

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplombiologe Heiko Kotter
Mannheim

Tag der mündlichen Prüfung:

Thema

Bionomie und Verbreitung der autochthonen Fiebertmücke *Anopheles plumbeus* (Culicidae) und ihrer Vektorkompetenz für *Plasmodium falciparum*, Erreger der Malaria tropica



Gutachter: Prof. Dr. Michael Lanzer
Prof. Dr. Volker Storch

Titelbild: *Anopheles plumbeus*-Weibchen im Flug (Kuhn)

Danksagung

Ich möchte all denjenigen danken, die mich während der Forschungsarbeiten unterstützt haben. Vor allen Dingen den verständnisvollen Menschen, die mir, wenn auch oft mit anfänglicher Skepsis und Verwunderung, Zutritt zu ihrem Privatgrund gewährten, um dort in Gruben nach Mücken zu suchen.

Ohne die Kooperationsbereitschaft der Behörden, Forstämter und Förster, welche die notwendigen Genehmigungen zum Befahren der weitläufigen Waldgebiete erteilten, wäre die Baumhöhlenkartierung nicht möglich gewesen.

Bei meinem Erstgutachter, **Prof. Dr. Lanzer**, der sich bereits 1999 bereit erklärte den parasitologischen Teil der Studie zu unterstützen, bedanke ich mich ganz herzlich. Ohne sein frühes Engagement, in Verbindung mit der Perspektive des Ende 2002 fertig gestellten, für die Infektionsversuche essentiellen Hochsicherheitsinsektariums, wäre diese Arbeit nie zustande gekommen.

Herrn Prof. Dr. Volker Storch danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein aufrichtiger Dank gilt **Dr. Kai Matuschewski** für die herzliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe sowie seiner aktiven Unterstützung während der zeitaufwendigen Kultur- und Infektionsversuche.

Nicht erst durch seine einmaligen Mückenbilder weckte **Dr. Roland Kuhn** meine Faszination für die Stechmücken. Weit vor Beginn dieser Studie konnte ich in gemeinsamen Projekten Erfahrungen in der Zucht von *Aedes*- und *Culex*-Mücken sammeln. Unsere vielen gemeinsamen Mücken-Exkursionen waren immer ein besonderes Abenteuer.

Prof. Dr. Hans Briegel, der mir Einblicke in seine erfolgreiche Methode der Mückenzucht, vor allem in die der Anophelinen gestattete.

Was wäre ein arbeitsreicher Tag ohne zuverlässige und verständnisvolle Kollegen. Den Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe und denen der Arbeitsgruppe Lanzer ein großes Lob für die tolle Zusammenarbeit, die konstruktiven Diskussionen und den Spaß im Labor.

Nicht zuletzt **Dr. Norbert Becker**, dem Technischen Direktor meines Arbeitgebers der "Kommunalen Aktionsgemeinschaft zur Bekämpfung der Schnakenplage e. V." (KABS), mit dem ich zusammen die Idee zu dieser Studie erarbeitete. Bereits in der Planungsphase des Projektes brachte er sein volles Engagement ein, um diese anspruchsvolle Studie auf den Weg zu bringen.

Den herzlichsten Dank spreche ich meiner Familie aus, die nicht nur meine sehr gewöhnungsbedürftigen Arbeitszeiten tolerierte, sondern auch während dieser Zeit viele Kompromisse eingehen musste. Ohne den Rückhalt und das Verständnis meiner Frau Sabine wäre es nicht gegangen.

Die Mücken

Dich freut die warme Sonne.
Du lebst im Monat Mai.
In deiner Regentonne,
Da rührt sich allerlei.

Viel kleine Tierlein steigen
Bald auf-, bald niederwärts,
Und, was besonders eigen,
Sie atmen mit dem Sterz.

Noch sind sie ohne Tücken,
Rein kindlich ist ihr Sinn.
Bald aber sind sie Mücken
Und fliegen frei dahin.

Sie fliegen auf und nieder
Im Abendsonnenglanz
Und singen feine Lieder
Bei ihrem Hochzeitstanz.

Du gehst zu Bett um zehne,
Du hast zu schlafen vor,
Dann hörst du jene Töne
Ganz dicht an deinem Ohr.

Drückst du auch in die Kissen
Dein wertes Angesicht,
Dich wird zu finden wissen
Der Rüssel, welcher sticht.

Merkst du, dass er dich impfe,
So reib mit Salmiak
Und dreh dich um und schimpfe
Auf dieses Mückenpack.

Wilhelm Busch

Unserem Sohn

Hagen Leonhard

I Zusammenfassung

In der letzten Dekade wurden in Deutschland jährlich bis ca. 1000 allochthon erworbene Malariafälle registriert, von denen etwa 70 % durch *Plasmodium falciparum* hervorgerufen wurden. Basierend auf der sich ausdehnenden Verbreitung von *Anopheles plumbeus* wurde ihre Bionomie sowie ihre Vektorkompetenz für *Plasmodium falciparum*, dem Erreger der Malaria tropica, untersucht. *Anopheles plumbeus* - eine Fiebertmücke, die ursprünglich in Baumhöhlen brütet, besiedelt in zunehmendem Maße nicht mehr intensiv genutzte Güllegruben. Nach 3 bis 5 Jahren können Larvendichten bis zu 1.800 Individuen pro dm² erreicht werden. Aufgrund ihres aggressiven Stechverhaltens kommt es dann zu erheblichen Einschränkungen in der Freizeitnutzung der Anwohner. Da die Mücke weder stenogam noch autogen ist, kann sie nicht in geschlossenen Systemen überleben. So kann, vor dem entwicklungsbedingten Ausfliegen der Mücken, durch ein simples Verschließen der Brutstätte die darin lebende Population ausgelöscht werden. Auch die in Gruben vorkommenden Populationen halten, wie die in Baumhöhlen brütenden Mücken, strikt eine jahreszeitlich gesteuerte Entwicklungsperiodik ein. Erstmals konnte ihre Kälte- und Frostresistenz bis -20° C gezeigt werden - eine Eigenschaft, die das Überleben in den Wäldern der Bergregionen erst ermöglicht.

Die erfolgreiche Etablierung eines *in vitro*-Kultivierungssystems für *P. falciparum*, in Verbindung mit dem Aufbau des Membran-Infektionsmodells, bildete die Grundlage für Untersuchungen zur Vektorkompetenz von *An. plumbeus*. Im Vorfeld wurde mit Hilfe von Infektionsversuchen an *An. stephensi* die Effektivität beider Systeme stetig verbessert. Unter Laborbedingungen konnten *An. plumbeus*-Weibchen sowohl aus Baumhöhlenvorkommen wie auch aus Grubenpopulationen erfolgreich mit dem *P. falciparum*-Stamm NF54 infiziert werden. Erstmals konnte dabei mit dem Nachweis von Sporozoiten in den Speicheldrüsen die Vollendung des Entwicklungszykluses von *P. falciparum* in *An. plumbeus* aus natürlichen wie auch aus anthropogenen Brutstätten bewiesen werden. Die Befunde dieser Studie zur Bionomie, Verbreitung und Vektorkompetenz der einheimischen Stechmücke stellen somit eine wichtige Grundlage zur Bewertung des Malaria-Risikos durch Übertragung autochthoner Anophelinen in Zentraleuropa dar.

II Summary

Although endemic malaria has disappeared in Germany, travellers imported approximately 1000 registered cases of malaria every year in the last decade. 70 per cent of these cases were caused by *Plasmodium falciparum*.

The mosquito is directly affected by its environment. Temperature, rainfall, presence of breeding places and the availability of hosts for blood meal control the mosquito population. Taking vector competence into account, we observed the occurrence and the expansion of *Anopheles plumbeus*. Remarkably, within three to five years, larval densities reach up to 1,800 individuals per square decimeter.

Due to its aggressive biting behaviour, this mosquito has become a significant nuisance in the areas affected, effectively limiting outdoor activities of the people living near its breeding grounds. However, as this mosquito is neither stenogam nor autogenous, a sealing of the breeding ground will eliminate the population within.

The mosquito populations that have their breeding grounds in tree cavities as well those that breed in pits both maintain a strictly season-triggered developmental periodicity. For the first time, it was possible to show the mosquito's ability to withstand temperatures of down to -20°C, a factor that permits its survival in forests at elevated altitudes.

The successful *in vitro* cultures of the gametocyte-producing *P. falciparum* strain NF54, efficient gametocyte production, and infection of the *Anopheles* species through membrane feeding were the prerequisites to study the transmission competence of *An. plumbeus*. The system was optimized in infection experiments with laboratory populations of *An. stephensi* under laboratory conditions field-collected *An. plumbeus* were successfully infected and produced salivary gland sporozoites, the infectious transmission stage of the malaria parasite. I could show that *P. falciparum* completes its mosquito life cycle in *An. plumbeus*, independent of their origin, i.e. collected from tree holes or man-made manure pits. Collectively, these findings provide the rationale for a risk evaluation of malaria transmission by autochthonous *Anopheles* in Central Europe.

III Inhaltsverzeichnis

I	Zusammenfassung	I
II	Summary	II
III	Inhaltsverzeichnis	III
1	Einleitung	1
1.1	Allgemeiner Teil	1
1.2	Zielsetzung der Arbeit	6
2	Bionomie und Verbreitung von <i>Anopheles plumbeus</i>	7
2.1	Einleitung	7
2.1.1	<i>Anopheles plumbeus</i> , Stephens (1828)	7
2.1.2	Das Stechverhalten	11
2.1.3	Biologische Stechmückenbekämpfung mit <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> (Serotyp H-14)	14
2.2	Methoden	17
2.2.1	Brutstätten von <i>Anopheles plumbeus</i>	17
2.2.2	Versuche zur Etablierung einer Laborkolonie von <i>Anopheles plumbeus</i>	19
2.2.2.1	Larvenaufzucht	19
2.2.2.2	Reproduktion von <i>An. plumbeus</i>	19
2.2.3	Untersuchung zur Entwicklungs- und Lebensdauer von <i>Anopheles plumbeus</i>	21
2.2.3.1	Temperaturabhängige Entwicklung der <i>An. plumbeus</i> -Larven	21
2.2.3.2	Untersuchungen zur Lebensdauer der weiblichen Imagines	22
2.2.4	Frostresistenz bei <i>Anopheles plumbeus</i> -Larven	23
2.2.5	Bio-Assays mit <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>	24
2.2.5.1	Allgemein	24

2.2.5.2 Herstellung der Bti-Stammlösung	24
2.2.5.3 Versuchsaufbau der Bio-Assays	24
2.3 Ergebnisse	26
2.3.1 Biologie von <i>Anopheles plumbeus</i>	26
2.3.1.1 Wald- und parkgebundenes Vorkommen	26
2.3.1.1.1 Dendrothelmen als Brutareale	26
2.3.1.1.2 Künstliche Baumhöhlen als Brutstätten	29
2.3.1.1.3 Autoreifen und Tümpel als Brutstätten	30
2.3.1.1.4 Larvenentwicklung und Flugaktivität	31
2.3.1.2 <i>An. plumbeus</i> als Lästling in der Nähe menschlicher Behausungen	31
2.3.1.2.1 Brutstätten	31
2.3.1.2.2 Populationsdynamik von <i>An. plumbeus</i> in geschlossenen Systemen	35
2.3.1.2.3 Stechmückenaktivität	36
2.3.1.3 Aufzucht der Larven von <i>An. plumbeus</i>	39
2.3.1.4 Versuche zur Etablierung einer <i>An. plumbeus</i> -Kolonie im Labor	40
2.3.1.5 Frostresistenz von <i>An. plumbeus</i>	42
2.3.1.6 Temperaturabhängige Entwicklung der <i>An. plumbeus</i> -Larven	46
2.3.1.7 Lebenserwartung der <i>An. plumbeus</i> -Weibchen	50
2.3.2 Empfindlichkeit der <i>Anopheles plumbeus</i> -Larven gegenüber <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>	52
2.4 Diskussion	55
3 Vektorkompetenz von <i>Anopheles plumbeus</i> unter besonderer Berücksichtigung von <i>Plasmodium falciparum</i>	63
3.1 Einleitung	63
3.1.1 <i>Plasmodium falciparum</i>	63
3.1.2 Sicherheitslabor	67
3.2 Methoden	69
3.2.1 Zucht von <i>Anopheles spec.</i>	69
3.2.1.1 Verwendete Anophelinen	69
3.2.1.2 Blutmahlzeit	69

3.2.1.2.1 Lebende Tiere als Blutspender	69
3.2.1.2.2 Membranfütterung	70
3.2.1.3 Eiablage	70
3.2.1.4 Larvenaufzucht	71
3.2.1.5 Haltung der Imagines	73
3.2.2 Kultivierung von <i>Plasmodium berghei</i>	74
3.2.2.1 Allgemein	74
3.2.2.2 Maushaltung	74
3.2.2.3 Blutentnahme bei Mäusen	74
3.2.2.4 Infektion von <i>Anopheles</i> -Weibchen mit <i>P. berghei</i>	75
3.2.2.5 Kontrolle der <i>P. berghei</i> -Infektion	75
3.2.2.6 Gametozytendichte und Exflagellation bei <i>P. berghei</i>	76
3.2.2.7 Herstellung von <i>P. berghei</i> -Blutstabilaten	76
3.2.3 Infektionen der <i>Anopheles</i> -Weibchen mit <i>Plasmodium falciparum</i>	77
3.2.3.1 Vergleich unterschiedlicher Membranen auf ihre Eignung zur <i>in vitro</i> -Infektion von <i>An. stephensi</i>	77
3.2.3.2 Container zur Infektion von <i>Anopheles spec.</i> mit <i>P. falciparum</i>	78
3.2.3.3 Die Infektionsapparatur	79
3.2.3.4 Vorbereitung der Gametozytenkultur	81
3.2.3.5 Infektion der <i>Anopheles</i> -Mücken	81
3.2.3.6 Infektionskontrolle	82
3.2.4 Kultivierung von <i>Plasmodium falciparum</i>	84
3.2.4.1 Allgemein	84
3.2.4.2 Medium für <i>P. falciparum</i> -Stammkulturen	85
3.2.4.3 Medium zur Kultivierung von <i>P. falciparum</i> -Gametozyten	85
3.2.4.4 Aufbereitung der Erythrozyten	85
3.2.4.5 Herstellung des Serums	86
3.2.4.6 Auftauen von <i>P. falciparum</i>	86
3.2.4.7 Stammplatten der <i>P. falciparum</i> -Kultur	87
3.2.4.8 Bestimmung der Parasitämie	87
3.2.4.9 Kryokonservierung von <i>P. falciparum</i>	88
3.2.4.10 Gametozytenkultivierung	88
3.2.4.11 Fertilitätsüberprüfung unter Nachweis der Exflagellation	89
3.2.5 Invasion von <i>Plasmodium falciparum</i> -Sporozoiten in Hepatozyten	90

3.2.5.1 Kultivierung von Hepatozyten (Huh7-Zellen)	90
3.2.5.2 Konservierung von Huh7-Zellen	90
3.2.5.3 Färbungen der invadierten <i>P. falciparum</i> -Speicheldrüsen- sporozoiten in Hepatozytenzellen	91
3.2.5.4 Leberstadienentwicklungs-Assay mit <i>P. falciparum</i> - Speicheldrüsen Sporozoiten	92
3.3 Ergebnisse	94
3.3.1 Fütterung der <i>Anopheles stephensi</i> -Larven	94
3.3.2 Vorversuche über die Eignung unterschiedlicher Membranen zur <i>in vitro</i> - Infektion von Anophelinen mit <i>Plasmodium spec.</i>	96
3.3.2.1 Untersuchung über die Akzeptanz unterschiedlicher Membranen für die <i>in vitro</i> -Blutfütterung von <i>An. stephensi</i>	96
3.3.2.2 Eignung von Membranen für die <i>in vitro</i> -Infektion von Anophelinen mit <i>P. falciparum</i>	97
3.3.3 Effektivität der <i>in vitro</i> -Infektion am Nagermalaria Modell	99
3.3.4 <i>In vitro</i> -Kultivierung von <i>Plasmodium falciparum</i> -Gametozyten	102
3.3.5 <i>In vitro</i> -Infektion der <i>Anopheles</i> -Weibchen mit <i>Plasmodium falciparum</i>	104
3.3.5.1 <i>In vitro</i> -Infektion von <i>An. stephensi</i> mit <i>P. falciparum</i> aus Gametozyten-Kulturen	104
3.3.5.2 <i>In vitro</i> -Infektion von <i>An. gambiae s. str.</i> und <i>An. albimanus</i> mit <i>P. falciparum</i> aus Gametozytenkulturen	107
3.3.5.3 <i>In vitro</i> -Fütterung von <i>An. plumbeus</i> mit kultivierten <i>P.</i> <i>falciparum</i> -Gametozyten	109
3.3.6 Sporozoiten-Invasion in Hepatozyten	115
3.3.6.1 Invasion von <i>P. falciparum</i> -Speicheldrüsen Sporozoiten in Hepatozyten	115
3.3.6.2 Entwicklung invadierter <i>P. falciparum</i> -Sporozoiten in Leberzellen (Hepatozyten)	118
3.4 Diskussion	120
 4 Zusammenfassende Diskussion	 127
 5 Literaturverzeichnis	 129

6 Anhang	137
6.1 Materialliste	137
6.1.1 Laborausstattung	137
6.1.2 Verbrauchsmaterialien	138
6.1.3 Chemikalien	140
6.1.4 Lösungen	141
6.1.5 Antikörper	141
6.2 Abkürzungsverzeichnis	142
6.3 Log-Probit Bti-Berechnungsprotokolle	145
6.3.1 Mortalität nach 24 h	145
6.3.2 Mortalität nach 48 h	145
6.3.3 Log-Probit Analyse nach 24 h	146
6.3.4 Log-Probit Analyse nach 48 h	147

1 Einleitung

1.1 Allgemeiner Teil

Nach WHO-Angaben lebten im Jahre 2004, verteilt auf 107 Staaten und Regionen, 3,2 Milliarden Menschen mit dem unmittelbaren Risiko an einer Malaria zu erkranken. Die Anzahl der daraus resultierenden klinischen Malariafälle wurde weltweit mit 350 bis 500 Millionen beziffert. Der weitaus größte Anteil wird dabei durch die Erreger *Plasmodium falciparum* und *P. vivax* hervorgerufen. Pro Jahr sterben annähernd 2 Millionen Menschen an der durch *P. falciparum* verursachten Malaria tropica. Der Schwerpunkt dieser Erkrankungen liegt dabei mit zirka 2/3 der weltweit registrierten Fälle im zentralen Afrika. Das Übertragungsmuster variiert in den unterschiedlichen Regionen, bedingt durch den Grad der Anpassung des Parasiten an seinen lokalen Vektor. Ergänzend muss hierbei die Ökologie der Vektoren berücksichtigt werden. Gute sozioökonomische Bedingungen bilden den Rahmen für eine effektive Malariabekämpfung mit der Grundlage einer geeigneten Gesundheitsvorsorge sowie einer effektiven Bekämpfung der Krankheitsüberträger (WHO, 2005).

Auch in Europa war in vergangener Zeit die Malaria, die hauptsächlich durch *P. vivax* hervorgerufen wurde, endemisch. In den vergangenen Jahrhunderten waren die Auswirkungen der Malaria auf die politischen und sozialen Strukturen oft verheerender als große Militärsaktionen. Folgt man den Geschichtsschreibern aus dieser Zeit, so war es das Wechsel- bzw. Sommerfieber, welches seinen Teil zur Entscheidung so mancher Belagerungen und so manches Feldzuges beitrug. So berichtete Guilelmi über die Belagerung Prescias durch Kaiser Heinrich VII. im Jahre 1310: "Wegen der großen Hitze lagerten die Truppen unbekleidet im Freien und setzten sich den Malariamücken aus. Mit entfesselter Gewalt brach das Fieber über die Heere hervor und nicht weniger als 70 Fürsten, 7.000 Lanzenreiter und 20.000 Mann wurden davon hinweggerafft. Der Kaiser selbst nahm den Todeskeim in sich auf, dem er 2 Jahre später erlag" (Ebner, 1947). Napoleon verlor auf dem Weg nach Russland in den Niederungen des Oberrheins mehr Soldaten durch die Malaria als durch militärische Gefechte.

Bereits im letzten Drittel des 19. Jh. war in verschiedenen Regionen Zentraleuropas die Anzahl an Malariaerkrankungen rückläufig. Ein maßgebender Grund für den Rückgang war

die Trockenlegung des **Bodens** verbunden mit der damals noch unbewussten Beseitigung vieler Mückenbrutstätten. So wurden Sümpfe sowie Wiesen entwässert und Flüsse durch Begradigungen in ihr Bett gezwungen. Dies erfolgte anfangs mit dem Ziel der Urbarmachung und für den Bereich der Flußsysteme, vor allem auch im Zuge des Ausbaus der Wasserstraßen. Der direkte Zusammenhang zwischen Malaria und ihrem Vektor, der *Anopheles*-Mücken, wurde erst 1897 durch Sir Ronald Ross entdeckt. Er erbrachte als erster den Nachweis pigmentierter Körper, also den Oozysten, im Darm zweier Mücken-♀♀, wahrscheinlich *An. stephensi*.

Die verbesserte Wohnungshygiene, basierend auf einer zunehmenden Kanalisierung des Abwassers, sowie der leitungsgebundene Transport von Trinkwasser, einhergehend mit der Stilllegung vieler Brunnenanlagen, führten zur Beseitigung von Wasseransammlungen, die den Mücken in urbanen Bereichen als Brutstätten dienten.

Mit der Entfestigung, also der Trockenlegung von Schutzgräben rund um die Bauten der traditionellen Militärstandorte, konnten in den als "Malaria Garnisonen" berühmt gewordenen Städten, wie Gernersheim, Landau in der Pfalz und Mainz, die Malariaerkrankungen ebenfalls deutlich reduziert werden (Schuberg, 1927).

Da nicht jede *Anopheles*-Mücke mit Vorliebe den Menschen sticht und nicht jede Art den Parasiten gleich gut überträgt, bedarf es schon einer sehr großen Anzahl an Vektoren, um die Malaria zu verbreiten. Weyer (1956) konnte am Erlöschen der ostfriesischen Malaria, des letzten endemischen deutschen Tertianavorkommens, einen Zusammenhang zwischen Mückendichte und Anzahl der Erkrankungen aufzeigen. In dieser ländlich strukturierten Gegend wurden in den Jahren 1939 bis 1955 durchschnittlich 221 Individuen gefangen. Im Vergleich zu der Erhebung zwischen 1931 bis 1938, mit durchschnittlich 1080 Mücken, war dies ein Rückgang an *Anopheles*-Weibchen um etwa 80 %. Die Artzusammensetzung blieb dabei mit 90 bis 96 % *An. atroparvus* zu 10 bis 4 % *An. messeae* weitestgehend konstant. Passend zu dieser Erhebung ging die Zahl der registrierten Malariafälle von 326 im Jahre 1938 kontinuierlich zurück. Bereits 1941 waren es weniger als 10 Fälle. Trotz der Ausnahmesituation in den Nachkriegsjahren (s. unten) kam es im Gegensatz zu anderen Gebieten zu keinem erneuten Anstieg der Infektionsraten.

In vielen Regionen kam es zur räumlichen Trennung der Wohneinheit von Mensch und Tier. Da *Anopheles maculipennis s. l.* als zoophile Spezies Großvieh als Blutspender bevorzugt, zieht es sie während ihrer Aktivitätszeit in der Dämmerung eher in die Stallungen als in die Häuser der Menschen.

Maßgeblich für den Rückgang der Malariaerkrankungen trug auch die ab der letzten Dekade des 19. Jh. kostengünstigere industrielle Produktion des Chinins bei. Das gegen die Plasmodien im Menschen gerichtete Medikament war nun leichter verfügbar und konnte in einem breiteren Spektrum angewandt werden. Als direkte Folge sank die Anzahl der Parasitenträger und somit die Zahl der Mücken, die sich beim Stich mit Plasmodien infizieren.

Alle drei Maßnahmen trugen dazu bei, den Infektionsweg und damit den Entwicklungszyklus der Malariaerreger zu durchbrechen, um letztendlich die Malaria in Deutschland langsam zu bezwingen.

Während der stückweisen Entspannung der Malariasituation im deutschsprachigen Europa, kam es lokal immer wieder zu Malariaausbrüchen. Diese traten immer dann auf, wenn im Zuge umfangreicher Erdarbeiten, wie unter anderem beim Hafenausbau, Deichbau sowie bei Eisenbahnprojekten der Fall, Menschen aus unterschiedlichen Regionen Deutschlands und dem Ausland rekrutiert wurden. Bedingt durch die schlechten hygienischen Verhältnisse und damit der Schaffung von Brutstätten durch offene Wasser- bzw. Abwasserflächen im Umfeld der Arbeiterunterkünfte, vermehrten sich die *Anopheles*-Mücken. Da sich unter den gedrängt lebenden und arbeitenden Menschen immer Parasitenträger befanden, konnten diese über den Vektor auf engstem Raum verbreitet werden. Die schwere körperliche Arbeit und der schlechte Ernährungszustand begünstigten dabei den Ausbruch der Malaria.

Ausgelöst durch die Rückkehr infizierter Menschen nach Deutschland, kam es in den Nachkriegswirren des Ersten und Zweiten Weltkrieges jeweils zu einem kurzzeitigen Anstieg der gemeldeten Malariaerkrankungen.

Bereits im Verlauf des ersten Weltkrieges und der damit einhergehenden Seuchenproblematik, in der auch die Malaria mit einbezogen wurde, leiteten die Gesundheitsbehörden präventiv geeignet erscheinende Maßnahmen ein. Die zuständigen Ministerien der Länder Württemberg, Mecklenburg-Schwerin sowie Mecklenburg-Strelitz ordneten 1917 die Anzeigepflicht für Malaria an. Zudem regte das Reichsgesundheitsamt an, eine Erhebung über die örtliche Verbreitung der *Anopheles*-Mücken zu veranlassen. Hieraus sollten wertvolle Hinweise für hygienische Maßnahmen zur Malariaprophylaxe (Beseitigung von Brutstätten durch Drainierung oder Aufschüttung des Bodens), sowie Informationen für die Errichtung von Krankenanstalten und Erholungsstätten in *Anopheles*-freien Gegenden gewonnen werden. Die wissenschaftliche Meinung zeigte sich gespalten und diskutierte die Gefahr eines erneuten Malariaausbruches durch eingeschleppte Erreger sehr konträr. So

machte die "Vereinigung zur Bekämpfung der Schnakenplage" in Baden in Rundschreiben an ihre Mitglieder bereits in den Jahren 1914 und 1915 auf die von Verwundeten und Gefangenen ausgehende Gefahr einer eingeschleppten Malaria aufmerksam. Mühlens (1916, 1919) betonte die Gefahr der Malariaausbreitung, die von den Parasitenträgern in *Anopheles*-reichen Gebieten ausgeht. Er fordert zur rechtzeitigen Vorbeugung strengste Verhütungsmaßnahmen.

Im Gegensatz dazu vertrat Martini (1920) eine moderatere Meinung. Er postulierte, dass von einer eingeschleppten Malaria keine längerfristige Gefahr ausgehe. Nach seiner Meinung kann sich dieser Erreger in malariafreien Regionen nicht auf Dauer manifestieren. In bestehenden Malariaherden kann es kurzfristig zu einem Anstieg der Erkrankungen kommen, aber, bedingt durch die inneren Gesetzmäßigkeiten, wird sich das ursprüngliche Gleichgewicht schnell wieder einstellen. Die Gefahren gingen eher von den schlechten wirtschaftlichen und hygienischen Verhältnissen der Nachkriegszeit aus. Halten diese Zustände länger an, könnte es, ausgehend von den durch Armut stärker betroffenen Menschen, zu einem Anstieg der Malariaerkrankungen kommen. Erschwerend kommt in Zeiten wirtschaftlicher und der daraus resultierenden finanziellen Not die fehlende Sorgfalt in der Malariavorsorge in den Bereichen Vektorbekämpfung sowie Medikation hinzu.

Die Stimmen, die eine erneute Ausbreitung der Malaria in Deutschland als Folge der Wirren des Ersten Weltkrieges propagierten, verstummten, da ihre Befürchtungen nicht eintraten. Wie Schuberg (1927) als Ergebnis seiner Studien präsentierte, kam es zu keiner nennenswerten Ausbreitung der Malaria in Deutschland als Folge dieses Krieges.

Ein ungeklärtes Ereignis wurde 1922 aus Berlin bekannt: in 20 Fällen wurde autochthon erworbene *P. falciparum* diagnostiziert. Im Jahr darauf wurden weitere vier Malaria tropica Erkrankungen festgestellt. Die genaue Herkunft der Infektionen konnte nicht geklärt werden.

Ein letztes kurzes Aufflackern der Malaria in Deutschland war eine Folge des Zweiten Weltkrieges. Nach Erhebungen von Hormann (1949) wurden zwischen 1947 bis 1949 in Deutschland 13.826 Malariainfektionen registriert. Von den 3561 autochthonen Fällen, die als Ersterkrankungen erfasst wurden, entfielen 2335 auf das Jahr 1946. Im darauf folgenden Jahr war die Anzahl mit 1226 Neuerkrankungen bereits rückläufig. Hormann verstand die erhobenen Zahlen als Mindestwerte und ging von einer sehr großen Dunkelziffer aus. Ohne Unterscheidung von allochthon oder autochthon erworbenen Fällen beziffert Neidel (1950) die von amtlicher Seite im britischen Sektor von Berlin registrierten Malariafälle mit 402 im Jahre 1947, 230 im Jahre 1948 und 27 Erkrankungen 1949.

Für den letzten bodenständigen Malariaherd in Deutschland, der ostfriesischen Malaria (s. o.), konnte als Folge der Nachkriegeswirren kein Anstieg verzeichnet werden. In Emden waren 1942 vier Fälle aktenkundig und in den folgenden Jahren bis 1950 wurden nie mehr als vier Erkrankungen registriert. Positiv wirkte sich hier die konstant niedrige Verbreitungsdichte der Vektoren in den Nachkriegsjahren aus (s. oben). So kam es um Emden, nicht wie es in Berlin der Fall war, zu keinem Anstieg in der *Anopheles*-Population. In und um Berlin war die *Anopheles*-Dichte so groß, dass in jeder noch so kleinen Wasseransammlung Larven vorhanden waren. Diese massenhafte Vermehrung hatte ihren Ursprung in den durch Kriegseinwirkungen zerstörten Flussläufen, Abwasserkanälen, Entwässerungsgräben, Teichen sowie Parkgewässern. Die neu geschaffenen Überflutungsflächen stellten ideale *Anopheles*-Brutstätten dar. Kurzfristig wurde das Problem durch die mangelnde Entwässerung sowie die fehlende Pflege der Wasserkörper in den Jahren nach Kriegsende verschärft. Vergleichbar war die *Anopheles*-Situation in Hamburg (Weyer, 1952).

Die letzten in Deutschland autochthon erworbenen *Plasmodium*-Infektionen wurden im Jahr 1950 gemeldet. In den folgenden Jahren wurden nur noch rezidive und vereinzelt allochthone Fälle beobachtet.

Alle vier humanpathogenen Formen der Malaria, ausgelöst durch die Erreger *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. ovale* sowie *P. malariae*, unterliegen in Deutschland weiterhin einer Meldepflicht. Durchschnittlich wurden in den letzten Jahren annähernd 1000 im Ausland erworbene und importierte Malariaerkrankungen pro Jahr registriert. Mit 707 Fällen wurden für das Jahr 2004 weniger Malaria-Fälle gemeldet als in den Vorjahren (2003: 820 Fälle; 2002: 859; 2001: 1.045; 2000: 836; 1999: 931; 1998: 1.008). Eine ähnlich geringe Anzahl gemeldeter Malariaerkrankungen wie im Jahr 2004 wurde zuletzt 1993 mit 732 Fällen beobachtet. Ein eindeutiger Trend ist damit in den zurückliegenden Jahren aber nicht zu beobachten (Robert Koch Institut, 2005). Die Rate der Malaria tropica, also der *P. falciparum* Infektionen, lag dabei in der Vergangenheit zwischen 70 und 80 %. Das ist nicht allzu sehr verwunderlich, da fast 90 % aller Malariaerkrankungen während Aufenthalten in Afrika erworben wurden. In den letzten Jahren wurde kein Malaria-Fall bekannt, der zweifelsfrei in Europa erworben wurde.

In den letzten 25 Jahren blieb die Dichte der deutschlandweiten *An. maculipennis* s. l.-Vorkommen in Abhängigkeit von Hochwassern sowie regionaler Niederschlagsereignisse auf einem konstant niedrigen Niveau. Neben wasserbaulichen und landespflegerischen Maßnahmen trägt auch die biologische Stechmückenbekämpfung zu der Regulierung der Anophelinen bei. In Anlehnung an die bereits 1910 konstituierte "Vereinigung zur

Bekämpfung der Schnakenplage" in Baden wurde 1976 die "Kommunale Aktionsgemeinschaft zur Bekämpfung der Schnakenplage" (KABS) gegründet. Deren Hauptaufgabe ist die Reduzierung der an temporären Überschwemmungsflächen angepassten Stechmücken der Gattungen *Aedes* und *Ochlerotatus*. Sie sind entlang der deutschen Flüsse und Seen bei entsprechenden Pegelanstiegen die Hauptverursacher einer Mückenplage (s. Kapitel 2.1.3).

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Seit einiger Zeit breitet sich bis dato die kaum beachtete Fiebermücke *An. plumbeus* aus (s. Kapitel 2.1.2). Auf der Basis ihrer sich ausdehnenden Verbreitung soll die Bionomie sowie ihre *Plasmodium falciparum*-spezifische Vektorkompetenz, also die Übertragung des Erregers der Malaria tropica, untersucht werden. Mit *P. falciparum* wurde der Malariaerreger gewählt, der - wie oben beschrieben - die Ursache der schlimmsten Epidemien ist, und der bei bis zu 80 % aller allochthonen Wechselfieberfälle in Deutschland diagnostiziert wurde. Aus Gründen der übersichtlicheren Darstellung werden die beiden Themenbereiche Bionomie und Verbreitung von *An. plumbeus* sowie die *P. falciparum*-spezifische Vektorkompetenz getrennt in Einleitung, Methoden, Ergebnissen sowie Diskussion bearbeitet. In einer abschließenden übergreifenden Diskussion werden im Zusammenhang mit den neu gewonnenen Vektordaten und der diskutierten globalen Erwärmung eine mögliche Ausbreitung des Malaria tropica-Erregers unter besonderer Berücksichtigung von *An. plumbeus* erörtert.

2 Bionomie und Verbreitung von *Anopheles plumbeus*

2.1 Einleitung

2.1.1 *Anopheles plumbeus* Stephens (1828)

Die Familie der Culicidae (Stechmücken) ist systematisch der Ordnung der Diptera zugeordnet. Durch ihre morphologischen Merkmale werden die Stechmücken in die Unterordnung *Nematocera* eingegliedert (Becker *et al.*, 2003).

Der Gattung *Anopheles* Meigen (1818) gehören in Deutschland sechs Arten an. Neben *An. plumbeus* Stephens (1828) sind dies: *An. claviger* Meigen (1804), *An. algeriensis* Theobald (1903) sowie die Mücken der Maculipennis-Gruppe: *An. atroparvus* Van Thiel (1927), *An. messeae* Falleroni (1926) und *An. maculipennis s. str.* Meigen (1818). Wie die meisten Anophelinen benötigen auch die Weibchen der oben genannten Spezies eine Blutmahlzeit zur Produktion von Eiern. Diese mit Auftriebskörper versehenen Eier werden einzeln auf die Wasseroberfläche gelegt. Nach Abschluss der Embrionalentwicklung schlüpft die Larve, die sich nach dem vierten Stadium zur Puppe häutet. Aus diesem Ruhestadium schlüpft nach Vollendung der Metamorphose die Mücke. Im Unterschied zu den anderen Vertretern der Culiciden besitzen die *Anopheles*-Larven am VIII-Abdominalsegment kein Atemsyphon, sondern eine Atemplatte (s. Abbildung 1). Dadurch bedingt und unterstützt durch die Palmhaare des Abdomens, hängen die Larven parallel unter der Wasseroberfläche. Zur Nahrungsaufnahme drehen sie ihren Kopf um 180 ° nach oben. Mit ihren lateralen Palatabürsten sind sie nicht nur in der Lage, kleine Staubpartikel als Nahrung von der Wasseroberfläche zu filtern, sie können auch Partikel von festen Strukturen lösen, indem sie diese abbürsten ("brushen"). So weiden sie auch dünne Bakterien- und Pilzrasen ab. Mit der aktiven Bürstbewegung ihrer Mundwerkzeuge können sie auch aus festen Oberflächen verwertbare Nahrungsbestandteile regelrecht herauschaben.

Die Taster (Palpen) der *Anopheles*-Mücken sind, im Gegensatz zu denen anderer Stechmückengattungen, ähnlich lang wie der Stechapparat (s. Abbildung 1 und 3). Während des Fliegens liegen die Taster parallel zum Stechapparat und zeigen in Flugrichtung.

Aufgrund dieser morphologischen Besonderheit, die wie ein Dreizack anmutet, bezeichnete man die Anophelinen auch als Gabelmücken (Martini, 1952). Sitzend sind die Weibchen leicht von anderen Culiciden zu unterscheiden. In der Ruheposition bilden Abdomen, Thorax, Caput sowie Stechapparat eine Linie, während das Abdomenende aller anderen Stechmücken zur Unterlage zeigt (s. Abbildung 2).

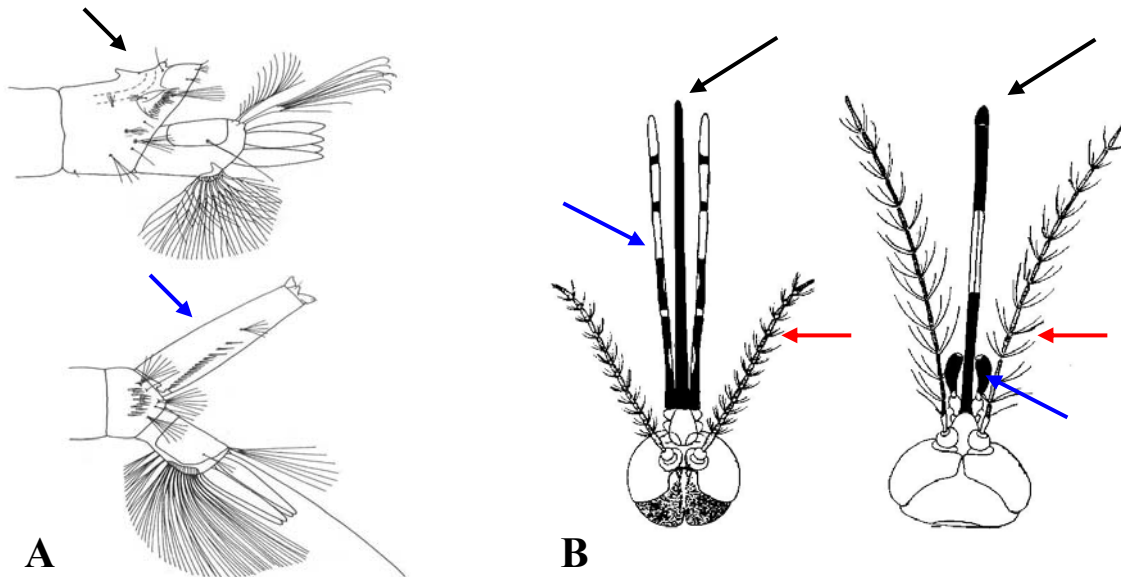


Abb. 1: Bild A: Die Übersichtsskizze zeigt oben die für *Anopheles*-Larve charakteristische Atemplatte am Abdominalsegment VIII (schwarzer Pfeil). Darunter ist als Beispiel aller anderen, an der Wasseroberfläche atmenden *Culiciden*-Larven, der Atemsyphon (blauer Pfeil) einer *Aedes*-Larve abgebildet. Bild B: links ist der Kopf eines *Anopheles*-Weibchens dargestellt. Charakteristisch für diese Gattung ist die Länge der Taster (Palpen) (blauer Pfeil). Diese reichen bis an den Stechapparat (Proboscis) (schwarzer Pfeil) heran. Im Gegensatz (rechte Abbildung) dazu sind bei allen anderen Stechmückengattungen die Taster wesentlich kürzer als der Stechapparat. Die roten Pfeile markieren die Antennen. (Bild A aus Becker *et al.*, 2003, Bild B aus Kettle, 1995)

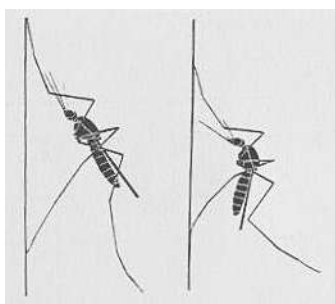


Abb. 2: Das linke Bild zeigt ein *Anopheles*-Weibchen in typischer Ruheposition. Die rechte Mücke zeigt die Sitzposition aller anderen Stechmücken. (Mohrig, 1969)

Haliday beschrieb 1828 erstmalig die Merkmale eines *Anopheles plumbeus*-Weibchens, als er die Ergebnisse seiner Exkursion in den Norden Irlands veröffentlichte. Trotz dieser Kurzbeschreibung hegte er Zweifel an seinen Beobachtungen und damit an der Verschiedenheit seines Exemplars zu *An. bifurcatus* (synonym für *An. claviger*), was ihn

davon abhielt, in seiner Publikation die Art neu zu benennen. Stephens erkannte diesen Unterschied und reagierte im gleichen Journal in einer unmittelbar darauf folgenden Veröffentlichung, indem er der Beschreibung Halidays den Artnamen "*plumbeus*" zuwies.

