahre 1999 wurde erstmals von humanen Krankheitsfällen durch *S. labiatopapillosa* berichtet. Es handelte sich dabei um vier Frauen in Rumänien, die jeweils unter subkonjunktiver Augenentzündung litten. Die Symptome bestanden aus Photophobie, Schwellungen des Auges und Fremdkörpergefühl. Die Patienten kamen alle aus derselben Gegend, die für große Ansammlungen an Stechmücken bekannt war. Die hierfür verantwortlichen Vektoren konnten jedoch nicht nachgewiesen werden. Nach chirurgischer Entfernung der Nematoden wurde bestätigt, dass es sich um *S. labiatopapillosa* handelte. Diese Publikation zeigt somit, dass *S. labiatopapillosa* ebenfalls ein Zoonoseerreger ist (Panaitescu et al., 1999).

Bezüglich potenzieller Vektoren von *S. labiatopapillosa* gibt es kaum Studien. Pietrobelli beschrieb die larvale Entwicklung der Nematode in *Aedes caspius* (Pietrobelli et al., 1998). 1997 wurde an einer Vektorkompetenzstudie gearbeitet, wobei Stechmücken in der Nähe eines infizierten Rindes gesammelt, identifiziert und auf Nematoden untersucht wurden. Es stellte sich heraus, dass die Mehrheit zu *Cx. pipiens* gehörte, diese aber nur sehr wenige Mikrofilarien von *S. labiatopapillosa* aufnahmen. In Relation dazu gab es auch einen großen Teil an Stechmücken der Gattung *Aedes* (im Detail *Ae. caspius* und *Ae. vexans*), die hingegen hohe Infektionsraten vorwiesen. Die Autoren bekräftigten daher die Annahme, dass Stechmücken der Gattung *Aedes* effizientere Vektoren für *S. labiatopapillosa* darstellen, als jene anderer Gattungen (Cancrini et al., 1997).

Aufgrund der Tatsache, dass in dieser Arbeit *S. labiatopapillosa* ebenfalls in *Ae. vexans* und sogar im Kopf/Thorax identifiziert wurde, bestärkt die These, dass diese Stechmückenspezies sehr wahrscheinlich einen kompetenten Vektor darstellt.

Stechmücken der Gattung *Aedes* zählen unter anderem zu den kompetenten Vektoren, die *D. repens* übertragen können. Obwohl in dieser Arbeit die Nematode im Abdomen identifiziert wurde, wird durch bereits durchgeführte Studien die potenzielle Vektorkompetenz nicht ausgeschlossen (Bocková et al., 2013; Rudolf et al., 2014). Ein möglicher Grund dafür, warum die Nematoden DNA im Abdomen und nicht in Kopf/Thorax nachgewiesen wurde, ist, dass die Blutmahlzeit am infizierten Hund sehr frisch war. Somit befanden sich die Mikrofilarien noch nicht im L3 Stadium und waren im Abdomen lokalisiert.

Die Vektorkompetenzstudie erbrachte bezüglich aviärer Malaria zwei positive Ergebnisse für *P. relictum*. Beide Proben wurden jeweils in *Cx. pipiens* f. *pipiens* erstmalig in Kopf/Thorax identifiziert. Somit gilt diese Stechmückenspezies als potenzieller Vektor für aviäre Malaria.

Andere Publikationen bestätigen diese Annahme. Die komplette Sporogonie von *P. relictum* wurde durch Valkiunas et al. in *Cx. pipiens* f. *molestus* und *Cx. quinquefasciatus* beobachtet und beschrieben (Valkiunas et al., 2015). Weiters wird dies durch epidemiologische und experimentelle Studien bekräftigt, dass Stechmücken der Gattung *Culex* als kompetenteste Vektoren bezeichnet werden (Pigeault et al., 2012; Ventim et al., 2012; Zittra et al., 2015). Vektoren der Gattung *Aedes* werden hingegen nur als weniger bedeutend für die Übertragung von aviärer Malaria beschrieben (Kimura et al., 2010; Santiago-Alarcon et al., 2012).

Die Vektorkompetenzstudie zeigt ebenfalls keine positiven Ergebnisse für *F. tularensis*. Mögliche Ursachen wurden bereits im vorherigen Kapitel besprochen.

Weiters wurden *Trypanosoma* sp. und *Paratrypanosoma* DNA identifiziert. Während der Sequenzanalyse war es nicht möglich, eine genauere Spezifizierung zu erzielen. Beide Erreger wurden jeweils in *Cx. pipiens* nachgewiesen, jedoch traten diese im Abdomen der Stechmücken auf.

Erste Hinweise auf eine neue Klade innerhalb der Trypanosomatida gab es bereits 2006, wobei zufällig neue Sequenzen erarbeitet wurden, die sich von jener in der Datenbank unterschieden (Van Dyken et al., 2006). *Paratrypanosoma* werden als der „missing link“ zwischen freilebenden *Bodonidae* und parasitären Trypanosomen bezeichnet. 2013 wurde durch Flegontov et al. *Paratrypanosoma confusum* zum ersten Mal beschrieben. *P. confusum* besitzt eine längliche, promastigote Form, wobei die Kinetoplast DNA (kDNA) in einer einzelnen, dichten Scheibe komprimiert ist. Die kDNA ist im kanonischen Bereich an der Basis des Flagellums lokalisiert. Die Größe der kDNA wird auf zirka 0,8 kb geschätzt. Außerdem wurde durch verschiedene statistische Methoden bewiesen, dass *P. confusum* sich deutlich von allen anderen Trypanosomen Kladen unterscheidet und somit den fundamentalsten Teil in der Phylogenie dieser Einzeller bildet (Flegontov et al., 2013).

In der bereits erwähnten Studie wurde *P. confusum* aus dem Mitteldarm von *Cx. pipiens* und *Cx. modestus* isoliert und kultiviert. In dieser Arbeit wurde ebenfalls *Paratrypanosoma* DNA, ohne weitere Spezifizierung, im Abdomen von *Cx. pipiens* identifiziert. Folglich zeigt sich, dass Stechmücken der Gattung *Culex* als potenzielles Reservoir für diese neuen Trypanosomatiden dienen können, jedoch sind sie als Vektoren für die Transmission durch die Lokalisation im Abdomen nicht adäquat.

5.4 Etablierung einer neuen qPCR für die Detektion von *D. repens*, *D. immitis* und *A. reconditum*

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene qPCR assays ausgearbeitet. Dadurch ist einerseits die Differenzierung zwischen Dirofilarien allgemein und *A. reconditum* und andererseits die spezifizierte Unterscheidung zwischen *D. repens* und *D. immitis* möglich. Erstaunlich war, dass sogar die DNA Menge von nur einer Mikrofilarie erfasst werden konnte. Aus diesem Grunde stellt diese qPCR ein potenzielles wichtiges diagnostisches Tool für die Zukunft dar.

Für die exakte Quantifizierung des jeweiligen Pathogens sind jedoch noch einige Schritte abzuarbeiten. Eine Möglichkeit ist, Verdünnungsreihen herzustellen und über die Standardkurve die Pathogene zu quantifizieren. Dies ist auch über ein „NanoDrop“ möglich.

6 Zusammenfassung

Stechmücken sind neben Zecken einer der wichtigsten Vektoren, wenn es um die Verbreitung verschiedenster Pathogene geht. Diese sind sowohl in der Human-, als auch in der Veterinärmedizin äußerst relevant. Dazu zählen vor allem Viren (West Nile Virus), Nematoden (Dirofilarien) und auch Protozoen (*Plasmodium*). Durch die zunehmende Globalisierung besitzen sowohl die Vektoren als auch die damit verbundenen Pathogenen die Möglichkeit, in nicht endemische Gebiete vorzudringen und sich zu etablieren. Zu den Mechanismen, die dies ermöglichen, gehören der globale Transport von Gütern, ansteigender Tourismus (auch mit Haustieren) und insbesondere die Klimaerwärmung. Mit steigenden Temperaturen erschließen sich den Vektoren Regionen, die von ihnen zuvor noch nicht besiedelt wurden. Aus all diesen Gründen ist es daher wichtig, Informationen über potenziell invasive Vektoren und Pathogenen zu sammeln. Weiter ist es von großer Bedeutung, auch die aktuelle Diversität an Parasiten und Stechmücken in einem bestimmten Gebiet zu erfassen. In dieser Arbeit wurden insgesamt über 6,000 Stechmücken gesammelt und auf filarioide Helminthen, aviäre Malaria, *Francisella tularensis* und Trypanosomen untersucht. Der erste Teil setzt sich aus einem allgemeinen Screening zusammen, in dem gepoolte Stechmücken analysiert wurden. Der zweite Teil bestand aus einer Vektorkompetenzstudie, in der Kopf/Thorax und Abdomen der Stechmücken einzeln und separat voneinander gescreent wurden. Im dritten Teil wurden zwei neue qPCR Verfahren etabliert, mit der zwischen Dirofilarien allgemein und *A. reconditum* und weiters zwischen *D. repens* und *D. immitis* spezifisch differenziert werden konnte. Sowohl das Screening, als auch die Vektorkompetenzstudie brachten interessante Ergebnisse hervor. Dazu zählen die Identifizierung von *D. repens*, *S. labiatopapillosa*, *Plasmodium* sp., *P. relictum*, *T. theileri*, *Trypanosoma* sp. und *Paratrypanosoma*. Das Screening auf *F. tularensis* verlief negativ. Außerdem wurde die Basis für zwei neue qPCR Verfahren gelegt. In Zukunft sind diesbezüglich aber ein paar Schritte noch ausständig.