Staeger beschrieb 1839 ein in Dänemark gefangenes *Anopheles*-Weibchen als *An. nigripes*, ohne dabei zu wissen, dass es sich bei den Exemplaren um die bereits von Stephens benannte Art handelte. Die Ähnlichkeit zu *An. claviger* sowie ihre relative Seltenheit führte bis zur vollständigen Beschreibung aller Stadien und Lebensgewohnheiten immer wieder zu falschen Zuordnungen der meist einzeln gefangenen Exemplare. Erst 1912 griff Edwards die Benennung von Stephens erneut auf und verhalf dadurch der Wiederbelebung und Festigung der Bezeichnung *An. plumbeus* sowie zur Revision der Art *An. nigripes* (Staeger).

Christopher (1916) ordnete nach dem Studium aller Stadien, der von James im Jahre 1911 aus dem westlichen Himalaja stammenden Mücke und als *An. barianensis* (James) beschriebenen Mücke, ebenfalls der europäischen Spezies *An. plumbeus* zu.

Das Vorkommen von *An. plumbeus* erstreckt sich über ganz Europa, das nördliche Afrika bis nach Indien. Angepasst an ihre natürlichen Brutareale kommt sie in Regionen mit Baumhöhlen tragenden Altholzbeständen (s. Abbildung 4 A) bis in alpine Regionen vor. Bedingt durch die begrenzte Kapazität der Dendrothelmen als Larvenbrutstätte, waren bisher keine starken Belästigungen durch diese *Anopheles*-Mücke bekannt. Die Weibchen sind sehr aggressiv in ihren Anflügen, dabei schweben sie eher als dass sie fliegen. So lange der potentielle Blutspender in ihrer Reichweite ist, versuchen sie ihn unbemerkt anzufliegen, um zu stechen. Der Stich selbst ist dabei ohne Reiz und wird von seinem Opfer nicht bemerkt. Umso heftiger ist die Hautreaktion des Opfers auf die in die Haut injizierten Fremdeiweiße des Mückenspeichels. Da der Kontakt mit dieser Mückenspezies, ausgehend von ihren natürlichen Brutarealen, eher selten ist, hat das Wirtsimmunsystem im Allgemeinen nicht die Möglichkeit einer Desensibilisierung gegenüber den Speicheliweißen von *An. plumbeus*.

Das Wasser der Brutstätten ist bedingt durch einen hohen Gehalt an Gerbsäure dunkelbraun gefärbt und weist eine niedrige Sauerstoffkonzentration auf. In Zentraleuropa ist sie meist mit der häufiger vorkommenden Aedini *Ochlerotatus geniculatus* vergesellschaftet. In Ausnahmen, meist in direkter Nähe von Siedlungen, können auch Larven der Hausmücke *Culex pipiens* in den *An. plumbeus*-Brutstätten gefunden werden.

Die Eier besitzen einen weniger stark ausgeprägten Schwimmgürtel und werden nach Mohrig (1969) über der Wasseroberfläche abgelegt. Der ablaufende Regen oder der steigende Wasserspiegel benetzt die Eier und leitet so nach abgeschlossener Embryogenese den Schlupf der Larven ein. Es konnte in Ablageversuchen gezeigt werden, dass die Eier auch auf der

Wasseroberfläche abgelegt werden. *An. plumbeus* überwintert im Ei- oder Larven-Stadium. Anhaltende Frostperioden, in denen die Baumhöhlen durchfrieren, verringern nach Mohrig (1969) das Überleben der im Bodenumulm ausharrenden Larven.

Bereits 1940 konnte Vogel zweifelsfrei *Anopheles*-Larven aus den ausgedienten Färbekammern einer alten Gerberei als *An. plumbeus* bestimmen. Neben unterirdischen Brutstätten werden auch in der Nähe natürlicher Larvenvorkommen gelagerte, wassergefüllte Altreifen zur Eiablage genutzt (Karch, 1995) (s. Abbildung 4 B).

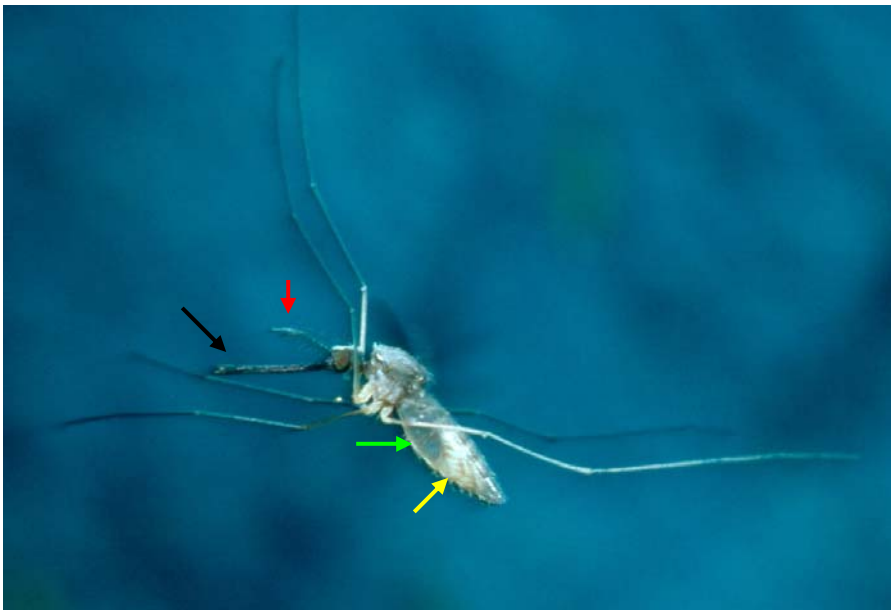


Abb. 3: *An. plumbeus*-Weibchen im Flug. Charakteristisch sind die Palpen, die eng an dem gleichlangen Stechrüssel liegen und mit ihm so eine optische Einheit bilden (schwarzer Pfeil). Deutlich sind die in der Funktion eines Stoßfängers weit abgespreizten drei Beinpaare. Der rote Pfeil markiert die Antennen. Zu sehen sind der mit Zuckerwasser gefüllte Kropf (grüner Pfeil), sowie die als Folge einer Blutmahlzeit gebildeten Eier (gelber Pfeil). Das abgebildete Weibchen war nicht inseminiert. (Kuhn)



Abb. 4: Bild A: Baumhöhle als natürliche Brutstätte von *An. Plumbeus* in einer Rosskastanie (*Aesculus hippocastanum*); der Standort liegt in einem kleinen Park mitten in einem Wohngebiet. Bild B: Wasser gefüllter Autoreifen, der als Ersatz für Baumhöhlen als Brutstätte akzeptiert wird.

2.1.2 Das Stechverhalten

Die meisten Anophelinen saugen an homöothermen Blutspendern, überwiegend werden Säugetiere bevorzugt (Mohrig, 1969; Becker *et al.*, 2003). Stechmücken, die hauptsächlich den Menschen anfliegen, werden in ihrem Verhalten als antropophil bezeichnet. Als zoophil werden diejenigen charakterisiert, die vornehmlich Tiere stechen. Anophelinen, die überwiegend im Freien stechen, werden als exophag bezeichnet. Im Gegensatz dazu werden Mücken, die mit Vorliebe in Gebäuden stechen, als endophag bezeichnet. Unterscheiden lässt sich ebenfalls das Verhalten vor und nach der Blutaufnahme. Sucht eine Mücke Ruheplätze außerhalb von Gebäuden, z. B. in der Vegetation, in Erd- oder Baumhöhlen auf, wird sie als exophil bezeichnet. Mit dem Pendant endophil werden all die Stechmücken bezeichnet, die in oder an Gebäuden ihre Ruheplätze aufsuchen. Diese Verhaltensmuster sind in den meisten Fällen sehr variabel und richten sich nach den örtlichen Gegebenheiten.

Im Gegensatz dazu wird das Zeitfenster, innerhalb dessen eine Art ihren Blutspender anfliegt und sticht, durch die innere Uhr, den circadianen Rhythmus, festgelegt. Die Ausführung wiederum ist abhängig von äußeren Faktoren wie Temperatur, Wind oder Niederschlag. Die überwiegende Anzahl der Anophelinen sticht zwischen der Abend- und Morgendämmerung sowie im Dämmerlicht des Waldes. So sticht *An. albimanus* in den frühen Abendstunden, *An. darlingi* sticht während der ganzen Nacht, gehäuft in der Dämmerungsphase (Tadei, 2000). Eine Ausnahme stellt *An. plumbeus* dar, sie sticht überwiegend während des Tages (s. Kapitel 2.1.1).

Vom Blutspender ausgehende Kohlendioxidemissionen, die Zusammensetzung des Schweißes, sowie Körpertemperatur und Feuchtigkeit bilden die Hauptattractantien für die *Anopheles*-Weibchen. Die unterschiedliche Attraktivität wird dabei mit der individuellen Zusammensetzung des Schweißes begründet (Ciba, 1996).

Zu Beginn des Stiches und während des Blutsaugens sezerniert die Mücke ihren Speichel in den Stichkanal. Die Bestandteile des Speichels hemmen die Blutgerinnung, erweitern die Gefäße und desensibilisieren den unmittelbaren Bereich um den Einstich (Stark, James, 1996). Durch den Saugkanal des Labrums wird das Blut aufgesaugt (Abbildung 6) und gelangt über den Schlund in den Mitteldarm (Abbildung 7). Die nach dem Stich auftretende lokale Schwellung, in Verbindung mit Rötung und Juckreiz, ist eine Immunantwort des Wirtes auf die körperfremden Eiweiße des Mückenspeichels. Über den Mückenspeichel können auch Krankheitserreger auf den Blutspender übertragen werden, wie dies am Beispiel der Malaria in Kapitel 3.1.1 erläutert wird.

Die aufgenommene Blutmenge liegt, in Abhängigkeit von der Mückengröße, zwischen 1 und 2,5 μl . Während des Saugens sind die Anophelinen in der Lage, Teile des Blutserums als durchscheinende Tropfen über den Darm auszuscheiden (s. Abbildung 5). Dadurch erhöht sich die Menge an effektiv aufgenommenen Blutkörperchen. Die mit der Blutnahrung aufgenommenen Proteine und Aminosäuren werden für die Produktion der Eier benötigt. Stechmücken, die für ihre Eiproduktion essentiell eine Blutmahlzeit benötigen, werden als anautogen bezeichnet. Demgegenüber stehen wenige Stechmückenarten, die als autogen bezeichnet werden, sie benötigen für ihr erstes Eigelege keine Blutmahlzeit. Die für die Eibildung eingesetzten Reservestoffe wurden während der Larvenentwicklung aufgenommen. Die Eizahlen der Gelege fallen dabei geringer aus. Für jede weitere Eiproduktion ist auch hier eine Blutmahlzeit zwingend notwendig.

Während eines Gonotrophen-Zyklus können die *Anopheles*-Weibchen mehrere Blutmahle aufnehmen. So konnten Klowden und Briegel (1994) zeigen, dass *Aedes aegypti* und *Ae. albopictus* innerhalb eines Gonotrophen-Zyklus nicht aktiv einen erneuten Blutspender suchen. Im Gegensatz dazu zeigten *An. gambiae*, *An. albimanus* sowie *An. freeborni* auch während der Eientwicklung ein unverändertes Suchverhalten. Bei *An. gambiae*, *An. stephensi* und *An. albimanus* konnten bis zu fünf Blutmahlen pro Zyklus beobachtet werden (Briegel, 1993). Dieses Verhalten begünstigt zum einen die Übertragungsrate eines Erregers auf den Blutspender sowie zum anderen die Reinfektion des Vektors.



Abb. 5: *Anopheles stephensi*-Weibchen, das während der Blutmahlzeit Serum ausscheidet, um dadurch ein größeres Volumen an Blutkörperchen aufnehmen zu können.

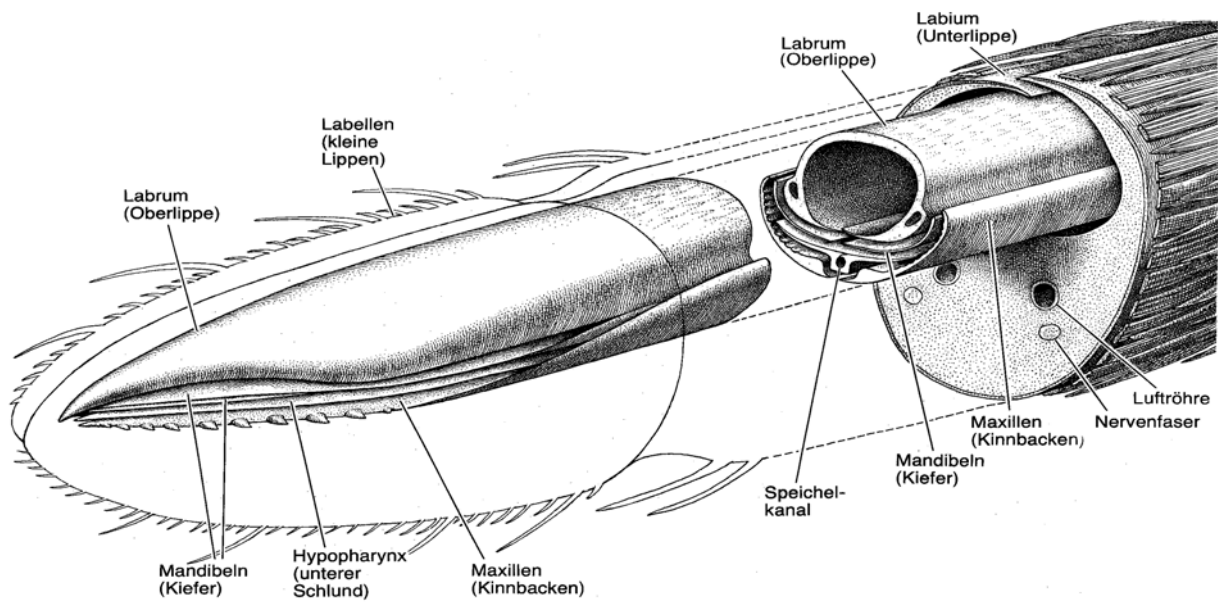


Abb. 6: Die einzelnen Teile des Stechapparates liegen eng beieinander und sind in das Labium eingebettet, die in zwei behaarte, als Sinnesorgane dienende Läppchen, die Labellen, ausläuft. Das Labium umschließt das Nadelbündel. Es besteht aus dem scharf zugespitzten Labrum (Oberlippe), in dem das Blut nach oben gesaugt wird. Die zwei skalpellförmigen Mandibeln (Kiefer) sitzen an den Seiten. Die Maxillen (Kinnbacken) haben scharfe, sägezahnartige Spitzen, mit denen sie sich in die Haut einschneiden. Der flache, spitz zulaufende Hypopharynx (Unterschlund) bildet den Boden des Nadelbündels und enthält den Speichelkanal. (Jones, 1979)

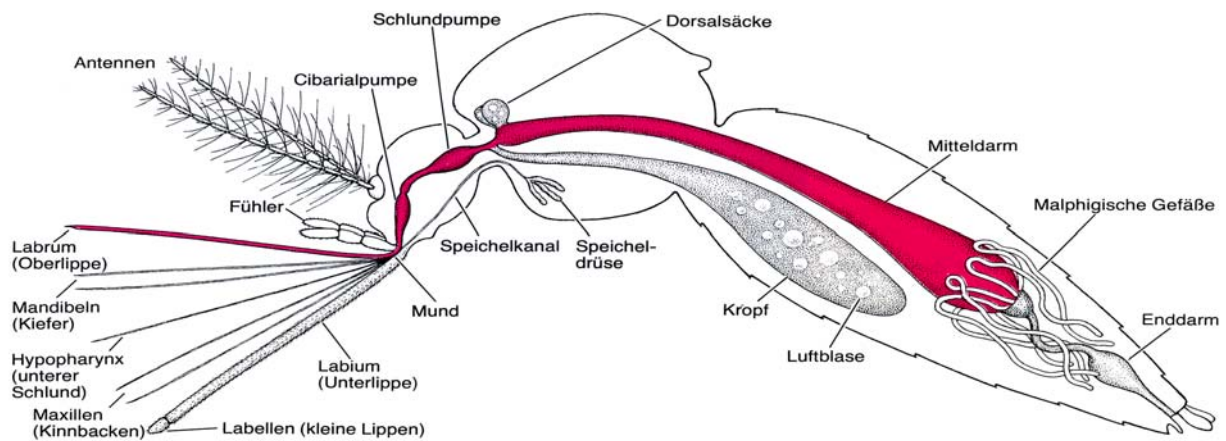


Abb. 7: Anatomie des Stechapparates sowie des Verdauungstraktes einer weiblichen Stechmücke. Mit seinen Antennen kann das Tier Geruchstoffe wahrnehmen. Auf diese Weise erkennt es seine potentiellen Blutspender aus der Entfernung. Mit dem Stechrüssel, der hier in seine Bestandteile aufgeblättert ist, saugt es zuckerhaltige Flüssigkeiten oder Blut. Blut gelangt dabei am Kropf vorbei direkt in den Mitteldarm. (Jones, 1979)

2.1.3 Biologische Stechmückenbekämpfung mit *Bacillus thuringiensis var. israelensis* (Serotyp H-14)

Bei *Bacillus thuringiensis var. israelensis* handelt sich um ein grampositives, peritrich begeißeltes, stäbchenförmiges Bakterium mit einer Größe von ca. 2 x 1 µm. Dieser *Bacillus thuringiensis*-Stamm wurde 1976 von Goldberg und Margalit aus toten *Culex pipiens*-Larven isoliert, die einem Brutplatz in der Wüste Negev entstammten. De Barajac beschrieb diesen als *Bacillus thuringiensis var. israelensis*. Im Gegensatz zu dem im Jahr 1911 von Berliner aus toten Mehlmottenraupen isolierten *Bacillus thuringiensis var. thuringiensis*, konnte bei Bti keine Wirkung auf Lepidopteren nachgewiesen werden. Goldberg und Margalit (1977) entdeckten seine Larvizität gegenüber Culiciden. Eine Bti-Empfindlichkeit konnte bis dato nur bei Nematoceren (*Diptera*) sicher nachgewiesen werden. Dies läßt sich noch weiter eingrenzen: Vertreter der *Culicidae* reagieren höchst sensibel auf Bti. *Simuliidae* und *Chironomidae* werden durch Bti-Konzentrationen getötet, die um das Zehnfache über den für die Culiciden toxischen Konzentrationen liegen. Andere Nematoceren-Familien reagieren noch unempfindlicher oder zeigen überhaupt keine Reaktion auf Bti. (Weiser, Vanková, 1978; Ali, 1980; Morawcsik, 1983; Becker, Margalit, 1993).

Bacillus thuringiensis kann unter ungünstigen Bedingungen Dauerstadien (Sporen) bilden. Gegen Ende der Sporulation wird in der Bakterienhülle ein Proteinkristallkomplex (Parasporalkörper) ausgebildet (s. Abbildung 8). Weder die lebenden Bazillen noch die Sporen sind für Culiciden-Larven toxisch. Die larvizide Eigenschaft ist allein auf den Parasporalkörper (Delta-Endotoxin, Protoxin) beschränkt. Nach oraler Aufnahme wird dieser im alkalischen Darmmilieu durch die Darmproteasen in vier Untereinheiten (Toxine), CryA (125 kDa), Cry4B (135 kDa), Cry10A (58 kDa) zerlegt. Eine fünfte, das CytA-Protein (27 kDa) bindet an Lipide und zeigt nicht den Cry-Protein spezifischen Bindungsmechanismus (Priest 1992). Die aktivierten Cry-Proteine oder auch Endotoxine binden synergistisch an die Glycoproteinrezeptoren des Mitteldarmepithels. Ionenkanäle des angrenzenden Darmepithels werden geöffnet und Ionen strömen unkontrolliert in die Zellen. Das jetzt erhöhte osmotische Potential im Zellinneren bedingt einen Wasserzustrom. Der Zellinnendruck steigt über einen kritischen Wert und die Zelle platzt. Durch die perforierte Darmwand vermischt sich dessen Inhalt mit dem Hämocoel, die Larve stirbt ab. Jede der vier Untereinheiten des Protoxins ist für Stechmückenlarven toxisch, ihre Effizienz liegt allerdings unter der des

Gesamtkomplexes. Dieser Mechanismus erschwert die Ausbildung von Resistenzen (Entwistle *et al.*, 1993).

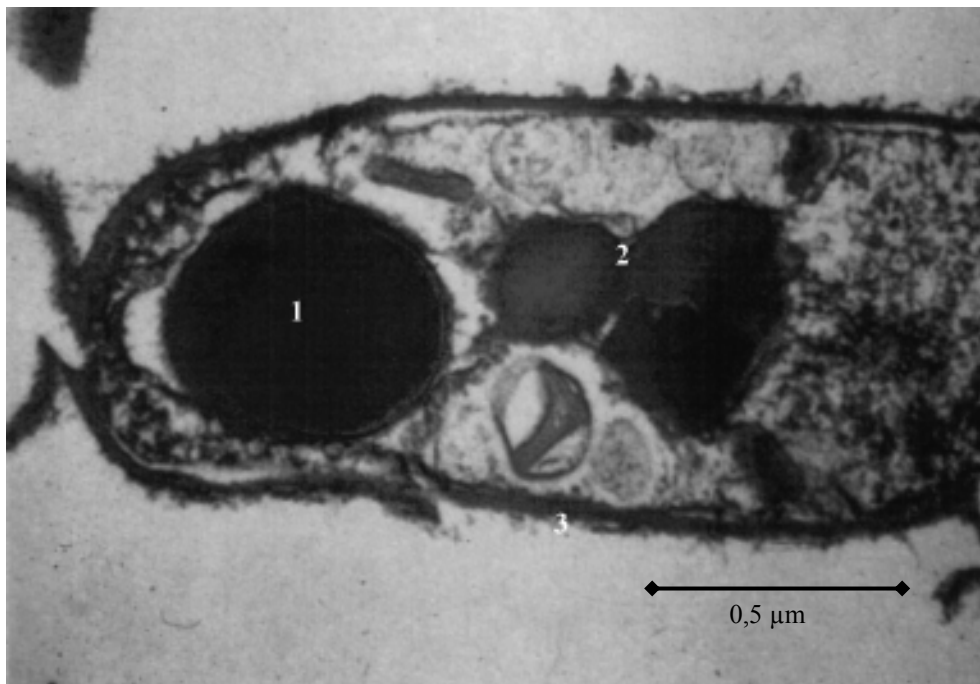


Abb. 8: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Serotyp H-14) nach der Sporulation. 1-Spore; 2-Proteinkristall (Delta-Endotoxin); 3-Bakterienhülle. (KABS)

Durch seine Wirkungsweise ist Bti ein selektives Larvizid. Nur unter der Voraussetzung, dass das Protoxin (Parasporalkörper) durch den pH-Wert im Darm in Verbindung mit den geeigneten Proteasen aktiviert wird und zusätzlich die geeigneten Glycoproteinrezeptoren vorhanden sind, entfaltet es die gewünschte Wirkung. Die als Vektoren und Lästlinge unerwünschten Culiciden und Simuliiden erfüllen diese drei Bedingungen und können aufgrund dieser Eigenschaften erfolgreich mit Bti bekämpft werden. Die Predatoren der Larven werden nicht beeinträchtigt und können so ihren natürlichen Beitrag zur Stechmückenbekämpfung leisten.

Zur Durchführung der Bti-Methode ist der Bekämpfungszeitpunkt für den Erfolg der Maßnahme ausschlaggebend. Die Empfindlichkeit gegenüber Bti sinkt etwa um einen Faktor fünf vom ersten bis zum vierten Larvenstadium (Becker, Rettich, 1994). Zu beachten ist ebenfalls, dass Bti als Fraßstoff Individuen, die sich in der Puppenruhe befinden, nicht beeinflusst. Abhängig von der aufgenommenen Bti-Menge sterben die Larven innerhalb 1 bis 24 Stunden nach der Applikation. Wirkstoff, der nicht aufgenommen wird, sedimentiert. Er unterliegt als Protein den natürlichen Abbauprozessen, die durch Temperatur und Trophiegrad des Gewässers beeinflusst werden.

Für die großflächige Stechmückenbekämpfung in Ökosystemen wird Bti – als einziger für diesen Zweck in Deutschland zugelassener Wirkstoff – am Oberrhein seit 20 Jahren eingesetzt. Resistenzen gegenüber Bti sind nicht bekannt. Vermeintliche Unempfindlichkeiten von Culiciden-Larven gegenüber Bti, die während der Bekämpfungsperiode 1997 auftraten, konnten auf eine zu niedrige Aktivität des Produktes zurückgeführt werden. Da das Ausbringen lebender Bakterien sowie keimfähiger Sporen in Deutschland verboten ist, werden die Bti-Präparate, die keimfähige Sporen enthalten, durch eine 24-stündige Gammabestrahlung mit 28 kGy sterilisiert.

2.2 Methoden

2.2.1 Brutstätten von *Anopheles plumbeus*

Als Brutstätten der *Anopheles plumbeus*-Larven kommen zwei verschiedene Typen in Betracht. Zum einen das ursprüngliche Vorkommen in Baumhöhlen und zum anderen unterirdische Brutstätten, meist ehemalige Güllegruben. Diese Brutstätten gilt es zu lokalisieren.

Ein Teil der untersuchten Dendrothelmen werden im Zuge des präventiven Monitorings eingeschleppter Stechmücken durch Flugzeuge und Altreifen kartiert. Geleitet wird diese Erhebung von Herrn Dr. Roland Kuhn, Universität Mainz, der das Projekt 1997 initialisierte. Ergänzend zu den im Rahmen diese Projektes gefundenen Brutstätten konnten in den Jahren von 1989 bis 2004 im Bereich des Frankfurter Flughafens (Abbildung 9), in der Umgebung des Zementwerkes in Mainz-Amöneburg, Stadtwald Wiesbaden im Bereich Goldgrund sowie im Wald der Gemeinde Böhl/Iggelheim weitere Baumhöhlen kartiert werden.

Zusätzlich wurden künstliche Baumhöhlen in Form von schwarzen Eimern mit 1,5 Liter Volumen in der Funktion als Eifallen (Ovitrap) in Bereichen rund um den Flughafen sowie um das Reifenlager der Zementfabrik aufgehängt (Abbildung 10). Mit einem Sisalstrick, der am Baumstamm ablaufendes Wasser in die künstliche Höhle leitet, wurden die Eimer in einer Höhe von drei bis vier Meter befestigt. Pappelaub sowie ein Stück Pappelborke oder ein gefurchtes Buchenholzbrettchen dienten als Substrat und als Oberfläche zur Eiablage (s. Abbildung 11 links). Eine kleine Öffnung unterhalb des Eimerrandes leitete bei starken Niederschlagsereignissen kontrolliert überschüssiges Wasser ab. Aufgefüllt wurden die Ovitrap mit 1,0 Liter demineralisiertem Wasser.

Die unterirdischen Brutstätten werden zum einen im Rahmen der Stechmückenbekämpfung der KABS (Kommunale Aktionsgemeinschaft zur Bekämpfung der Schnakenplage e.V.), die routinemäßig Befragungen in den Mitgliedsgemeinden nach alten Sicker- oder Güllegruben durchführt, kartiert. Desweiteren werden durch Stechmücken hervorgerufene Belästigungen außerhalb des KABS-Gebietes an die Organisation herangetragen. In zunehmendem Maße handelt es sich bei der Plage erregenden Stechmückenart um die Spezies *Anopheles plumbeus*. Hier gilt es, möglichst umfangreiche Daten im Biotop der Mücken zu erheben. Nach sorgfältiger Recherche und Begutachtung vor Ort werden in den Jahren 1998 bis 2004 *An.*

plumbeus-Vorkommen in der Innerschweiz, in der Ostschweiz, in den Kreisen Freiburg, Freudenstadt, Schwäbisch Hall sowie im Rems-Murr-Kreis, nach Norden im Rhein-Taunus-Kreis und im Rhein-Lahn-Kreis sowie im Westen in den Kreisen Germersheim und Birkenfeld in die Studie mit einbezogen.

In den Larven-Brutstätten werden abiotische Parameter wie Temperatur, pH-Wert und Sichttiefe gemessen. Neben der Besatzdichte der Larven wird die Brutstätte auf sympatrische Culiciden-Arten untersucht. Ist eine Brutstätte lokalisiert, wird im näheren und weiteren Umfeld des Vorkommens nach weiteren Gruben gesucht und von diesen ebenfalls detaillierte Daten erhoben. Die Brutstätte der Larven ist nur ein Teil des Biotops von *An. plumbeus*. Ergänzend dazu wird der mückenspezifische Teil des Lebensraumes auf potentielle Blutspender, Aufenthaltsplätze der Mücken - inklusive deren Mikroklima - sowie der Aktionsradius der Mücken untersucht. Um eine Aussage über den Besiedelungszeitpunkt der betroffenen Grube und damit über die Bestandsentwicklung machen zu können, werden die Anwohner nach dem Zeitpunkt der Belästigungen und deren Verlauf befragt.

Schwieriger zu lokalisieren sind Baumhöhlen, in denen die Spezies *Anopheles plumbeus* brütet. Sie basieren meist auf Zufallsfunden oder auf gezielter Suche in besonders für Baumhöhlen prädestinierten alten Buchenbeständen. Auch hier werden abiotische und biotische Daten erhoben.

Aus den Brutstätten werden Larven abgesammelt und im Labor aufgezogen. Es soll dabei versucht werden, eine *An. plumbeus*-Kolonie unter Laborbedingungen zu etablieren. Des Weiteren werden die Entwicklung der Larven, ihr Fressverhalten sowie die Überwinterungsstrategien der Mückenart untersucht.

2.2.2 Versuche zur Etablierung einer Laborkolonie von *Anopheles plumbeus*

2.2.2.1 Larvenaufzucht

Die Larven werden aus ihren Brutbiotopen entnommen und im Labor bei 18° C Wassertemperatur aufgezogen. Als Aufzuchtmedium wird, wie bei der Aufzucht der Anophelinen üblich, demineralisiertes Wasser verwendet. In einer zweiten Versuchsanordnung werden dem demineralisiertem Wasser 10 Gramm Meersalz pro Liter (10 ‰) zugegeben. Zum anderen werden die Larven im Nährmedium ihres Ursprungsbiotopes aufgezogen. Dieses wurde zu Beginn mit maximal fünf Teilen demineralisiertem Wasser verdünnt. Während der Larvenaufzucht verdunstende Flüssigkeit wird mit demineralisiertem Wasser ersetzt.

Aufgezogen werden je 100 Larven in 21x18x10 cm (LxBxH) großen Schalen mit 2 Litern Flüssigkeit. Die Fütterung erfolgt wahlweise mit Katzentrockenfutter (Brekki[®]) oder mit Staubfischfutter (MicroMin[®] Baby).

2.2.2.2 Reproduktion von *An. plumbeus*

Um eine zuverlässige Ressource für die Infektionsversuche zu haben, werden Versuche zur Etablierung einer *Anopheles plumbeus*-Kolonie im Labor durchgeführt. Als Basis für diese Versuchsreihen werden in Baumhöhlen und in Gruben brütende Populationen aus unterschiedlichen Standorten verwendet. In einem ersten Versuchsansatz werden Viertlarven und Puppen in einen 40 x 50 x 60 cm (LxBxH) großen Käfig verbracht. Aus den fünf Grubenpopulationen werden je 1.000 Individuen bereitgestellt. Da das Larvenpotential der drei Baumhöhlenpopulationen weitaus geringer als das der Grubenbiotope ist, werden, ohne das natürliche Vorkommen zu schwächen, aus den drei Verbreitungsgebieten 300 Larven verwendet. Die Versuche werden mehrmals wiederholt.

In einer zweiten Versuchsreihe werden in drei Ansätzen jeweils 10.000 Viertlarven und Puppen aus drei Grubenpopulationen in ein Netz mit 3 Meter Durchmesser und einer Länge von 6 Metern überführt. Die Stadien können sich in der im Netz aufgestellten Miniatur-Grube in Form einer zylindrischen Kunststofftonne (Durchmesser 80 cm), die mit minimalen Ein-

und Ausflughöffnungen ausgestattet ist, zu Imagines entwickeln (siehe Abbildung 17). Das Nährmedium mit einem Volumen von 30 Litern ist eine Mischung aus zwei Teilen demineralisiertem Wasser und einem Teil Gülle aus der Ursprungsgrube.

Den *Anopheles*-Mücken wird Watte, getränkt mit demineralisiertem Wasser und einer 10 prozentigen Saccharoselösung, die beide täglich erneuert werden, angeboten. Ergänzend werden die Mücken mit Honig, der auf kleinen Schwämmen aufgetragen ist, ernährt. Die erste Blutfütterung findet 10 Tage nach Schlupf der Mücken statt und wird am darauf folgenden Tag wiederholt. Die nächste Blutfütterung erfolgt jeweils 3 Tage nach dem letzten Blutmahl an 2 aufeinander folgenden Tagen. In den Käfigen stehen nach der letzten Blutfütterung zur Eiablage ein Zentimeter hoch gefüllte, innen mit Filterpapier ausgeschlagene dunkle Becher (Durchmesser 80 mm) bereit. In den Freilandversuchen werden schwarze 1,5 Liter-Eimer verwendet, die mit 5 cm Wasser gefüllt und ebenfalls mit Filterpapier ausgeschlagen sind. Diese werden auch drei Tage nach der letzten Blutmahlzeit aufgestellt.

2.2.3 Untersuchung zur Entwicklungs- und Lebensdauer von *Anopheles plumbeus*

2.2.3.1 Temperaturabhängige Entwicklung der *An. plumbeus*-Larven

Für die Infektionsversuche mit *P. falciparum* müssen die benötigten *An. plumbeus*-Weibchen zuverlässig verfügbar sein. Wie in Kapitel 2.3.1.4 gezeigt wird, konnte aus keiner der untersuchten Populationen eine Kolonie im Labor etabliert werden. Die Lebensdauer der Imagines ist nur auf wenige Wochen begrenzt. Larven entwickeln sich in Abhängigkeit von der Temperatur, wobei niedrigere Temperaturen das Larvenwachstum verzögern. In einer Versuchsreihe soll der Einfluss niedrigerer Temperaturen auf die Dauer der Larvenentwicklung untersucht werden.

Je 200 Drittlarven aus Gruben der zwei Vorkommen Freudenstadt und Germersheim, sowie je 50 Drittlarven aus den Baumhöhlenvorkommen Wiesbaden Goldgrund und Mainz-Amöneburg werden bei 11° C (+/- 1° C) auf ihre Entwicklungsgeschwindigkeit hin untersucht. Die Larven aus den Grubenpopulationen werden in einen Liter unverdünnter Nährlösung aus ihrem Ursprungsbiotop gesetzt. Aus den Baumhöhlen können, um die Zönose nicht zu gefährden, nur geringe Volumina entnommen werden. Aus diesem Grund werden für die Versuche 250 ml Baumhöhleninhalt mit 750 ml demineralisiertem Wasser gemischt. Um die Verdunstung zu verhindern, werden die 21x18x10 cm (LxBxH) großen Schüsseln mit einem Deckel verschlossen. In wöchentlichen Intervallen werden diese auf vorhandene Puppen untersucht. Die Fütterung der Larven erfolgt in 14-tägigem Rhythmus mit 27 mg Brekkis[®] pro Zehn Larven. Die Versuchsreihe endet, nach dem alle Larven verpuppt sind.

In einer zweiten Testreihe mit gleichem Versuchsaufbau wird die Dauer der Larvenentwicklung bei 4° C (+/- 1° C) untersucht. Allerdings werden, im Unterschied zu dem oben beschriebenen Versuch, die lebenden Larven in Intervallen von 14 Tagen gezählt.

Die verwendeten Larven wurden Ende Juli gesammelt und stammen somit aus der Sommergeneration der Populationen.

2.2.3.2 Untersuchungen zur Lebensdauer der weiblichen Imagines

Die Lebensdauer der Mückenweibchen soll in zwei unterschiedlichen Temperaturregimen untersucht werden. Dabei wird ein dem natürlichen *An. plumbeus*-Vorkommen ähnliches Temperaturregime nachgestellt. Dazu wird eine Tagestemperatur von 21° C (+/- 1° C) und einer Nachtabenkung von 3° C auf 18° C (+/- 1° C) in einem Tag-Nacht-Rhythmus von 14 zu 10 Stunden aufrechterhalten. Ergänzend zu den idealisierten natürlichen Temperaturbedingungen der Anophelinen wird die Lebensdauer der Mücken bei 26° C (+/- 1° C), einer für die *P. falciparum*-Entwicklung idealen Temperatur, untersucht. Die vorgegebene Temperatur bleibt dabei ohne Berücksichtigung des Tag-Nacht-Rhythmus konstant.

Gehalten werden die Mücken in 50x60x60 cm (LxBxH) großen Gaze Käfigen und mit einer 10 prozentigen Saccharoselösung sowie auf einem Schwämmchen aufgetragenem Honig ernährt. Das für die Mücken essentielle Trinkwasser und die Zuckerlösung werden jeden zweiten Tag, der Honig im Abstand von 7 Tagen erneuert. Die Beleuchtung wird in einem Langtagesrhythmus 14 zu 10 Stunden gesteuert. Die relative Luftfeuchte liegt bei 70 % (+/- 5 %).

Unabhängig voneinander werden die Versuche mit 30 weiblichen Mücken aus Baumhöhlen- sowie je 100 Weibchen aus Grubenpopulationen durchgeführt.

2.2.4 Frostresistenz bei *Anopheles plumbeus*-Larven

Für die Versuche standen Larven aus den Grubenvorkommen Germersheim und Freudenstadt zur Verfügung. Die Larven im dritten Stadium wurden mit 2 Liter Gülle aus ihrem Ursprungsbiotop in eine verschließbare Schale überführt und an einer meist schattigen Stelle im Freien platziert. Mit einem Deckel wurde die Verdunstung des Schaleninhaltes vermindert. Die Anzahl der Larven aus dem Grubenbrutplatz betrug 200 je Schüssel.

Aus den Baumhöhlenpopulationen Böhl/Iggelheimer Wald und Flughafen Frankfurt wurde jeweils eine Schüssel mit je 30 Larven besetzt. Während des Beobachtungszeitraumes werden die Schalen jeden zweiten Tag geöffnet und überprüft. Einmal alle 14 Tage werden die Larven der Baumhöhlenpopulation mit einem Pellet (270 mg) Katzentrockenfutter gefüttert. Die größere Anzahl an Larven aus den Gruben werden mit einem Pellet (270 mg) pro Schüssel alle 7 Tage gefüttert. Die Tages- und Nachttemperaturen werden mit einem Minimum-Maximum-Thermometer gemessen. Nach Ende der Frostperiode werden die überlebenden Larven ausgezählt.

Ergänzend zu den Versuchen unter natürlichen Witterungsbedingungen soll eine Dauerfrostperiode bei -20°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) über eine Dauer von 14 Tagen simuliert werden. Dazu werden insgesamt sechs Kunststoffdosen mit je 20 Larven in 200 ml Wasser 2 Tage bei $+4^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) kühl gestellt und anschließend in einem Gefrierschrank bei -20°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) eingefroren. Damit die Präparate während der Frostzeit nicht austrocknen, werden die Dosen mit einem Deckel verschlossen. Nach Ende des Versuchszeitraumes werden die Dosen über einen Zeitraum von 24 Stunden vorsichtig bei 0 bis 4°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) aufgetaut und die lebenden Larven gezählt.

2.2.5 Bio-Assays mit Bti

2.2.5.1 Allgemein

Die Empfindlichkeit von *Anopheles plumbeus* gegenüber *Bacillus thuringiensis* serotyp H14 (Bti) ist noch nicht bekannt. Mit einer Reihe von Untersuchungen soll die Sensibilität der Anopheline gegen den Bti-Standard IPS 82 (strain 1884) bestimmt werden. Seine Aktivität ist mit 15.000 ITU/mg gegen *Aedes aegypti* festgelegt, dieser Wert dient als Vergleichsmaßstab für alle produzierten Bti-Produkte.

Die Bio-Assays werden in Anlehnung an die Richtlinien der WHO (1996) durchgeführt.

2.2.5.2 Herstellung der Bti-Stammlösung

In einer 20 ml Schraubdeckelglasflasche werden 50 mg des Bti-Standards eingewogen. Dieser wird mit 10 ml deionisiertem Wasser unter Zuhilfenahme von 15 Glasperlen (Durchmesser 6 mm) für 10 Minuten auf einem Vortex-Schüttler bei 700 Umdrehungen pro Minute durchmischt. Dieses Homogenat kann, ohne seine Aktivität zu verlieren, bei 4° C mehrere Monate aufbewahrt werden. Von dieser Ausgangslösung wird eine Verdünnung 1:100 mit deionisiertem Wasser in einem Gesamtvolumen von 10 ml hergestellt. Vor ihrer Verwendung muss diese Stammsuspension zwei Minuten auf einem Vortex-Schüttler bei maximaler Geschwindigkeit suspendiert werden.

2.2.5.3 Versuchsaufbau der Bio-Assays

Plastikbecher mit einem Eichvolumen von 200 ml werden mit 148 ml deionisiertem Wasser gefüllt. In jeden Becher werden 15 *An. plumbeus*-Larven im dritten Stadium mit 2 ml deionisiertem Wasser pipettiert. Dem Gesamtvolumen von 150 ml werden nun zur Einstellung der gewünschten Bti-Konzentrationen die in Tabelle 1 aufgeführten Mengen der Stammsuspension hinzupipettiert.

Für jede Konzentration sowie für die Kontrolle werden vier Ansätze vorbereitet. Die Assays werden an den zwei aufeinander folgenden Tagen wiederholt, so dass für jede Konzentration insgesamt 12 Becher mit Larven ausgewertet werden.