7 **Abstract**

Beside ticks, mosquitoes are one of the most important vectors when it comes to spreading various pathogens. These are extremely relevant in both human and veterinary medicine. These include, in particular, viruses (West Nile virus), nematodes (*Dirofilaria*) and also protozoa (*Plasmodium*). Due to increasing globalization, both the vectors and the associated pathogens have the potential to expand and establish themselves in non-endemic regions. The mechanisms that make this possible include the global transport of goods, increasing tourism (including domestic animals), and in particular, climate warming. With increasing temperatures, there is a higher chance of vectors to colonize regions, which have not been there before. For all these reasons, it is therefore important to collect information about potentially invasive vectors and pathogens. Furthermore, it is of great importance to capture the current diversity of parasites and mosquitoes in a given area. In this study, a total of more than 6,000 mosquitoes were collected and tested for filarioid helminths, avian *Plasmodium*, *Francisella tularensis* and trypanosomes. The first part consisted of a general screening in which pooled mosquitoes were analyzed. The second part comprises a vector competence study in which the head/thorax and abdomen of the mosquitoes were screened and analyzed separately. In the third part, two new qPCR procedures were established. Within these procedures it is possible to specifically differentiate between filarioid helminths and *A. reconditum*, and also between *D. repens* and *D. immitis*. Both the screening and the vector competence study produced interesting results. These include the identification of *D. repens*, *S. labiatopapillosa*, *Plasmodium* sp., *P. relictum*, *T. theileri*, *Trypanosoma* sp. and *Paratrypanosoma*. The screening for *F. tularensis* was negative. In addition, the basis for two new qPCR procedures was provided. In the future, however, a few steps are still necessary.

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Skizze zum allgemeinen Aufbau einer weiblichen Stechmücke (Becker et al., 2010).	4
Abb. 2: Lebenszyklus von <i>D. repens</i> / <i>D. immitis</i> (Simón et al., 2012).....	8
Abb. 3: Überblick Rumänien mit Sammelstandorten (▲) (www.weltkarte.com/europa/rumaenien/physische-karte-rumaenien.htm).....	16
Abb. 4: Grafik zur Darstellung aller gesammelten Stechmückenspezies.....	34
Abb. 5: Kurven von <i>D. immitis</i> (gelb) und <i>D. repens</i> (blau).....	42

9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zusammensetzung des Mastermixes für den Nachweis von <i>Filaroidea</i>	18
Tab. 2: Temperaturprofil zur Amplifikation von <i>Filaroidea</i>	19
Tab. 3: Zusammensetzung des nest 1 Mastermixes für den Nachweis von <i>Plasmodiidae</i>	20
Tab. 4: Zusammensetzung des nest 2 Mastermixes für den Nachweis von <i>Plasmodiidae</i>	20
Tab. 5: Temperaturprofil zur Amplifikation von <i>Plasmodiidae</i>	21
Tab. 6: Zusammensetzung des Mastermixes zum Nachweis von <i>Francisella tularensis</i>	22
Tab. 7.: Temperaturprofil zur Amplifikation von <i>Francisella tularensis</i>	22
Tab. 8: Zusammensetzung des nest 1 Mastermixes für den Nachweis von Trypanosomatidae.....	23
Tab. 9: Zusammensetzung des nest 2 Mastermixes für den Nachweis von Trypanosomatidae.....	24
Tab. 10: Temperaturprofil zur Amplifikation von Trypanosomatidae.....	24
Tab. 11: Zusammensetzung des Mastermixes für den Primer Test.....	26
Tab. 12: Temperaturprofil für den Primertest.....	26
Tab. 13: Zusammensetzung des Mastermixes für die Testung der Sonden.....	27
Tab. 14: Temperaturprofil für die Testung der Sonden.....	28
Tab. 15: Zusammensetzung der Ligation.....	29
Tab. 16: Zusammensetzung des Mastermixes für 12 Proben für den Testverdau.....	31
Tab.: 17: Auflistung der gesammelten Stechmückenspezies.....	32
Tab. 18: Ergebnisse des allgemeinen Screenings.....	35
Tab. 19: Ergebnisse der Vektorkompetenzstudie.....	36
Tab. 20: Zusammensetzung des Mastermixes für qPCR (1).....	40
Tab. 21: Temperaturprofil für qPCR (1)).....	41
Tab. 22: Zusammensetzung des Mastermixes für qPCR (2).....	41
Tab. 23: Temperaturprofil für qPCR (2)).....	42

10 Literaturverzeichnis

- Al-Dabagh M.A. (1966): Mechanisms of Death and Tissue Injury in Malaria. Shafik Press. Baghdad.
- Argy N., Sabou M., Billing A., Hermsdorff C., Candolfi E., Abou-Bacar A. (2011): A First Human Case of Ocular Dirofilariosis due to *Dirofilaria repens* in Northeastern France. Journal of Tropical Medicine. 2011: 698647.
- Aspöck H. (2010): Krank durch Arthropoden: Gliederfüßer als Erreger und Überträger von Krankheiten des Menschen. Grundlagen und Überblick. Land Oberösterreich, Biologiezentrum - Oberösterreichische Landesmuseen.
- Aspöck H., Walochnik J. (2014): Durch blutsaugende Insekten und Zecken übertragene Krankheitserreger des Menschen in Mitteleuropa aus der Sicht von Klimawandel und Globalisierung Inhaltsverzeichnis: Vortrag SIEEC, 14, 61–98.
- Auer H., Susani M. (2008): Der erste autochthone Fall einer subkutanen Dirofilariose in Österreich. Wiener Klinische Wochenschrift. 120: 104-106.
- Barker E.N., Tasker S., Day M.J., Warman S.M., Woolley K., Birtles R., Georges K.C., Ezeokoli C.D., Newaj-Fyzul A., Campbell M.D., Sparagano O. A. E., Cleaveland S., Helps C.R. (2010): Development and use of real-time PCR to detect and quantify *Mycoplasma haemocanis* and "*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*" in dogs. Veterinary Microbiology. 140: 167–170.
- Becker N., Petrić D., Zgomba M., Boase C., Madon M., Dahl C., Kaiser A., (2010): Mosquitoes and their control. 2nd edition Heidelberg: Springer, Boisvert.
- Becklund W.W., Walker M.L. (1969): Taxonomy, hosts, and geographic distribution of the Setaria (Nematoda: Filarioidea) in the United States and Canada. The Journal of Parasitology. 55: 359-368.
- Bennett G.F., Bishop M.A., Peirce M.A. (1993): Checklist of the avian species of Plasmodium Marchiafava & Celli, 1885 (Apicomplexa) and their distribution by avian family and Wallacean life zones. Systematic Parasitology. 26: 171.
- Bensch S., Hellgren O., Pérez-Tris J. (2009): MalAvi: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome b lineages. Molecular Ecology Resources. 9: 1353-1358.