Die überlebenden Larven werden 24 und 48 Stunden nach der Bti-Exposition ausgezählt. Mit Hilfe einer Log-Probit-Analyse werden die LC-Werte errechnet.

Bti-Konzentration	0,008 mg/l	0,01 mg/l	0,02 mg/l	0,03 mg/l	0,04 mg/l	0,05 mg/l	0,075 mg/l	0,1 mg/l
Volumen der Stammsuspension	24 µl	30 µl	60 µl	90 µl	120 µl	150 µl	225 µl	300 µl

Tabelle 1: Die Tabelle gibt die zur Einstellung der Konzentrationen (in mg/l \equiv ppm) benötigten Volumina Stammsuspensionen in µl an. Die Werte beziehen sich auf ein Endvolumen 150 ml.

2.3 Ergebnisse

2.3.1 Biologie von *Anopheles plumbeus*

2.3.1.1 Wald- oder parkgebundenes Vorkommen

2.3.1.1.1 Dendrothelmen als Brutareale

Die natürlichen Brutbiotope der *Anopheles plumbeus*-Mücke sind Baumhöhlen. Die Biozönose der Dendrothelmen wurde unter besonderer Berücksichtigung der Culicide *Anopheles plumbeus* untersucht. Insgesamt konnten 154 Baumhöhlen in dem Erhebungszeitraum Zeitraum gefunden und in die Auswertung mit einbezogen werden. Exemplarisch ist in Abbildung 10 ein Teil der potentiellen Brutstätten in der Umgebung des Flughafens Frankfurt dargestellt.



Abb.9: Linkes Bild: Absaugen des Baumhöhleninhalts mittels Unterdruck in einen Schraubbehälter. Nach ausgiebiger Auswertung (rechts oben) wurde eine *An. plumbeus*-Larve im II. Stadium (blauer Pfeil) sowie zwei durch schwarze Pfeile gekennzeichnete *Prionocyphon*-Larven (*Helodidae*, *Coleoptera*) entdeckt.

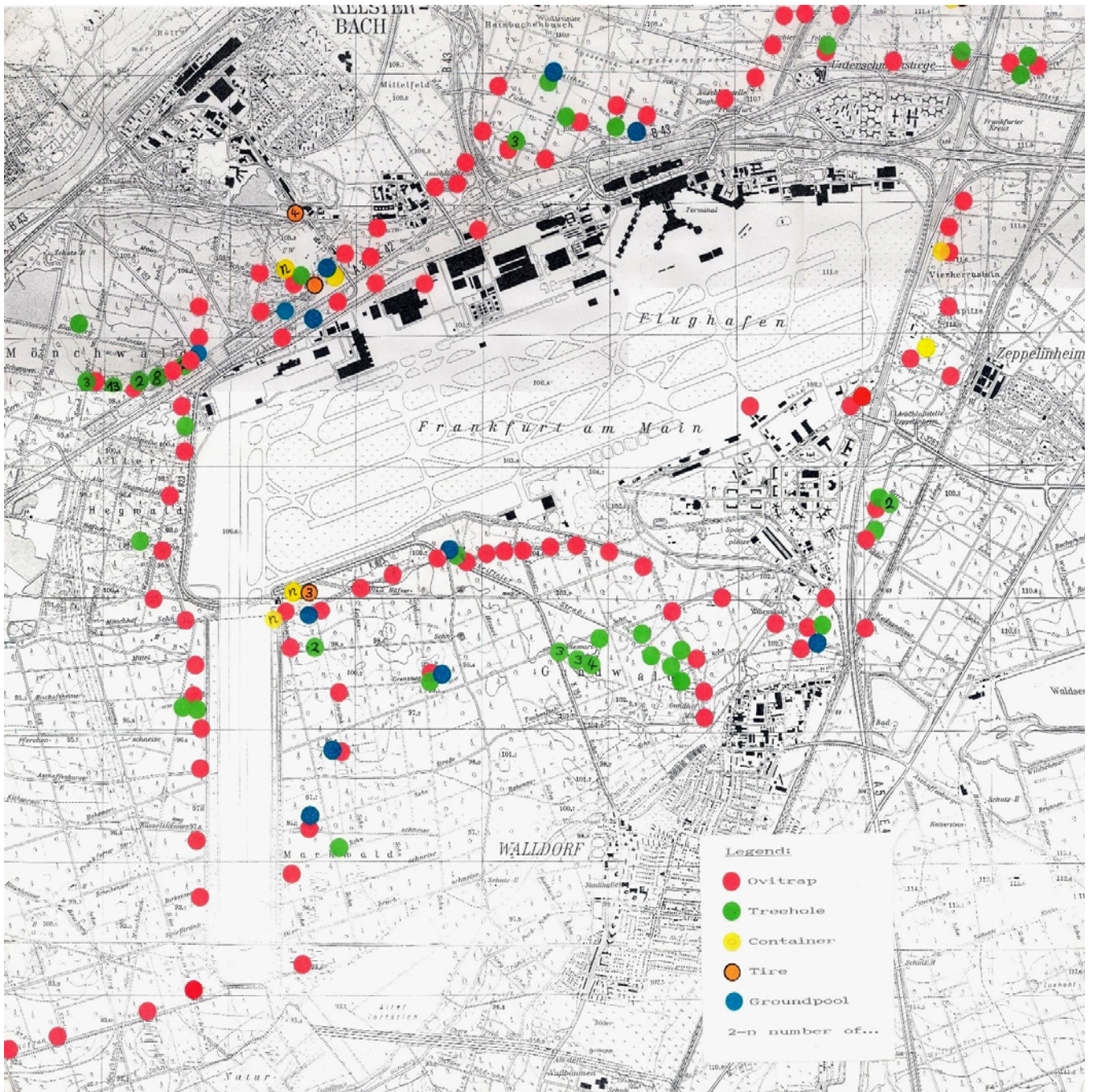


Abb. 10: Die Abbildung zeigt die um das Untersuchungsgebiet kartierten Baumhöhlen (grüne Punkte), die aufgehängten Ovitrap (rote Punkte) sowie Reifen (orangefarbene Punkte), Tümpel (blaue Punkte) und sonstige Container (gelbe Punkte).

Der Baumhöhleninhalt wurde durch einen Schlauch per Unterdruck in einen Schraubbehälter gesaugt (Abbildung 9) und über ein Edelstahlsieb mit einer Maschenweite von 0,1 mm gefiltert. Der Rückstand im Sieb wurde zur Auswertung in demineralisiertem Wasser aufgeschwemmt. Um einen möglichst großen Teil der Culiciden zu registrieren, wurde die Baumhöhle mit demineralisiertem Wasser aufgefüllt und erneut abgesaugt. Nach der Auswertung wurde der entnommene Baumhöhleninhalt wieder in diese zurück geschüttet.

Mit 129 befand sich der überwiegende Anteil an Baumhöhlen in Buchen (*Fagus sylvatica*), 18 wurden in Hainbuchen (*Carpinus betulus*), 2 in Rosskastanien (*Aesculus hippocastanum*), 2 in Roteichen (*Quercus rubra*) und 2 in Stieleichen (*Quercus robur*) sowie 1 in Schwarzerlen (*Alnus glutinosa*) gefunden. Von den insgesamt 154 routinemäßig kontrollierten Baumhöhlen konnten in 22 keine *Culiciden* nachgewiesen werden. In 55 der Baumhöhlen wurden Larven von *Ochlerotatus geniculatus* gefunden. In weiteren fünf Höhlen waren diese mit Larven der Gattung *Culex* vergesellschaftet. Larven der Zielart *An. plumbeus* wurden in 72 Baumhöhlen gefunden. Diese waren in allen Brutplätzen mit den Larven der Art *Ochlerotatus geniculatus* vergesellschaftet, in zwei Baumhöhlen konnten zusätzlich während eines Sommers Larven von *Culex pipiens* gefunden werden. Auffallend war, dass in vier Bereichen die *An. plumbeus*-Populationen so stark waren, dass dort über den gesamten Beobachtungszeitraum Larven in allen Baumhöhlen nachgewiesen werden konnten. Die Besatzdichten der *An. plumbeus*-Larven konnten dabei sehr stark schwanken. In Baumhöhlen, die isoliert von anderen *An. plumbeus*-Brutstätten und damit nicht im Hauptverbreitungsgebiet lagen, konnten über Wochen keine Larven gefunden werden. So wurden in einer Baumhöhle über einen Zeitraum von 28 Monaten keine dieser *Anopheles*-Larven nachgewiesen. *Oc. geniculatus*-Larven waren in dieser Brutstätte immer nachzuweisen. Die Höhenverteilung der untersuchten Dendrothelmen erstreckte sich vom Fuße der Bäume bis in eine Höhe von ca. 4 Metern. Es konnte dabei keine höhenspezifische Bevorzugung der Brutstätten festgestellt werden.

Die gemessenen pH-Werte lagen im Bereich zwischen 7,4 und 8,5. Damit zeigten *An. plumbeus* sowie *Oc. geniculatus* eine hohe Toleranz gegenüber alkalischen pH-Werten. Aus den gemessenen pH-Werten konnten keine baumhöhlenspezifische Präferenz von *An. plumbeus* abgeleitet werden.

Die Baumhöhlen waren im Winter bei Temperaturen unterhalb von -5°C durchgefroren. Mit beginnendem Frühjahr wurden in den Baumhöhlen *An. plumbeus*-Larven der Stadien eins bis drei nachgewiesen. Dies zeigte deutlich, dass diese Larven den Dauerfrost im Eis überlebten (s. auch Kapitel 2.3.1.5).

In niederschlagsarmen Zeiten trockneten viele Baumhöhlen, bedingt durch ihr geringes Volumen, aus und wurden erst bei einsetzendem Regen mit Wasser, das über die Rinde des Baumes abläuft, gefüllt. In Baumhöhlen, die komplett austrockneten, ohne dass Restfeuchtigkeit im Mulm oder an der Wand verblieb, wurden auch sieben Tage nach erneuter Überschwemmung keine Larven gefunden. Bei den Brutstätten, bei denen über einen Zeitraum bis zu 4 Wochen kein Wasser, sondern nur feuchter Mulm am Grund der Höhle war, konnten bis sieben Tage nach künstlicher Flutung keine Larven nachgewiesen werden. Wenn hingegen der freie Wasserkörper in der Höhle verdunstet und der Mulm am Grund noch mit Wasser durchsetzt war, wurden überlebende Larven nach Auffüllen mit Wasser nachgewiesen. Aber auch hier konnte kein Nachweis auf Erstlarven, die aus Eiern, welche vorher an der Höhlenwand abgelegt wurden und erst nach Überflutung dieser Eier schlüpfen, erbracht werden; während in Höhlen, die bedingt durch ihre Struktur und Lage das ganze Jahr über mit Wasser gefüllt waren, frisch geschlüpfte Erstlarven nachgewiesen wurden. Dieser Befund zeigte, dass es wie bei allen Vertretern der Gattung *Anopheles*, auch bei *An. plumbeus* keine Trockenresistenz der Eier gibt. Ganz im Gegensatz zu *Oc. geniculatus*: bei Flutung trocken gefallener Baumhöhlen konnten in einigen Fällen bereits 24 Stunden danach Erstlarven nachgewiesen werden.

Das Volumen der Baumhöhlen variierte zwischen wenigen Dezilitern bis zu 13 Litern. Die Larvendichte war abhängig vom Volumen der Baumhöhle sowie der Oberfläche des Wasserkörpers. Während einer Bestandserhebung konnten in einer Baumhöhle mit 12,5 Liter Inhalt und einer Fläche von ca. 700 cm² bei den Erhebungen der Larvenanzahl maximal 493 *An. plumbeus*-Larven der Stadien eins bis drei gezählt werden. In dieser Höhle, die auch während langer Trockenperioden ausreichend Wasser führte, waren immer Larven vorhanden. Ohne Berücksichtigung des Höchstwertes wurden in dieser Baumhöhle über den gesamten Beobachtungszeitraum gesehen zwischen 50 und 353 Larven gezählt. Eine der kleineren Höhlen war, bei einem Volumen von ca. 0,2 l und einer Oberfläche von ca. 12 cm², mit maximal 23 *An. plumbeus*-Larven besetzt.

2.3.1.1.2 Künstliche Baumhöhlen als Brutstätten

Die entlang des Flughafens und der Reifenlagerstätte (s. Abbildung 11) zum Nachweis eingeschleppter Stechmücken aufgestellten künstlichen 163 Eiablage- bzw. Brutmöglichkeiten (Ovitrap) besaßen eine große Attraktivität für die in Baumhöhlen

brütenden Culiciden *An. plumbeus* und *Oc. geniculatus*. In 44 der 121 Ovitrapps wurden Larven von *An. plumbeus* vergesellschaftet mit *Oc. geniculatus* gefunden. Zusätzlich konnten in drei dieser 44 künstlichen Brutstätten Larven von *Cx. pipiens* bestimmt werden. Lediglich in zwei der Ovitrapps wurden ausschließlich Larven von *An. plumbeus* gefunden und das, obwohl sich in unmittelbarer Nähe eine Baumhöhle befand, in der die Larven von beiden Arten, *An. plumbeus* und *Oc. geniculatus*, vorkamen. *Oc. geniculatus* brütete in 63 der künstlichen Baumhöhlen ohne *An. plumbeus*, dafür aber in acht Fällen zusammen mit *Cx. pipiens*. In 12 Ovitrapps wurden zu keinem Zeitpunkt Culiciden nachgewiesen. Ähnlich wie im Falle der Baumhöhlen, konnten auch bei den Ovitrapps keine detaillierten Erkenntnisse über die Bevorzugung bestimmter Brutstätten gewonnen werden.



Abb. 11: Das Bild links zeigt eine künstliche Baumhöhle. Bestehend aus einem Eimer, gefüllt mit Wasser und Blättern. Als Anflug- und Eiablagehilfe diente hier ein auf der Unterseite gefurchtes Buchenholzbrettchen (s. Pfeil). Rechts ist die Falle an einer Rosskastanien (*Aesculus hippocastanum*) befestigt. Im Hintergrund ist ein Bruchteil der Reifen der Zementfabrik sichtbar.

2.3.1.1.3 Autoreifen und Tümpel als Brutstätten

Ergänzend zu den baumgebundenen Brutstätten wurden Tümpel und Reifen auf *An. plumbeus*-Larven untersucht. In den Tümpeln, die meist nur temporär Wasser führten, konnte kein Nachweis auf Larven erbracht werden. Die Untersuchungen der Altreifen waren

hingegen erfolgreich. So konnten in zwei von sieben einzelnen im Wald liegenden Reifen sowie bei einer einmaligen, vom Betreiber des Zementwerkes zugelassenen Begutachtung der dortigen Reifenberge (s. Abbildung 11 rechtes Bild) *An. plumbeus*-Larven gefunden werden. Vergesellschaftet waren diese mit Larven von *Cx. pipiens* oder *Oc. geniculatus*.

2.3.1.1.4 Larvenentwicklung und Flugaktivität

Die Altersstruktur der *An. plumbeus*-Larven in ihrem Biotop, und damit die nachgewiesenen Entwicklungsstadien, sind jahreszeitenabhängig. So wurden, je nach Temperaturen der Vormonate von Februar bis April, vermehrt Puppen und Viertlarven gefunden. Eine vergleichbare Entwicklungsstadienstruktur innerhalb der Zönose wurde in den Monaten August bis Oktober beobachtet. In den Sommer- und Wintermonaten setzten sich die Larvenpopulationen hauptsächlich aus Erst- bis Drittlarven zusammen. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass die Hauptflugzeit der *An. plumbeus*-Imagines im Frühjahr und Herbst liegt (s. auch Kapitel 2.3.1.1.1).

Innerhalb des fünfjährigen Untersuchungszeitraumes konnten lediglich 11 *An. plumbeus*-Weibchen bei Stechversuchen gezählt werden. Neun Anflüge wurden im Frühjahr, also während der ersten Aktivitätsphase der Mücken, und zwei während der Herbstaktivitätsphase registriert. In den Wald- und Parkbereichen waren während des Sommers, bedingt durch die hohen Temperaturen sowie der geringen Luftfeuchte, keine adulten *An. plumbeus*-Mücken aktiv.

Im Gegensatz dazu kam es in der Nähe von *Oc. geniculatus*-Brutbiotopen während der gesamten Vegetationsperiode zu sehr aggressiven Stechversuchen dieser Culiciden-Weibchen.

2.3.1.2 *An. plumbeus* in der Nähe menschlicher Behausungen

2.3.1.2.1 Brutstätten

Die Suche nach den Brutbiotopen der *An. plumbeus*-Mücke nahm in allen Fällen ihren Anfang bei Hinweisen mückengeplagter Anwohner. Nach Auswertung von Umgebungsplänen und Begehung der betroffenen Gebiete wurden Jauche- und Abwassergruben kartiert und auf ihren Culiciden-Besatz hin untersucht.

In den zehn voneinander unabhängigen Gebieten konnte *An. plumbeus* in 28 von 54 Gruben zweifelsfrei nachgewiesen werden. 15 dieser Gruben beinhalteten nur Larven von *An. plumbeus*. In 13 Gruben war *An. plumbeus* mit *Culex*-Larven vergesellschaftet; zwei von diesen enthielten zusätzlich *Culiseta*-Larven. Zusätzlich wurden in einer Grube Larven von *Oc. geniculatus* gefunden.

Das untersuchte grubengebundene Verbreitungsgebiet von *An. plumbeus* erstreckte sich bis auf eine Höhe von 920 Meter.

Im Gegensatz zur Entwicklung der Hausschnaken (*Culex* und *Culiseta*) verlief im Jahresverlauf die Entwicklung des überwiegenden Teils der *An. plumbeus*-Larven einer Brutstätte synchron. Über den Winter entwickelten sich die Larven, die aus den im Herbst abgelegten Eiern zeitnah schlüpften. Die Mehrzahl der Larven verpuppten sich in Abhängigkeit der Temperatur von Anfang April bis Mitte Mai. Nach dem Schlupf der Puppen schwammen, relativ zur Anzahl derer, die ihre Entwicklung abgeschlossen hatten, wenige Zweit- und Drittlarven im Brutbiotop. Diese schlossen ihre Entwicklung mit mehrwöchiger Verzögerung ab. Etwa 3 bis 4 Wochen nach dem Ausschwärmen der ersten Generation des Jahres war die zweite Generation aus ihren Eiern geschlüpft. Die Larven entwickelten sich bis zum Spätsommer und verpuppten sich mit zurückgehenden Tagesdurchschnittstemperaturen Ende August bis Anfang Oktober. Auch hier konnten nach der Hauptschlupfphase wenige Larven gezählt werden, die ihre Entwicklung noch nicht vollendet hatten. Es konnte nicht beobachtet werden, dass diese Larven vor Einbruch des Winters ihre Entwicklung vollendeten und sich verpuppten.

Die Gruben boten während des gesamten Jahres ideale Entwicklungsbedingungen für die *An. plumbeus*-Larven. In den Gruben herrschten immer optimale Temperaturen. Bis auf eine Grube, die aufgrund ihrer ungünstigen besonnten Lage und Bauart 20,5° C aufwies, lag die Temperatur aller anderen Gruben im Sommer zwischen 11 und 18° C. Auch bei Temperaturen von -21° C im Winter sank die Temperatur in den Gruben, bedingt durch die biologische Aktivität des Inhalts sowie durch ihre Lage im Erdreich, nicht unter 6° C. Zudem ließ das kontinuierliche Wachstum der Larven auch in sehr hohen Besatzdichten (siehe unten) über mehrere Jahre auf eine optimale Nahrungsversorgung schließen.

An. plumbeus-Larven zeigten eine große Akzeptanz für alkalische Hydroniumionenkonzentrationen. Mit gemessenen pH-Werten von 9,2 im Biotop dieser *Anopheles*-Larven (s. Abbildung 12) lagen diese weit über der Akzeptanz (pH-Wert 8,5) der *Culex*-Larven. In keiner der überprüften Gruben, auch nicht in denen, die keinerlei Culiciden-Larven beinhalteten, wurde ein höherer pH-Wert als in den mit *An. plumbeus*-Larven besetzten

Gruben gemessen. Solche hohen pH-Werte wurden in Gruben gemessen, deren angeschlossene Stallungen nicht mehr zur Großtierhaltung genutzt wurden.

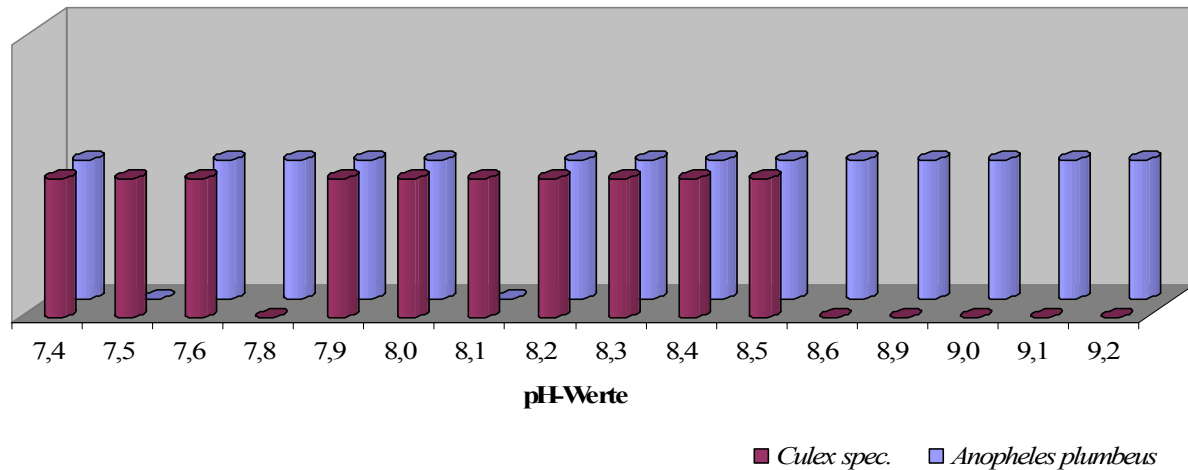


Abb. 12: Die Graphik zeigt die Akzeptanz basischer Hydroxoniumkonzentrationen. Das Vorkommen von *Culex*-Larven (rote Balken) konnte bis zu einem pH-Wert von 8,5 nachgewiesen werden, während Larven von *An. plumbeus* (blaue Balken) einen pH-Wert von 9,2 tolerierten.

Diese Gruben waren entweder überdacht oder soweit abgedeckt, dass Regenwasser nicht in größeren Mengen zuströmen konnte. Zudem wurden die Gruben seit Jahren nicht mehr geleert. Der Flüssigkeitskörper in der Grube reduzierte sich über die Jahre durch Verdunstung. Alle diese Gruben zeichneten sich durch eine dicke Schlammschicht am Grund aus. Die verbliebene Flüssigkeit war in allen Fällen sehr dunkel und die Sichttiefe sehr gering. Auffallend bei all diesen Gruben war die hohe Viskosität des flüssigen Inhaltes; diese lag weit über der des Wassers. Sie konnte am ehesten mit der Fließeigenschaft eines qualitativ hochwertigen, kalt gepressten Olivenöls verglichen werden. In den so zu beschreibenden Gruben, in denen ausschließlich *An. plumbeus*-Larven lebten, kamen diese in sehr großer Dichte vor. Eine helle Kunststoffplatte wurde wenige Zentimeter unter der Wasseroberfläche positioniert. So konnten die dicht gedrängten Larven fotografiert und ausgezählt werden. Abbildung 13 zeigt eine Larvendichte bis zu 1800 Individuen pro 1 dm².

Viele der Gruben waren zusätzlich zu den Brettern und Balken mit organischen Materialien dicht abgedeckt oder komplett aus Beton gefertigt. In diesen Fällen waren die von den Mücken als Ein- bzw. Ausflugmöglichkeiten genutzten Öffnungen sehr klein. Meist waren dies die Ablaufrinnen des angeschlossenen Stalls oder sehr dünne Spaltöffnungen zwischen den die Gruben abdeckenden Brettern und Balken. Ein besonderer Fall zeigte die defekte

Muffe eines 100 mm Abwasserrohres, das durch einen neben der Grube liegenden Kellerraum verlief. Durch ein etwa 2 cm² kleines Loch flogen die Mücken ca. 3,5 m im Rohr bis in die Grube.

Alle Vorkommen lagen in der Nähe von Baumbeständen, die aufgrund ihres Alters flüssigkeitsgefüllte Höhlen tragen könnten. Der absolute Beweis konnte allerdings nur in einem Fall erbracht werden. Angrenzend an die mit *An. plumbeus*-Larven besetzte Grube erstreckte sich auf eine Länge von ca. 90 Metern eine Weidefläche des betroffenen Reitbetriebes, die an einem Mischwald mit alten Buchenbeständen endete. In einem ehemals ausgebrochenen Ast konnten im Wasserkörper der entstandenen Baumhöhle Larven von *Oc. geniculatus* sowie zwei Zweitlarven von *An. plumbeus* nachgewiesen werden. Legt man die in Kapitel 2.3.1.1.1 aufgeführten Beobachtungen zu Grunde, konnte in dem weitläufigen

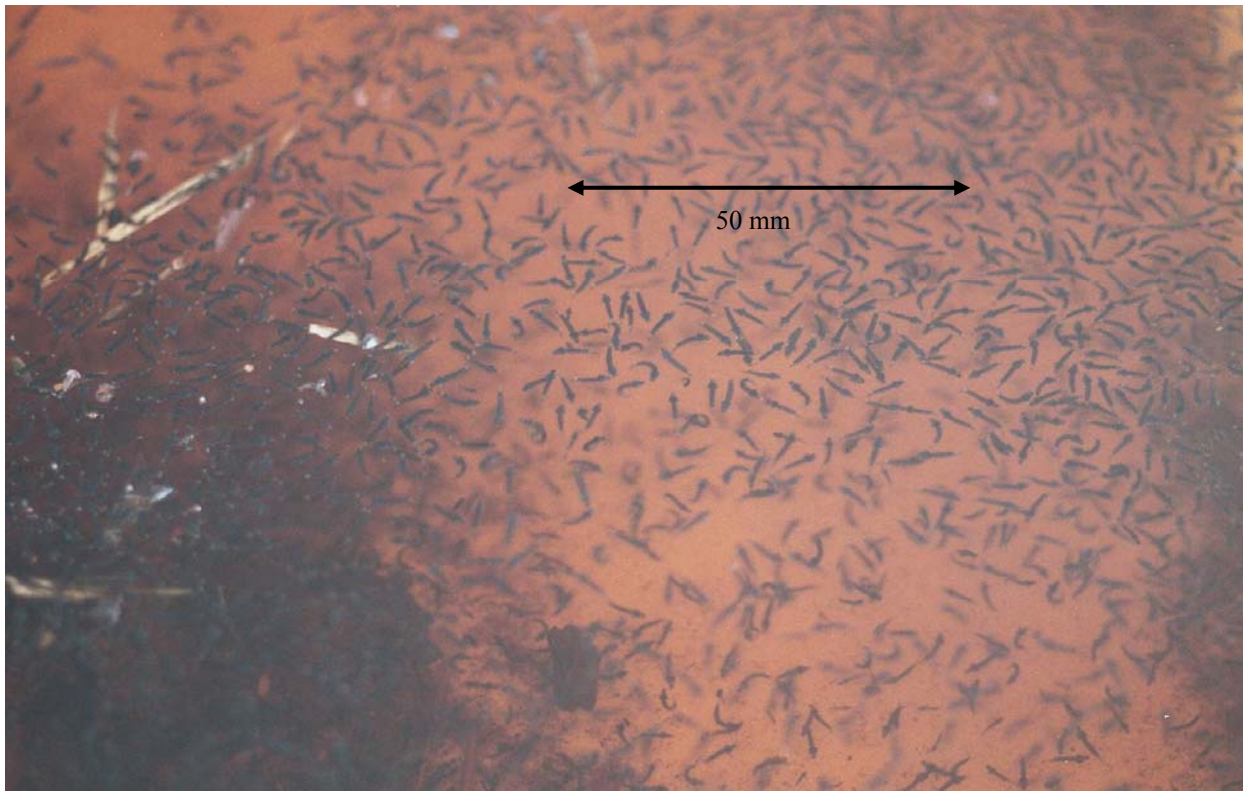


Abb. 13: Ausschnitt aus einer Grube, in der nur *An. plumbeus*-Larven vorkamen. Um die Larvendichte zu zählen, wurde eine helle Kunststoffplatte wenige Zentimeter unter der Wasseroberfläche positioniert und dann fotografiert. Das Auszählen der Bilder ergab eine Larvendichte von bis zu 1800 Individuen pro 10 cm².

Waldgelände von der Existenz einer beständigen *An. plumbeus*-Population ausgegangen werden. Der Ursprung einer Grubenbesiedlung kann durchaus als Zufallsereignis angesehen werden. In dem oben beschriebenen Fall könnte eine mit Hilfe des Windes verdriftete Mücke

der Ursprung einer neuen Population gewesen sein. Mit stetigem Anwachsen der Population erschlossen die Mücken neue Brutmöglichkeiten, auch wenn diese nicht ideal waren. So wurden, bedingt durch die stark angewachsene Population, bei drei Vorkommen Larven in mit klarem Wasser gefüllten Regentonnen gefunden. In unmittelbarer Nähe des in Abbildung 14 dargestellten Vorkommens liegt eine Jauchegrube (rotes Grubensymbol) ohne *An. plumbeus*-Besatz, obwohl diese Grube ein idealeres Brutbiotop darstellte (s. auch Kapitel 2.3.1.2.3). Im Gegensatz dazu wurde eine Regentonne im nördlichen Hauptaktivitätsgebiet als Brutstätte angenommen (rotblaues Regentonnensymbol), in ihr konnten nach gründlicher Filterung des Wassers 253 Larven nachgewiesen werden. Eine weitere Regentonne (rotes Regentonnensymbol), die sich im südlichen Hauptverbreitungsgebiet befand, beinhaltete nur *Culex*-Larven. Dies war das Ergebnis einer turnusmäßigen Totalleerung dieser Tonne. So wurden die sich langsam, aber innerhalb der Population annähernd synchron entwickelnden *Anopheles*-Larven ausgeschüttet. Daher wurde die Regentonne nur durch die ständig eierlegenden Hausmücken besiedelt.

2.3.1.2.2 Populationsdynamik von *An. plumbeus* in geschlossenen Systemen

Inwieweit einzelne Individuen innerhalb einer *An. plumbeus*-Population stenogam in Verbindung mit einer ausgeprägten Autogenie waren, wurde ergänzend zu den in Kapitel 3.1.3 dargestellten Versuchen im natürlichen Brutbiotop untersucht. Aus unabhängigen Verbreitungsgebieten wurden fünf Gruben ausgewählt. In zwei der Gruben entwickelten sich zusätzlich Larven der Gattung *Culex*, in den drei weiteren Gruben lebten nur *An. plumbeus*-Larven. Die Gruben hatten eine Grundfläche zwischen 10 und 15 m² und waren zwischen 1,5 und 2,5 Meter tief. Die Individuendichte lag ca. zwischen 800 und 1800 *Anopheles*-Larven je 1 dm², also 80.000 bis 180.000 Individuen pro m². In der Hoffnung, dass in der sehr großen Anzahl an Versuchstieren Individuen vorhanden waren, bei denen beide Merkmale ausgeprägt waren, wurden die Gruben mückendicht verschlossen. In den folgenden Wochen und Monaten verkleinerten sich die Populationen von *An. plumbeus* bis keine Larven sowie Imagines mehr gefunden wurden. Im Gegensatz dazu waren in den beiden *Culex*-Populationen keine signifikanten Schwankungen zu erkennen. Da alle untersuchten *An. plumbeus*-Populationen erloschen waren, ist davon auszugehen, dass kein stenogames Verhalten kombiniert mit Autogenie vorhanden war.

2.3.1.2.3 Stechmückenaktivität

Im Jahresverlauf waren in den Beobachtungsgebieten zwei Hauptaktivitätsphasen der *An. plumbeus*-Mücken zu erkennen (s. Kapitel 2.3.1.2.2). Zwischen der ersten, der Frühjahrsgeneration, und der zweiten, der Herbstgeneration, wurden nur vereinzelt fliegende *Anopheles*-Mücken gefunden. Die massive Belästigung der Anwohner in der Nähe einer unterirdischen *An. plumbeus*-Brutstätte war in allen Untersuchungsgebieten auf ein Kerngebiet mit einem Radius von maximal 50 Meter um die Grube beschränkt. Mit zunehmender Distanz nahm die Stechaktivität spürbar ab. Bereits in einer Entfernung von 100 Meter zur Brutstätte wurden in keinem Fall adulte Mücken festgestellt. Der Aktivitätsradius war in allen Fällen abhängig von der Windrichtung. Ausgehend von der Brutstätte war die Verbreitung gegen die Windrichtung stark eingeschränkt. Während der zwei Hauptflugphasen der Mücken wurden im Umfeld derjenigen Brutstätten, die eine Larvendichte von mehr als 800 Larven pro 1 dm² aufwiesen, zwischen 30 und 117 Anflüge pro Minute gezählt. Die Aktivitätszeit der Mücken reichte von Sonnenaufgang bis nach Einbruch der Dunkelheit. Bei künstlicher Beleuchtung waren die Mücken auch während der Nacht aktiv. Nur während völliger Dunkelheit wurden keine Stechaktivitäten registriert. Eine signifikante tagesperiodische Stechaktivität konnte in der Nähe der Mücken-Ruheplätze nicht nachgewiesen werden, dagegen waren die Zahl der Anflüge auf einen sonnenexponierten Blutspender geringer. Gezeigt werden konnte, dass die Mücken keine weiten Flieger waren. Die Stechmücken ruhen windgeschützt an schattigen bis dunklen Plätzen in oder an Gebäuden sowie in hohen, aber dichten Vegetationsstrukturen. Potentielle Blutspender werden nur im unmittelbaren Bereich der Mückenruheplätze von diesen belästigt. Der Aufenthalt auf freien, nicht beschatteten Flächen, die zudem eine geringe Luftfeuchte aufweisen, mit der Wahrung eines Abstandes von mindestens 10 Metern zum nächsten Ruheplatz schützte vor Stichen.

Nach Aussagen der Anwohner traten die massiven Belästigungen in allen untersuchten Vorkommen vor 3 bis 5 Jahren mit zunehmender Aggressivität der Stechmücken auf. Diese beschriebene zunehmende Aggressivität ließ sich mit dem exponentiellen Anwachsen der Stechmückenpopulation und damit auch der zunehmenden Zahl stechwütiger Weibchen erklären.

Auf der in Abbildung 14 dargestellten Karte ist exemplarisch eines der untersuchten *Anopheles plumbeus*-Vorkommen in einer Höhe von 850 Meter dargestellt. Die Abbildung 15 zeigt die fotografische Darstellung des Verbreitungsgebietes in der Blickrichtung von Nord nach Süd. Die dunklere der unterlegten Flächen auf der Karte zeigt das Kerngebiet der

Stechaktivität mit Anflugraten von 5 bis 92 Weibchen pro Minute. Die meisten Anflüge wurden im Stall, der über ein Entwässerungsrohr direkt an die Brutstätte (blaues Grubensymbol) angeschlossen war, gezählt. Die etwa 9 cm² große Restöffnung des Zulaufes war die einzige Möglichkeit der Mücken, die Grube zu verlassen bzw. diese zur Eiablage erneut aufzusuchen. Vom Stall aus breiteten sich die Mücken, begünstigt durch den meist aus südwestlicher Richtung wehenden Wind, entlang der Holzstapel hauptsächlich nach Norden aus. Das unmittelbar südlich gelegene Wohnhaus lag mit maximal 38 in unmittelbarer Hauswandnähe anfliegenden Weibchen pro Minute ebenfalls im Kerngebiet. Der heller unterlegte Bereich, der das Kerngebiet umgibt, wurde als Randgebiet der Stechaktivität bezeichnet. In diesem Bereich wurden bis zu fünf Anflüge gezählt. Außerhalb dieses Bereiches konnten nur vereinzelt Weibchen von *An. plumbeus* gefunden werden. An den westlich der Brutstätte liegenden Häusern konnten nur an der dem Vorkommen zugewandten Seite weniger als fünf anfliegende Weibchen in einer Minute gezählt werden. Ganz und gar unüberwindbar für die Mücken war die direkt an die Brutstätte angrenzende und sich nach Osten ausdehnende Wiese, auf der keinerlei horizontale Strukturen vorhanden waren. Hinter der Wiese lag in einer Entfernung von ca. 60 Metern eine weitere Grube (rotes Grubensymbol), die das über einen Pferdemisthaufen ablaufende Wasser sammelte. In der Grube konnten keine *An. plumbeus*-Larven gefunden werden. Auch der Nachweis adulter *An. plumbeus*-Weibchen konnte nicht erbracht werden, obwohl in direkter Nachbarschaft Großvieh, welches sehr attraktive Blutspender darstellt, gehalten wurde. Ähnliche Beobachtungen wurden bei allen untersuchten Vorkommen gemacht.

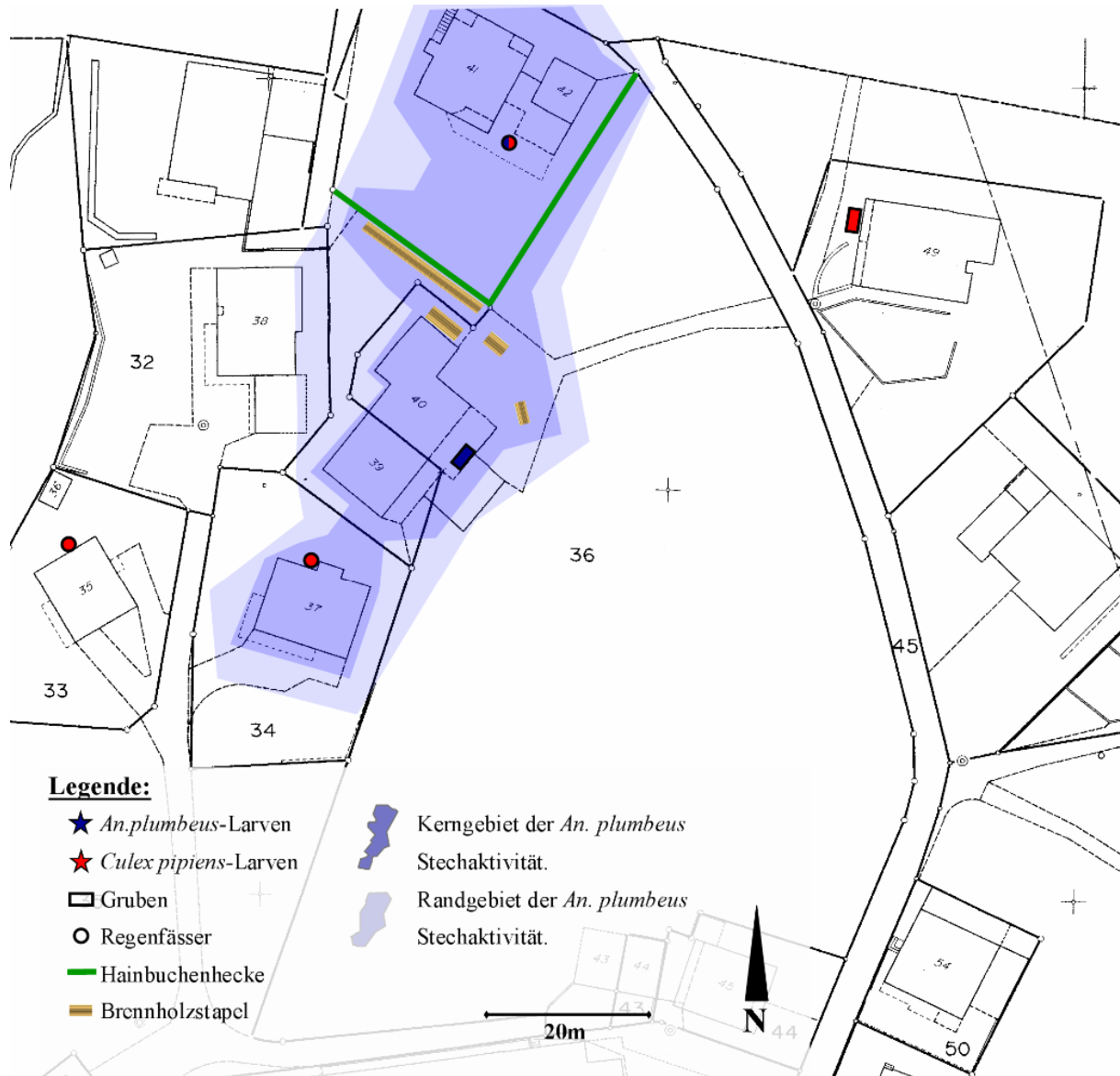


Abb. 14: *An. plumbeus*-Vorkommen. Eingezeichnet sind die Brutstätten sowie die Aktivitätszonen der Mücken. Erklärung siehe Legende.

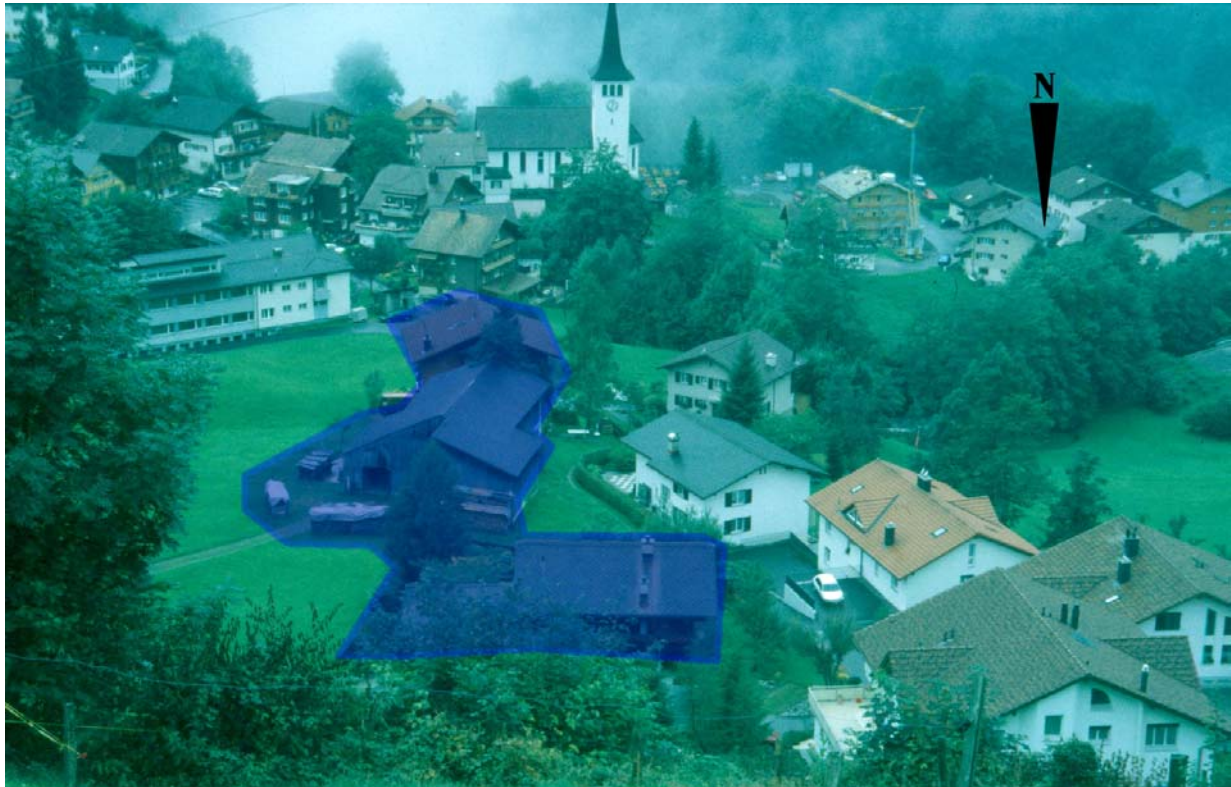


Abb. 15: Bild des *An. plumbeus*-Vorkommen in Abb. 14. Eingezeichnet ist die Kernzone der Stechaktivität. Der Blick von Nord nach Süd ist entgegengesetzt zur Ausrichtung der Karte in Abb. 14.

2.3.1.3 Aufzucht der Larven von *An. plumbeus*

Die anfängliche Aufzucht in demineralisiertem Wasser führte zu starken Bestandsausfällen bis hin zum Totalausfall. Augenscheinlich schädigten die an Nahrungsresten und auf den Gefäßwänden wachsenden Keime die Larven. Gefüttert wurden die Larven wahlweise mit beiden Futtermethoden. Katzentrockenfutter (Brekki[®]) sowie Staubfischfutter (MicroMin[®] Baby), führten zu dem gleichen Ergebnis. Auch durch die Zugabe von 10 g Meersalz pro Liter ins Aufzuchtswasser konnte keine Verbesserung bei der Larvenaufzucht erzielt werden.

Basierend auf diesen Erfahrungen wurden die Larven in ihrem Nährmedium aus ihren Ursprungsbiotopen, welches maximal mit fünf Teilen demineralisiertem Wasser verdünnt wurde, aufgezogen. Bei dieser Fütterungsmethode gingen die Ausfälle auf ein Minimum zurück. Ebenfalls konnte ein übermäßiges Wachstum der unerwünschten Mikroorganismen an den Wänden der Schalen sowie an den Futterresten nicht mehr festgestellt werden.

Ebenso wie dies bei *An. stephensi* der Fall war, akzeptierten auch die Larven von *An. plumbeus* feines Staubfutter, das sie von der Wasseroberfläche aufnahmen, sowie größere

Futterpartikel, deren Oberfläche sie aktiv abbürsteten, um so die abgelösten Partikel aufzunehmen. Ein Beispiel für die zuletzt genannte Art der Nahrungsaufnahme war eine in der Gülle ertrunkene Maus. Diese wurde mit den Larven aus der Grube abgefischt und von diesen in der Aufzuchtsschale im Laufe der Larvenentwicklung skelettiert (s. Abbildung 16).



Abb. 16: Eine Spitzmaus, die von Larven der Spezies *An. plumbeus* teilweise skelettiert wurde.

2.3.1.4 Versuche zur Etablierung einer *An. plumbeus*-Kolonie im Labor

Zuerst wurde untersucht, ob diese *Anopheles*-Mücken in den Käfigen reproduzieren. Obwohl eine Großzahl der Mücken über die Membran das Blut saugte, kam es zu nur spärlichen Eiablagen. So konnten in den bereitgestellten Eiablagebehältern über eine Dauer von 7 Tagen maximal 39 Eier bei den Mücken der Baumhöhlenpopulation gezählt werden. Die Ausbeute der Grubenpopulationen lag bei maximal 82 Eiern (s. Tabelle 2). Nach 2 bis 5 Tagen verpilzten die Eier oder fingen an einzufallen. Eine Begutachtung unter dem Mikroskop zeigte, dass sich in den Eiern kein Embryo entwickelte, die Eier also nicht befruchtet waren. Aus allen Chargen wurden die nun 21 bis 30 Tage alten Mückenweibchen seziiert und die Spermatophoren herauspräpariert. Dabei konnte bei keinem der Weibchen, auch nicht bei denen, die Eier trugen, Spermien nachgewiesen werden.

Nr.	Anzahl Larven	Anzahl Weibchen	Anzahl Eier
1	300	121	15
2	300	115	18
3	300	176	39
4	1000	669	73
5	1000	429	45
6	1000	736	82
7	1000	729	56
8	1000	589	61

Tab. 2: Die aufgelistete Larvenanzahl von *An. plumbeus* wurde in Käfigen zur Untersuchung der Reproduktionsfähigkeit der sich daraus entwickelnden Imagines überführt. Ebenfalls sind die Anzahl der geschlüpften Weibchen so wie die Zahl der gelegten Eier angegeben.

Die aus den Reproduktionsversuchen in der großen Voliere (s. Abbildung 17) resultierenden Ergebnisse waren vergleichbar mit denen aus den kleinen Käfigen. Es kam ebenfalls nur zu spärlichen Eiablagen. Auch hier waren die Eier nicht befruchtet. Die Spermatheken der seziierten Weibchen waren ebenfalls nicht mit Spermatophoren besetzt.

Im Verlauf von fünf Jahren gelang es nicht mit verschiedenen Methoden eine Kolonie, die sich durch natürliche Kopulation vermehrt, im Labor zu etablieren. Als für die Infektionsversuche essentielles Ergebnis bleibt festzuhalten, dass die Weibchen von *An. plumbeus* sehr aggressiv Blut saugten, obwohl sie noch nicht inseminiert waren.



Abb. 17: links: Netz zur Verpaarung eurygamer Stechmücken. Maximale Höhe 6 m, Durchmesser 3 m. rechts: Verfasser beim Absaugen von *An. plumbeus*-Weibchen.

2.3.1.5 Frostresistenz von *An. plumbeus*

Die bestehende Meinung, dass Larven nur unter dem Eis oder im nicht gefrorenen Mulm den Winter überleben können, wurde mit nachfolgenden Testreihen untersucht.

Zur Überprüfung der Toleranz von Temperaturen unter dem Gefrierpunkt wurden in einem ersten Schritt Larven zweier Baumhöhlenpopulationen aus dem Vorkommen Böhl/Iggelheim und Flughafen Frankfurt sowie zweier Grubenpopulationen aus Germersheim und Freudenstadt den natürlichen Temperaturschwankungen des Winters ausgesetzt. Die mit einem Minimum-Maximum-Thermometer gemessenen Temperaturen im Zeitraum September 2004 bis März 2005 sind in Auszügen in Abbildung 18 dargestellt. Zusätzlich sind die Zeiträume, in denen der Schaleninhalt komplett durchgefroren war, markiert.

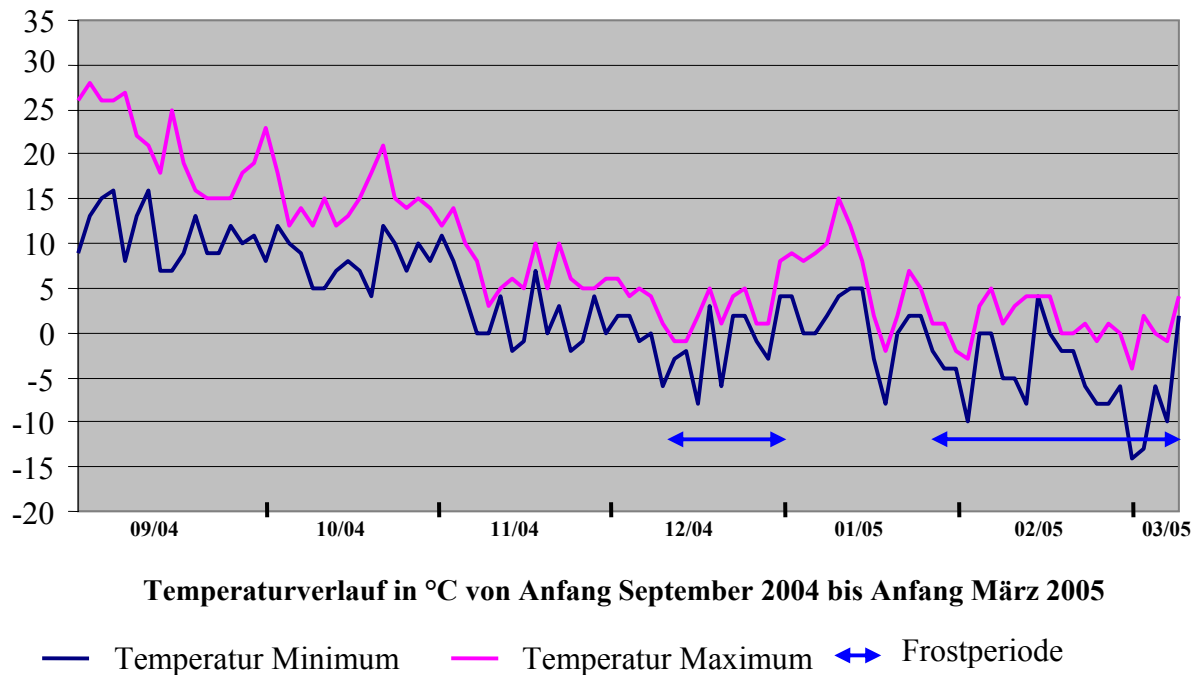


Abb. 18: Die Grafik zeigt den Verlauf der minimalen und maximalen Temperatur während des Untersuchungszeitraumes. Die blauen Pfeile markieren die Frostperiode, in der die Schalen ganz durchgefroren waren.

In einer ersten Dauerfrostperiode, die sich durch leicht sinkende Temperaturen ankündigte, waren die Schüsseln 10 Tage komplett durchgefroren. Eine zweite Frostperiode kündigte sich 3 Wochen später an und schloss die Larven für 28 Tage im Eis ein. Mit dem Ende der Frostperiode Anfang März wurden die überlebenden Larven gezählt (s. Tabelle 3). Von den 400 den Witterungsverhältnissen ausgesetzten Larven der Grubenpopulationen überlebten 281 und damit 70 %. Mit 48 von 60 Individuen lebten zu Beginn der Vegetationsperiode noch 80 % der Larven aus den Baumhöhlenpopulationen. Zwischen den Überlebensraten der Larven aus den einzelnen Vorkommen gab es keine signifikanten Unterschiede. Dies zeigte, dass *An. plumbeus*-Larven eine Frostperiode völlig im Eis eingeschlossen überleben.

	Überlebende Larven	
	Anzahl	in %
Schale 1	118/200	59,0
Schale 2	163/200	81,5
Schale 3	23/30	76,7
Schale 4	25/30	83,3
Gesamt	329/460	71,5

Tabelle 3: Den Winter überlebende Larven von *An. plumbeus*. Schalen 1 und 2 waren zu Beginn mit je 200 Drittlarven aus der Grubenpopulation Germersheim und Freudenstadt besetzt, die Schalen 3 und 4 waren mit je 30 Drittlarven des Baumhöhlenvorkommens Böhl/Iggelheim und Flughafen Frankfurt bestückt. Angegeben ist die absolute Anzahl der überlebenden Larven sowie der prozentuale Anteil.

In einem weiteren Versuchsaufbau wurden die Larven in demineralisiertem Wasser für 14 Tage bei -20°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) eingefroren (s. Abbildung 19). Diese Abbildung zeigt einen aus seiner Dose gelösten Block mit den im Eis eingefrorenen *An.plumbeus*-Larven. In der Detailvergrößerung markiert der blaue Pfeil eine abgestorbene Larve. Sie ist an ihrem durchscheinenden und bereits durch die Verdauungsenzyme zersetzten Abdomen zu erkennen. Der schwarze Pfeil zeigt auf eine dunkle, noch lebende Larve. Sobald das Eis um die einzelne Larve geschmolzen war, begann diese sich in typischer Art zu bewegen. Der linke Abschnitt der Abbildung 20 zeigt eine noch im Eis eingeschlossene Larve. Im Bild rechts daneben ist das Eis um die Larve bereits geschmolzen. Die Wasserschicht über dem Eis ist noch so dünn, dass die normal nach unten gerichteten langen Ruderhaare der Larve auf dem Eis zur Seite gleiten und sich dadurch das letzte Abdominalsegment, an dem sie ihren Ursprung haben, zur Seite biegt (weißer Pfeil). Zu sehen sind die bereits zur Nahrungsaufnahme geöffneten lateralen Palatalbürsten (roter Pfeil).

Nach dem das Eis geschmolzen war, wurden die überlebenden Larven ausgezählt. In den fünf Schalen mit insgesamt 120 Drittlarven überlebten 82 Individuen und damit 68,3 % die 14 Tage im Eisblock bei -20°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) (s. Tabelle 4). Auch durch dieses Experiment wurde gezeigt, dass die Larven von *Anopheles plumbeus* die Fähigkeit besitzen, eine anhaltend starke Frostperiode im Eis zu überleben.

Die Larven entwickelten sich bei einer Umgebungstemperatur von 21°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) bis zum Puppenstadium, aus dem die Imagines schlüpfen. Während dieser Phase traten weder Anomalien in ihrer Entwicklung noch signifikant höhere Sterberaten auf.

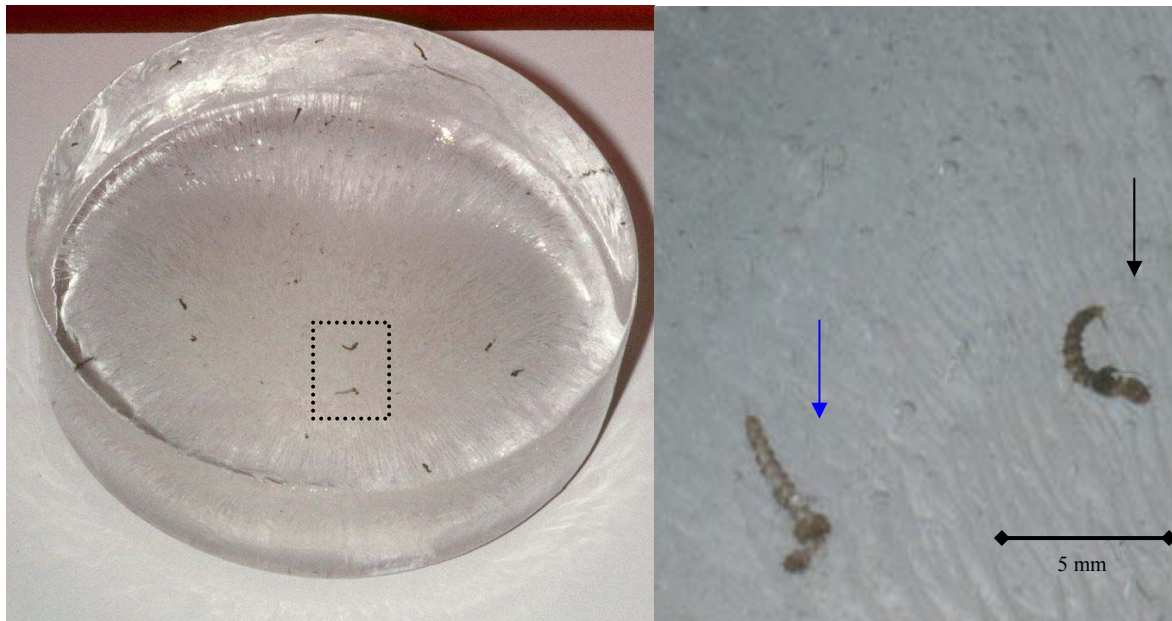


Abb. 19.: Bei -20°C eingefrorene *An. plumbeus*-Larven. Die Detailansicht zeigt eine abgestorbene Larve (blauer Pfeil) und eine lebende Larve (schwarzer Pfeil).

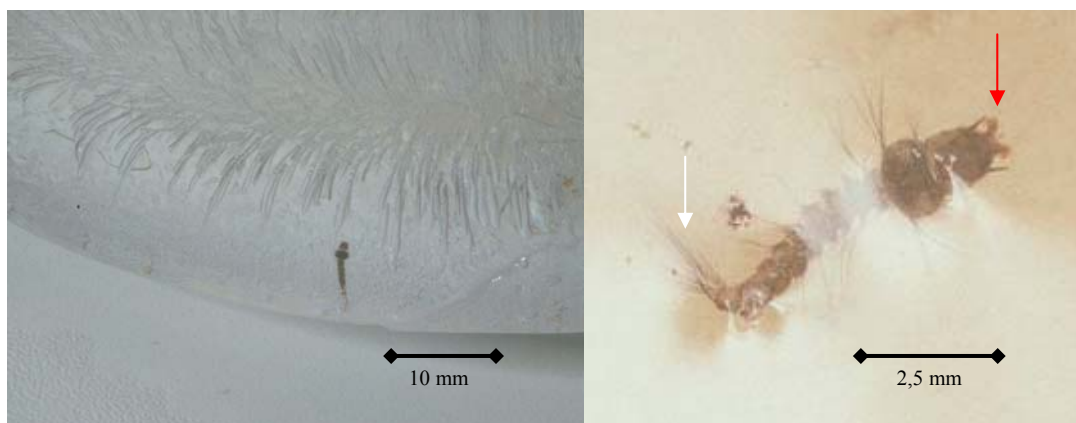


Abb. 20: Abgebildet ist eine *An. plumbeus*-Larve. Im linken Abschnitt ist sie noch im Eis eingefroren. Im rechten Bild ist das sie umgebende Eis aufgetaut. Der auf dem Eis stehende Wasserfilm ist nur so tief, dass sie sich gerade frei bewegen kann. Die langen Ruderhaare des X.-Abdominalsegments haben keinen Platz zur Ausbreitung nach unten und stehen auf dem Eis auf, wodurch das Segment zur Seite kippt. Am Kopf sind die ausgefahrenen lateralen Palatalbürsten (roter Pfeil) zu erkennen.

	Überlebende Larven	
	Anzahl	in %
Schale 1	12/20	60,0
Schale 2	9/20	45,0
Schale 3	15/20	75,0
Schale 4	16/20	80,0
Schale 5	15/20	75,0
Schale 6	14/20	70,0
gesamt	82/120	68,3

Tabelle 4: Die Larven von *An. plumbeus* im dritten Stadium wurden in sechs Chargen à 20 Tiere 14 Tage bei -20°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) eingefroren. Angegeben ist die absolute Anzahl der überlebenden Larven sowie der prozentuale Anteil. Die Larven der Schalen 1 und 2 sind aus der Grubenpopulation Gernersheim, Nr. 3 und 4 aus dem Vorkommen Freudenstadt. Schale 5 aus dem Baumhöhlenvorkommen Böhl/Iggelheim und Nr. 6 aus der Population Flughafen Frankfurt

2.3.1.6 Temperaturabhängige Entwicklung der *An. plumbeus*-Larven

Für die Infektionsversuche werden kontinuierlich *An. plumbeus*-Weibchen in gleicher Altersstruktur und gleicher Qualität benötigt. Da es nicht gelang, eine Laborkolonie dieser Art zu etablieren (s. Kapitel 2.3.1.4), wurde nach einer anderen Möglichkeit gesucht *An. plumbeus* zuverlässig zur Verfügung zu haben. Die Wachstumsgeschwindigkeit der Culiciden-Larven wird maßgeblich von der Umgebungstemperatur beeinflusst. Vor diesem Hintergrund wurde der Einfluss niedriger Temperaturen auf die Larvenentwicklung von *An. plumbeus* untersucht.

In der ersten Versuchsreihe wurde die Entwicklungsgeschwindigkeit bei einer Temperatur von 11°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) untersucht. Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse über den relevanten Teil des Beobachtungszeitraumes von 32 Wochen. Einmal pro Woche wurden die Schüsseln überprüft und vorhandene Puppen abgesammelt. Die ersten Ruhestadien traten 22 Wochen nach Versuchsbeginn auf. In beiden Chargen verpuppte sich das Gros der Larven zwischen der 23. und der 27. Woche, wobei sich die männlichen Individuen etwas früher zwischen der 23. und 26. Woche und - verzögert - die weiblichen hauptsächlich zwischen der 24. und 27. Woche verpuppten. Die Sterblichkeit der Puppen lag in Charge 1 mit 16 bei 8,6 %, bezogen auf 187 der gesamt verpuppten Individuen. In der Charge 2 starben 10 (5,7 %) von 189 Puppen. In Charge 1 überlebten somit 187 (93,5 %) und 189 (94,5 %) von 200 in Charge 2 bis zur Verpuppung.

Woche Charge		22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	ges.
		1	♂	4	15	11	33	18	1	5	1	0	0
♀	1		0	8	10	28	21	8	1	5	0	1	83
†	1		0	0	2	2	3	4	2	1	1	0	16
2	♂	1	21	18	11	16	8	4	2	2	9	1	93
	♀	0	8	10	35	15	3	9	5	0	1	0	86
	†	0	1	0	0	1	3	5	1	0	0	1	10

Tab. 5: Entwicklungsdauer der *An. plumbeus*-Larven, ausgehend vom dritten Stadium bis zur Puppe bei einer Temperatur von 11° C (+/- 1° C). In der Woche, in der sie abgesammelt wurden, wurden die Puppen bei 21° C Umgebungstemperatur zum Schlupf gebracht. Unterschieden wurde zwischen männlichen (♂) und weiblichen Mücken (♀). Die gestorbenen und nicht geschlüpften Puppen sind ebenfalls aufgeführt (†). Die Larven der Charge 1 stammen aus der Freudenstadt-Population, die Larven der Charge 2 aus der Germersheimer-Population.

Ähnlich wie die oben beschriebenen Larven aus den Grubenpopulationen entwickelten sich die Larven aus den Baumhöhlen (s. Tabelle 6). In Charge 3 verpuppten sich die männlichen Individuen schwerpunktmäßig in der 24. und 25. Woche. Die Weibchen hingegen verpuppten sich schwerpunktmäßig erst zwischen der 26. und 28. Woche. In Charge 4 begann die Verpuppung der Männchen in der 22. Woche und dauerte mit einem Peak in der 23. Woche bis zur 24. Woche. Zwei Individuen verpuppten sich erst in der 27. Woche. Die weiblichen Individuen verpuppten sich hauptsächlich in der 23. und 24. Woche. Die Sterberate lag mit 6,4 % bei 3 von 47 verpuppten Larven in Charge 3 und in Charge 4 bei 2 Ausfällen von 46 Puppen bei 4,3 %. In Charge 3 entwickelten sich 92 % (47 von 50) der bereitgestellten Larven bis zur Puppe. Ohne signifikante Abweichungen waren dies in Charge 4 mit 46 von 50 Entwicklungsstadien 94%.

Woche Charge		22	23	24	25	26	27	28	29	ges.
		3	♂	0	2	8	8	1	1	1
♀	0		0	3	3	9	3	5	0	23
†	0		0	0	0	2	0	0	1	3
4	♂	4	13	7	0	0	2	0	0	26
	♀	0	6	8	2	1	1	0	0	18
	†	0	0	1	0	0	1	0	0	2

Tab. 6: Entwicklungsdauer der *An. plumbeus*-Larven, ausgehend vom dritten Stadium bis zur Puppe bei einer Temperatur von 11° C (+/- 1° C). In der Woche, in der sie abgesammelt wurden, wurden die Puppen bei 21° C Umgebungstemperatur zum Schlupf gebracht. Unterschieden wurde zwischen männlichen (♂) und weiblichen Mücken (♀). Die gestorbenen und nicht geschlüpften Puppen sind ebenfalls aufgeführt (†). Die Larven der Charge 3 entstammen der Baumhöhlenpopulation aus Wiesbaden, die Larven der Charge 4 sind aus Mainz-Amöneburg.

Ein weiteres Versuchsdesign brachte Aufschluss über die Entwicklungsdauer bei 4° C (+/- 1° C) (s. Tabelle 7 und 8). Es konnte gezeigt werden, dass nach 56 Wochen, also einem Jahr bei der niedrigen Temperatur die durchschnittliche Überlebensrate über 75 % (Charge 1: 87 %, Charge 2: 86 %, Charge 4: 86 %, Charge 4: 74 %) lag. Die Larvenentwicklung stoppte im vierten Stadium, Verpuppungen wurden bei dieser Temperatur nicht beobachtet. Nach der 56. Woche wurden aus jeder Charge 20 Viertlarven entnommen und zur Untersuchung der Weiterentwicklung bei 21° C (+/- 1° C) Umgebungstemperatur aufgezogen. Aus den Puppen schlüpfen nach einer Ruhezeit von durchschnittlich 8 Tagen und einer durchschnittlichen Gesamtzeit nach Temperaturerhöhung von 18 Tagen die Imagines. Gefüttert wurden die Larven mit Brekkis® nach Bedarf. Die Mortalitätsrate der Puppen lag mit 8,8 % (Charge 1: 15 %, Charge 2: 5 %, Charge 4: 5 %, Charge 4: 10 %) in normalen Grenzen. Auch war keine abnorme Signifikanz bei der Geschlechtsverteilung der geschlüpften Mücken zu erkennen.

Woche Charge	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68
1	187	187	186	185	184	175	174	174	174	149	125	124
2	200	200	192	191	188	188	173	172	172	150	150	138

Tab. 7: Entwicklungsgeschwindigkeit der *An. plumbeus*-Larven, ausgehend vom dritten Stadium bei einer Temperatur von 4° C (+/- 1° C). Aufgeführt sind die Anzahl der Larven in Intervallen von 4 Wochen. Die Larven der Charge 1 stammen aus der Freudenstadt-Population, die Larven der Charge 2 aus der Germersheimer-Population. Nach Ablauf der 56. Woche wurden 20 Larven aus jeder Charge entnommen und bei einer Temperatur von 21° C aufgezogen (s. Tabelle 9).

Woche Charge	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68
3	48	48	48	48	48	48	43	43	43	22	22	22
4	50	50	50	46	46	39	39	38	37	17	17	17

Tab. 8: Temperatur von 4° C (+/- 1° C). Aufgeführt sind die Anzahl der Larven in Intervallen von 4 Wochen. Die Larven der Charge 3 entstammen der Baumhöhlenpopulation aus Wiesbaden, die Larven der Charge 4 sind aus Mainz-Amöneburg. Nach Ablauf der 56. Woche wurden 20 Larven aus jeder Charge entnommen und bei einer Temperatur von 21° C aufgezogen (s. Tabelle 9).

Das Experiment endete nach einer Laufzeit von 68 Wochen. Abzüglich der entnommenen 20 Larven erlebten das Ende der Versuchsreihe in der Charge 1: 68,9 %, Charge 2: 76,7 %, Charge 4: 73,3 %, Charge 4: 56,7 %. Es wurde während der Überprüfungen mehrmals karnivores Verhalten der Larven beobachtet. Die als Nahrung dienenden Larven waren natürlich gefärbt und zeigten auch keinerlei für Kadaver charakteristische Auflösungserscheinungen. Dies ließ den Schluss zu, dass die Larven erst unmittelbar zuvor durch die Überwältigung des Artgenossen starben.

Nach der 68. Woche wurden abermals aus den Chargen 1 bis 3 je 20 Larven sowie aus der Charge die verbleibenden 17 Larven bei 21° C (+/- 1° C) aufgezogen (s. Tabelle 9). Die Mortalität der Puppen lag mit Charge 1: 30 %, Charge 2: 15 %, Charge 4: 30 %, Charge 4: 23,5 % höher als in der 56. Woche. Die Verteilung der Geschlechter war normal. Die Entwicklung zur Puppe war synchron und betrug 9 Tage. Nach weiteren 8 bis 10 Tagen schlüpfen die Imagines. Gefüttert wurde ebenfalls nach Bedarf mit Brekkis[®].

		Charge			
		1	2	3	4
56	♂	10	9	8	7
	♀	7	10	11	11
	†	3	1	1	2
68	♂	5	8	8	8
	♀	9	7	6	5
	†	6	5	6	4

Tab. 9: Die Larven aus den Langzeitversuchen zur Larvenentwicklung bei 4° C wurden in der 56. und 68. Woche entnommen und bei 21° C (+/- 1° C) aufgezogen. Aus den Chargen 1 bis 3 wurden je 20 Larven und aus der Charge 4 17 Larven untersucht. Individuen der Charge 1 stammen aus der Freudenstadt-Grubenpopulation, die Larven der Charge 2 aus der Germersheimer-Grubenpopulation. Die Charge 3 entstammt der Baumhöhlenpopulation aus Wiesbaden, die Larven der Charge 4 sind aus Mainz-Amöneburg.

2.3.1.7 Lebenserwartung der *An. plumbeus*-Weibchen

Untersucht wurde die Lebensdauer der Weibchen bei einem Temperaturgefüge von 21° C (+/- 1° C) am Tage und 18° C (+/- 1° C) in der Nacht. In Tabelle 10 sind die Ergebnisse der überlebenden Mücken in einer Zwei-Wochenperiodik zusammengefasst dargestellt. In der Charge 1 begann ab der 7. Woche ein kontinuierlicher Bestandsrückgang. Nach 26 Wochen starb das letzte Weibchen. In Charge 2 ging ab der 9. Woche der Mückenbestand im Käfig signifikant zurück. Die letzten 2 Weibchen starben zwischen der 23. und 24. Woche.

In beiden Baumhöhlen-Chargen waren die Überlebensraten bis zur 10. Woche konstant. Gegen Ende der 11. Woche kam es zu den ersten größeren Ausfällen. Ein Weibchen lebte 23 Wochen und damit 6 Wochen länger als die übrigen Mücken aus der Charge 3. Die Ergebnisse der 4. Charge sind mit denen der 3. Charge vergleichbar. Hier überlebten 2 Weibchen 24 Wochen.

Woche Charge	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23	25	27
1	98	91	82	68	41	16	7	3	3	1	1	1	0
2	100	92	90	79	61	37	18	9	7	5	2	0	0
4	30	30	29	29	24	18	14	5	1	1	1		0
5	29	29	29	27	26	11	8	8	3	3	2	0	0

Tab. 10: Untersuchung der Lebensdauer von *An. plumbeus*-Weibchen bei einer Tagestemperatur von 21° C (+/- 1° C) und einer um 3° C abgesenkten Nachttemperatur. Angegeben sind die am Ende der jeweiligen Woche überlebenden Mücken. Die Chargen entstammen aus unterschiedlichen Vorkommen, wobei Nr.1 (Rhein-Taunus-Kreis) sowie Nr. 2 (Schwäbisch Hall) aus Gruben entnommen wurden, während Nr. 3 und Nr. 4 aus Baumhöhlen rund um den Flughafen stammen.

Weitaus geringer war die Lebensdauer der Mückenweibchen in der folgenden Versuchsreihe (s. Tabelle 11). Bei einer über den Versuchszeitraum konstanten Temperatur von 26° C (+/- 1° C) zeigen bereits in Charge 1 nach Ablauf der 4. Woche sowie in Charge 2 ab der 5. Woche einen erheblichen Rückgang der Individuendichte. Nach maximal 11 Wochen waren alle Weibchen gestorben.

Die Baumhöhlenmücken der Chargen 3 und 4 zeigte sich eine Reduktion der Individuen auf 75 % überlebender Weibchen ab Anfang der 7. Woche. Mitte der 12. Woche verstarb das letzte Weibchen.

In beiden Versuchsreihen konnten in den Käfigen mit den Individuen aus den Baumhöhlen, welche mit nur 30 Weibchen besetzt waren, weniger Flugaktivitäten beobachtet werden als in den Käfigen mit den 100 Weibchen der Grubenpopulationen.

Woche Charge	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	100	99	99	95	76	59	27	15	9	1	0	0
2	94	93	91	89	82	42	15	6	4	2	2	0
4	30	30	29	29	27	20	9	2	2	2	1	0
5	30	30	30	30	28	22	14	3	3	0	0	0

Tab. 11: Untersuchung der Lebensdauer von *An. plumbeus*-Weibchen bei einer konstanten Temperatur von 26° C (+/- 1° C). Angegeben sind die am Ende der jeweiligen Woche überlebenden Mücken. Die Chargen entstammen aus unterschiedlichen Vorkommen, wobei Nr.1 (Rhein-Taunus-Kreis) sowie Nr. 2 (Schwäbisch Hall) aus Gruben entnommen wurden, während Nr. 3 und Nr. 4 aus Baumhöhlen rund um den Flughafen stammen.

2.3.2 Empfindlichkeit der *Anopheles plumbeus*-Larven gegenüber *Bacillus thuringiensis israelensis*

Die Mortalitätsraten der *Anopheles plumbeus*-Larven errechnen sich als Mittelwert aus den zwölf mit einer Bti-Konzentration durchgeführten Versuchen. Die Mortalitätsrate wird als absolute Größe dem Ablesezeitpunkt (T) gegenübergestellt. T wird numerisch von 0 bis X angegeben, wobei 0 für den Zeitpunkt der Applikation steht, und X den Zeitpunkt der letzten Auswertung wiedergibt. Die Zeitintervalle werden in Stunden (h) angegeben. Die Tabelle informiert über die Gesamtzahl (n) der Versuchstiere pro Konzentration. Den Mortalitätsraten sind in der Tabelle 12 die aus den 12 Versuchsansätzen errechneten Standardabweichungen gegenübergestellt. Auf die Übertragung der Standardabweichung in das Diagramm der Abbildung 21 wurde der Übersichtlichkeit wegen verzichtet.

Die Mortalitätsrate der Kontrolle lag deutlich niedriger als die der Bti-Konzentrationen und stieg signifikant mit zunehmender Wirkstoffkonzentration an. Bei der höchsten Dosis von 0,1 mg/l lag sie nach Ablauf von 48 Stunden bei 96,11 %. Die hohen Werte der Standardabweichung spiegelten die heterogenen Einzelergebnisse der Versuchsreihen wieder, welche im Anhang Kapitel 6.3 aufgeführt sind. Der kontinuierliche Anstieg der Mortalitäten der Bti-Konzentrationen, abhängig von der Versuchsdauer, ist anschaulich in Abbildung 21 zu sehen.

Konzentration in ppm (mg/l)	Mortalitätsrate in % nach	
	24 h	48 h
Kontrolle	1,7 (± 3,0)	9,4 (± 6,6)
0,008	13,3 (± 10,6)	31,7 (± 16,4)
0,01	28,9 (± 11,1)	51,7 (± 19,5)
0,02	31,1 (± 13,1)	58,3 (± 12,8)
0,03	43,9 (± 16,7)	64,4 (± 16,9)
0,04	37,2 (± 17,9)	66,7 (± 18,2)
0,05	55,0 (± 18,0)	82,2 (± 15,9)
0,075	70,0 (± 17,4)	93,3 (± 9,4)
0,1	84,4 (± 14,0)	96,1 (± 6,0)

n = 180

Tab. 12: Bti-Assay mit *Anopheles plumbeus*. Aufgeführt sind die Mortalitätsraten nach 24 und 48 Stunden (h). Den Werten sind die Standardabweichungen errechnet aus 12 Wiederholungen mit je 15 Larven pro Konzentration gegenübergestellt; n gibt die Gesamtzahl der Larven pro Konzentration an.

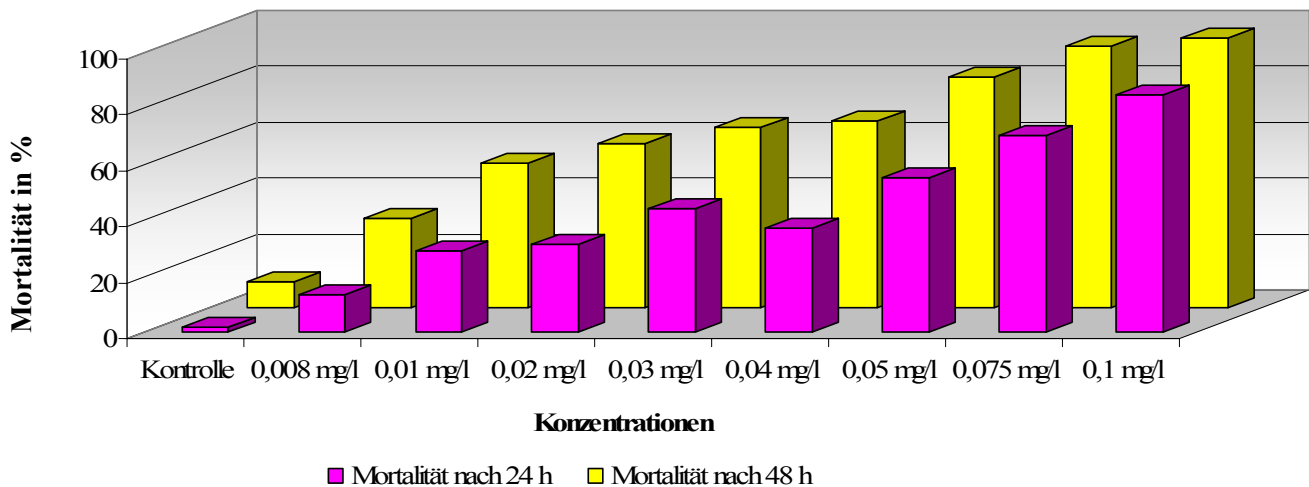


Abb. 21: Bti-Assay mit *Anopheles plumbeus*. Aufgeführt sind die Mortalitätsraten nach 24 und 48 Stunden (h) aus Tabelle 12.

Mittels einer Log-Probit-Analyse wurden die LC-Werte für den Zeitpunkt $t = 24$ h sowie $t = 48$ h berechnet. Grundlage dieser Berechnung sind die statistisch aufgearbeiteten Mortalitätsraten. Diese Sterberaten unterscheiden sich von den errechneten Mittelwerts-Mortalitätsraten, da hier die Ausfälle in den Kontrollen mit in die Berechnung einfließen (s. Tabelle 12). Des Weiteren wurde die Anzahl der je Bti-Dosis tatsächlich gestorbenen Larven mit der statistisch errechneten Todesrate verglichen. Mit einer χ^2 -Quadrat-Analyse wurden die tatsächlichen mit den erwarteten Mortalitäten verglichen. Bei den Wirkstoffkonzentrationen von 0,01 mg/l sowie bei 0,04 mg/l lag durch den Unterschied beider Mortalitäten der χ^2 -Wert über zehn. Nach weiteren statistischen Analysen, die kein anderes Ergebnis zeigten, wurde der Unterschied beider Werte als Besonderheit des biologischen Testsystems gewertet (s. Tabelle 13).

In der Tabelle 14 sind die wichtigsten LC-Werte gekoppelt an eine Zuverlässigkeit von 0.95 angegeben. Bei der angegebenen Konzentration sterben rechnerisch die dem LC-Wert entsprechende prozentuale Anzahl der Versuchstiere. Dies bedeutet, dass bei dem LC 50 die Hälfte aller Versuchstiere bei einer Dosis von 0.01719 mg/l Bti IPS 82 sterben, und das mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 %. Die LC 50-Dosis liegt mit einer Wahrscheinlichkeit von 0 bis 1 im Bereich von 0,01226 mg/l bis 0,02399 mg/l. Die in der Tabelle aufgelisteten Werte resultierten aus der Auswertung nach 48 Stunden. Das komplette Auswertungsprotokoll ist im Anhang 8.2 eingefügt.

Dosis	Mortalität korrigiert in %	Larven gesamt	Anzahl gestorben tatsächlich	gestorben erwartet	CHI^2 - Verteilung
0,008	24,0	180	57	62,41	0,8182
0,010	46,3	180	93	72,33	10,6504
0,020	53,7	180	105	106,69	0,0644
0,030	60,5	180	116	126,42	2,7234
0,040	63,0	180	120	138,95	10,5434
0,050	80,2	180	148	147,49	0,009
0,075	92,6	180	168	160,00	3,2856
0,100	95,7	180	173	166,52	3,0555
Tatsächliche Mortalität in der Kontrolle:			9,44%		
Geschätzte natürliche Mortalität:			10,00%		
Anzahl der Iterationen:		3			

Tab. 13: Bti-Assay mit *Anopheles plumbeus*. Die Tabelle zeigt die unter Einbeziehung der Sterberate in der Kontrolle errechneten Mortalitäten. Die tatsächlich gestorbenen Individuen werden mit der statistisch erwarteten Anzahl unter zu Hilfenahme einer CHI^2 -Analyse verglichen.