Beugnet F., Chalvet-Monfray K. (2013): Impact of climate change in the epidemiology of vector-borne diseases in domestic carnivores. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 36: 559-566.

Bichet C., Sorci G., Robert A., Julliard R., Lendvai A.Z., Chastel O., Garnier S., Loiseau C. (2014): Epidemiology of *Plasmodium relictum* infection in the house sparrow. *The Journal of Parasitology*. 100: 59-65.

Bocková E., Rudolf I., Kočišová A., Betášová L., Venclíková K., Mendel J., Hubálek Z. (2013): *Dirofilaria repens* microfilariae in *Aedes vexans* mosquitoes in Slovakia. *Parasitology Research*. 112: 3465-3470.

Böse R., Heister N. C. (1993). Development of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* in tabanids. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. 40: 788–792.

Braun U., Rogg E., Walser M., Nehrbass D., Guscelli F., Mathis A., Deplazes P. (2002): *Trypanosoma theileri* in the cerebrospinal fluid and brain of a heifer with suppurative meningoencephalitis. *The Veterinary Record*. 150: 18-19.

Brown R.N., Lane R.S., Dennis D.T. (2005): Geographic distribution of tick-borne diseases and their vectors, in: Goodman J.L., Dennis D.T., Sonenshine D.E. (Eds.), *Tick-borne diseases of humans*, ASM Press, Washington, USA. 363–391.

Calvert C.A., Rawlings C.A. (1985): Pulmonary manifestation of heartworm disease. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*. 15: 991–1009.

Cancrini G., Pietrobelli M., Frangipane Di Regalbono A., Tampieri M.P. (1997): Mosquitoes as vectors of *Setaria labiatopapillosa*. *International Journal for Parasitology*. 27: 1061-1064.

Cielecka D., Żarnowska-Prymek H., Masny A., Salamatin R., Wesołowska M., Gołąb E. (2012): Human dirofilariosis in Poland: the first cases of autochthonous infections with *Dirofilaria repens*. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 3: 445-450.

Ciucă L., Musella V., Miron L.D., Maurelli M.P., Cringoli G., Bosco A., Rinaldi L. (2016): Geographic distribution of canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in stray dogs of eastern Romania. *Geospatial Health*. 11: 499.

Das D., Das K., Islam S., Bhattacharjee K., Bhattacharjee H., Das S. M., Deka, A. (2015): A rare case of anterior chamber dirofilariasis. *Oman Journal of Ophthalmology*, 8: 50–53.

Diakou A., Kapantaidakis E., Tamvakis A., Giannakis V., Strus N. (2016): *Dirofilaria* infections in dogs in different areas of Greece. *Parasites and Vectors*. 9: 508.

- Dillon A.R., Warner A.E., Brawner W., Hudson J., Tillson M. (2008): Activity of pulmonary intravascular macrophages in cats and dogs with and without adult *Dirofilaria immitis*. *Veterinary Parasitology*. 158: 171–176.
- Doherty M. L., Windle H., Voorheis H. P., Larkin H., Casey M., Clery D., Murray, M. (1993): Clinical disease associated with *Trypanosoma theileri* infections in a calf in Ireland. *The Veterinary Record*. 26: 653–656.
- Eliasson H., Lindbäck J., Nuorti J.P., Arneborn M., Giesecke J., Tegnell A.(2002): The 2000 tularemia outbreak: a case-control study of risk factors in disease-endemic and emergent areas, Sweden. *Emerging Infectious Diseases*. 8: 956-960.
- Farrar R. G., Klei T. R. (1990): Prevalence of *Trypanosoma theileri* in Louisiana cattle. *The Journal of Parasitology*. 76: 734–736.
- Flegontov P., Votýpka J., Skalický T., Logacheva M.D., Penin A.A., Tanifuji G., Onodera N.T., Kondrashov A.S., Volf P., Archibald J.M., Lukeš J. (2013): *Paratrypanosoma* is a novel early-branching trypanosomatid. *Current Biology*. 23: 1787-1793.
- Formińska K., Zasada A.A., Rastawicki W., Śmietańska K., Bander D., Wawrzynowicz-Syczewska M., Yanushevych M., Niścigórska-Olsen J., Wawszczak M. (2015): Increasing role of arthropod bites in tularaemia transmission in Poland - case reports and diagnostic methods. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 22: 443-446.
- Forsman M., Sandström G., Sjöstedt A. (1994): Analysis of 16S ribosomal DNA sequences of *Francisella* strains and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 44: 38-46.
- Genchi C., Kramer L.H., Rivasi F. (2011): *Dirofilaria* infections in Europe. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*. 11: 1307-1317.
- Genchi C., Rinaldi L., Mortarino M., Genchi M., Cringoli G. (2009): Climate and *Dirofilaria* infection in Europe. *Veterinary Parasitology*. 163: 286-292.
- Grandi G., Živičnjak T., Beck R. (2007): Pathogenesis of *Dirofilaria* spp. infection. *Mappe parasitologiche*. 8: 59–66.
- Greco A., Loria G. R., Dara S., Luckins T., Sparagano O. (2000): First isolation of *Trypanosoma theileri* in Sicilian cattle. *Veterinary Research Communications*. 24: 471–475.
- Greer A., Ng V., Fisman D. (2008): Climate change and infectious diseases in North America: the road ahead. *Canadian Medical Association Journal*. 178: 715-722.

- Gurycová D. (1998): First isolation of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* in Europe. European Journal of Epidemiology 14: 797-802.
- Haro A., Tamiyac S., Nagashimaba A. (2016): A rare case of human pulmonary dirofilariasis with a growing pulmonary nodule after migrating infiltration shadows, mimicking primary lung carcinoma. International Journal of Surgery Case Reports. 22: 8-11.
- Harrus S., Baneth G. (2005): Drivers for the emergence and re-emergence of vector-borne protozoal and bacterial diseases. International Journal for Parasitology. 35: 1309-1318.
- Hellgren O., Waldenström J., Bensch S. (2004): A new PCR assay for simultaneous studies of *leucocytozoon*, *plasmodium* and *heamoproteus* from avian blood. Journal of Parasitology. 90(4):797-802.
- Hightower J., Kracalik I.T., Vydayko N., Goodin D., Glass G., Blackburn J.K. (2014): Historical distribution and host-vector diversity of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia, in Ukraine. Parasites and Vectors. 7: 453.
- Hoare C. A. (1972): The Trypanosomes of Mammals. Blackwell, Oxford.
- Huynh T., Thean J., Maini R. (2001): Dipetalonema reconditum in the human eye. British Journal of Ophthalmology. 85: 1391–1392.
- Ionică A.M., Matei I.A., D'Amico G., Daskalaki A.A., Juránková J., Ionescu D.T., Mihalca A.D., Modrý D., Gherman C.M. (2016): Role of golden jackals (*Canis aureus*) as natural reservoirs of *Dirofilaria* spp. in Romania. Parasites and Vectors. 9: 240.
- Ionică A.M., Matei I.A., Mircean V., Dumitrache M.O., D'Amico G., Györke A., Pantchev N., Annoscia G., Albrechtová K., Otranto D., Modrý D., Mihalca A.D. (2015): Current surveys on the prevalence and distribution of *Dirofilaria* spp. and *Acanthocheilonema reconditum* infections in dogs in Romania. Parasitology Research. 114: 975-982.
- Kaiser L., Spickard R.C., Sparks H.V. Jr., Williams J.F. (1989): *Dirofilaria immitis*: alteration of endothelium-dependent relaxation in the in vivo canine femoral artery. Experimental Parasitology. 69: 9 –15.
- Khedri J., Radfar M.H., Borji H., Azizzadeh M. (2014): An epidemiological survey of *Setaria* in the abdominal cavities of Iranian sistani and brahman cattle in the southeastern of iran. Iranien Journal of Parasitology. 9: 249-253.
- Kimura M., Darbro J.M., Harrington L.C. (2010): Avian malaria parasites share congeneric mosquito vectors. Journal of Parasitology. 96: 144-151.