LC	Dosis mg/l	Zuverlässigkeit	Berechnete Streubreite		
10	0,00336	0,95	0,00147	< LC <	0,00754
50	0,01719	0,95	0,01226	< LC <	0,02399
90	0,08783	0,95	0,05341	< LC <	0,14603
99	0,33206	0,95	0,33206	< LC <	0,85896

t = 48h

Tab. 14: Bti-Assay mit *Anopheles plumbeus*. Angegeben sind die mit einer Zuverlässigkeit von 95% berechneten LC-Werte zum Zeitpunkt t=48 h. Die berechnete Streubreite gibt das Intervall des LC-Wertes über die ganze Zuverlässigkeitsskala wieder.

2.4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnten erstmalig wesentliche Aspekte der Bionomie von *An. plumbeus* nachgewiesen werden: Die ursprünglich als Baunhöhlenbrüter lebende Art kann anthropogen entstandene Habitats massiv bevölkern. *An. plumbeus*-Larven besitzen eine bisher nicht beschriebene Kälteresistenz und können längere Frostperioden unbeschadet überstehen. Aufgrund der Befunde konnte die Dynamik der *An. plumbeus*-Population klar dargestellt werden.

In den vier untersuchten Baumhöhlenvorkommen Frankfurter Flughafen, Mainz-Amöneburg, Stadtwald Wiesbaden im Bereich Goldgrund sowie im Wald der Gemeinde Böhl/Iggelheim konnte *An. plumbeus* flächendeckend nachgewiesen werden. Dabei war keine Bevorzugung von Dendrohelmen in bestimmten Bäumen zu erkennen. Dies wird durch Blacklock (1920c) bestätigt, der ebenfalls von keiner Bevorzugung der Baumhöhlen einzelner Baumarten als Eiablageplätze berichtete. Die Tatsache, dass die Larven hauptsächlich in Buchen (*Fagus sylvatica*) nachgewiesen wurden, korreliert bedingt durch ihre wachstumsspezifischen Besonderheiten mit der hohen Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Baumhöhlen bei dieser Baumart. Ebenfalls spiegelt sich in der Besiedlung künstlicher Brutstätten die Akzeptanz eines breiten Spektrums potentieller Eiablageplätze wider. Bereits Martini (1920), Schuberg (1927) und Mohrig (1969) listeten vereinzelt gemeldete Vorkommen quer durch Deutschland auf. Ergänzt mit den gewonnenen Erkenntnissen zur Verbreitung ist zu erwarten, dass *An. plumbeus* flächendeckend in Altholzbeständen vorkommt. Diese Wälder weisen prädestiniert durch ihre Alterstruktur eine hohe Dichte an wasserführenden Baumhöhlen auf. Unterstützt wird die Annahme der flächendeckenden Verbreitung von *An. plumbeus* durch spontan entdeckte Baumhöhlen in anderen Waldbereichen, wie z.B. im Bereich Kyffhäuser sowie entlang der Unstrut, bei Homburg an der Saar sowie im Vinchgau (Italien), die meist mit *An. plumbeus*-Larven besetzt waren.

Da Baumhöhlen häufig nur temporär Wasser führen, ist neben ihrer Verfügbarkeit ein ausreichender Niederschlag der Faktor, welcher den Bestand darin brütender Mücken reguliert. Dies wirkt sich besonders auf *An. plumbeus* aus, deren Eier eine anhaltende Trockenperiode nicht überstehen. Nach Angaben von Blacklock (1920) und Mohrig (1969) bleiben die Eier mehrere Wochen in sehr feuchter, nicht überfluteter Umgebung schlupffähig; dafür konnten in dieser Studie keine Anhaltspunkte gefunden werden. Die im gleichen Biotop vorkommende Waldmücke *Oc. geniculatus* ist dagegen in der Lage, auch längere Trockenperioden im Eistadium zu überdauern, sofern die Feuchtigkeit einen kritischen Wert

nicht unterschreitet (Yates, 1979). Wie alle Culiciden ist auch *An. plumbeus* ein Expansionsorganismus. Wurden in der Nähe beständig wasserführender Brutstätten, also dort, wo eine stabile Population vorkam, in einer Höhe von 3 bis 5 Metern künstliche Brutmöglichkeiten angebracht, waren diese während der Flugperiode der Imagines binnen 10 Tagen mit Larven besetzt. Eine Spontanbesiedlung dieser auch als Ovitrapps bezeichneten Eiablageplätze fand auch dann statt, wenn vegetationsbedingt im näheren Umfeld keine Larvenvorkommen zu erwarten waren. Eine große Akzeptanz von neuen Brutstätten zeigt auch die Besiedelung von Altreifen (Karch, 1995). Neben einzeln im Wald liegenden Exemplaren wurden Reifen, die bis zu ihrer thermischen Verwertung zu Millionen lagerten, von *An. plumbeus* als Eiablageplätze angenommen. Durch ihre typische Form verbleibt nach Niederschlägen immer Wasser im Reifen. In Verbindung mit eingetragenen Blättern und mineralischen Bestandteilen entstehen so geeignete Bedingungen für eine Brutstätte.

Während die Larven von *Oc. geniculatus* in allen Stadien das Jahr über vorhanden sind, zeigt sich bei *An. plumbeus* eine deutliche dem Jahreszyklus unterworfenen Periodik. Dabei entwickeln sich die Larven weitgehend synchron. Ausgelöst von den steigenden Temperaturen schlüpft die erste Mückengeneration aus den sich nun schnell verpuppenden Viertlarven. Die aus den abgelegten Eiern dieser Imagines resultierende nächste Larvengeneration entwickelt sich bis zum Spätsommer zur zweiten Mückengeneration. Mit dieser Jahresperiodik ist die Stechmückenart an die niederschlagsarme Zeit während des Sommers angepasst. Im Frühjahr werden unterschiedlichste Baumhöhlen zur Eiablage genutzt. Bedingt durch die niederschlagsarmen Sommermonate trocknen viele Brutstätten während dieser Zeit aus. Die Larven können zwar kurzfristig im nassen Mulm überleben, sterben aber bei fehlender Flutung ihrer Brutstätte ab. Zudem schwindet das Angebot an geeigneten Larvenhabitaten deutlich. In dieser Zeit ist es wenig effektiv eine große Anzahl von Imagines, also Verbreitungsstadien, hervorzubringen, um neue Baumhöhlen als Brutstätten zu besetzen. Ergänzend kommt hinzu, dass in den baumhöhlentragenden Altholzbeständen das Klima im Verlauf des Sommers auch für austrocknungsgefährdete Mücken immer ungünstiger wird. Die Luftfeuchtigkeit sinkt bei zunehmender Austrocknung des durch die Hallenstruktur spärlich bewachsenen Bodens. Mit dieser Strategie, bei allgemein ungünstigen Umweltbedingungen ihre Population über das Larvenstadium am Leben zu halten, gleichen die *Anopheles*-Mücken ihre fehlende Trockenresistenz der Eistadien wieder aus. Im Gegensatz dazu ist bei *Oc. geniculatus* das Überdauern von Trockenperioden im Eistadium (s. oben) (Yates, 1979) sowie das aperiodische Larvenwachstum innerhalb einer Vegetationsperiode und damit das ständige Vorhandensein

von Flugstadien die Grundlage für die stärkere Verbreitung. Sie sind damit in der Lage kurzfristig neue Brutstätten zu besiedeln. Geeignete, aber trocken gefallene, Larvenhabitate werden zur Eiablage genutzt. Aus diesen können unmittelbar nach einer Überschwemmung die Larven schlüpfen und sich umgehend zur Mücke entwickeln.

In den letzten Jahren kam es mit steigender Tendenz zu Beschwerden über aggressiv stechende Mücken in Ortschaften sowie einzelnen Gehöften. Der Plageerreger konnte jeweils während einer Ortsbegehung sehr schnell bestimmt werden. Wichtig war es, die Ursache der räumlich begrenzten Stechaktivitäten von *An. plumbeus* zu ermitteln. Anflüge von mehr als 100 Weibchen pro Minute konnten nur aus einem enormen Larvenvorkommen resultieren. Güllegruben, die zum Auffangen des mit Stickstoffverbindungen angereicherten Wassers, unterhalb von Misthaufen angelegt wurden, dienten den Mücken als Brutstätten. Auch ausgediente Jauchegruben, die ehemals mit den Abwässern aus der Schweine- oder Rindermast gespeist wurden, beherbergten *An. plumbeus*-Larven. Die Frage war, warum massive Belästigungen durch diese Stechmücke erst in letzter Zeit auftraten. Die Entdeckung, dass *An. plumbeus* auch andere Brutstätten als Baumhöhlen nutzt, war nicht ganz so neu. Bereits Vogel (1940) erwähnte in seiner Abhandlung über die Stechmücken Württembergs eine Belästigung durch diese Anopheline. Ihre Brutstätte wurde nach langem Suchen in ausgedienten Farbgruben einer nahen Färberei entdeckt. Auch die Beschreibung von Blacklock und Carter (1920c), die von mehreren Imagines in der Nähe eines Bauernhauses berichteten, ohne dabei Baumhöhlen gefunden zu haben, lässt auf die mit hoher Wahrscheinlichkeit vorhandene Grube als Brutstätte schließen. Warum die Beschwerden sich in den letzten Jahren häuften, hat zwei wesentliche Gründe. Der erste ist die tatsächliche Expansion der Mücke und eine daraus resultierende Belästigung, ausgehend von der Besiedlung neuer Brutstätten die durch ihre Größe die Grundlage für eine Massenvermehrung darstellen. Zweitens ist die Stärke einer Belästigung immer dem subjektiven Empfinden unterworfen. In den meisten Fällen beschwerten sich neu hinzugezogene Menschen über die penetrant stechenden Mücken. Nach Befragung der Nachbarn der Beschwerdeführer traten die Belästigungen zwar zuvor schon auf, wurden von den bodenständigen Anwohnern auch bemerkt, aber nicht als unabwendbare Plage angesehen. Mückendichte Gaze an Fenstern und Türen schützte das Innere der Wohnungen vor dem unliebsamen Gezeifer und Repellentien ermöglichten den stichfreien Aufenthalt im Freien. Waren die Stechaktivitäten zu unangenehm, wick man mit der Freizeitnutzung in mückenfreie Gebiete aus.

Die unterirdisch gelegenen Gruben bieten ideale Bedingungen für die Entwicklung der Larven. Meist wird nach ihrer Stilllegung der flüssige Inhalt ausgefahren und die Gruben

dadurch geleert, zurück bleibt eine nährstoffhaltige Schlammschicht. Nach erneutem, allmählichem Auffüllen durch Regenwasser oder Abwasser aus den Stallungen, entstehen so geeignete Bedingungen für die Larven. Auch Gruben, deren darüberliegender Misthaufen mit einem hohen Anteil an Stroh oder Holzspänen, wie das bei der Pferde-, Hasen- oder Schaf- bzw. Ziegenhaltung der Fall ist, bestückt sind, werden als Brutstätten angenommen. Der frische Mist von Schweinen und Rindern ist ohne Einstreu von wenig fester Konsistenz und schwimmt flächendeckend auf der Jauche. Mückenlarven, die obligat atmosphärische Luft benötigen, können unter diesen Bedingungen nicht überleben und ersticken bzw. das Weibchen findet hier keine offene Wasserfläche, um seine Eier abzulegen. Diese Jauchegruben eignen sich erst als Brutstätten, wenn diese Schwimmschicht nach einer Stilllegung oder weniger intensiven Nutzung nicht mehr vorhanden ist. Auch Fäkaliengruben, die im Zuge einer Kanalisierung bestehen bleiben, aber nicht mehr mit Abwässern gefüllt werden, sind ebenfalls ideale Culiciden-Brutstätten. Unter diesen Bedingungen findet *An. plumbeus* gute Voraussetzungen für eine optimale Larvenentwicklung vor und kann sich so in großer Zahl vermehren.

Es konnte zudem gezeigt werden, dass Larven von *An. plumbeus* höhere pH-Werte tolerieren als die sympatrisch vorkommenden Culiciden. Während bei den in den Baumhöhlen gemessenen pH-Werten bis 8,5 auch *Culex pipiens* und *Oc. geniculatus* vorkamen, lebten in den Gruben bei Werten ab 8,5 bis maximal 9,2 nur Larven der Fiebertmücke. Besatzdichten bis 180.000 Individuen pro Quadratmeter sind ein Beweis für eine gute Anpassung an die extremen Bedingungen. Dabei handelt es sich nicht um eine Fähigkeit, die nur zufällig in einem Verbreitungsgebiet ausgeprägt ist. Das Phänomen der Akzeptanz hoher pH-Werte trat in allen beobachteten Grubenvorkommen auf. Diese Toleranz verschafft *An. plumbeus* einen entscheidenden Vorteil gegenüber anderen Culiciden, die in einem gemeinsam genutzten Larvenbiotop direkte Nahrungskonkurrenten sind.

Ein weiterer Vorteil einer Grube als Brutstätte sind ihre konstanten klimatischen Bedingungen. Während eine Baumhöhle aufgrund ihres kleinen Volumens bei geringen Niederschlägen im Sommer schnell austrocknen kann (s. oben), besteht diese Gefahr bei einer Grube nicht. Auch wenn ihr Inhalt abgesaugt wird, verbleibt ausreichend Nährmedium in der Grube, um einen Fortbestand der Art zu gewährleisten. Förderlich für das Anwachsen der Population sind die in den Gruben bestehenden Temperaturen. Das umgebende Erdreich und die Grubendecke, die meist zusätzlich durch Humus, Mist oder Stroh abgedeckt ist, stellen eine hervorragende Isolierung dar. Zusätzlich produzieren die Mikroorganismen bei ihren Ab-

und Umbauprozessen im Nährmedium Wärme. So wurden im Winter bei extremen Außentemperaturen von -21°C in der Güllegrube keine Werte unter 6°C gemessen.

Unter diesen konstanten Lebensbedingungen entwickeln sich die Larven in den Gruben ebenso synchron wie die der Baumhöhlenvorkommen und bringen zwei Mückengenerationen pro Jahr hervor. Dies mit dem Unterschied zum naturnahen Larvenhabitat, dass die Massen an synchron schlüpfenden Mücken der Gruben zu einer starken Belästigung führen. Für Baumhöhlen brütende Vorkommen ist dieses extreme Phänomen nicht bekannt.

Die Hauptaktivitätszeit der Mücken lag auch hier im Frühjahr und im Spätsommer. Ausgehend von einer dicht besiedelten Grube erschlossen die Mücken entlang ihren schattigen Ruheplätzen neue Brutbiotope. Dabei wurden auch in weniger günstigen Brutstätten wie Regenwassertonnen und sonstige mit klarem Wasser gefüllte kleine Behältnisse Larven nachgewiesen. Da *An. plumbeus*-Mücken bei längerem Aufenthalt in der Sonne auszutrocknen drohen und auch sonst scheinbar keine weiten Strecken auf einmal zurücklegen, nutzen sie beschattete Ruheplätze als Trittsteinbiotope zur aktiven Erschließung neuer Lebensräume. Ideale Lebensräume, die sich durch vorhandene Brutstätten und Blutspender anboten, aber durch eine Brache ohne horizontale Strukturen von einem *An. plumbeus*-Vorkommen getrennt waren, können nur durch Windverdriftung erobert werden. War dies aufgrund ungünstiger Windrichtungen nicht möglich, wurden dort auch keine Larven oder Mücken nachgewiesen (Kapitel 2.3.1.2.3).

Für die zwei, im Jahre 1997 in Duisburg aufgetretenen autochthonen Malariafälle (Krüger *et al.*, 2001), wurde basierend auf dem Nachweis einer Baumhöhle mit Larven, auch *An. plumbeus* als möglicher Überträger diskutiert. In dem Krankenhaus wurde zur gleichen Zeit ein Mädchen aus Angola an einem Kieferabszess behandelt. Wie sich später herausstellte, war sie symptomlos *P. falciparum*-positiv. Die Übertragung von Patient zu Patient wurde formal ebenso ausgeschlossen wie die Infektion über eine *P. falciparum* tragende tropische Mücke. Jain S. *et al.* (2005) konnten am Beispiel eines aktuellen Falles belegen, dass eine unbemerkte Übertragung der Malariaerreger von Patient zu Patient sehr wohl möglich ist. Als Ergebnis seiner Studie fordert er die Abschaffung aller Multiinfusionssysteme aus den Krankenhäusern und Arztpraxen.

Es ist allerdings auch sehr unwahrscheinlich, dass *An. plumbeus*, eine Mücke die leicht auszutrocknen droht, eine Distanz von 700 Metern über Beton und Asphalt von ihrem Brutareal im Park in das Krankenhaus zurücklegt, zudem der Sommer trocken und heiß war und potentielle Blutspender jeglicher Art in einem Stadtpark nicht selten sind. Die Entwicklungszeit von *P. falciparum* dauert bei einer durchschnittlichen Temperatur von 26°C

immerhin 14 Tage (Warrell und Gilles, 2002). Eine Zeitspanne, die in klimatisierten Räumen für eine Stechmücke ohne ausreichende Flüssigkeitsversorgung nicht zu überleben ist. Zudem ist diese tagaktive, schwarze Mücke, die langsam aber direkt den potentiellen Blutspender anfliegt, nur schwer zu übersehen. Die aufgeführten Tatsachen unterstützen in diesem Fall nicht den Verdacht, dass es sich bei dem Überträger um ein aus dem Park stammendes *An. plumbeus*-Weibchen gehandelt hat.

Die Frage nach der Überwinterung von *An. plumbeus* aus Baumhöhlenpopulationen wird von allen Autoren (Blacklock, Carter, 1920c; Martini, 1952; Mohrig, 1969; Becker *et al.*, 2003) ähnlich beantwortet. Prinzipiell gehen die Autoren davon aus, dass die Art im Larvenstadium überwintert. Dabei verbringen die Larven die kalte Jahreszeit im Mulm ihres Habitats und können dort auch längere Zeit bei zugefrorener Oberfläche überstehen. Anhaltende Frostperioden, in denen die Baumhöhlen ganz durchfrieren, führen zu großen Ausfällen bis hin zum Erlöschen des Larvenvorkommens.

Dieser Annahme steht die Höhenverbreitung der Mücke, die bis zu einer Höhe von 2000 Meter angegeben wird, gegenüber (Blacklock, Carter, 1920c; Mohrig, 1969; Becker *et al.*, 2003; Schaffner *et al.*, 2001). Unter Berücksichtigung der Tiefsttemperaturen, die im Winter in den Hochwäldern Mittel- und Osteuropas über einer Höhe von 1000 Metern erreicht werden, scheint in diesen Regionen ein Überleben von *An. plumbeus* ohne ausgeprägte Frostresistenz nicht möglich. Bereits in den Mittelgebirgen bis zu einer Höhe von 1000 Metern sind anhaltende Dauerfrostperioden keine Seltenheit. Die Ergebnisse in den Kapiteln 2.3.1.5 bzw. 2.3.1.6 zur Frost- und Kälteverträglichkeit zeigen, wider allen bisherigen Annahmen, eine sehr gute Adaption von *An. plumbeus* an extrem niedere Temperaturen. Immerhin überlebten 68 % der Larven eingeschlossen im Eis eine 14-tägige Frostperiode bei -20°C . Dabei war kein signifikanter Unterschied der Sterberate zwischen Baumhöhlen- und Grubenpopulationen zu erkennen. So haben auch die Vorkommen von *An. plumbeus* aus den frostfreien Gruben ihre Fähigkeit der Kälteadaptation nicht verloren. Ein weiterer Hinweis der Anpassung an niedere Temperaturen zeigte die Verzögerung der Larvenentwicklung bei einer Temperatur von 4°C . Während des Versuchsintervalls von 68 Wochen stoppte die Entwicklung der Larven im vierten Stadium. Das Ende der Untersuchungen erlebten dabei 68 % der Versuchsindividuen. Die lange Entwicklungspause beeinflusste nur in geringem Maße die Weiterentwicklung der Larve über das Ruhestadium zur Mücke. So entwickelten sich nach 54 Wochen Kälteruhe 91 % der bereitgestellten Larven bei 21°C Umgebungstemperatur zu Imagines. Nach weiteren 14 Wochen Kältestagnation entwickelten sich 73 % der Larven

zu Mücken. Beide Testreihen zeigten keine Auffälligkeiten bezüglich der Geschlechtsverteilung der geschlüpften Mücken. Auch gab es keine signifikanten Unterschiede in den Mortalitätsraten der Versuchsorganismen aus Gruben- sowie Baumhöhlenvorkommen.

An. plumbeus gilt als eurygam. Um erfolgreich zu kopulieren, formieren sich die Mückenmännchen über markanten Strukturen zu zylindrischen Hochzeitsschwärmen. Die Weibchen werden beim vertikalen Durchfliegen dieser Schwärme von den männlichen Individuen angefliegen und im Idealfall auch begattet. Ein stenogames Verhalten, welches für die Gruben brütende Anopheline von Vorteil wäre, konnte weder in den Freilandversuchen noch unter Laborbedingungen nachgewiesen werden. Ebenfalls konnte kein Nachweis einer Autogenie erbracht werden wie dies Schaffner *et al.* (2001) für *An. plumbeus* angibt. Dagegen konnte gezeigt werden, dass Weibchen auch ohne Insemination aktiv nach Blutspendern suchen und diese aggressiv stechen. Nach erfolgter Blutmahlzeit bilden diese Weibchen Eier aus. Es konnte kein Beweis erbracht werden, dass die Weibchen ohne vorherige Blutmahlzeit Eier produzierten. Stenogames Verhalten in Verbindung mit einer ausgeprägten Autogamie ist für eine Spezies, die partiell geschlossene Brutstätten besiedelt, ein Überlebensvorteil (Aslamkhan, Laven, 1970). Beide Eigenschaften sind bei *Culex pipiens pipiens* Biotyp *molestus* vereint (Becker *et al.*, 2003). Ihr daraus resultierender Expansionserfolg zeigt sich in der Besiedelung von 98 % der während der Projektdauer untersuchten 256 unterirdischen Brutstätten. Eine grubenbrütende Mückenspezies, die weder in begrenzten Räumen erfolgreich kopuliert, noch die Fähigkeit besitzt ohne eine Blutmahlzeit ein Eigelege zu produzieren, kann durch hermetisches Abriegeln ihrer Brutstätte zuverlässig bekämpft werden. Essentiell ist dabei, neben der Kartierung aller Brutstätten eines *An. plumbeus*-Vorkommens, die genaue Begutachtung der Gruben, um jede noch so kleinen Öffnungen zu erkennen. Den Mücken dienen bereits Durchlässe von einem cm² im weitläufigen verzweigten Zuleitungssystem der Grube als Ein- bzw. Ausgang. Ist ein hermetisches Verschließen der Grube nicht möglich, kann ergänzend ein geeignetes Larvizid eingesetzt werden. Da der Grubenhalt weiterhin zu Düngezwecken in Agrarkulturen ausgebracht werden kann, sollte hier ein für Culiciden selektiver Wirkstoff verwendet werden. Mit Hilfe von Bioassays konnte die Empfindlichkeit der Larven gegenüber *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Serotyp H14) bestimmt werden. Unter Laborbedingungen tötete eine Dosis von 0,1 ppm des hochaktiven Stammes IPS 82 nach 48 Stunden 96 % der *An. plumbeus*-Larven. Im Einsatz in den Gruben zeigten sich Konzentrationen von 1 bis 5 ppm des handelsüblichen Bti-Präparates Vectobac 12 AS[®] (ValentbioSciences) als effektiv für eine Larvenbekämpfung. Die

Berechnung der volumenbezogenen Dosis erfolgt auf der grundlegenden Beobachtung, dass sich die Larven hauptsächlich in den ersten 10 cm ihres Biotops aufhalten. Nur bei massiven Störungen tauchen sie weiter ab. Die Effektivität des Wirkstoffes ist indirekt abhängig von der Temperatur. Bei niederen Temperaturen ist der Energiebedarf geringer, es wird also weniger Nahrung aufgenommen. Auch ist der Aktionsradius der Larven eingeschränkt. Bei Temperaturen des Larvenhabitats unter 12° C empfiehlt es sich, eine Dosis von 5 ppm anzuwenden. Bei Temperaturen darüber kann diese bis auf 1 ppm gesenkt werden. Der Erfolg der Maßnahme muss nach 48 Stunden überprüft werden. Damit Bti wirkt, muss es von seinem Zielorganismus oral aufgenommen werden, daher werden Eier und Puppen von ihm nicht beeinflusst. Um eine Brutstätte dauerhaft erfolgreich zu bekämpfen muss nach der Erstapplikation routinemäßig kontrolliert werden, ob weitere Larven aus noch vorhandenen Eiern geschlüpft sind. Einem positiven Befund muss bis zum Erreichen der Puppenruhe mit einer erneuten Bti-Behandlung begegnet werden.

3 Vektorkompetenz von *Anopheles plumbeus* unter besonderer Berücksichtigung von *Plasmodium falciparum*

3.1 Einleitung

3.1.1 *Plasmodium falciparum*

Wie alle Malariaerreger benötigt auch *P. falciparum* zwei Wirte, um seinen Lebenszyklus zu vollenden (s. Abbildung 22). Der Endwirt, in dem per Definition die Reduktionsteilung des Parasiten erfolgt, ist die *Anopheles*-Mücke. Der Mensch gilt demnach in der Entwicklung der Malariaerreger als Zwischenwirt. Die *Anopheles*-Mücke nimmt mit der Blutmahlzeit an einem mit *Plasmodium falciparum* infizierten Menschen den Parasiten auf. Mit diesem Wirtswechsel werden, mit Ausnahme der reifen Gametozyten, alle anderen parasitären Stadien verdaut. Streng genommen findet so eine Auslese statt, es wird nur das genetische Material erfolgreich die Vektorpassage absolvieren, welches in der Lage ist, fertile Gametozyten auszubilden. In der *in vitro*-Kultivierung von *P. falciparum* ist die Selektion durch den Vektor nicht gegeben. Die Parasiten werden rein asexuell vermehrt und verlieren mit der Zeit ihre Fähigkeit zur Bildung ausreichend fertiler Gametozyten.

Durch die spezifischen Bedingungen im Mückendarm und dem daraus resultierenden Anstieg des pH-Wertes, in Verbindung mit dem Absinken der Temperatur, vollenden die haploiden Gametozyten ihre Entwicklung. Sichtbar wird dies durch die Abrundung der zu Anfang bananenförmigen Mikro- und Makrogametozyten. Dabei nimmt die Xanthurensäure eine Schlüsselfunktion ein (Sinden, Croll, 1975). Zwischen 10 bis 15 Minuten nach der Blutaufnahme nimmt ein optisch eindrucksvolles Ereignis der Parasitenentwicklung seinen Lauf. Während der Exflagellation bildet der Mikrogametozyt befruchtungsfähige Mikrogameten. Dabei werden aus den Mikrogametozyten 4 - 6 so genannte Plasmaprotuberanzen ausgestülpt, in welche die neu gebildeten Kerne einwandern. Die so gebildeten fadenförmigen Mikrogameten lösen sich mit wild schlängelnden Bewegungen vom Restkörper und bewegen sich angelockt durch chemische Reize auf die Makrogameten zu, um

diese zu befruchten. Der weibliche Gamet reift weitaus unspektakulärer aus seinem Gametozyten. Das Verschmelzungsprodukt beider Gameten, die diploide Zygote, entwickelt sich nach 16 bis 24 Stunden zu einem Ookineten. Bis einschließlich zu diesem Entwicklungsstadium im Vektor kann die Parasitenentwicklung auch in anderen, nicht anophelinen Culiciden, nachgewiesen werden. Der Ookinet wandert durch die peritrophe Membran zum Mitteldarmepithel, wo er sich zwischen Basallamina und Epithel zur Oozyste differenziert. Dem neuen Entwicklungsabschnitt, der Sporogonie, geht eine Reduktionsteilung voraus. Während der Wachstumsphase der Oozyste durch mitotische Teilungen wachsen einkernige Sporoplasten, in denen sich die Kerne weiter teilen. Diese Kerne wandern in die Plasmaauswölbungen der Sporoplasten ein und bilden die Sporozoiten, die radiär in der Oozyste angeordnet sind. Diese Mitteldarmsporozoiten werden in das Hämocoel der Mücke freigesetzt. Mit dem Hämolymphestrom werden sie zur Speicheldrüse transportiert und dringen durch das Epithel der Loben in diese ein.

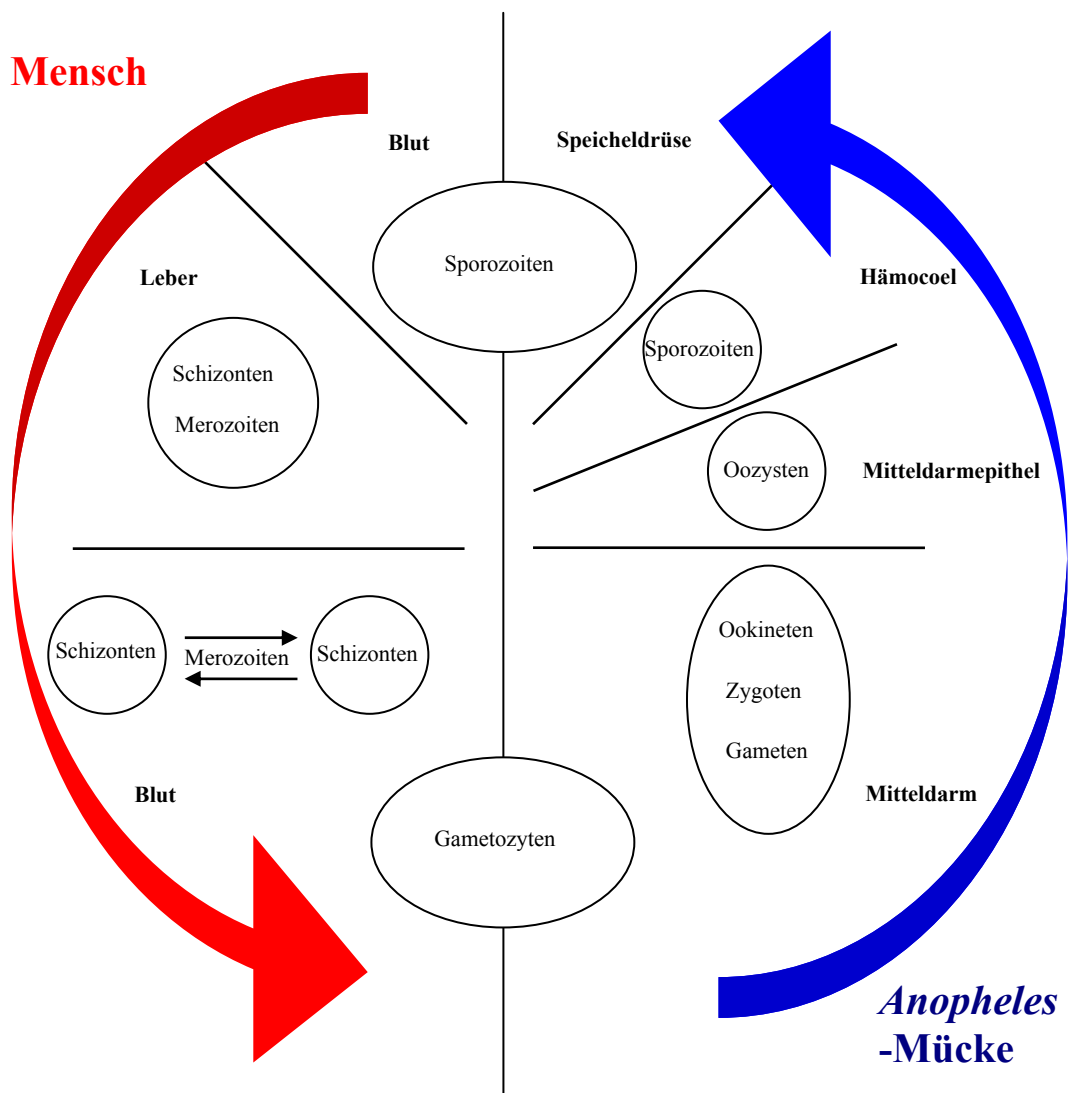


Abb. 22: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum*. Der blaue Bereich stellt die Entwicklung im *Anopheles*-Weibchen dar. Der rote Pfeil zeigt die Entwicklungsrichtung im Menschen.

Die Entwicklungsgeschwindigkeit des Malariaerregers in der *Anopheles*-Mücke ist temperaturabhängig. Unterhalb einer Temperaturschwelle von 20° C im Durchschnitt entwickelt sich *P. falciparum* nicht weiter. Bei einer Durchschnittstemperatur von 26° C können bereits 12 bis 14 Tage nach der Infektion der Mücke mit dem Erreger der Malaria tropica Sporoziten in den Speicheldrüsen nachgewiesen werden. Aus den Speichelgängen wandern sie bei einem erneuten Stich der Mücke über den Stichkanal in die Haut des Blutspenders. Die Infektion ist dabei sehr effektiv, da in Abhängigkeit von der Zeitdauer des Stiches nur zwischen 15 und 200 Speicheldrüsen-Sporoziten injiziert werden (Vanderberg, 1977; Rosenberg *et al.*, 1990).

Um der Phagozytose durch das Immunsystem des Wirtes zu entgehen, ist die Verweildauer in der Haut nur kurz. Bereits nach 10 bis 20 Minuten befinden sich die Sporoziten im Blut, von wo aus sie die Leber infizieren und ihre Entwicklung fortsetzen. Über die Kupferchencellen dringen sie in das Endothel ein und durchwandern mehrere Hepatozyten. Sie setzen sich in einer Hepatozyte fest und durchlaufen dort innerhalb von 47 bis 52 Stunden die ungeschlechtliche Vermehrung, auch exo-erythrozytäre Schizogonie genannt (Frevert, Nardin, 2005). Das Eindringen der Sporoziten in die Hepatozyten wird durch die Einstülpung der Wirtszell-Plasmamembran hervorgerufen. Es entsteht die parasitophore Vakuole, welche den eindringenden Parasiten schützend umgibt (Meis *et al.*, 1983). Die Sporoziten differenzieren sich innerhalb von 47 bis 52 Stunden hinweg über das Trophozoiten-Stadium zu reifen Leberschizonten, diese enthalten etwa 1500 bis 8000 Merozoiten, wobei die Anzahl der Merozoiten pro reifem Schizonten stark in den unterschiedlichen Wirten variieren kann. Durch Aufplatzen der infizierten Hepatozyten wird die erste Generation von haploiden Merozoiten freigesetzt, sie gelangen in den Blutstrom und dringen in die Erythrozyten ein. Bei der zweiten ungeschlechtlichen Vermehrung innerhalb des Erythrozyten (intra-erythrozytäre Schizogonie) entwickeln sich die Merozoiten innerhalb der parasitophoren Vakuole (Lingelbach, Joiner, 1998) über Ring- und Trophozoiten-Stadium zum reifen Schizonten (s. Abbildung 23). Während des Trophozoiten-Stadiums metabolisiert der Parasit in seiner Nahrungsvakuole hauptsächlich das Hämoglobin des Erythrozyten. Der Globinanteil wird verwertet und das dabei freiwerdende Häm, welches nicht abgebaut werden kann, polymerisiert zu dem unlöslichen Malaria-Pigment, dem Hämozoin, welches in der Nahrungsvakuole akkumuliert wird. Die vielkernigen Schizonten zerfallen in mehrere Merozoiten, die durch Platzen der Zelle freigesetzt werden und somit im Blutstrom erneut Erythrozyten infizieren können, welches sich auch in einem Anstieg der Parasitämie im Blut (Prozentsatz der infizierten roten Blutkörperchen) bemerkbar macht. Die ungeschlechtliche

Differenzierung der Blutstadien bei *P. falciparum* verläuft anfänglich synchron, bei steigender Parasitendichte zunehmend asynchron, so dass Ring-Stadien, Trophozoiten und Schizonten gleichzeitig im peripheren Blut vorhanden sind. Die Dauer eines vegetativen Entwicklungszyklusses ist abhängig vom Parasitenstamm und kann zwischen 18 bis 30 Stunden betragen. Nach Erreichen einer kritischen Parasitendichte differenziert ein Teil der Ringe zu generativen Stadien, den Makro- oder Mikrogametozyten (s. Abbildung 23). Nach einer Entwicklungsdauer von 12 bis 14 Tagen sind diese ausgereift und bleiben für maximal weitere 5 Tage fertil. Durch den Stich und die Blutaufnahme einer *Anopheles*-Mücke können die Gametozyten ihre Entwicklung, wie oben beschrieben im Zwischenwirt fortsetzen.

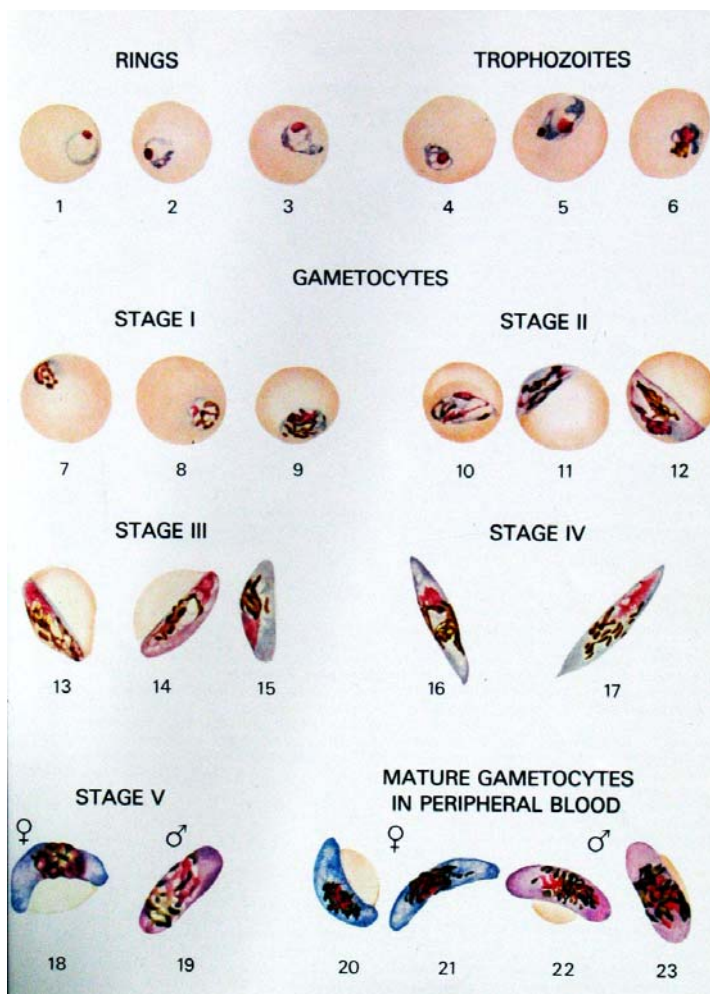


Abb. 23: Dargestellt sind die Blutstadien von *Plasmodium falciparum*. Die Ziffern 1 bis 6 zeigen die vegetative Entwicklung. Das erste Stadium, das sog. Ringstadium (Ziffer 1-3), entwickelt sich weiter zu den Trophozoiten (Ziffer 4-6). Die Entwicklung der Gametozyten wird in fünf Stadien unterteilt (Stage I-V). Eine eindeutige Differenzierung zwischen weiblichen und männlichen Gametozyten ist ab dem IV-Stadium möglich. Die Parasiten des V. Gametozytensatadiums können, wenn sie von einer *Anopheles*-Mücke aufgenommen werden, sich in ihrem Vektor weiterentwickeln. (Carter, Miller, 1979)

3.1.2 Sicherheitslabor

Die Infektion von *Anopheles*-Mücken mit humanpathogenen Plasmodien sowie die Handhabung der Vektor-Parasiten-Einheit sind über die TRBA 105 (Technischen Regeln für Biologische Arbeitsstoffe) geregelt. Beim Arbeiten mit infizierten Vektoren ist ein Entweichen der Stechmücken zu verhindern. Grundsätzlich darf die Infektion der Mücken sowie ihre Haltung und nicht zuletzt die Kontrolle der Parasitenentwicklung im Zwischenwirt nur in den zugelassenen, ausbruchsicheren Räumen durchgeführt werden. Das Sicherheitslabor ist nur über eine Schleuse, deren zwei Türen sich unabhängig voneinander nur einzeln öffnen lassen, zu betreten bzw. zu verlassen. Um eventuell entwichene Stechmücken besser erkennen zu können sind, wie in den Abbildungen 24 und 25 zu erkennen, die Wände im Labor und in der Schleuse weiß gestrichen. Beim Betreten des Sicherheitsbereichs ist ein mückenstichdichter Schutzanzug anzulegen (s. Abbildung 24). Die Zu- und Abluftschächte sind mit mückenundurchlässiger Gaze versehen (s. Abbildung 24). Über einen Notausschalter besteht die Möglichkeit, die Lüftung im Sicherheitsbereich abzustellen. Dies ist im Falle des unkontrollierten Entweichens von infizierten Stechmücken notwendig, damit das bereitstehende Insektizid nach seiner Freisetzung seine Wirkung ungehindert entfalten kann. Beim Verlassen des Sicherheitsbereiches startet in der Schleuse ein Zyklon, der am Schutzanzug festsitzende Mücken innerhalb seiner zweiminütigen Laufzeit abbläst. Die Tür zum Verlassen der Schleuse wird nach weiteren zwei Minuten entsperrt und kann dann geöffnet werden. In dieser Zeit muss die Schleuse nach frei gesetzten Mücken abgesucht werden. Einzelne Mücken können manuell getötet werden. Für den Fall eines Massenausbruchs steht ebenfalls ein Insektizid bereit.