- Lachish S., Knowles S.C., Alves R., Wood M.J., Sheldon B.C. (2011): Fitness effects of endemic malaria infections in a wild bird population: the importance of ecological structure. *The Journal of Animal Ecology*. 80: 1196-1206.
- Lapointe D.A., Atkinson C.T., Samuel M.D. (2012): Ecology and conservation biology of avian malaria. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1249: 211-226.
- Latif A.A., Bakheit M.A., Mohamed A.E., Zweggarth E. (2004): High infection rates of the tick *Hyalomma anatolicum anatolicum* with *Trypanosoma theileri*. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 71: 251-256.
- Latrofa M.S., Montarsi F., Ciocchetta S., Annoscia G., Dantas-Torres F., Ravagnan S., Capelli G., Otranto D. (2012): Molecular xenomonitoring of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in mosquitoes from north-eastern Italy by real-time PCR coupled with melting curve analysis. *Parasites and Vectors*. 5: 76.
- Lee Y.F., Cheng C.C., Lin N.N., Liu S.A., Tung K.C., Chiu Y.T. (2010): Isolation of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* from dairy cattle in Taiwan. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 72: 417-424.
- Lindemann B.A., Evans T.L., McCall J.W. (1983): Clinical responses of dogs to experimentally induced *Dipetalonema reconditum* infection. *American Journal of Veterinary Research*. 44: 2170–2172.
- Litster A., Atkins C., Atwell R. (2008): Acute death in heartworm-infected cats: unravelling the puzzle. *Veterinary Parasitology*. 158: 196-203.
- Longo M.V., Jatón K., Pilo P., Chabanel D., Erard V. (2015): Long-Lasting Fever and Lymphadenitis: Think about *F. tularensis*. *Case Reports in Medicine*. 2015: 191406.
- Manfredi M.T., Di Cerbo A., Genchi M. (2007): Biology of filarial worms parasitizing dogs and cats. *Mappe parassitologiche*. 8: 39–47.
- Martínez-de la Puente J., Muñoz J., Capelli G., Montarsi F., Soriguer R., Arnoldi D., Rizzoli A., Figuerola J. (2015): Avian malaria parasites in the last supper: identifying encounters between parasites and the invasive Asian mosquito tiger and native mosquito species in Italy. *Malaria Journal*. 14: 32.
- Maslov D.A., Lukes J., Jirku M., Simpson L. (1996): Phylogeny of trypanosomes as inferred from the small and large subunit rRNAs: implications for the evolution of parasitism in the trypanosomatid protozoa. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 75: 197-205.

- Matějů J., Chanová M., Modrý D., Mitková B., Hrazdilová K., Žampachová V., Kolářová L. (2014): *Dirofilaria repens*: emergence of autochthonous human infections in the Czech Republic (case reports). BMC Infectious Diseases. 16: 171.
- McCall J.W., Genchi C., Kramer L.H., Guerrero J., Venco L. (2008): Heartworm disease in animals and humans. Advances in Parasitology. 66: 193–285.
- Mehlhorn H. (2008): Encyclopedia of Parasitology. 3rd Edition. Springer. Berlin.
- Miterpáková M., Iglódyová A., Čabanová V., Stloukal E., Miklisová D. (2016): Canine dirofilariosis endemic in Central Europe-10 years of epidemiological study in Slovakia. Parasitology Research. 115: 2389-2395.
- Montoya-Alonso J.A., Carretón E., Corbera J.A., Juste M.C., Mellado I., Morchón R., Simón F. (2011): Current prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs, cats and humans from the island of Gran Canaria, Spain. Veterinary Parasitology. 176: 291-4.
- Muro A., Cordero M. (2001): Clinical aspects and diagnosis of human pulmonary dirofilariosis. Heartworm infection in humans and animals. 191–202.
- Ndao M., Pandey V.S., Zinsstag J., Pfister K. (1995): Helminth parasites and hypobiosis of nematodes in N'Dama cattle during the dry season in The Gambia. Veterinary Parasitology. 60: 161-166.
- Nguyen C., Koh W.L., Casteriano A., Beijerink N., Godfrey C., Brown G., Emery D., Šlapeta J. (2016): Mosquito-borne heartworm *Dirofilaria immitis* in dogs from Australia. Parasites and Vectors. 9: 535.
- Nogami S., Sato T. (1997): Prevalence of *Dirofilaria immitis* infection in cats in Saitama, Japan. The Journal of Veterinary Medical Science. 59: 869-871.
- Orihel T. C., Eberhard M. L. (1998): Zoonotic Filariasis. Clinical Microbiology Reviews. 11: 366-381.
- Otranto D., Dantas-Torres F., Brianti E., Traversa D., Petrić D., Genchi C., Capelli G. (2013): Vector-borne helminths of dogs and humans in Europe. Parasites and Vectors. 6: 16.
- Oyston P.C., Sjöstedt A., Titball RW. (2004): Tularemia: bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis*. Nature Reviews. Microbiology. 2: 967-978.

- Panaiteescu D., Preda A., Bain O., Vasile-Bugarin A.C. (1999): Four cases of human filariasis due to *Setaria labiatopapillosa* found in Bucharest, Romania. Roumanian archives of Microbiology and Immunology. 58: 203-207.
- Petersen J.M., Mead P.S., Schriefer M.E. (2009): *Francisella tularensis*: an arthropod-borne pathogen. Veterinary Research. 40: 7.
- Philip C.B., Parker R.R. (1932): Experimental transmission of tularaemia by mosquitoes. Public Health Reports. 47: 2077–2088.
- Pietrobelli M., Cancrini G., Frangipane di Regalbono A., Galuppi R., Tampieri M.P. (1998): Development of *Setaria labiatopapillosa* in *Aedes caspius*. Medical and veterinary Entomology. 12: 106-108.
- Pigeault R., Nicot A., Gandon S., Rivero A. (2015): Mosquito age and avian malaria infection. Malaria Journal. 14: 383.
- Pigeault R., Vézilier J., Cornet S., Zélé F., Nicot A., Perret P., Gandon S., Rivero A. (2015): Avian malaria: a new lease of life for an old experimental model to study the evolutionary ecology of *Plasmodium*. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences. 370: 20140300.
- Popescu I., Tudose I., Racz P., Muntau B., Giurcaneanu C., Poppert S. (2012): Human *Dirofilaria repens* Infection in Romania: A Case Report. Case Reports in Infectious Diseases. 2012: 472976.
- Rudolf I., Šebesta O., Mendel J., Betášová L., Bocková E., Jedličková P., Venclíková K., Blažejová H., Šikutová S., Hubálek Z. (2014): Zoonotic *Dirofilaria repens* (Nematoda: Filarioidea) in *Aedes vexans* mosquitoes, Czech Republic. Parasitology Research. 113: 4663-4667.
- Santiago-Alarcon D., Palinauskas V., Schaefer H.M. (2012): Diptera vectors of avian Haemosporidian parasites: untangling parasite life cycles and their taxonomy. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society. 87: 928-964.
- Santic M., Molmeret M., Klose K.E., Abu Kwaik Y. (2006): *Francisella tularensis* travels a novel, twisted road within macrophages. Trends in Microbiology. 14: 37-44.
- Semenza J.C., Menne B. (2009): Climate change and infectious diseases in Europe. The Lancet. Infectious Diseases. 9: 365-375.

- Silbermayr K., Eigner B., Joachim A., Duscher G.G., Seidel B., Allerberger F., Indra A., Hufnagl P., Fuehrer H.P. (2014): Autochthonous *Dirofilaria repens* in Austria. *Parasites and Vectors*. 7: 226.
- Simón F., Genchi C. (2000): Dirofilariasis and other zoonotic filariases: an emerging public health problem in developed countries. *Research and Reviews in Parasitology*. 60: 1–16.
- Simón F., López-Belmonte J., Marcos-Atxutegi C., Morchón R., Martín-Pacho J.R. (2005): What is happening outside North America regarding human dirofilariasis? *Veterinary Parasitology*. 133: 181–189.
- Simón F., Siles-Lucas M., Morchón R., González-Miguel J., Mellado I., Carretón E., Montoya-Alonso J.A. (2012): Human and animal dirofilariasis: the emergence of a zoonotic mosaic. *Clinical Microbiology Reviews*. 25: 507-544.
- Sjöstedt A., Eriksson U., Berglund L., Tärnvik A., (1997): Detection of *Francisella tularensis* in ulcers of patients with tularemia by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 35: 1045-1048.
- Slocombe J.O., Villeneuve A. (1993): Heartworm in dogs in Canada in 1991. *The Canadian Veterinary Journal*. 34: 630-633.
- Sood N.K., Singla L. D., Singh R.S, Uppal S.K. (2011): Association of *Trypanosoma theileri* with peritonitis in a pregnant cross-bred cow: a case report. *Veterinari Medicina*. 56: 82-84.
- Şuleşco T., Volkova T., Yashkova S., Tomazatos A., von Thien H., Lühken R., Tannich E. (2016): Erratum to: Detection of *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis* DNA in mosquitoes from Belarus. *Parasitology Research*. 115: 3677.
- Svobodová M., Volf P., Votýpka J. (2015): Trypanosomatids in ornithophilic bloodsucking Diptera. *Medical and Veterinary Entomology*. 29: 444-447.
- Tappe D., Plauth M., Bauer T., Muntau B., Dießel L., Tannich E., Herrmann-Trost P. (2014): A case of autochthonous human *Dirofilaria* infection. *Euro Surveillance*. 9: 2-4.
- Tarello W. (2002): Dermatitis associated with *Dirofilaria (Nochtiella) repens* microfilariae in dogs from central Italy. *Acta Veterinaria Hungarica*. 50: 63–78.
- Tarello W. (2011): Clinical Aspects of Dermatitis Associated with *Dirofilaria repens* in Pets: A Review of 100 Canine and 31 Feline Cases (1990-2010) and a Report of a New Clinic Case Imported from Italy to Dubai. *Journal of Parasitology Research*. 2011: 578385.