Die infizierten Mücken werden nach dem "Käfig in Käfig System" in bruchfesten, ausbruchsicheren Dosen in hermetisch schließenden sowie abschließbaren Inkubatoren bis zu ihrer Sektion untergebracht. Das Sicherheitslabor ist mit drei eingebauten Inkubatoren ausgestattet (s. Abbildung 25), so können gleichzeitig unterschiedliche klimatische Bedingungen simuliert werden.

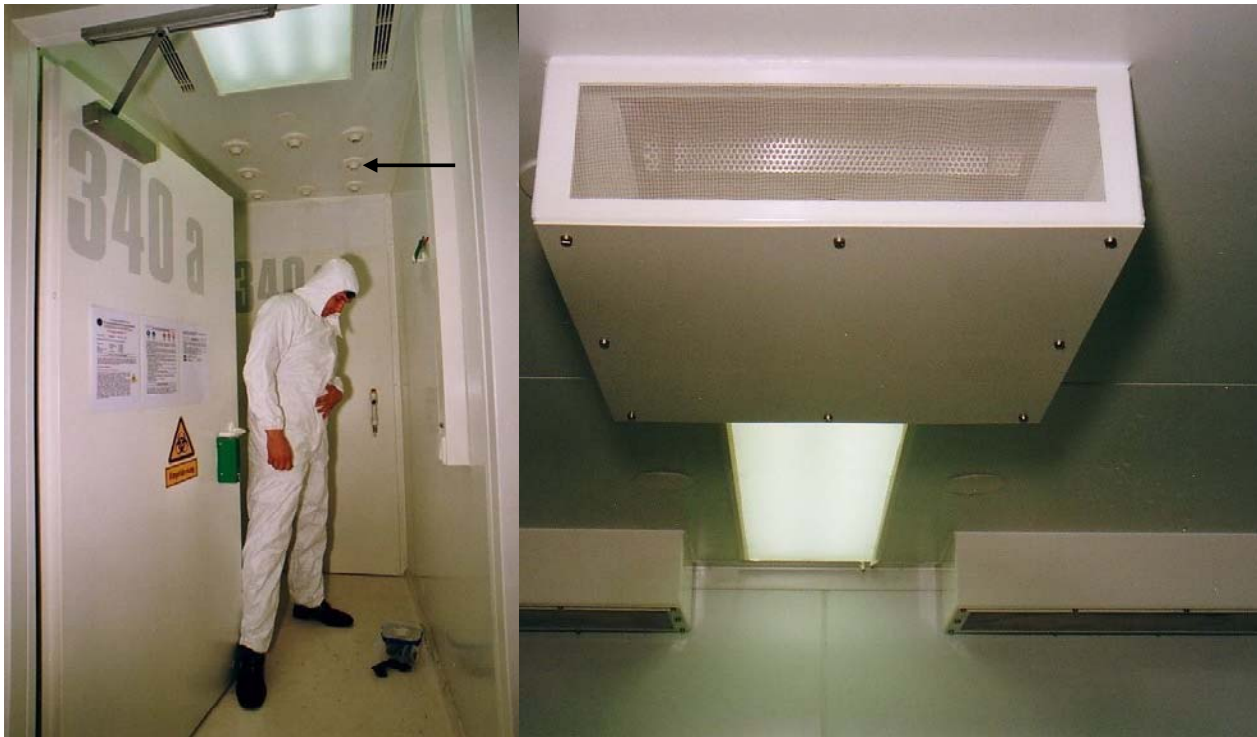


Abb. 24: Die Abbildung A zeigt das Betreten der Schleuse mit Schutzanzug in Richtung Sicherheitslabor. An der Decke sind die Düsen der Luftdusche zu erkennen (schwarzer Pfeil). Beim Verlassen des Sicherheitsbereiches sollen dadurch am Anzug sitzende Mücken abgeweht werden. In Bild B ist das mit Mückengaze verschlossene Lüftungssystem dargestellt.



Abb. 25: Abbildung A zeigt das Arbeiten in Schutzkleidung. Links ist einer von drei eingebauten Inkubatoren zu sehen. Alle Oberflächen sind weiß gehalten, um ausgebrochene Mücken besser zu erkennen. Teil B zeigt das Absaugen infizierter Mücken mit einer Membran-Saugpumpe. Die Mücken werden gezählt und einzeln entnommen.

3.2 Methoden

3.2.1 Zucht von *Anopheles spec.*

3.2.1.1 Verwendete Anophelinen

Für die Etablierung des *in vitro*-Infektionsmodells von *An. plumbeus* mit *P. falciparum* werden im Vorfeld tropische Anophelinen benötigt. Die Infektionsraten dieser permanent verfügbaren Anophelinen aus Laborkulturen zeigen die Einflüsse der Mückenaufzucht sowie die Effektivität unterschiedlicher Methoden der *P. falciparum*-Kultivierung auf. *An. gambiae s. str.* (Giles) Stamm LAGO und *An. albimanus* (Weidemann) Stamm ELSA wurden von Prof. Briegel (Zoologisches Institut der Universität Zürich, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Der speziell auf eine *P. falciparum*-Sensibilität selektionierte Stamm von *An. stephensi* (Liston) stammt aus dem Medizinisch Parasitologischen Institut in Nijmegen, Holland. Die später benötigten *An. plumbeus*-Mücken werden als Larven aus ihren Biotopen entnommen und im Labor aufgezogen.

3.2.1.2 Blutmahlzeit

3.2.1.2.1 Lebende Tiere als Blutspender

Je nach Anzahl der Mücken im Käfig werden ein bis drei Mäuse (NMRI-Auszucht-Mäuse) mit Ketamin/Xylazinhydrochlorid narkotisiert. Damit die Blutspender nach 10 Minuten einschlafen und entsprechend lange ruhig gestellt sind, werden pro Maus 100µl Narkoselösung injiziert. Bis zum Einsetzen der Narkose verbleiben die Tiere in ihren Käfigen. Sind sie völlig eingeschlafen, werden sie für 15 bis 20 Minuten auf einen Käfig mit Mücken gelegt. Nachdem die Versuchstiere erste Regungen zeigen, werden sie zurück in ihren Käfig gebracht und benötigen etwa eine Stunde, bis sie sich wieder vollends von der Narkose erholt haben. Falls das gleiche Tier abermals als Blutspender verwendet werden soll, sollte die Regenerationszeit von einer Stunde eingehalten werden. Während der Schlafphase sinkt die Körpertemperatur des blutspendenden Tieres unter die normale Körpertemperatur, daher

sollte während der Fütterungen die Umgebungstemperatur einen Wert von 27° C nicht unterschreiten.

3.2.1.2.2 Membranfütterung

Für diese Art der Fütterung wird den Stechmücken schlachtfisches Schweineblut über eine Membran zum Saugen angeboten. Zur Verhinderung der Gerinnung wird das Blut nach der Entnahme verquirlt. Vorbereitend für die späteren Infektionsversuche wird die Akzeptanz dreier unterschiedlicher Membrantypen durch die Stechmücken untersucht. Dabei wird das Blut in eine speziell angefertigte Schale aus HDD PE mit einem Volumen von 60 ml gefüllt, mit der jeweiligen Membran abgedeckt und unter zu Hilfenahme eines Gummibandes um den Rand fixiert. Als Testmembranen werden Parafilm[®], frischer, gereinigter Schweinedünndarm und Kollagenkünstdarm verwendet. Sowohl der Kollagenkünstdarm wie auch der Schweinedarm werden in Quadrate von je 10 cm Kantenlänge geschnitten. Bei der dritten Membran, dem Parafilm[®], genügt eine Kantenlänge von 3 cm, die vor Gebrauch in jede Richtung maximal gedehnt wird. Die gefüllten und verschlossenen Blutschälchen werden in einem Wasserbad auf 37° C vorgewärmt und mit der Membran nach unten auf einen Käfig mit 100 Mückenweibchen gelegt. Mit Hilfe einer auf das Blutschälchen gelegten "Mini Mouse", einer nach Kuhn (1998) so benannten Wärmeplatte, wird die Temperatur des Blutes konstant gehalten. Nach Ablauf von 15 Minuten wird das Blutmahl entfernt und die vollgesaugten Mücken gezählt.

3.2.1.3 Eiablage

Bei einer Umgebungstemperatur zwischen 27° C und 30° C ist die Eientwicklung bei *Anopheles stephensi* nach zwei Tagen abgeschlossen. Am dritten Tag nach der Blutfütterung wird ein befeuchtetes Filterpapier in einem Schälchen als Eiablagemöglichkeit über Nacht in den Käfig gestellt. Am darauf folgenden Morgen wird das mit den *Anopheles*-Eiern besetzte Filterpapier aus dem Käfig genommen und mit einer Pinzette die toten Stechmücken abgesammelt. Um die Infektionsrate der nächsten Mückengeneration mit Endoparasiten der Gattung *Nosema* weitestgehend zu minimieren, werden die Mückeneier in 70 prozentigem Ethanol gewaschen. Die Parasiten sitzen auf der Eioberfläche und infizieren die Larven beim

Schlupf aus der Eihülle. Je stärker die Anfangsinfektion mit dem Parasit *Nosema*, desto höher sind die Sterberaten der Larven während ihrer Entwicklung (Vavara, Undeen, 1970).

Für die Alkoholdesinfektion werden an eine Wasserstrahlpumpe eine Saugflasche mit einem Filter bestücktem 40 mm Nutschaufsatz verwendet. Die Mückeneier werden mit dem Ethanol aus einer Spritzflasche in den Filteraufsatz gespült. Nach einer einminütigen Wartezeit wird über die Wasserstrahlpumpe der Alkohol abgesaugt und mit Wasser aus einer Spritzflasche nachgespült. Das Filterpapier mit den Eiern wird in eine Schlupfschale mit einer Wassertiefe von einem Zentimeter gegeben. Durch Wasserbewegungen können Eier an die Seitenwände gespült werden und dort kleben bleiben. Um ein Austrocknen dieser Eier zu verhindern, werden diese mit Hilfe eines feinen Wasserstrahls zurückgespült.

3.2.1.4 Larvenaufzucht

Bei einer Wassertemperatur von 23° C ist die Embryonalentwicklung zwei Tage nach der Eiablage abgeschlossen, und die durchscheinenden, etwa 1,5 mm langen Larven schlüpfen. Die Aufzucht der Stechmückenlarven erfolgt auf der Grundlage der Briegelschen Methode (Timmermann, Briegel, 1993). Die Larven werden in einer Schale mit 1,5 Liter demineralisiertem Wasser aufgezogen (s. Abbildung 26). Um die Verdunstung und Kontaminationen mit Anflugkeimen zu minimieren, sind die Wasserschalen mit einer Plexiglasscheibe abgedeckt. Nach dem Schlupf der Larven aus ihren Eihüllen werden je 400 Erstlarven aus der Schlupfschale in eine Aufzuchtsschale gezählt. Am Tag drei nach dem Schlupf wird das Wasser erstmalig gewechselt. Abweichend von der Methode nach Briegel werden die Larven aus einer Schale zu je 100 Stück auf neue Aufzuchtsschalen verteilt. Jeden zweiten Tag werden die Larven über ein Netz abgeseibt und in eine Schüssel mit frischem demineralisiertem Wasser überführt. Ab Tag acht, gerechnet seit dem Schlupf aus den Eiern, verpuppen sich die ersten Stechmückenlarven. Mit Hilfe einer Pipette werden diese aus den Schalen abgesammelt und in einen mit Wasser gefüllten Becher (10 cm Durchmesser) in einen Käfig gestellt. Die Puppen eines Geleges werden bis einschließlich Tag 11 abgesammelt. Alle übrigen noch nicht verpuppten Larven werden danach abgetötet.

Als Futter wird TetraMin[®]-Baby Staubfutter gegeben, welches sich durch die Oberflächenspannung gleichmäßig auf dem Wasser verteilt. Wichtig hierbei ist eine ausreichende Futtermittelversorgung, ohne eine Überdosierung, um somit die Bildung einer Kahlhaut und damit eine Verschlechterung der Wasserqualität zu vermeiden.

Als weitere, weniger aufwendige Fütterungsmethode, werden einem Teil der Larven Brekkis[®] Katzentrockenfutter gegeben. Nach dem Schlupf werden zwei je 1/3 große Teile (ca. 90 mg/Drittel) eines Brekkis[®] pro Schüssel und ab dem dritten Tag zwei halbe Teile (ca. 130 mg/Hälfte) gefüttert. Bei jedem Wasserwechsel wird auch das Trockenfutter erneuert. Die Pellets wiesen durch ihre Farbe und Konsistenz auf unterschiedliche Zusammensetzungen hin. Je nach Mückenart gibt es unterschiedliche Vorlieben bei der Akzeptanz des Katzenfutters.

Da sich an Futterresten in den Aufzuchtsschalen Bakterien und Pilze entwickeln, welche die Larven kontaminieren und in ihrer Entwicklung schädigen können, muss auf strengste Sauberkeit geachtet werden. Die Schalen werden nach ihrem Gebrauch mit 60° C heißem Wasser ausgewaschen und ausgerieben. Der schmierige Belag in der Schale muss komplett entfernt werden und diese anschließend mit 70 prozentigem Ethanol desinfiziert werden.



Abb. 26: Larvenaufzucht unter Langtagsbedingungen. Die einzelnen Larven der unterschiedlichen Arten sind farblich unterschiedlichen Aufzuchtsschalen untergebracht. Zusätzlich ist jede Schale mit einem der Mückenart zugeordneten Code sowie dem Ablage- und Schlupfdatum versehen.

3.2.1.5 Haltung der Imagines

Für die Mücken zucht steht ein klimatisierter Raum mit einer Temperatur von 28° C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 80 % bereit. Die Beleuchtung ist auf einen Hell-/Dunkelrhythmus von 14 zu 10 Stunden eingestellt. Die Anophelinen sind in zerlegbaren 35x35x35 cm (LxBxH) großen Kunststoffkäfigen untergebracht. Sie werden täglich mit einer 10 prozentigen Saccharoselösung und einem in Wasser getränktem Wattebausch gefüttert. Zwei bis drei mal pro Woche erhalten sie eine Blutmahlzeit (s. Kapitel 3.2.1.2). Nicht nur bei den Larven, auch bei den adulten Mücken ist zur Vermeidung von Bestandsausfällen auf maximale Hygiene zu achten. Die Käfige müssen nach ihrer Verwendung unter heißem Wasser abgebürstet und mit 70 prozentigem Ethanol desinfiziert werden. Zerlegbare Käfige oder kleinere Container sollten, wenn sie sich dazu eignen, in einer Spülmaschine gereinigt werden. Dunkle Stellen, die auf Pilzbefall hinweisen, müssen besonders sorgsam entfernt werden.

Falls Milben in der Mücken zucht auftreten, müssen die befallenen Behältnisse, auch die Inkubatoren, Wände, Regale sowie sonstige Gerätschaften umgehend gereinigt und sterilisiert werden. Die Mücken der befallenen Zuchtansätze werden ohne Ausnahme entsorgt, nur Larven sowie Eier, die sorgfältig auf Milben untersucht werden, bleiben im Bestand.

3.2.2 Kultivierung von *Plasmodium berghei*

3.2.2.1 Allgemein

Die Effektivität der Blutfütterungsapparatur wird am Nagermalaria-Modell, *Plasmodium berghei*, untersucht. Dazu werden infizierte Mäuse mit vergleichbarer Parasitämie und Exflagellationsrate benötigt. An einer Maus saugen die Mücken direkt, und das Blut der anderen Maus wird den Mücken über die Fütterungsapparatur angeboten.

Der Erreger der Mausmalaria *P. berghei* (WT) wird *in vivo* in NMRI-Mäusen kultiviert. Diese Mäuse werden entweder mit asexuellen Plasmodienstadien von Maus zu Maus bzw. mit kryokonservierten Erregern infiziert oder die Parasiten werden auf natürliche Weise durch den Stich von sporozoitentragenden *Anopheles stephensi*-Mücken auf den Zwischenwirt übertragen.

3.2.2.2 Maushaltung

Die Mäuse, ausschließlich Weibchen, stammen von einem kommerziellen Züchter. Sie werden in Makrolon-Käfigen bei einer Besatzdichte von fünf Individuen gehalten. Die Raumtemperatur liegt bei konstanten 22° C, während die relative Feuchtigkeit im Bereich zwischen 50 - 60 % variiert. Der Tag-/Nachtrhythmus beträgt 12 Stunden. Als Nahrung steht Wasser und Standard-Trockenfutter (Trockenpellets) von SSNIFF bereit.

3.2.2.3 Blutentnahme bei Mäusen

Um die Parasiten aus den Nagetieren zu ernten, wird eine möglichst große Menge Blut durch Herzpunktion den Mäusen entnommen. Dazu werden die Tiere einzeln in einem abgeschlossenen Behälter mit Diethyläther narkotisiert. Nach 1 - 2 Minuten sind die Tiere betäubt und schmerzfrei, sodass nach dem Freipräparieren des Herzens die Punktion mit einer heparinisierten Spritze vorgenommen werden kann. Das so gewonnene Blut kann direkt in die im Kapitel 3.2.3.3 beschriebene *in vitro*-Infektionsapparatur gegeben werden. Falls

notwendig, können aus dem Blut auch, wie in Kapitel 3.2.2.7 beschrieben, Kryostabilate hergestellt oder direkt weitere Mäuse infiziert werden.

3.2.2.4 Infektion von *Anopheles*-Weibchen mit *P. berghei*

Grundlage einer erfolgreichen Infektion von *Anopheles*-Weibchen ist das Vorhandensein ausgereifter Gametozyten. Dazu wird zunächst, wie in Kapitel 3.2.4.9 beschrieben, die Exflagellation der mit *P. berghei*-infizierten Maus überprüft. Ist der Test erfolgreich, wird das Tier mit Ketamin/ Xylazinhydrochlorid narkotisiert und 15 Minuten auf einen Infektionscontainer (s. Kapitel 3.2.3.2) mit drei bis sieben Tage alten *Anopheles*-Weibchen gelegt (Maus- oder *in vivo*-Fütterungsmethode). Für die Infektion der *Anopheles*-Mücken mit *P. berghei* über eine Membran (Membran- oder *in vitro*-Fütterungsmethode) wird das Blut, wie in Kapitel 3.2.2.3 beschrieben, entnommen. Hierbei muss sehr zügig gearbeitet werden, da beim Absinken der Bluttemperatur eine ungewollt frühzeitige Exflagellation der Mikrogameten einsetzt (Sinden, Croll, 1975) und dadurch das Ergebnis negativ beeinflusst werden kann. Den Mücken wird die jeweilige Blutmahlzeit für 15 Minuten angeboten.

Nach erfolgreicher Blutaufnahme wird der Infektionscontainer in einen Kunststoffkäfig überführt und dort vorsichtig geöffnet. Dieser Käfig wird für 24 Stunden in einem Inkubator bei 21° C und 80 % relativer Luftfeuchte untergebracht. Die Mückenweibchen, die am Vortag erfolgreich gesaugt haben, werden nun mit einem Exhaustor in verschlossene Behältnisse überführt. Dabei werden die selektierten Mücken gezählt und ihre Anzahl ebenfalls in das Infektionsprotokoll eingetragen. Auf den Behältnissen werden die Mückenspezies, deren Anzahl sowie der Infektionstag und der Parasitenstamm vermerkt. Anschließend werden sie wieder in den Inkubator zurückgestellt und täglich mit Wasser und Zuckerlösung versorgt.

Die Stechmückenweibchen, deren Mitteldärme nicht mit Blutgefüllt waren, werden in dem Käfig für 10 Minuten bei -80° C eingefroren und so abgetötet.

3.2.2.5 Kontrolle der *P. berghei*-Infektion

Die Oozysten sind nach neun bis elf Tagen so weit entwickelt, dass sie eindeutig zu erkennen sind. In diesem Zeitraum wird die Infektionsrate der Mücken nach der bereits in Kapitel 3.2.3.6 beschriebenen Methode bestimmt.

3.2.2.6 Gametozytendichte und Exflagellation bei *P. berghei*

Vor einer Mücken-Fütterung mit infiziertem Blut muss sowohl die Parasitendichte als auch die Anzahl ausgereifter Gametozyten bestimmt werden. Dazu wird der Maus durch Schwanzpunktion ein Tropfen Blut entnommen und dieser auf einen Objektträger übertragen. Der Blutropfen wird, wie in Kapitel 3.2.4.8 beschrieben, ausgestrichen und gefärbt.

Werden ausreichend Gametozyten im Blut der Maus gefunden, verschafft man sich nun einen Überblick über die Reife der Gametozyten und macht sich dabei die Exflagellation der männlichen Gametozyten zu Nutze. Vor einer Infektion der *Anopheles*-Mücken mit *P. berghei* muss sicher sein, dass die männlichen Gametozyten ausreichend exflagellieren. Normalerweise findet diese Exflagellation, d.h. die Differenzierung des Mikrogamonten in vier bis acht Mikrogameten, im Darm der Mücke statt. Ein Faktor, der die Exflagellation induziert, ist ein Temperaturrückgang von 2 - 5° C (Sinden, Croll, 1975). Diese Eigenschaft nutzt man *in vitro*, indem man die Parasiten im Blut der Maus von 37° C auf Raumtemperatur abkühlen lässt.

Dazu wird wieder der Maus durch Schwanzpunktion ein Tropfen Blut entnommen, dieser auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen bedeckt. Nach etwa 10 Minuten bei Raumtemperatur werden die Parasiten bei 40-facher Vergrößerung im Phasenkontrast auf Exflagellation überprüft. Wenn man pro Gesichtsfeld durchschnittlich vier bis sechs exflagellierende Mikrogamonten sieht, kann man das Tier für eine Parasitenübertragung verwenden.

3.2.2.7 Herstellung von *P. berghei*-Blutstabilaten

Zur längerfristigen Lagerung von infektiösen *P. berghei*-Blutstadien werden Kryostabilate angefertigt. Nach der Herzpunktion werden 200 µl Blut mit dem doppelten Volumen an Gefrierlösung gemischt und in Kryoröhrchen direkt in flüssigen Stickstoff eingefroren. Bei Bedarf kann mit dem so konservierten Stabilat, nach dessen Erwärmen auf 37° C, eine Maus durch intraperitoneale Injektion mit den Erregern infiziert werden.

3.2.3 Infektionen der *Anopheles*-Weibchen mit *Plasmodium falciparum*

3.2.3.1 Vergleich unterschiedlicher Membranen auf ihre Eignung zur *in vitro*-Infektion von *An. stephensi*

Für die anstehenden Infektionsversuche war es notwendig, verschiedene Membranen auf ihre Eignung zu testen. Untersucht wurden Parafilm[®], Kollagen-Kunstdarm und ungesalzener Schweinedarm. Die Versuche wurden im Rahmen der Mücken zucht mit schlachtfrischem Schweineblut durchgeführt.

Parafilm[®] zeichnet sich durch seine adhären te Eigenschaft aus, und so schließt das Blutschälchen auch ohne Verwendung eines Gummiringes dicht ab. Bei maximaler Dehnung ist die Membran allerdings äußerst empfindlich. Berührungen mit spitzen, scharfen sowie rauhen Oberflächen lassen den eine Öffnung überspannenden Parafilm[®] schnell reißen. Liegt das mit Parafilm[®] verschlossene Schälchen erst mal auf dem Mückecontainer auf, darf es nicht mehr verschoben werden, da sonst das Blut durch die perforierte Membran in das Behältnis tropft. Wenn der Parafilm[®] nicht maximal nach allen Seiten gedehnt wird, fliegen die Mücken zwar an, können aber nicht durch die zu massive Membran stechen.

Als natürliche Membran wird gespülter Dünndarm vom Schwein verwendet. Er muss möglichst frisch und nicht durch Salz konserviert sein. Salz verhärtet durch Austrocknen das Darmepithel, so dass die Mücken nicht mehr durch ihn hindurchstechen können. Die vorbereiteten 10 cm Quadrate werden auf die mit Blut gefüllten Schalen gelegt und mit einem Ringgummi dicht befestigt. Da die Naturmembran mikrometergroße Risse aufweist, treten geringe Mengen an Blut aus, welche die Membranoberfläche benetzen. Durch Herabtropfen in die Käfige können diese verschmutzen.

Eine längere Vorbereitungszeit benötigte man für den Kunstdarm. Vor seiner Verwendung muss der in trockenem Zustand pergamentartige Kollagensaitling für 10 Minuten in 37° C warmem Wasser eingeweicht werden. Er lässt sich leicht handhaben und ist reißfest, zudem ist er im Gegensatz zum Naturdarm undurchlässig für Blut. Zu seinem Nachteil beginnt er auf der Seite, an der er der Luft ausgesetzt ist, also dort wo die Mücken saugen, nach wenigen Minuten einzutrocknen. Damit die Mücken weiter stechen und saugen können, ist es essentiell, das Blutschälchen erneut für zwei Minuten in ein 37° C warmes Wasserbad zu legen, um die äußere Seite der Membran wieder aufzuweichen.

Im Vorfeld der Blutfütterungsversuche wird die Eigenattraktivität der Membranen getestet. Dazu werden die vorbereiteten Membranstücke für zwei Minuten bei Zimmertemperatur auf die Käfige mit 100 *Anopheles*-Weibchen gelegt. In dieser Zeit werden die anfliegenden und aktiv zu stechen versuchenden Mücken gezählt. Alle Arbeiten während dieser Testreihen erfolgen mit Handschuhen, um die Eigenattraktivität der Membranen nicht zu verfälschen.

Die in den Vorversuchen als geeignet erscheinenden zwei Membranen werden im direkten Vergleich unter Bedingungen, unter denen später die Infektionen durchgeführt werden, getestet. Die Blutfütterglocken werden mit den jeweiligen Membranen überzogen und je 30 *An. stephensi*-Weibchen in einem Infektionscontainer für 15 Minuten angeboten. Alle verwendeten Mückenweibchen stammen aus einer Entwicklungscharge. Als Blutmahlzeit wird eine Mischung mit einem Hämatokrit von 60 aus frischen gewaschenen Humanerythrozyten und hitzedeaktiviertem Humanserum verwendet.

3.2.3.2 Container zur Infektion von *Anopheles spec.* mit *P. falciparum*

Wegen ihrer Stabilität sowie ihrer leichten Handhabung haben sich Pappbecher (250 ml) als Infektionscontainer bewährt. Mit einem Netz, dessen Maschengröße 1 mm² nicht überschreiten darf, wird die Öffnung abgedeckt und rundherum mit einem Klebeband fest verklebt. Im unteren Drittel des Bechers wird eine Öffnung von einem Zentimeter Durchmesser geschnitten und mit einem überlappenden Stück Pappe unter Zuhilfenahme eines Klebestreifens verschlossen. Einen Tag vor Versuchsbeginn werden drei bis sieben Tage alte Stechmückenweibchen aus ihrem Käfig mit einem Exhaustor durch die runde Öffnung in die Infektionsbecher überführt. Die Mücken können sich in dieser Zeit vom Stress des Umsetzens regenerieren, eine negative Auswirkung auf die Saugbereitschaft wird damit verhindert.

Die Anzahl der Individuen pro Becher ist abhängig von der Größe der Mücken sowie ihres Anflug- und Stechverhaltens. Da der Saugvorgang möglichst schnell abgeschlossen sein muss (s. Kapitel 3.2.3.3), dürfen sich die Mücken nicht gegenseitig stören, daher sollten die in Tabelle 15 aufgeführten Stückzahlen pro Becher nicht überschritten werden.

Mückenspezies	Individuen pro Becher
<i>An. stephensi</i>	30
<i>An. gambiae</i>	20
<i>An. albimanus</i>	20
<i>An. plumbeus</i>	15

Tab. 15 : Maximale Individuenzahl der verwendeten Mückenspezies pro Infektionsbecher.

3.2.3.3 Die Infektionsapparatur

Die Infektionsapparatur (s. Abbildung 27) besteht aus vier Blutfütterungsglocken, die über einen Wasserkreislauf mit 38° C warmem Wasser aus einem Wasserbad erwärmt werden. Mit dieser Zirkulationstemperatur wird der Inhalt der Blutkammern auf einem für die Gametozyten essentiellen, konstanten Wert von 37° C gehalten.



Abb. 27: Aufbau der Infektionsapparatur. Die Glasfütterglocken vom Typ II sind an eine 38° C warme Wasserzirkulation angeschlossen. Unter den Fütterglocken stehen die Infektionscontainer mit den vorbereiteten Stechmücken.

Für die Versuche werden zwei Typen von Blutfütterungsglocken aus Glas verwendet. Zum einen eine hier als Typ I bezeichnete Futterglocke, deren Blutkammer sich nach oben zu einem Einfüllrohr verjüngt (s. Abbildung 28). Ihr Blutkammervolumen liegt zwischen 0,8 bis 1,1 ml bei einem Durchmesser von 30 mm. Als weiteres Modell (Typ II) werden Fütterungsglocken in Anlehnung an Ponnudurai (1989) gefertigt (s. Abbildung 28). Diese Fütterungsglocken unterscheiden sich grundlegend in der Konstruktion ihrer Blutkammern. Bei der Fütterungsglocke nach Ponnudurai grenzt sich die Blutkammer zum Heizkreislauf durch eine parallel zur Membran verlaufende Decke ab. Die Blutkammer wird über zwei dünne Glaskapillaren gefüllt. Bei einem Durchmesser von 40 mm beinhalten die Blutkammern ein Volumen zwischen 0,8 und 1,1 ml. Die Unterschiede beider Fütterungsglockentypen in ihrem jeweiligen Blutkammervolumen resultieren aus der manuellen Einzelfertigung.

Als Membran wird Parafilm[®] verwendet. Dazu wird ein Quadrat mit der Kantenlänge von 2 cm zugeschnitten und abwechselnd an den gegenüberliegenden Seiten jeweils maximal ausgezogen bis er sich nicht mehr dehnen lässt. Nun wird der dünne Parafilm[®] vorsichtig über die Blutkammer gelegt und mit einem Gummiring an der Glasglocke fixiert. Die nun komplette Fütterungsapparatur benötigt 20 Minuten bis alle Teile richtig aufgewärmt sind.

Nach dem Einfüllen der Gametozyten in die Blutkammer können die Mücken für 15 Minuten an der Membran saugen. Nach Ablauf diese Zeit sinkt der Infektionserfolg, da die Mikrogametozyten als Folge der nicht idealen abiotischen Bedingungen bereits vor der Aufnahme durch die Mücke exflagellieren (Ponnudurai, 1989 a).

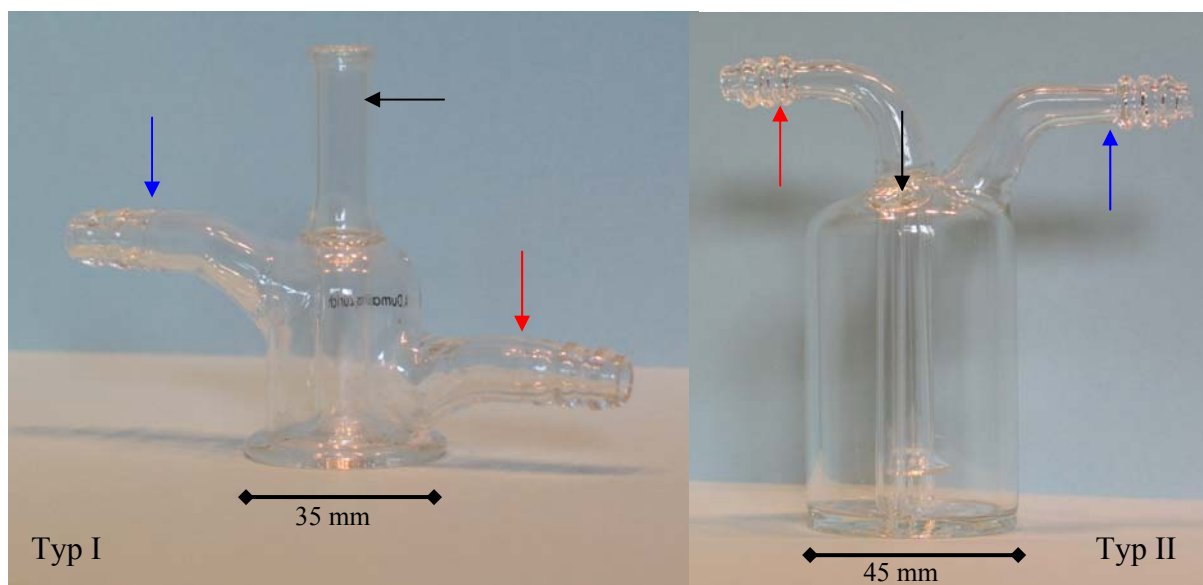


Abb. 28: Abgebildet sind beide Typen der für die Membranfütterung zur Verfügung stehenden Glasglocken. Roter Pfeil: Warmwasserzulauf. Blauer Pfeil: Warmwasserauslauf. Einfüllöffnung für Füttermedium

3.2.3.4 Vorbereitung der Gametozytenkultur

Erst nachdem die Fütterungsapparatur funktionsfähig ist und die hungrigen Mücken bereit stehen, werden die Gametozyten (wie nachfolgend beschrieben) für Infektionsversuche vorbereitet.

Aus der Kulturflasche werden 1,5 ml Gametozytenkultur in ein vorgewärmtes Mikroreaktionsgefäß überführt und bei 1000 g für 30 Sekunden abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und der Zellschlag im Verhältnis 1:3 bis 1:5 mit einem A⁺ Erythrozytenkonzentrat vermischt und umgehend in die vorbereitete Fütterungsapparatur gegeben. Die verwendeten Erythrozyten dürfen nicht älter als 24 Stunden sein und werden mit hitzeinaktiviertem A⁺ Serum auf einen Hämatokrit-Wert von 60 verdünnt. Für eine erfolgreiche Infektion ist es wichtig, diesen Arbeitsschritt zügig durchzuführen. So dürfen von der Entnahme der Gametozyten aus der Kulturflasche bis zum beginnenden Saugen der Mücken an der Membran nicht mehr als 3 Minuten vergehen. Während der Vorbereitung muss die Temperatur der Gametozyten auf 37° C konstant gehalten werden. Um dies zu gewährleisten, werden alle verwendeten Gefäße, Geräte und Medien auf 37° C erwärmt.

3.2.3.5 Infektion der *Anopheles*-Mücken

Für die Infektion ist das Alter der Mücken in Abhängigkeit von der Art wichtig. Zum einen lässt die Aggressivität, also das Verlangen Blut zu saugen, mit der Zeit nach, zum anderen ist die Dauer der temperaturabhängigen Parasitenentwicklung zu berücksichtigen. Bewährt hat sich für die tropischen Mückenarten *Anopheles stephensi*, *An. gambiae* sowie *An. albimanus* ein Infektionsalter mit 2 bis 7 Tagen. *An. albimanus*-Weibchen fliegen einen potentiellen Blutspender bereits wenige Stunden nach dem Schlupf an und beginnen zu saugen. Für *An. plumbeus* ist ein Alter zwischen 10 bis 18 Tagen ideal für die Infektion. Obwohl die Weibchen bereits 3 Tage nach dem Schlupf Blut von natürlichen Spendern saugen, zeigte sich, dass sich erst ab dem Tag 10 die Bereitschaft, zügig an der Membran zu saugen, einstellte. Wie bereits oben beschrieben, werden die *Anopheles*-Weibchen einen Tag vor Versuchsbeginn in die Infektionscontainer überführt. In jeden Becher müssen die Mücken einzeln gezählt und ihre Anzahl in das Infektionsprotokoll eingetragen werden.

Um ihre Saugbereitschaft zu erhöhen, lässt man die Mücken 24 Stunden hungern, indem keine Zuckerlösung angeboten wird. In dieser Zeit werden sie nur mit Wasser versorgt, welches ebenfalls zwei Stunden vor der Versuchsdurchführung entfernt wird.

Aus Sicherheitsgründen darf die Infektion der Stechmücken mit humanpathogenen Malariaerregern nur in einem zugelassenen Hochsicherheitsraum durchgeführt werden.

Den Infektionscontainer mit den Mückenweibchen belässt man für 15 Minuten so unter der Blutkammer, dass die Membran leicht auf der Gaze aufliegt. Nach erfolgreicher Aufnahme der Gametozyten wird der Infektionscontainer in einen Kunststoffkäfig überführt und dort vorsichtig geöffnet. Dieser Käfig wird für 24 Stunden in einem Inkubator bei 26° C und 80 % relativer Luftfeuchte untergebracht. Die Mückenweibchen, die am Vortag erfolgreich gesaugt haben, werden nun mit einem Exhaustor in spezielle Behältnisse überführt. Dabei werden die selektierten Mücken gezählt und ihre Anzahl ebenfalls in das Infektionsprotokoll eingetragen. Auf den Behältnissen werden die Mückenspezies, deren Anzahl, sowie der Infektionstag und der Parasitenstamm vermerkt. Anschließend werden sie wieder in den Inkubator zurückgestellt und täglich mit Wasser und Zuckerlösung versorgt.

Die Stechmückenweibchen, deren Mitteldärme nicht mit Blut gefüllt waren, werden in dem Käfig für 10 Minuten bei -80° C eingefroren und so abgetötet.

3.2.3.6 Infektionskontrolle

Während des Umgangs mit infizierten Mücken müssen die aus den Behältnissen entnommenen Versuchstiere peinlichst genau gezählt werden. Die Infektionskontrolle darf nur in einem zugelassenen Hochsicherheitsinsektarium durchgeführt werden. Mit humanpathogenen Erregern infizierte Stechmücken dürfen diesen Hochsicherheitsbereich nicht lebend verlassen. Während der Mückensektion muss mit höchster Konzentration gearbeitet werden, daher sollten Störungen und Unterbrechungen vermieden werden.

Unter Zuhilfenahme eines Aspirators werden fünf Stechmücken aus dem Container entnommen und mit CO₂ narkotisiert. Diese werden unter einem Binokular bei geringer Vergrößerung in einer RPMI/ 3 % BSA-Lösung seziiert.

Zwischen Tag sieben bis Tag neun sind die Oozysten so weit entwickelt, dass sie nach einer Mitteldarmsektion leicht zu erkennen sind. Zur Sektion werden zwei spitze Nadeln benötigt, bewährt haben sich Injektionskanülen der Stärke 21 und 27.

Dem betäubten Mückenweibchen wird auf einem Objektträger von lateral das Abdomen zwischen dem ersten und zweiten Segment geteilt. Zusätzlich wird die Pleuralmembran zwischen Sternit und Tergit distal geöffnet. Eine Nadel fixiert am Thorax, die andere setzt am letzten Abdominalsegment an und zieht dies distal weg. Der Mitteldarm wird anterior an seinem Anfang und posterior nach den Malpighi-Gefäßen abgeschnitten. Mit der Nadelspitze wird der Mitteldarm, ohne ihn zu verletzen, in die auf einem Objektträger vorbereitete 0,1 prozentige Mercurchrom[®] Lösung gelegt.

Diese Kontrastfärbung lässt die Oozysten nach einer Einwirkzeit von 20 Minuten als rote strukturierte Kugeln auf dem Mitteldarm erscheinen. Sie sind bereits unter dem Binokular bei stärkster Vergrößerung zu erkennen.

In den Speicheldrüsen der Mücken können bei einer erfolgreichen Infektion ab dem Tag 14 die Sporoziten sicher nachgewiesen werden. Zur Präparation wird der Thorax mit der einen Nadel fixiert, während die andere hinter den Augen ansetzend den Caput langsam vom Körper weg zieht. Die Speicheldrüse wird vorsichtig vom Speichelkanal abgetrennt und auf einen mit RPMI/ 3 % BSA-Lösung bestückten Objektträger überführt. Bei 40-facher Vergrößerung im Phasenkontrast wird das Umfeld der Speicheldrüsen auf bereits frei schwimmende Sporoziten hin untersucht. Ist die Speicheldrüse unversehrt, wird das Deckglas über der Speicheldrüse mit einem stumpfen Gegenstand leicht nach unten gedrückt, um so diese zu zerdrücken. Die in den Speichelgängen der Loben sitzenden Sporoziten werden dann teilweise ausgespült und können im Umfeld gezählt werden.

Wie allgemein üblich, wird zur Bestimmung der Infektionsrate die Anzahl der Sporoziten pro Speicheldrüse in Gruppen zusammengefasst. Mit dieser in Tabelle 16 aufgeführten übersichtlichen Kategorisierung können die einzelnen Infektionsergebnisse besser verglichen werden.

Sporozitenzahl	Kategorie
1 – 10 Sporoziten	A
11 – 100 Sporoziten	B
101 – 1000 Sporoziten	C
> 1000 Sporoziten	D

Tab. 16: Ordnet die Anzahl an Speicheldrüsen Sporoziten einer Infektionskategorie zu.

3.2.4 Kultivierung von *Plasmodium falciparum*

3.2.4.1 Allgemein

Um ein gleichmäßiges *in vitro*-Wachstum zu gewährleisten, benötigen Endoparasiten konstante abiotische Parameter. Für die Versuche wird der verwendete *Plasmodium falciparum*-Stamm NF54 in einem Inkubator bei einer Temperatur von 37° C in einer Atmosphäre mit 5% O₂, 3% CO₂ sowie 92% N₂ kultiviert. Zusätzlich steht für die Begasung der Zellkulturflaschen eine Hochdruckflasche mit gleichem Gasgemisch bereit. Um einem Abkühlen der Parasitenkulturen während der Zellkulturarbeiten entgegenzuwirken, werden die Arbeiten in steriler Umgebung auf einer 37° C warmen Heizplatte durchgeführt. Das verwendete Medium wird vor der Zugabe ebenfalls auf eine Temperatur von 37° C erwärmt. Als Wirtszellen der Parasiten werden Erythrozyten der Blutgruppe A⁺ verwendet.

Plasmodien der Art *P. falciparum*, die zu lange *in vitro* kultiviert werden, verlieren mit der Zeit ihre Fähigkeit, fertile Gametozyten zu entwickeln. Ponnudurai *et al.* (1982) konnten zeigen, dass bei dem Stamm NF54 bei kontinuierlicher Kultivierung, in Abhängigkeit der jeweiligen Subkultur, die Gametozytogenese sich nach vier Monaten verringert und nach 5 Monaten fast ganz zum Erliegen kommt (s. auch Kapitel 3.1.1).

Bei der *in vitro*-Kultivierung, also der Vermehrung nur über asexuelle Stadien in Blutkultur, kann die Fähigkeit, fertile Gametozyten zu bilden, durch die Kryokonservierung der Parasiten aufrechterhalten werden. So konnten Ponnudurai *et al.* (1982) ebenfalls zeigen, dass es im Vergleich desselben Parasitenstammes aus Patienten mit einem Kryostabilat keinen signifikanten Unterschied während der Gametozytenentwicklung gab. Die *in vitro* kultivierten Parasiten müssen allerdings zu einem Zeitpunkt eingefroren werden, indem sie noch ein hohes Gametozytenbildungspotential besitzen.

Unter der Berücksichtigung dieser Ergebnisse werden die Stammplatten einer Subkultur nach dem Auftauen, beginnend mit dem ersten notwendigen Verdünnen der Parasitendichte in eine neue Platte, kontinuierlich nummeriert. Diese Nummerierung ist in etwa mit dem 48 Stunden dauernden Generationszyklus der Parasiten des Stammes NF54 vergleichbar. Für die Gametozytenentwicklung werden Stockplatten der Generationen 5 bis 20 verwendet. Eingefroren werden die Parasiten der Generationen 5 bis 8.

3.2.4.2 Medium für *P. falciparum*-Stammkulturen

Zur Herstellung des Mediums werden 500 ml RPMI, 56 ml Human Serum A⁺, 5 ml Hypoxanthin, 100 µl Gentamycin vermischt.

Dieses Medium kann unter Lichtabschluss bei 4° C 7 Tage aufbewahrt werden. Die Flaschen werden nach dem Gebrauch mit dem für *P. falciparum* verwendeten Gasgemisch geflutet.

3.2.4.3 Medium zur Kultivierung von *P. falciparum*-Gametozyten

Für diese Medium werden 500 ml bidestilliertes Wasser in einer Glasflasche mit 25 mg Hypoxanthin und 5,94 g Hepes mindestens 60 Minuten auf einem Magnetheizrührer bei einer Temperatur von 40° C gerührt. Nachdem keine Hypoxanthin-Kristalle mehr zu erkennen sind, gibt man 5,25 g RPMI Puder zu und rührt weiter, bis dieses sich ebenfalls löst. Nach der Zugabe von 17,8 ml Natriumbicarbonat, 56 ml Humanserum A⁺ sowie 100 µl Gentamycin wird das Medium mit einer 500 ml Nalgene-Filtereinheit steril gefiltert. Das Medium soll nach fünf Tag aufgebraucht sein und kann im Dunkeln bei 4° C aufbewahrt werden. Vor dem Zurückstellen in den Kühlschrank werden die Flaschen mit dem zur Verfügung stehenden Gasgemisch geflutet.

3.2.4.4 Aufbereitung der Erythrozyten

Für die Kultivierung der Parasiten werden die benötigten Erythrozyten aus frischem Humanblut mit der Blutgruppe A⁺ gewonnen.

Die benötigte Menge Blut wird dem Spender über eine Venenpunktion mit einem Heparin-Blutabnehmeröhrchen abgenommen. Nach der Überführung in ein Schraubdeckelröhrchen wird das Blut 10 Minuten bei 1000 g zentrifugiert. Das überstehende Serum und die dünne Schicht an Leukozyten werden mit einer Pipette abgenommen. Es wird RPMI-Medium im gleichen Volumen wie der Rest in dem Röhrchen zugegeben und beides gut vermischt. Nach einem zweiten Zentrifugationsschritt wird der Überstand erneut abgenommen und darauf geachtet, dass die weißen Blutkörperchen dabei ganz entfernt werden.

Nun wird die gleiche Menge an RPMI-Komplettmedium zugegeben und nach dem Vermischen für 2 Minuten bei 900 g zentrifugiert. Das Röhrchen wird, mit Blutgruppe und Datum beschriftet, bei 4° C im Kühlschrank aufbewahrt und kann bis zu 7 Tagen verwendet werden.

3.2.4.5 Herstellung des Serums

Zur Herstellung des benötigten Serums wird Plasma der Blutgruppe A⁺ von fünf verschiedenen Spendern gemischt. Um das im Plasma vorhandene Fibrin zu fällen, werden 800 µl 1 M Calciumchlorid pro 50 ml Plasma zugegeben. Unmittelbar danach wird das Plasma in 50 ml Schraubdeckelröhrchen portioniert und 30 Minuten bei 37° C belassen. Nach einer Ruhezeit über Nacht bei 4° C werden die Röhrchen bei 3.400 g für 50 Minuten zentrifugiert. Während 30 Minuten im Wasserbad bei 56° C wird das Serum inaktiviert. Die Röhrchen werden bei -20° C gelagert und nach Bedarf aufgetaut.

3.2.4.6 Auftauen von *P. falciparum*

Das tiefgefrorene Kryoröhrchen mit den Parasiten wird direkt nach der Entnahme aus dem flüssigen Stickstoff in einem 37° C warmen Wasserbad aufgetaut und umgehend pro ml Röhrcheninhalt 0,2 ml 12 prozentige NaCl-Lösung hinzugegossen. Dabei sollte die zugegebene Lösung durch Schütteln gut untergemischt werden. Mit der Pipette wird die Mischung in ein 15 ml Schraubdeckelröhrchen überführt. Nach einer Inkubationszeit von zwei Minuten werden unter kontinuierlichem Schütteln neun Volumeneinheiten einer 1,6 prozentigen NaCl-Lösung in einer Menge von 1 - 2 Tropfen pro Sekunde zugegeben. Das Ganze wird bei 800 g 3 Minuten bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und das verbleibende Zentrifugat mit neun Volumenanteilen einer Lösung bestehend aus 0,9 % NaCl und 0,2 % Glukose, die ebenfalls langsam mit 1 - 2 Tropfen pro Sekunde zugegeben wird, resuspendiert. Es folgt ein zweiter Zentrifugationsschritt, wie oben beschrieben. Der Überstand wird abgenommen und das verbleibende Pellet in eine Petrischale mit 10 ml auf 37° C erwärmtes RPMI- Komplettmedium und 0,5 ml Blut überführt. Die Petrischale verbleibt die folgenden zwei Tage im Brutschrank ohne Mediumswechsel. Danach wird, wie in Kapitel 3.2.4.7 beschrieben, weiterverfahren.

3.2.4.7 Stammplatten der *P. falciparum*-Kultur

Die Parasiten werden wie in Kapitel 3.2.4.6 beschrieben aufgetaut. Nach der Ruhezeit von 2 Tagen wird am dritten Tag das überstehende Medium mit einer 10 ml Pipette abgesaugt und 10 ml frisches 37° C warmes Medium zugegeben. Dazu wird die Petrischale mit ruhiger Hand aus dem Inkubator auf eine 37° C warme Heizplatte in den Sterilarbeitsplatz überführt. Ist das überstehende Medium etwas trübe, sollte die Platte 2 bis 5 Minuten auf der Heizplatte stehen bis die aufgeschwemmten Zellen wieder sedimentiert sind. Bei der Entnahme sollen möglichst keine Erythrozyten mitabgesaugt werden. Deshalb darf der Überstand in der leicht schräg gehaltenen Platte nur so weit abgesaugt werden, bis sich eine aufsteigende rote Fahne im Medium der Pipettenspitze nähert. Nach weiteren 2 Tagen bestimmt man die Parasitendichte in der Platte (s. Kapitel 3.2.4.8). Bei einer Parasitämie unter 1,5 %, wird das Medium gewechselt und nach 2 Tagen erneut die Parasitendichte bestimmt. Liegt der Anteil an Parasiten über 1,5 %, so muss die Parasitenkultur in eine neue Stockplatte geteilt werden. Dazu werden in einer Petrischale 10 ml vorgewärmtes Medium und 0,5 ml Blut vermischt. Aus der Ursprungsplatte wird so viel Material in die neue Platte überführt, um in dieser eine errechnete Parasitenkonzentration zwischen 0,4 % und 0,6 % einzustellen.

Nach einer Ruhezeit von einem Tag wird nach 48 Stunden erneut die Parasitendichte bestimmt und wie oben beschrieben weiter verfahren.

Muss über einen Zeitraum von mehreren Tagen ohne Mediumswechsel ausgekommen werden, kann man die Anfangsparasitendichte niedrig halten und nur 50 µl der Ausgangskultur in eine neue Platte überimpfen. Dabei sollte ein Zeitraum ohne Mediumswechsel von 72 Stunden nicht überschritten werden, da die temperaturempfindlichen Inhaltsstoffe des Mediums - sollten sie nicht durch den Parasitenstoffwechsel aufgebraucht werden - bei Temperaturen über 4° C nicht stabil sind.

3.2.4.8 Bestimmung der Parasitämie

Aus der zu bewertenden Parasitenkultur wird ein Tropfen mit Erythrozyten auf einen Objektträger gebracht. Mit einem zweiten Objektträger wird dieser Tropfen dünn ausgestrichen. Nachdem der Ausstrich durchgetrocknet ist, wird er eine Minute in Methanol fixiert. Ist das Methanol verdunstet, wird der Objektträger für acht Minuten in einer 10 prozentigen Giemsalösung gefärbt. Anschließend wird er mit demineralisiertem Wasser

abgewaschen und vorsichtig mit einem Papiertuch abgetrocknet. Nach vollständiger Trocknung des Objektträgers wird der Ausstrich bei 100-facher Vergrößerung mit einem Öl-Immersionsobjektiv am Lichtmikroskop ausgezählt.

Dazu werden durch ein Okularraster an zehn verschiedenen Stellen auf dem Objektträger jeweils die Erythrozyten sowie die Parasiten getrennt gezählt.

3.2.4.9 Kryokonservierung von *P. falciparum*

Zur Konservierung werden die Parasiten in flüssigen Stickstoff überführt. Am besten für diese Kryokonservierung eignen sich junge Ringstadien. Der Inhalt einer Stammplatte, die eine hohe Konzentration an jungen Ringstadien aufweist, wird in ein 15 ml Schraubdeckelröhrchen überführt und zwei Minuten bei 900 g zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das Zentrifugat mit der gleichen Menge an Gefrierlösung resuspendiert und in ein mit Datum und Parasitenstamm beschriftetes Kryoröhrchen pipettiert. Dieses wird in einem Gemisch aus einem Teil Trockeneis und einem Teil 96 % Ethanol 10 Minuten schockgefroren. Nach einem Tag im -80° C Gefrierschrank werden die Parasiten dauerhaft in flüssigen Stickstoff gelagert. Die Präparate können so über mehrere Jahre konserviert werden.

3.2.4.10 Gametozytenkultivierung

Im Gegensatz zu den Stammkulturen werden die Gametozyten nicht in Petrischalen, sondern in gasdichten 200 ml Zellkulturflaschen herangezogen. Vorbereitend werden 25 ml 37° C warmes RPMI-Komplettmedium mit 1,5 ml Erythrozyten in eine Flasche gegeben. Anschließend werden 5 ml einer Stammkultur mit einer Parasitämie zwischen 1,5 % und 2 % zugegeben. Umgehend wird die Flasche, wie auch nach jedem Mediumswechsel, begast und 48 Stunden ohne Mediumswechsel im Inkubator belassen. Ab dem zweiten Tag muss alle 24 Stunden bis zum Ende der Kultivierungsphase das Medium gewechselt werden. Nach Ablauf von 13 Tagen wird wie Kapitel 3.2.4.11 beschrieben, die Exflagellationsrate bestimmt.

3.2.4.11 Fertilitätsüberprüfung unter Nachweis der Exflagellation

Zwischen Tag 14 und Tag 17 wird der Entwicklungszustand der Parasiten anhand der Exflagellation der Mikrogamtozyten überprüft. Dazu werden 200 µl aus der aufgeschüttelten Kulturflasche entnommen und in einem Mikroreaktionsgefäß 30 Sekunden bei 1000 g zentrifugiert.

Der Überstand wird ohne das Zentrifugat aufzuschwemmen abgenommen. Zu dem verbliebenen Zellniederschlag wird die gleiche Menge auf Zimmertemperatur erwärmtes frisches RPMI-Komplettmedium zugegeben und das Ganze resuspendiert. Von diesem Gemisch werden 10 µl auf einen Objektträger getropft und dieser für 10 Minuten in eine Feuchtkammer gelegt. Nach Ende dieser Entwicklungszeit, wird der Tropfen mit einem Deckgläschen (18 x 18 mm) in Vaseline verschlossen und bei einer 40-fachen Objektivvergrößerung im Phasenkontrast beobachtet. Sind pro Gesichtsfeld mindestens zwei Exflagellationen zu erkennen, kann die Gametozytenkultur für die Infektionsversuche verwendet werden.

3.2.5 Invasion von *Plasmodium falciparum*-Sporozoiten in Hepatozyten

3.2.5.1 Kultivierung von Hepatozyten (Huh7-Zellen)

Die Invasion von *P. falciparum*-Sporozoiten in Leberzellen und deren Leberstadienschizogonie werden *in vitro* mit Hilfe der Hepatozyten der Humanen Hepatoma Zelllinie (Huh7) untersucht.

Zur Kultivierung werden die Huh7-Zellen langsam aufgetaut, mit 15 ml vorgewärmtem DMEM-Medium gewaschen und zum Wachsen mit DMEM-Komplettmedium in eine Kulturflasche gegeben. Zellkulturen benötigen für ihr gleichmäßiges Wachstum einen regelmäßigen Wechsel des Mediums.

Ein Aufteilen der adhärent wachsenden Zellen auf neue Kulturflaschen ist vor der kompletten Überwucherung des Flaschenbodens notwendig. Zuerst muss das im Medium enthaltene FCS durch Waschen mit 20 ml HBSS entfernt werden. Um die Zellen zu lösen, werden sie mit 3 ml Trypsin/EDTA überdeckt und für 2 min bei 37° C inkubiert. Diese Suspension wird zwei Mal mit 15 ml DMEM-Medium gewaschen und anschließend 1-3 ml der Suspension, je nach Zelldichte, in eine neue Kulturflasche mit 15 ml DMEM-Komplettmedium überführt. Die Zellen werden in einer 5 % CO₂-Atmosphäre (95% Stickstoff) bei 37° C kultiviert.

Um definierte Zellzahlen ausplattieren zu können ist die genaue Bestimmung der Zellzahl nötig. Zu dünn ausgesäte Zellen wachsen nur sehr langsam, zu dicht ausgesäte können ihren Phänotyp verändern. Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer können Zellsuspensionen in geeigneter Verdünnung ausgezählt werden (Lindl, 2000).

Zur Vorbereitung der in Kapitel 3.2.5.3 und 3.2.5.4 beschriebenen Invasions- und Entwicklungs-Assays werden ein Tag vor dem Experiment die gekammerten Objektträger vorbereitet. Pro Kammer werden 400 µl Medium mit 30.000 Hepatozyten angeimpft und bei 37° C kultiviert.

3.2.5.2 Konservierung von Huh7-Zellen

Hepatozyten, die nicht permanent in Kultur gehalten werden sollen, kann man zur Konservierung einfrieren. Die Zellen werden mit Trypsin vom Boden der Zellkulturflasche

abgelöst und abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in einem entsprechenden Einfriermedium (Freezing-Solution: 10 % DMSO, 90 % FCS) resuspendiert, in Kryoröhrchen überführt und langsam bei -80° C eingefroren. Die Einfrierbox enthält Isopropanol, das pro Minute um 1° C abkühlt. Nach 24 Stunden werden die eingefrorenen Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196° C gelagert.

Aufgetaut werden die Zellen direkt aus dem Stickstofftank in einem Wasserbad bei 37° C. Die Zellen werden zuerst in ein 15 ml Schraubdeckelröhrchen überführt und 15 ml DMEM-Komplettmedium zugegeben. Anschließend bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, das Zellpellet im Medium resuspendiert und in die Zellkulturflaschen überführt. Am darauffolgenden Tag wird das Medium gewechselt (Lindl, 2000).

3.2.5.3 Färbungen der invadierten *P. falciparum*-Speicheldrüsen-sporozoiten in Hepatozytenzellen

Durch Immunfluoreszenz-Färbung lassen sich extra- sowie intrazellulär lokalisierte Parasiten mit unterschiedlichen Farben markieren. Hierzu werden die infizierten Speicheldrüsen in einem Mikroreaktionsgefäß in 200 µl RPMI/3 % BSA zerkleinert. Zur Aktivierung der Speicheldrüsen-sporozoiten wird das Röhrchen für eine Stunde bei 4° C ruhen gelassen. Der Inhalt des Reaktionsgefäßes wird nun gleichmäßig auf die Kammern des vorbereiteten Objektträgers mit kultivierten Huh7-Zellen verteilt und 1,5 Stunden bei 37° C inkubiert. Bei zwei Waschschritten mit je 400 µl 37° C warmem DMEM-Komplettmedium werden die nicht adhären oder invadierten Sporozoiten aus den Kammern entfernt. Fixiert werden die Präparate für 10 Minuten bei Raumtemperatur in 2,5 % Formaldehyd in PBS. In zwei Waschschritten mit je 400 µl PBS werden die Reste der Fixierlösung entfernt und mit PBS/ 10% FCS über Nacht bei 4° C oder für 30 Minuten bei 37° C blockiert. Der primäre Antikörper anti-*P. falciparum* CSP wird in einer Verdünnung 1:100 in PBS/ 10% FCS für 45 Minuten inkubiert. Alle Antikörper-Inkubationsschritte werden 45 Minuten bei 37° C in einer feuchten Kammer durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/ 1% FCS erfolgt die Inkubation mit dem fluoreszierenden sekundären Antikörper (anti-Maus Alexa-Fluor 546) in einer Verdünnung von 1:300 ebenfalls für 45 Minuten.

Intrazelluläre Strukturen können nur angefärbt werden, wenn die Zellmembran durchlässig ist. In diesem Permeabilisierungsschritt werden 0,05 % Saponin in PBS/ 1% FCS 10 Minuten bei Raumtemperatur auf die Zellen einwirken gelassen. Nach zwei weiteren Waschschritten

mit 0,01% Saponin in PBS/ 1% FCS müssen erneut unspezifische Protein-Bindungsstellen mit PBS/ 10% FCS blockiert werden. Dieser Inkubationsschritt kann bei 4° C über Nacht oder bei 37° C in 30 Minuten durchgeführt werden. Nun folgt die zweite Inkubation mit dem primären unmarkierten Antikörper anti-*P. falciparum* CSP in einer Verdünnung 1:100. Dem schließen sich drei Waschschriffe mit PBS/ 1% FCS an, bevor mit dem fluoreszenzmarkierten Antikörper (anti-Maus Alexa-Fluor 488) für 45 Minuten inkubiert wird. Nach dreimaligem Waschen in PBS/ 1% FCS werden die Präparate mit 50 % Glycerol in PBS eingebettet und mit Nagellack versiegelt. Das Präparat ist mehrere Wochen bei 4° C haltbar.

Durch diese schrittweise Immunofluoreszenz-Färbung sind die intrazellulären Parasiten ausschließlich grün, die extrazellulären Sporozoiten rot und grün markiert. Mit einem Fluoreszenzmikroskop werden die infizierten Zellen untersucht. Dabei wird insbesondere auf die Anwesenheit von grünen (invadierten) Sporozoiten geachtet (Renia, 1988).

3.2.5.4 Leberstadienentwicklungs-Assay mit *P. falciparum*-Speicheldrüsen-sporozoiten

Nach der Infektion ihres Wirtes durchläuft das *Plasmodium* als ersten Entwicklungsschritt ein Stadium der Schizogonie in den Hepatozyten, bei dem es als Exo-erythrozytäre-Form (EEF) vorliegt. *In vitro* können diese Stadien in Huh7-Zellen kultiviert und nach Antikörperfärbung analysiert werden (Hollingdale *et al.*, 1983). Diese Entwicklung ist jedoch sehr ineffizient. Bis heute ist noch kein zuverlässigeres *in vitro*-Kultivierungssystem für *P. falciparum*-EEFs verfügbar.

Es soll *in vitro* gezeigt werden, inwieweit der in Kultur befindliche *P. falciparum* Stamm (NF54) sich in Hepatozyten-Zellen (Huh 7) entwickeln kann.

Die infizierten Speicheldrüsen werden in einem Mikroreaktionsgefäß in 200 µl RPMI/3 % BSA zerkleinert. Zur Aktivierung der Sporozoiten wird das Röhrchen für eine Stunde bei 4° C ruhen gelassen. Nach dieser Aktivierungsphase werden die Speicheldrüsen-sporozoiten gleichmäßig auf die Kammern des vorbereiteten Objektträgers mit kultivierten Huh7-Zellen verteilt und 12 Stunden bei 37° C inkubiert. Bei zwei anschließenden Waschschriffen mit je 400 µl 37° C warmem DMEM-Komplettmedium mit "Roundup" werden die nicht adhärenierten oder invadierten Sporozoiten aus den Kammern entfernt. Das dem DMEM-Medium zugegebene "Roundup" verhindert das unerwünschte Wachstum von Pilzen und Bakterien. Im 12-Stunden-Intervall wird das verbrauchte Kulturmedium gegen frisches 37° C warmes

DMEM-Komplettmedium mit "Roundup" ausgetauscht. Nach Ablauf von 72 Stunden werden die Zellen mit -20° C kaltem Methanol für 10 Minuten fixiert und dreimal mit PBS/ 1% FCS gewaschen. Das Methanol permeabilisiert gleichzeitig die Hepatozyten. Nach einem Blockierungsschritt mit PBS/ 10% FCS für 30 Minuten bei 37° C oder über Nacht bei 4° C, werden die Zellen mit dem primären monoklonalen Antikörper anti- *P. falciparum* CSP in einer Verdünnung 1:100 mit PBS/ 10% FCS für 45 Minuten inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/ 1% FCS wird der sekundäre Antikörper anti-Maus Alexa-Fluor 488 zugegeben und inkubiert. Nach 45 Minuten wird der sekundäre Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS/ 1% FCS ausgespült. Das Präparat wird mit 50 % Glycerol in PBS eingebettet und luftdicht verschlossen (Hollingdale *et al.*, 1983).

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Fütterung der *Anopheles stephensi*-Larven

Bei einem Überangebot an Futterpellets konnten deren Oberflächen nicht vollständig von den Mückenlarven "abgebürstet" werden. Dies führte um die Pellets zu einer Zone regen Pilz- und Bakterienwachstums, welche von den Mückenlarven weder durchdrungen noch abgeweidet werden konnte. Probleme hatten vor allem Erst- und Zweitlarven, die zudem in diesem Geflecht hängenblieben und verendeten. Ähnliches konnte bei Bestandteilen des Katzenfutters beobachtet werden, welche für die *Anopheles*-Larven als Nahrung wenig attraktiv waren. Sie verpilzten und waren zudem von einem zähen Bakterienschleim umgeben. Nahmen diese schnell wachsenden unerwünschten Keime überhand, schädigten sie zusehends die Larven, was oft einem Totalausfall gleichkam. Bei auftretenden Symptomen (lethargisches Schwimmverhalten) wurden die Aufzuchtsschalen über ein Sieb abgegossen und die Larven unter einem warmen Wasserstrahl abgewaschen. Die Schale wurde mit einem Tuch unter fließendem Wasser ausgerieben, mit mindestens 60° C heißem Wasser ausgespült und mit 70 prozentigem Ethanol desinfiziert.

War das angebotene Trockenfutter zu gering bemessen, wirkte sich das ebenfalls negativ auf die Larvenaufzucht aus. Bei einer zu geringen Futtermenge kam es zu Larvenansammlungen um die Pellets. Die Larven, die ihren Platz in der Nähe des angebotenen Futters behaupteten, wuchsen schneller als die übrigen Larven. Ferner konnte bei Größenunterschieden karnivores Verhalten der stärkeren gegenüber den kleineren Larven beobachtet werden.

Bei der Staubfüttermethode darf nur so viel TetraMin[®]Baby auf die Wasseroberfläche gestreut werden, wie die Larven in kürzester Zeit fressen. Vorteil dieser Methode war das gleichmäßige Wachstum der Larven. Wichtig war auch hier die Vermeidung einer Überdosierung. Einer zu raschen Kahmhautbildung konnte die geringe Anzahl an Larven pro Schale nicht schnell entgegenwirken. Die Larven waren dann nicht mehr in der Lage diese massiv wachsende Mikroorganismenschicht auf der Wasseroberfläche mit ihren Atemplatten zu durchdringen und erstickten. Bei leichter Überdosierung sanken die Nahrungspartikel zu Boden und bildeten die Grundlage für ein starkes Wachstum der Mikroorganismen, die ebenfalls schädigenden Einfluss auf die Mückenlarven hatten. Auch hier galt: bei abnormem Larvenverhalten sowie übermäßigem Wachstum der Mikroorganismen, sollten die Schalen mit den Larven wie oben beschrieben gereinigt werden.

Nach der Sektion von Mitteldärmen und Speicheldrüsen zeigte sich, dass Mückenweibchen aus optimal mit Staubfutter versorgten Chargen eine geringere Kontamination mit Bakterien und Pilzen im Bereich der präparierten Organe aufwiesen. Mücken aus Chargen mit überdosiertem Staubfutter sowie aus denen mit Brekkis[®] gefütterten, zeigten eine höhere Kontamination um die herauspräparierten Organe. Eine erhöhte Kontamination Mücken mit Bakterien und Pilzen wirkte sich störend auf die Entwicklung der Plasmodien aus. Vor diesem Hintergrund wurden die Larven der Chargen, die für die Infektion mit Plasmodien vorgesehen waren, mit MicroMin[®]Baby gefüttert.

3.3.2 Vorversuche über die Eignung unterschiedlicher Membranen zur *in vitro*-Infektion von Anophelinen mit *Plasmodium spec.*

3.3.2.1 Untersuchung über die Akzeptanz unterschiedlicher Membranen für die *in vitro*-Blutfütterung von *An. stephensi*

Unter den getesteten Membranen, Parafilm[®], Naturdarm und Kollagensaitling, zeigte sich, dass der Naturdarm mit 18 % angeflogenen Mücken eine im Gegensatz zu den zwei künstlichen Membranen weitaus größere Attraktivität gegenüber den Mücken zeigte (s. Tabelle 17).

	Angeflogene Mücken in Prozent für n=100 Durchschnittswert bei 10 Wiederholungen
Parafilm [®]	1
Naturdarm	18
Kollagensaitling	3

Tab. 17: Eigenattraktivität der Membranen bei Umgebungstemperatur. Gezählt wurden die innerhalb von 2 Minuten angeflogenen und aktiv suchenden *An. stephensi*-Weibchen. Angegeben ist der prozentuale Durchschnittswert bei zehn Wiederholungen je Membran.

Die in Tabelle 18 dargestellten Ergebnisse der *in vitro*-Blutfütterungen deckt sich mit dem Resultat der oben beschriebenen Eigenattraktivitätsuntersuchungen. Als Vergleichswert sind den Blutfütterungen über eine Membran Ergebnisse einer *in vivo*-Fütterung an der Maus mit aufgeführt. Die meisten vollgesogenen Mücken konnten bei der Verwendung des Naturdarms gezählt werden. Mit 94 % der zur Verfügung stehenden Mückenweibchen haben ein Prozent mehr Mücken in den 15 Minuten gesaugt als an der Maus. Mit 85 % saugten mehr als 2/3 der Mücken am Parafilm[®]. Die geringste Akzeptanz bei den Mücken hatte der Kollagensaitling. Mit zunehmender Dauer der Fütterung trocknete der Kunstdarm immer weiter aus. So wurden die Mücken zwar angelockt, konnten die Membran aber nicht durchdringen und somit auch kein Blut aufnehmen.

	Vollgesogene Mücken in Prozent für n=100 Durchschnittswert bei 10 Wiederholungen
Parafilm [®]	85
Naturdarm	94
Kollagensaitling	53
Maus	93

Tab. 18: Attraktivität der Membranen während der Blutfütterung. Gezählt wurden die innerhalb von 15 Minuten vollgesogenen *An. stephensi*-Weibchen. Als Vergleich sind Anflugdaten einer Mausfütterung mit aufgeführt. Angegeben ist der Durchschnittswert bei zehn Wiederholungen je Membran. Die Bluttemperatur lag bei konstanten 37° C.

3.3.2.2 Eignung von Membranen für die *in vitro*-Infektion von Anophelinen mit *P. falciparum*

Resultierend aus dem in Kapitel 3.3.2.1 beschriebenen Ergebnis werden der Parafilm[®] und der Naturdarm unter Infektionsbedingungen getestet. An beiden Membranen saugte ein hoher Prozentsatz der *Anopheles*-Weibchen (s. Tabelle 19). Wie erwartet lag der Naturdarm bei einer Akzeptanz von 95 % der bereitgestellten Mücken. Mit 91,7 % fiel das Ergebnis der Parafilm[®]-Membran nur unwesentlich geringer aus. Nach Ablauf von sieben Tagen wurden die Mückenweibchen seziiert und Mitteldarm sowie Speicheldrüse herauspräpariert. Unter einem Mikroskop bei 40-facher Vergrößerung im Phasenkontrast, sowie bei 100-facher Vergrößerung wurden die Präparate auf ihre augenscheinliche Kontamination mit Bakterien und Pilzen untersucht. Vergleicht man beide Membrantypen unter diesem Aspekt, so sind die am Naturdarm gesaugten Mücken deutlich stärker mit Keimen belastet als diejenigen, die an der Parafilm[®]-Membran saugten.

Membran	Anzahl Mücken		gesaugt in %
	bereitgestellt	gesaugt	
Naturdarm	120	114	95,0
Parafilm [®]	120	110	91,7

Tab. 19: Vergleich der Attraktivität von Parafilm und Naturdarm während der *in vitro*-Fütterung an der Infektions-Apparatur. Gezählt wurden die innerhalb von 15 Minuten vollgesogenen Weibchen. Die Ergebnisse wurden in 4 Wiederholungen mit je 30 *An. stephensi*-Weibchen pro Infektionscontainer ermittelt.

3.3.3 Effektivität der *in vitro*-Infektion am Nagermalaria-Modell

Vier Mäusen wurde parallel die gleiche Dosis eines kryokonservierten *Plasmodium berghei* Wildtyp Stabilates intraperitoneal injiziert. Nachdem sich der Parasit erfolgreich in seinem Mäusewirt behaupten konnte und die Exflagellationsrate einen Schwellenwert von drei Exflagellationen pro Raster überschritten hatte, wurden zwei Mäuse mit der höchsten Gametozytendichte für die Infektionsversuche mit *Anopheles stephensi* ausgewählt. In Tabelle 20 sind die Exflagellationswerte der für die Versuche geeigneten Mäuse aufgelistet. Angegeben ist der gerundete durchschnittliche Exflagellationswert von zehn unter dem Mikroskop bei einer 40-fachen Vergrößerung ausgezählten Rasterfeldern.

Zur Vorbereitung wurden die Mäuse, ihrer jeweiligen Bestimmung entsprechend, betäubt (s. Kapitel 3.2.2.3). Die narkotisierte Maus sowie die aus der zweiten Maus geernteten Parasiten wurden gleichzeitig den vorbereiteten Stechmücken für 15 Minuten angeboten. Die Versuche wurden mit drei Wiederholungen an insgesamt vier Tagen durchgeführt. Am Tag 11 nach der Infektion wurden die Mücken seziiert und die Mitteldärme nach Oozysten untersucht. Ergänzend zur Oozysten-Zahl und der daraus resultierenden Infektionsrate wurden die Anzahl der gesaugten Mücken, die während des Inkubationszeitraums gestorbenen Mücken, sowie die Unterschiede in der Eiproduktion zwischen der Membran- und der Mausfütterung verglichen (s. Tabelle 21).

An der Maus saugten im Durchschnitt 89,2 % der *Anopheles*-♀♀. Verglichen mit der Saugrate der Membranfütterung mit 82,1 % lag der Wert der Mausfütterung damit um 7 % höher. Deutlicher zeigte sich der Unterschied bei den Infektionsraten der zwei Fütterungsvarianten. So waren bei der *in vitro*-Fütterung lediglich 33,1 % aller blutgesaugten Mücken infiziert. Damit lag die Membranfütterung 22,8 % unter der Infektionsrate der direkt an der Maus infizierten Mücken, die eine Quote von 55,9 % erreichte. Ein Blick auf Tabelle 20 zeigt, dass die Infektion bei Mücken, die Eier ausgebildet hatten, wesentlich stärker war als bei den Mücken, die keine Eier trugen.

Die unterschiedliche Effektivität beider Modelle war bereits an der Gesamtzahl der jeweils infizierten Mücken zu erkennen, wurde aber noch deutlicher, wenn man die absoluten Oozysten-Zahlen (Tabelle 21) in die Wertung miteinbezog. Beim *in vivo*-Modell konnten maximal 89 (s. Abbildung 29), 82, 75, 38 und 27 Oozysten pro Mitteldarm gezählt werden. Mit den Werten 17, 9, 8, 7 und 6 entwickelten sich deutlich weniger Parasiten im Mitteldarm der membrangefütterten Mücken.

Während der Sektion wurden die Darmpräparate nach graviden und nicht graviden Mücken sortiert. Hier zeigte sich, dass die Anzahl eiertragender Weibchen aus der Membranfütterung mit 66,6 % um 4,1 % höher lag, als die der Mücken, welche an der Maus gefüttert wurden. Unter Einbeziehung der Infektionsrate, die bei der Membranfütterung qualitativ und quantitativ geringer ausfiel als bei der Fütterung an der Maus, konnte auf dieses Ergebnis geschlossen werden.

Nr:	Methode	Exfl.	Sektion	Anzahl der Mücken				
				bereitgestellte	gesaugte	tote	gravide	mit Oozysten
1	<i>in vivo</i>	10	Tag 11	20	18	4	9	10
	<i>in vitro</i>	10	Tag 11	20	17	2	11	7
2	<i>in vivo</i>	6	Tag 11	30	28	3	18	16
	<i>in vitro</i>	9	Tag 11	30	28	3	19	15
3	<i>in vivo</i>	6	Tag 11	30	30	3	23	8
	<i>in vitro</i>	5	Tag 11	30	21	1	15	0
4	<i>in vivo</i>	> 15	Tag 11	30	22	0	13	17
	<i>in vitro</i>	12	Tag 11	30	24	2	15	9
<i>in vivo</i>			gesamt Durchschnitt in %		89,2	10,7	62,5	55,9
<i>in vitro</i>			gesamt Durchschnitt in %		82,1	8,9	66,6	33,1

Tab. 20: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse der *in vitro* (Infektion über Membran) und *in vivo* (Infektion an der Maus) von *Anopheles stephensi* mit *Plasmodium berghei*. Die Exflagellationsrate (Exfl.) ist ein gerundeter Durchschnittswert aus zehn bei 40-facher Vergrößerung ausgezählten Rasterfeldern. Durch eine Mitteldarmresektion wurde der Infektionserfolg am Tag 11 untersucht. Des weiteren ist die Anzahl folgender Mücken aufgeführt: die für Versuche in Infektionscontainern vorbereitet wurden; die Blut gesaugt haben; die Inkubationszeit nicht überlebt haben; die Eier trugen; an deren Mitteldärmen Oozysten nachgewiesen wurden.

Nr:	Methode	Anzahl der Oozysten pro Mitteldarm	
		gravide Mücken	nicht gravide Mücken
1	<i>in vivo</i>	89;17;7;6;4;3;2;2	75;3
	<i>in vitro</i>	5;4;2;2;2	2;2
2	<i>in vivo</i>	38;25;19;15;12;11;7;3;1;1;1;1	25;23;2
	<i>in vitro</i>	8;7;6;4;3;3;2;2;1;1;1;1	17;3
3	<i>in vivo</i>	6;5;2;1;1	8;6
	<i>in vitro</i>	0	0
4	<i>in vivo</i>	27;26;19;9;5;5;4;3;1;1	82;27;20;11;6;4;3
	<i>in vitro</i>	9;6;6;2;2;1;1;1;1	0

Tab. 21: Tabellarische Auflistung der Oozysten-Zahlen pro Mitteldarm der *in vitro* (Infektion über Membran) und *in vivo* (Infektion an der Maus) infizierten *Anopheles stephensi* mit *Plasmodium berghei*. Unterschieden wird zwischen graviden und nicht graviden Mückenweibchen. Die mit einer Kontrastfärbung behandelten Mitteldärme wurden unter einem Mikroskop 40 x Vergrößerung im Phasenkontrast ausgezählt.

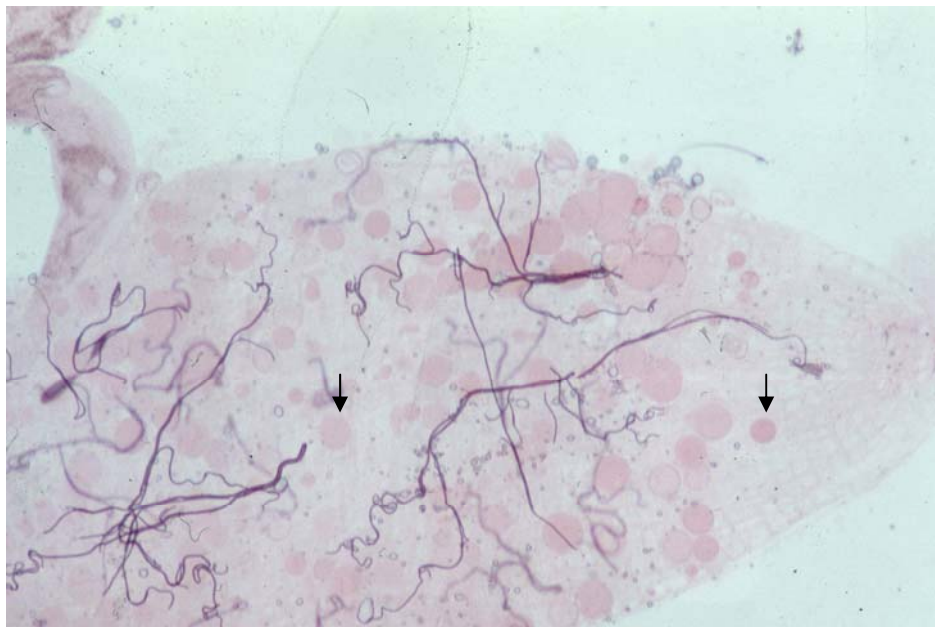


Abb. 29: Mitteldarm von *Anopheles stephensi* mit Oozysten von *Plasmodium berghei*. Zwei Oozysten sind exemplarisch mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet. Die Sektion erfolgte am Tag 11 nach der *in vivo*-Fütterung.

3.3.4 *In vitro*-Kultivierung von *Plasmodium falciparum*-Gametozyten

Grundlegend musste ein Kultivierungsmodell für *Plasmodium falciparum* zur zuverlässigen Infektion von *Anopheles*-Weibchen etabliert werden. Für die Versuche wurde der *P. falciparum* Stamm NF 54 verwendet. Basis dieses Abschnittes sind die unter 3.2.4 beschriebenen Methoden, die dem Ergebnisteil vorangestellt wurden.

Es zeigte sich, dass die Gametozytenkulturen sich während ihrer 14 bis 16 Tage dauernden Wachstumsphase gleichmäßig und erwartungsgemäß entwickelten. Die anschließende Überprüfung der Gametozytenfertilität anhand der Exflagellation der männlichen Gametozyten fiel zu Anfang allerdings negativ aus. Ein Vergleich dieser Kulturen mit späteren, gut exflagellierenden Kulturen zeigte weder in der Anzahl sowie in der Verteilung der Stadien noch in der optischen Begutachtung der einzelnen Stadien miteinander einen Unterschied. Rein mikroskopisch schienen die Kulturen gleich. Nach vielen Kultivierungsreihen zeigte sich jedoch, dass das Medium, wie es in Kapitel 3.2.4.3 beschrieben ist, zu einem ansatzweise besseren Ergebnis führte als mit dem unter 3.2.4.2 beschriebenen. Zügiger Mediumswechsel und striktes Beachten der idealen Mediumstemperatur von 37° C führten zu einer weiteren Produktionssteigerung fertiler Gametozyten. Im Zuge der Versuchsreihen konnte gezeigt werden, dass möglichst gleichbleibende Gaskonzentrationen die Gametozytenqualität erheblich verbessern. Die Kulturen waren in einem gasgesteuerten Inkubator untergebracht. Da dieser durch andere Experimente stark frequentiert war, wurden die eingestellten Gaskonzentrationen sowie die ideale Temperatur durch das häufige Öffnen ständig unterschritten (schlechte Kultivierungsbedingungen). Zu Zeiten, in denen der Inkubator nicht anderweitig genutzt wurde, wurden beste Exflagellationsraten erzielt (optimale Kultivierungsbedingungen). Um auf Dauer diesem nicht kalkulierbaren Zustand entgegenzuwirken, wurde ein Wärmeschrank, der ausschließlich der Gametozytenkultivierung zur Verfügung stand, benutzt. Dazu wurden die Gametozyten in gasdichten Kulturflaschen mit einem Gasgemisch aus 5 % O₂, 3 % CO₂ und 92 % N₂ geflutet und fest verschlossen in den Inkubator gestellt (mittlere Kultivierungsbedingungen).

In Tabelle 22 sind die Exflagellationsraten sowie die Infektionserfolge bezogen auf die drei Qualitätseinstufungen zusammenfasst aufgeführt.