- Tasić-Otašević S.A., Trenkić Božinović M.S., Gabrielli S.V., Genchi C. (2015): Canine and human *Dirofilaria* infections in the Balkan Peninsula. *Veterinary Parasitology*. 209: 151-156.
- Thompson C.K., Godfrey S.S., Thompson R.C. (2014): Trypanosomes of Australian mammals: A review. *International Journal of Parasitology. Parasites and Wildlife*. 3: 57-66.
- Török E., Tomazatos A., Cadar D., Horváth C., Keresztes L., Jansen S., Becker N., Kaiser A., Popescu O., Schmidt-Chanasit J., Jöst H., Lühken R. (2016): Pilot longitudinal mosquito surveillance study in the Danube Delta Biosphere Reserve and the first reports of *Anopheles algeriensis* Theobald, 1903 and *Aedes hungaricus* Mihályi, 1955 for Romania. *Parasites and Vectors*. 9: 196.
- Valkiunas G. (2005): *Avian Malaria Parasites and Other Haemosporidia*. CRC Press, Boca Raton.
- Valkiunas G., Žiegytė R., Palinauskas V., Bernotienė R., Bukauskaitė D., Ilgūnas M., Dimitrov D., Iezhova T.A. (2015): Complete sporogony of *Plasmodium relictum* (lineage pGRW4) in mosquitoes *Culex pipiens pipiens*, with implications on avian malaria epidemiology. *Parasitology Research*. 114: 3075-3085.
- Van Dyken M., Bolling B.G., Moore C.G., Blair C.D., Beaty B.J., Black W.C. 4th, Foy B.D. (2006): Molecular evidence for trypanosomatids in *Culex* mosquitoes collected during a West Nile virus survey. *International Journal for Parasitology*. 36: 1015-1023.
- Van Riper C. III, Atkinson C.T., Seed T.M. (1994): *Plasmodia* of birds. In *Parasitic Protozoa*. Academic Press. New York. 7: 73-140.
- Venco L., Genchi C., Simón F. (2011): La filariosis cardiopulmonar (*Dirofilaria immitis*) en el perro. La filariosis en las especies domésticas y en el hombre. 19–60.
- Venco L., Vezzoni A. (2001): Heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease in dogs and cats. Heartworm infection in humans and animals. 161–177.
- Ventim R., Ramos J.A., Osório H., Lopes R.J., Pérez-Tris J., Mendes L. (2012): Avian malaria infections in western European mosquitoes. *Parasitology Research*. 111: 637-645.
- Verloo D., Brandt J., Van Meirvenne N., Büscher, P. (2000): Comparative in vitro isolation of *Trypanosoma theileri* from cattle in Belgium. *Veterinary Parasitology*. 89: 129–132.
- Villa A., Gutierrez C., Gracia E., Moreno B., Chacón G., Sanz P. V., Büscher P., Touratier L. (2008): Presence of *Trypanosoma theileri* in Spanish Cattle. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1149: 352–354.

Vonesch N., D'Ovidio M.C., Melis P., Remoli M.E., Ciufolini M.G., Tomao P. (2016): Climate change, vector-borne diseases and working population. *Annali dell'Istituto superiore di sanità*. 52: 397-405.

Warner R.E. (1968): The role of introduced diseases in the extinction of the endemic Hawaiian avifauna. *Condor* 70: 101–120.

Wells E. A. (1976): Subgenus *Megatrypanum*. In *Biology of the Kinetoplastida*, Vol. I. Academic Press, London. 257–275.

Wijesundera W.S., Chandrasekharan N.V., Karunanayake E.H., Dharmasena S.P. (1996): Development of a diagnostic DNA probe to detect *Setaria digitata*: the causative parasite of cerebrospinal nematodiasis in goats, sheep and horses. *The British Veterinary Journal*. 152: 561-571.

Wongkamchai S., Nochote H., Foongladda S., Dekumyoy P., Thammapalo S., Boitano J., Choochote W. (2014): A high resolution melting real time PCR for mapping of filaria infection in domestic cats living in brugian filariosis-endemic areas. *Veterinary Parasitology*. 201: 120-127.

Zácutná L., Dorko E., Rimárová K., Kizeková M. (2015): Pilot Cross-Sectional Study of Three Zoonoses (Lyme Disease, Tularaemia, Leptospirosis) among Healthy Blood Donors in Eastern Slovakia. *Central European Journal of Public Health*. 23: 76-85.

Zittra C. (2013): Grundlagenwissen über Stechmücken (Culicidae: Diptera) des Nationalparks Donau-Auen: Nationalpark Donauauen - diverse wissenschaftliche Arbeiten. 19: 1-9.

Zittra C., Kocziha Z., Pinnyei S., Harl J., Kieser K., Laciny A., Eigner B., Silbermayr K., Duscher G.G., Fok É., Fuehrer H.P. (2015): Screening blood-fed mosquitoes for the diagnosis of filarioid helminths and avian malaria. *Parasites and Vectors*. 8: 16.

11 Anhang

Standortangaben

Auflistung der Standorte aufgestellter Fallen im Donaudelta/Rumänien mit exakten Koordinaten.

Standort	Breitengrad	Längengrad	Fallentypus	Datum
infected dogs island 1	45.413654	29.278379	BGS	11.07.2015
infected dogs island 2	45.413654	29.278379	BGS	12.07.2015
infected dogs island 3	45.413654	29.278379	BGS	13.07.2015
Riverbank Island	45.413016	29.279681	BGS	11.07.2015
Riverbank Island	45.413016	29.279681	BGS	12.07.2015
Riverbank Island	45.413016	29.279681	CDC	12.07.2015
Pigs Island	45.414264	29.278552	BGS	11.07.2015
Pigs Kloster	45.311077	29.29503	ASP	14.07.2015
Cattle Mainland 1	45.416330	29.282291	CDC	11.07.2015
Cattle Mainland 2	45.416330	29.282291	CDC	11.07.2015
Cattle Mainland	45.416330	29.282291	BGS	12.07.2015
Mainland	45.411710	29.280447	ASP	11.-13.07. 2015
Mainland	45.411710	29.280447	ASP	14.07.2015
Island	45.413654	29.278379	ASP	10.07.2015
Island	45.413654	29.278379	ASP	11.07.2015
Tulcea	45.166687	28.789310	ASP	09.07.2015