Kultivierungsbedingungen	Gametozyten-dichte	Exflagellationen	<i>Anopheles</i> -Infektion in %			Oozysten pro Mitteldarm
			Durchschnitt	maximal	minimal	
schlecht	0,5 - 4 %	1-10 pro Objekttr.	00,00 % n=100			
mittel	0,5 - 4 %	1-3 pro Feld	23,34 % n=253	35,00%	10,43%	1 - 12
optimal	0,5 - 4 %	3-8 pro Feld	33,50 % n=223	55,36%	16,67%	1 - 42

Tab. 22: Gametozytenqualität unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen. Angegeben ist die Gametozytendichte. Die Exflagellation ausgezählt pro Objektträger in der Übersicht oder pro Feld bei zehn ausgezählten Feldern. Die Infektion in % n gibt die Anzahl der infizierten Mücken an und die Spanne der Oozystenzahlen pro Mitteldarm.

3.3.5 *In vitro*-Infektion der *Anopheles*-Weibchen mit *Plasmodium falciparum*

3.3.5.1 *In vitro*-Infektion von *An. stephensi* mit *P. falciparum* aus Gametozyten -Kulturen

Die Qualität der Gametozytenkulturen von *Plasmodium falciparum* wurde anhand ihrer Infektionsrate von *Anopheles stephensi* überprüft. Im Vorfeld gab es trotz guter Exflagellationsergebnisse unzuverlässige und geringe Infektionserfolge. Die aus diesem Versuchsabschnitt gewonnenen Erkenntnisse sind in die Methodikkapitel 3.2.3 und 3.2.4 mit eingeflossen. Mit den zu Anfang benutzten Glasfütterglöcken des Typ I (Kapitel 3.2.3.3) konnten keine hohen Infektionsraten erzielt werden, obwohl alle anderen Faktoren optimiert wurden. Im direkten Vergleich beider zur Verfügung stehender Modelle zeigten die an Fütterglöcken des Typ II gefütterten Anophelinen mit 26,2 % infizierter Mücken eine wesentlich höhere Rate (Tabelle 23) als die 5,7 % an Typ I infizierten Weibchen. Die Infektion wurde am Tag sieben nach der Fütterung anhand der Oozysten auf dem Mitteldarm festgestellt. Pro Fütterglöcken-Typ wurden 150 Mücken in fünf Bechern zu je 30 Stück bereitgestellt. Es zeigte sich auch, dass an Typ I mit 81,3 % etwa 9 % weniger Mücken saugten als dies mit 90,7 % an Typ II der Fall war.

Fütterglöcke	Mücken in %	
	gesaugt	Infiziert
Typ I	81,3	5,7
Typ II	90,7	26,2

n = 150

Tabelle 23 : Effektivität der verwendeten Glasfütterglöcken für die Infektion von *An. stephensi* mit *P. falciparum*. Bei n = 150 infizierten Mücken. Mitteldarmresektion am Tag 7.

Für die weiteren Infektionsversuche wurden ausschließlich die Glasfütterglöcken Typ II verwendet. Durchschnittlich konnten 31,5 % der 416 vollgesogenen Mücken infiziert werden. Ergänzend zur Infektionsrate sind in Tabelle 24 die Mortalitätsrate und die Anzahl der eiertragenden Weibchen aufgeführt. Ein Chargenvergleich der Verhältnismäßigkeiten der drei Werte untereinander zeigte keinen direkten Einfluss der *P. falciparum*-Infektion auf die Höhe der Mortalitätsrate oder auf die Anzahl eiertragender Weibchen. So lag die Mortalität der unter Nr. 5 aufgeführten Charge, bei 20 % infizierter Mücken, mit 25 % erwartungsgemäß

relativ hoch. Vergleicht man dazu die Mortalitätsrate von 27,3 % unter Nr. 12, bei einer Infektionsrate von 43,8, und die unter Nr. 16 dargestellte Sterberate von 8,9 %, mit einer Infektion von 60,8 %, zeigte sich keine eindeutige Korrelation der beiden Werte. Ein ähnliches Ergebnis bringt der Vergleich von Infektionsrate mit der Anzahl gravider Weibchen. Zu erwarten wäre ein relativer Rückgang eiertragender Weibchen bei zunehmender Infektionsrate. Dies konnte nicht bestätigt werden, so wies die höchste Infektionsrate mit 60,8 % mit 42,9 % auch die meisten graviden Weibchen auf.

Die Exflagellationswerte galten als Richtgröße für die Gametozytenqualität. Durchschnittswerte unter zwei Exflagellationen pro zehn Felder führten zu keiner oder nur einer äußerst geringen Infektion von *Anopheles stephensi* mit *Plasmodium falciparum*. Wie aus Tabelle 24 gut ersichtlich ist, erhöht sich der Anteil infizierter Mücken bei größerer Exflagellationsdichte.

Nr.	Exfl.	bereitgestellt	gesaugt	Infektionsrate in %	Graviditätsr. in %	Mortalität in %
1	2	30	27	12,0	11,1	7,4
2	5	25	24	25,0	4,2	16,7
3	5	25	21	29,4	19,0	19,0
4	3	30	26	34,8	23,1	11,5
5	4	40	20	20,0	25,0	25,0
6	5	40	25	15,8	40,0	24,0
7	4	30	21	29,4	19,0	19,0
8	3	36	24	18,2	8,3	8,3
9	5	30	21	35,3	14,3	19,0
10	5	20	16	38,5	0,0	18,8
11	4	25	17	25,0	11,8	29,4
12	5	30	22	43,8	27,3	27,3
13	3	30	27	27,3	22,2	18,5
14	3	25	19	25,0	21,1	36,8
15	3	30	20	46,7	20,0	25,0
16	7	60	56	60,8	42,9	8,9
17	8	30	30	48,0	40,0	16,7
Gesamt		536	416	31,5 (Mittelwert)		
				12,692 (Standabw.)		

Tab. 24: Infektion von *An. stephensi* mit *P. falciparum*. Aufgeführt sind zusätzlich die Mortalitäts- und Graviditätsrate. Die Exflagellationswerte berechnen sich als gerundeter Mittelwert aus zehn ausgezählten Blickfeldern.

gravide und nicht gravide Weibchen ließ keine signifikante Abhängigkeit der Werte zueinander erkennen. Bei der Berechnung der Qualität der Infektion, also der durchschnittlichen Anzahl von Sporozoiten pro Speicheldrüse, zeigte sich mit 2,9 ein leichter Qualitätsvorsprung der graviden Tiere gegenüber einem Wert von 2,5 bei den Weibchen ohne Eier. Dies errechnete sich als Mittelwert der Summe der Wertigkeiten der einzelnen Kategorien. Dazu wurden den Kategorien A, B, C und D aufsteigend die Werte 1 bis 4 zugeordnet.

Nr.	infizierte Mücken	infizierte Speicheldrüsen in %			Sporozoiten pro Speicheldrüse	
		absolut	gravid	nicht gravid	gravid	nicht gravid
1	8/23	34,8	26,1	8,7	D;C;C;C;C;C	D;C
2	2/15	13,3	0,0	13,3		C;B
3	3/19	15,8	10,5	5,3	C;C	B
4	5/17	29,4	11,8	17,6	C;B	C;C;A
5	4/22	18,2	4,5	13,6	B	B;B;B
6	6/17	35,3	5,9	29,4	B	B;B;B;B;A
7	2/8	25,0	0,0	25,0		C;C
8	2/7	28,6	14,3	14,3	C	B
9	4/12	33,3	16,7	16,7	C;C	C;C
gesamt	36/140	26,0	41,7	58,3		

Tab. 26: Infektionsrate der *An. stephensi*-Speicheldrüsen mit *P. falciparum*-Sporozoiten. Unterschieden wird zwischen graviden und nicht graviden Weibchen. Die Sporozoitenzahlen werden in Gruppen zusammengefasst und mit den Kategorien A (1-10), B (11-100), C (101-1000) sowie D (< 1000) bezeichnet.

Innerhalb eines Experimentes war die Qualität der Infektionen relativ konstant. Parameter, welche die Qualität beeinflussen, sind unter anderem Variabilität der Transmissionskapazität der *Anopheles*-Mücken und der Exflagellationskapazität der *P. falciparum*-Kulturen.

3.3.5.2 *In vitro*-Infektion von *An. gambiae s. str.* und *An. albimanus* mit *P. falciparum* aus Gametozytenkulturen

Ergänzend zu den Infektionsversuchen mit *Anopheles stephensi* standen mit *An. gambiae s. str.* und *An. albimanus* zwei weitere Vertreter tropischer Mücken zur Verfügung. Es wurden drei Versuchsreihen mit je 20 *Anopheles*-Weibchen pro Art durchgeführt. *Anopheles gambiae* saugte nur sehr zögerlich an der Membran. Alle 21 der insgesamt 60 bereitgestellten Mücken flogen erst nach 8 bis 11 Minuten an und begannen zu saugen. Im Gegensatz dazu saugen *An. albimanus* und die Reverenzart *An. stephensi* nach einer Orientierungsphase von 1 bis 2 Minuten zügig an der angebotenen Gametozytenkultur. Nach einer an das Parasitenwachstum angepassten Wartezeit von sieben Tagen wurden den Mücken die Mitteldärme entnommen und auf Oozysten untersucht. Wie Tabelle 27 zeigt, waren 31 und damit 70,5 % der 50 seziierten *An. albimanus* gravid. *An. gambiae* hatte mit 4 von 19, also 21,1 % der untersuchten Weibchen, die geringste Anzahl an eiertragenden Weibchen. Mit 14,3 % der Versuchstiere lag die Sterberate bei *An. gambiae* um ein Vielfaches höher als bei den beiden anderen *Anopheles*-Arten. Eine sehr gute Infektionsrate konnte bei *An. stephensi* festgestellt werden. Auf 42,9 % der mittleren Darmabschnitte hatten sich Oozysten entwickelt. Bei *An. albimanus* konnten bei 4,5 % und damit bei 2 der 50 Mückenweibchen Oozysten nachgewiesen werden. Auf beiden präparierten und mit Mercuchrom® gefärbten Mitteldärmen konnten je zwei Oozysten gezählt werden. *An. gambiae* ließ sich unter den Versuchsbedingungen nicht mit *Plasmodium falciparum* infizieren.

Spezies	bereitgestellt	gesaugt		infiziert		gravid		gestorben	
		Anzahl	in %	Anzahl	in %	Anzahl	in %	Anzahl	in %
<i>An. gambiae s. str.</i>	60	21	35,0	0	0,0	4	21,1	3	14,3
<i>An. albimanus</i>	60	52	86,7	2	4,5	31	70,5	2	4,3
<i>An. stephensi</i>	60	51	85,0	21	42,9	26	53,1	2	3,9

Tab. 27: Ergebnisse der Fütterung von *An. gambiae s. str.*, *An. albimanus* und *An. stephensi* mit *P. falciparum*. Zusätzlich sind Daten, die Auskunft über Sterberate und Gravidität geben, aufgeführt.

3.3.5.3 *In vitro*-Fütterung von *An. plumbeus* mit kultivierten *P. falciparum*-Gametozyten

Anknüpfend an die Infektionsversuche mit *Anopheles stephensi*, mit deren Hilfe die *in vitro*-Infektionssmethode mit kultivierten Gametozyten des Erregers der Malaria tropica optimiert wurde, folgten die Versuche mit *Anopheles plumbeus*. Die im Vorfeld gemachten Erfahrungen mussten im Detail erst an diese Mückenspezies angepasst werden. So zeigte sich, dass - bedingt durch das Volumen der Infektionscontainer und die Fläche der Membran - mehr als 20 Mückenweibchen pro Infektionseinheit nicht zweckmäßig sind. Befinden sich zu viele Mücken in dem Becher, stören sie sich gegenseitig und verhindern so die für eine Infektion essentielle zügige Aufnahme der Gametozyten. Im Gegensatz zu den *An. stephensi* und *An. albimanus* zeigten Weibchen von *An. plumbeus* im Alter bis 10 Tagen innerhalb der 15 Minuten ein geringes Interesse an der Membran zu saugen. Ab Tag 10 waren Anflüge und Saugverhalten so weit ausgeprägt, dass die Mückenweibchen zügig während der vorgegebenen Zeit saugten. Verwendet wurden Mücken in einem Alter von 14 Tagen, da sich unter den Versuchsbedingungen ab diesem Zeitpunkt das zuverlässigste Saugverhalten zeigte. In Tabelle 28 ist zu sehen, dass sich das Alter der Mücken nicht nachteilig in einer erhöhten Sterberate widerspiegelt. Die unter Nr. 2 und Nr. 4 aufgeführten Chargen wurden über 14 Tage gehalten, die Chargen 1 und 2 wurden nach 7 Tagen seziiert. Im Vergleich der Mortalitätsraten gibt es keinen auf die Lebensdauer bezogenen signifikanten Unterschied. Erstaunlich ist der Anteil gravider Weibchen von *An. plumbeus*, im Gesamtdurchschnitt liegt er mit 92,8 % weit über dem der tropischen Mücken in diesen Versuchsreihen. In allen Chargen, in denen eine *P. falciparum*-Infektion nachgewiesen werden konnte, lag der Anteil der Mücken, die in der vorgegebenen Zeitspanne sich vollgesogen hatten, mit 81,0 % zu 60,6 % deutlich über dem der Kontrollart *An. stephensi*.

Die verwendeten Mückenweibchen der Chargen 1, 2 sowie 3 wurden als Larven aus Jauchegruben entnommen. Die Mücken der Charge 4 stammen aus einer in Baumhöhlen brütenden Population. Aus beiden Brutstättentypen wurden Larven entnommen und im Labor aufgezogen.

Drei der Mitteldärme trugen Oozysten, zwei waren mit jeweils zwei Parasitenstadien und der dritte mit einem Parasiten belegt. Die erste erfolgreiche Infektion von *An. plumbeus* wurde durch Oozysten auf den Mitteldärmen nachgewiesen (Tabelle 29). Bei 14,3 %, also 3 der 21 Mücken, konnten 7 Tage nach Infektion auf den präparierten Mitteldärmen unter dem Mikroskop bei 40-facher Vergrößerung im Phasenkontrast die mit Mercurchrom[®] angefärbten

Oozysten gezählt werden. Drei der mittleren Darmabschnitte trugen Oozysten, zwei waren mit jeweils zwei Oozysten und der dritte Mückendarm mit einer Oozyste infiziert (Tabelle 29). Gute Voraussetzungen für die Infektion von *An. plumbeus* war ein Exflagellationsdurchschnitt von vier bei zehn ausgezählten Feldern sowie eine hohe Saugrate von 80,0. % Anzumerken ist, dass die Mehrzahl der Mücken bereits in den ersten 10 Minuten mit Erfolg gesaugt hatte. Bei der Kontrollinfektion lag die Infektionsrate mit 2 der 15 seziierten Mücken bei 13,3 %, auf beiden Mitteldärmen entwickelte sich je eine Oozyste.

Nr:	Spezies	Exfl.	bereitgestellt	gesaugt in %	Infektion der Mücken (Rate in %)	Gravidität in %	Mortalität in %
1	<i>An. plumbeus</i>	4	30	80,0	3/21 (14,3)	81,0	12,5
	<i>An. stephensi</i>		30	60,0	2/15 (13,3)	66,7	16,7
2	<i>An. plumbeus</i>	5	45	71,1	3/15 (20)	100,0	6,3
	<i>An. stephensi</i>		45	57,8	5/13 (38,5)	65,2	11,5
3	<i>An. plumbeus</i>	2	30	36,7	0/9 (0,0)	100,0	18,2
	<i>An. stephensi</i>		30	63,3	2/18 (11,1)	38,9	5,3
4	<i>An. plumbeus</i>	4	25	92,0	2/12 (16,7)	90,0	13,0
	<i>An. stephensi</i>		25	64,0	3/8 (37,5)	40,0	6,3

Tab. 28: Infektion von *An. plumbeus* über eine Membran mit *in vitro* kultivierten *P. falciparum*-Gametozyten. Die Chargen 1 bis 3 stammen aus einer Jauchegrubenpopulation, die Nr. 4 aus einer Baumhöhlenpopulation. Als Infektionskontrolle fungierte *An. stephensi*. Die Exflagellation (Exfl.) ist als gerundeter Durchschnittswert aus zehn ausgezählten Feldern angegeben.

In Charge 2 wurden am Tag 7 nach Infektion 15 der Weibchen seziiert, auch hier konnten an drei Mitteldärmen Oozysten nachgewiesen werden. Neben einem mit zwei und einem mit einer Oozyste wurden auf dem dritten Mitteldarm 41 Oozysten gezählt. Am Tag 14 wurden aus den verbliebenen 13 Weibchen die Speicheldrüsen und die Mitteldärme präpariert. Es zeigte sich, dass eine Speicheldrüse mit 100 bis 1000 Sporozoiten (Kategorie "C") infiziert war (Tabelle 30). Der zu dieser Mücke gehörende Mitteldarm war zusätzlich mit einer nicht vollständig entwickelten Oozyste infiziert. An einem zweiten Mitteldarm wurden sieben Oozysten gezählt, die Loben der dazugehörigen Speicheldrüse enthielten keine Sporozoiten.

Auch bei dieser Charge basierte das gute Infektionsergebnis auf der hohen Qualität der Gametozyten, die sich in der hohen Exflagellationsrate von fünf widerspiegelte. In der Kontrolle wurde dies mit 30 % infizierter Mücken bestätigt. Bei zwei der fünf infizierten Mitteldärme am Tag 7 wurden 14 und acht Oozysten gezählt. Nach 14 Tagen waren drei Speicheldrüsen mit Sporoziten infiziert: Zwei davon aus der Kategorie "C" und eine aus "B".

Nr:	Spezies	Tag 7				
		seziert	Mitteldarm infiziert		Oozysten pro Mitteldarm	
			Anzahl	%	gravid	nicht gravid
1	<i>An. plumbeus</i>	21	3	14,3	2;2;1	0
	<i>An. stephensi</i>	15	2	13,3	1;1	0
2	<i>An. plumbeus</i>	15	3	20,0	41;2;1	0
	<i>An. stephensi</i>	13	5	38,5	8;2;	14;1;1
3	<i>An. plumbeus</i>	9	0	0,0	0	0
	<i>An. stephensi</i>	18	2	11,1	3	2
4	<i>An. plumbeus</i>	12	2	16,7	2;1	0
	<i>An. stephensi</i>	8	3	37,5	4	12;2

Tab. 29: Infektionsnachweis von *An. plumbeus* mit *P. falciparum* 7 Tage nach Fütterung. Angegeben sind die Zahl der seziierten Mücken sowie die Infektionsrate und die detektierten Oozysten pro Mitteldarm.

Die beispielhaft in Tabelle 29 aufgeführte dritte Charge wurde mit Gametozyten infiziert, deren im Vorfeld bestimmte Exflagellationsrate nur bei einem Wert von zwei lag. In der Kontrolle mit *An. stephensi* waren 2 der 18 untersuchten Mückenweibchen mit je drei und zwei Oozysten infiziert. Bei *An. plumbeus*, die mit knapp 37 % der 30 vorbereiteten Mücken ein eher schlechtes Saugergebnis lieferten, konnte keine Infektion nachgewiesen werden. Und das, obwohl alle neun nach sieben Tagen seziierten Mücken Eier ausgebildet hatten, also genug Erythrozyten sowie Parasiten aufgenommen haben mussten. Eine Sektion der zwei verendeten Mücken zeigte auch keine Spuren einer *P. falciparum*-Infektion. Mit 63,3 % voll gesaugter Exemplare wurde in der Kontrolle ein durchschnittlich guter Wert erreicht.

Nr:	Spezies	Tag 14								
		seziert	Speicheldrüsen infiziert				Mitteldärme infiziert			
			Anzahl	%	gravid	nicht gravid	Anzahl	%	gravid	nicht gravid
2	<i>An. plumbeus</i>	13	1	7,7	C	0	2	15,4	7;1	0
	<i>An. stephensi</i>	10	3	30,0	0	B;C;C	1	10,0	0	2
4	<i>An. plumbeus</i>	8	1	12,5	B	0	1	12,5	5	0
	<i>An. stephensi</i>	7	3	42,9	C;C;B	0	0	0,0	0	0

Tab. 30: Infektionsnachweis von *An. plumbeus* mit *P. falciparum* 14 Tage nach Fütterung. Angegeben sind die Zahl der seziierten Mücken sowie die Infektionsrate, die detektierten Oozysten pro Mitteldarm und die infizierten Speicheldrüsen. Angegeben sind die Sporozoitenzahlen in den Kategorien "B" und "C". B = 11 bis 100 und C = 101 bis 1000 Sporozoiten.

Mit der vierten Charge wurden *An. plumbeus*-Mücken aus einer Baumhöhlenpopulation infiziert. Auch diese Mücken akzeptierten die angebotene Blutmahlzeit mit einer Quote von 92 % sehr gut (s. Tabelle 28). Das schnelle und effiziente Saugen ließ zumindest auf eine hohe Eiproduktionsrate schließen. Ebenso konnte bedingt durch eine Exflagellationsrate von vier, basierend auf den vorherigen Ergebnissen, eine Infektion erwartet werden. Die Sterberate lag bei durchschnittlich 13 %. In der Kontrolle lagen die Saugrate sowie die Gravidität unter den Werten von *An. plumbeus*. Die gesamte Infektionsrate erreichte allerdings mit 40 % einen zweifach höheren Wert. Am Tag 7 zeigte die Sektion von 12 *An. plumbeus*-Weibchen eine Infektion von 16,7 %, es konnten an einem Mitteldarm eine und bei einem anderen zwei Oozysten nachgewiesen werden (s. Tabelle 29). Nach 14 Tagen wurden die verbliebenen acht Weibchen auf eine Infektion mit *P. falciparum* untersucht. In einer Speicheldrüse waren Sporozoiten vorhanden, die nach Auszählen einer Infektion der Kategorie "B" zugeordnet wurden. Auf dem Mitteldarm eines weiteren Mückenweibchens entwickelten sich fünf Oozysten. Die zu diesem Entwicklungszeitpunkt geringe Größe der Oozysten sowie eine nicht mit Sporozoiten infizierte Speicheldrüse lassen darauf schließen, dass die Parasiten ihre Entwicklung in dieser Mücke nicht vollenden konnten.

Etwa die Hälfte der mit *P. falciparum* infizierten *An. stephensi*-Weibchen waren nicht gravid. Im Gegensatz dazu konnte innerhalb der - wenn auch kleinen - Gruppe nicht graver *An. plumbeus*-Weibchen keine Infektion diagnostiziert werden.

Unter den idealen Laborbedingungen war eine Infektion der *An. plumbeus*-Weibchen aus Baumhöhlen und Jauchgrubenpopulationen mit *P. falciparum* möglich. Ergänzend zu dem

Nachweis von Oozysten (Abbildung 30) konnte mit den Sporozoiten infizierten Speicheldrüsen (Abbildung 31, 32) gezeigt werden, dass die über eine Membran gefütterten *in vitro* kultivierten Gametozyten des *P. falciparum*-Stammes NF54 ihren Entwicklungszyklus in *An. plumbeus* vollenden können, wenn auch in einem geringeren Maße als bei den Parasiten adaptierten *An. stephensi*-Weibchen.

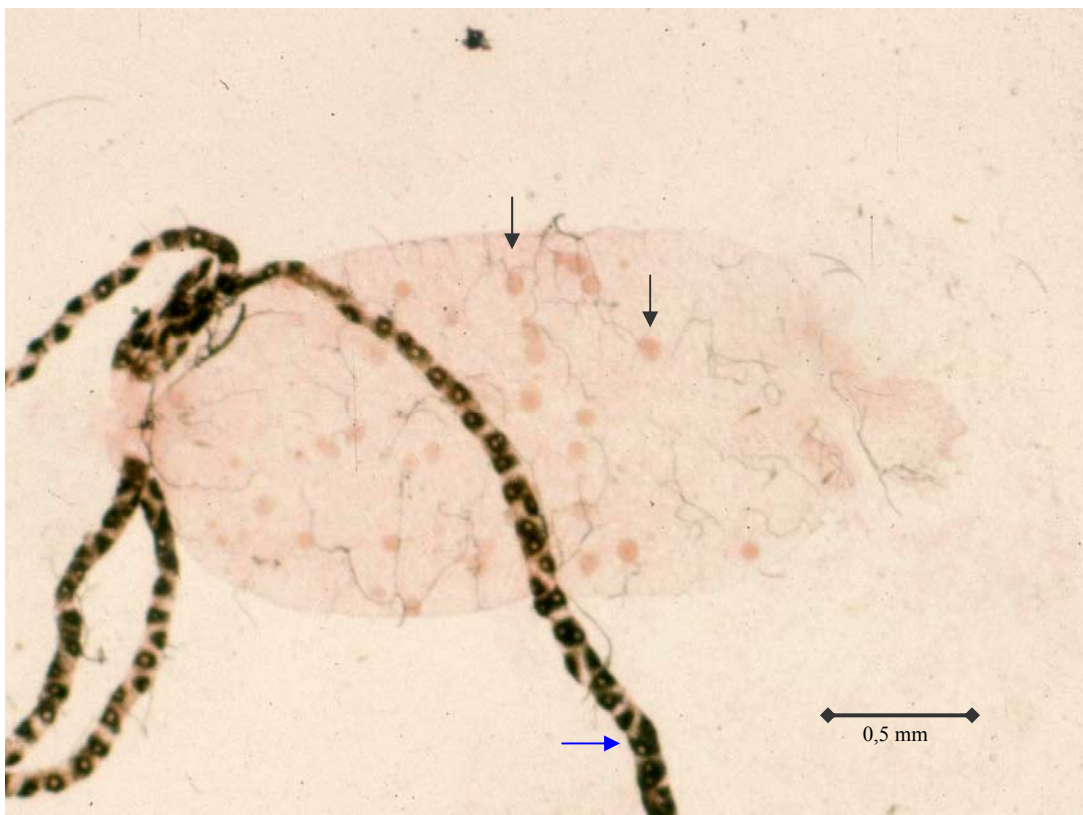


Abb. 30: Mitteldarm von *An. plumbeus* mit *P. falciparum*-Oozysten in einer Kontrastfärbung mit 0,1 % Mercuchrom. Exemplarisch sind zwei Oozysten durch Pfeile markiert. Der blaue Pfeil markiert ein Malpighi-Gefäß.

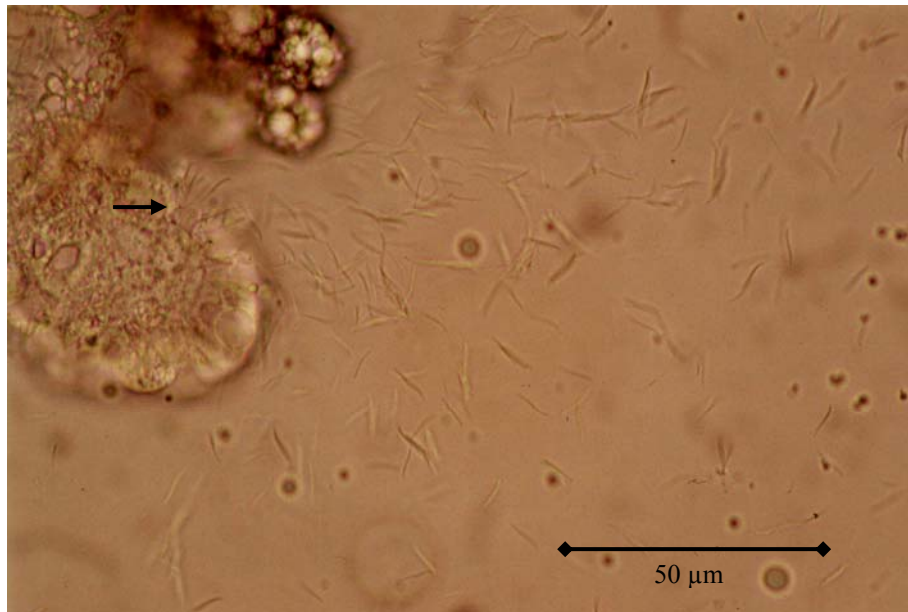


Abb.31: Mit *P. falciparum*-Sporozoiten infizierte Speicheldrüse eines *An. stephensi*-Weibchens bei 100 facher Vergrößerung. Der Pfeil zeigt die rupturierte Stelle am Lobus, an der die Sporozoiten austreten. Die Präparation der Speicheldrüse erfolgte am Tag 14 nach der *in vitro*-Infektion.

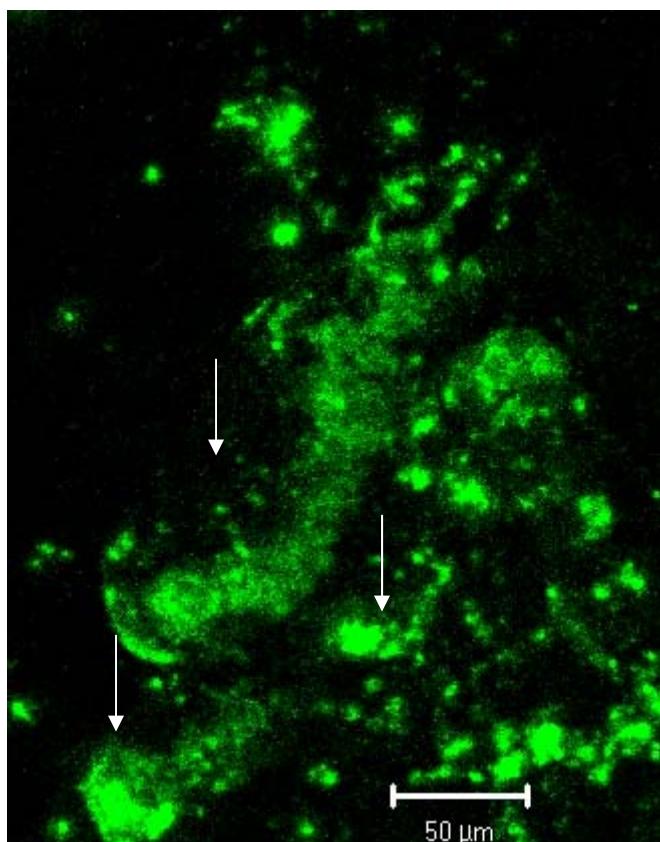


Abb. 32: Immunofluoreszenzfärbung von *P. falciparum*-Sporozoiten in einer Speicheldrüse von *An. stephensi*. Angefärbt mit sekundären Antikörpern anti-Maus Alexa-Fluor 488 zeigen die Sporozoiten angeregt durch einen 488 nm Laser spezifische Grün-Fluoreszenz. Die Infektionsstärke ist der Kategorie D (> 10.000 Sporozoiten) zuzuordnen. Zu erkennen sind die Konturen von drei Loben (Pfeil) der Speicheldrüsen.

3.3.6 Sporozoiten-Invasion in Hepatozyten

3.3.6.1 Invasion von *P. falciparum*-Speicheldrüsensporozoiten in Hepatozyten

In einem ersten Schritt sollte die Invasionsfähigkeit der aus den Speicheldrüsen von *Anopheles stephensi* gewonnen Sporozoiten aus *in vitro* kultivierten Gametozyten von *Plasmodium falciparum* Stamm NF54 überprüft werden. Untersucht wurde die Invasion der Sporozoiten sowie deren Leberstadienschizogonie an kultivierten Hepatozyten der humanen Hepatoma Zelllinie (Huh7). Mit der durchgeführten Doppelfärbung wurden, mit Hilfe des sekundären Antikörpers anti-Maus Alexa-Fluor 546, die außerhalb der Hepatozyten liegenden und zuvor mit einem primären Antikörper anti-PfCSP markierten Sporozoiten rot gefärbt. Nach der Permeabilisierung der Zellmembran wurden, nach einer erneuten Markierung der Sporozoiten, auch die im Inneren der Zellen befindlichen Sporozoiten mit dem sekundären anti-Maus Alexa-Fluor 488 grün angefärbt. Die intra- sowie extrazellulären Sporozoiten konnten nach entsprechender Anregung mit Hilfe des konfokalen Laser-Scan-Mikroskopes sichtbar gemacht und somit unterschieden werden.

Durch die Inkubationszeit von 90 Minuten wurde den Sporozoiten genug Zeit gewährt, um in die Hepatozytenzellen zu invadieren. Abbildung 33 zeigt in Abschnitt A einen Sporozoiten, der während der Anregung durch einen 546 nm Laser nur schwach bzw. unspezifisch rot leuchtet. Dies zeigt, dass der Parasit während des ersten Färbeschrittes von dem sekundären anti-Maus Alexa-Fluor 546 Antikörper abgeschirmt war. Segment C der Abbildung 33 zeigt im 488 nm Laser eine spezifische Grünfärbung des Parasiten. Nach der Permeabilisierung der Zellmembran konnte er mit dem primären Antikörper als *P. falciparum*-Sporozoit markiert und mit dem sekundären Antikörper entsprechend grün gefärbt werden.

Während im Durchlicht (Abschnitt B) nur die Konturen der Hepatozyten deutlich sichtbar sind, ist der Sporozoit selbst nicht zu erkennen. Teil D der Abbildung 33 zeigt unter Verwendung beider Laser sowie des Durchlichtes die Lage des grün fluoreszierenden Parasiten in seiner Wirtszelle, die ihrerseits unspezifisch rot/grün fluoresziert. In Abbildung 34 ist zum Vergleich ein Parasit, der nicht invadiert war, dargestellt. Abschnitt A und C zeigen, bei jeweils unterschiedlicher Laserfrequenz, eine spezifische intensive rote bzw. grüne Färbung. Der Parasit wurde, da er nicht durch die Zellmembran geschützt war, bei beiden Färbeschritten jeweils mit dem sekundären Antikörper anti-Maus Alexa-Fluor 546 sowie 488

gefärbt. Auch dieser Sporozoit war im Durchlicht (Abbildung 34 Abschnitt B) nicht zu erkennen. Unter der Verwendung aller drei Beleuchtungsarten konnte die Lage des Parasiten deutlich außerhalb einer Hepatozytenzelle bestimmt werden.

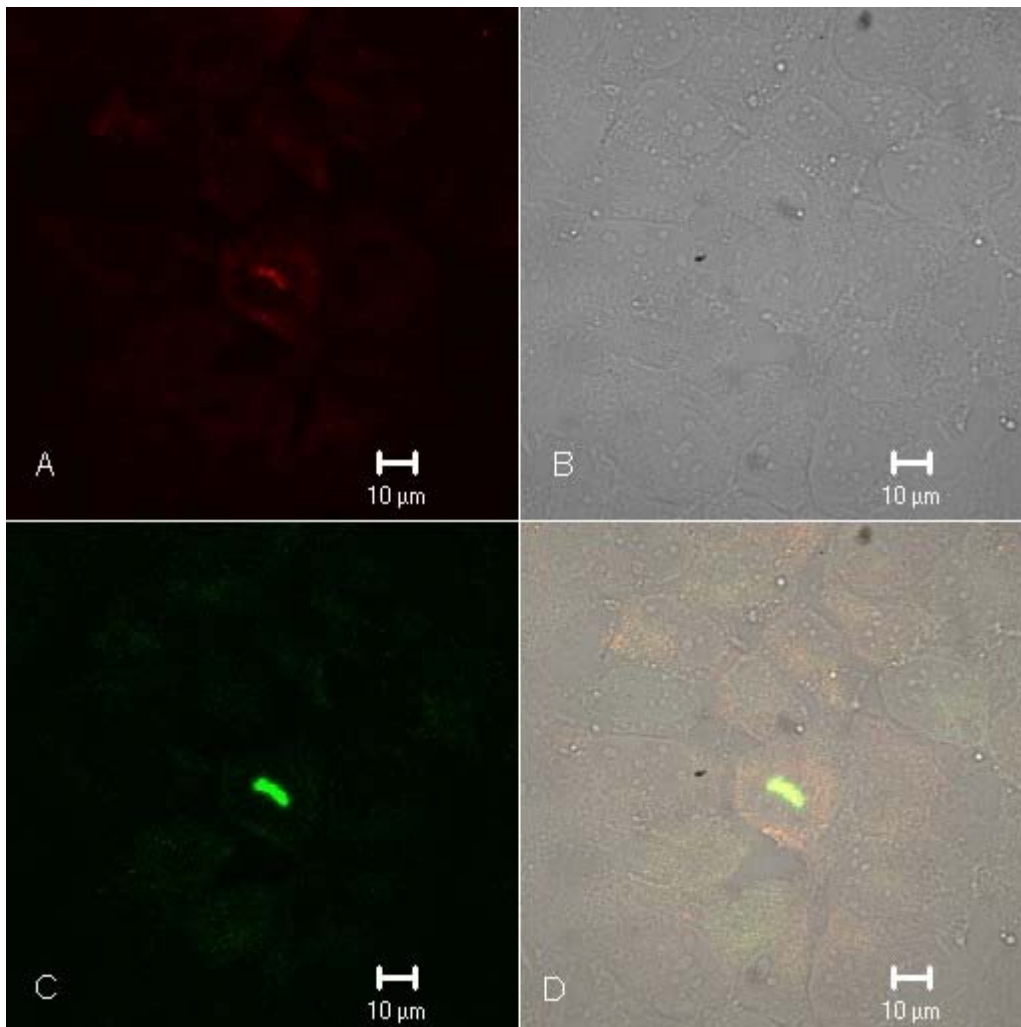


Abb. 33: In Hepatozyten invadierter *P. falciparum*-Speicheldrüsensporozoit. Immunofluoreszenzfärbung mit anti-*Pf*CSP Antikörper und sekundären Antikörpern anti-Maus Alexa-Fluor 546 sowie anti-Maus Alexa-Fluor 488. **A** zeigt die unspezifische Rot-Fluoreszenz des Sporozoiten unter Verwendung eines 546 nm Lasers. In **B** sind die Konturen der Hepatozyten im Durchlicht zu erkennen. **C** zeigt die spezifische Grün-Fluoreszenz des Parasiten, angeregt durch einen 488 nm Laser. **D** zeigt den Parasiten und die Hepatozyten unter Verwendung des 488 nm und des 546 nm Lasers bei gleichzeitigem Durchlicht.

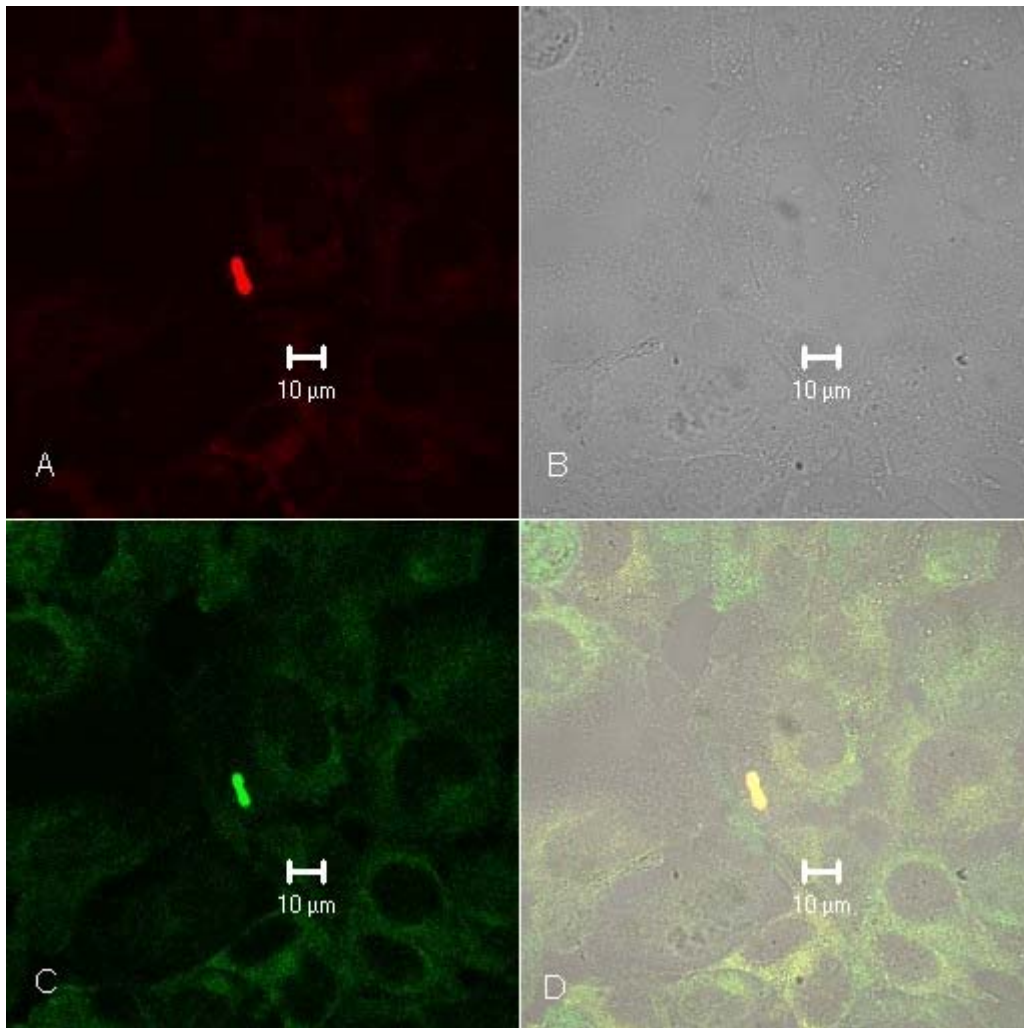


Abb. 34: Extrazellulärer *P. falciparum* Speicheldrüsen-sporozoit. Immunofluoreszenzfärbung mit anti-*Pf*CSP Antikörper und sekundären Antikörpern anti-Maus Alexa-Fluor 546 sowie anti-Maus Alexa-Fluor 488. **A** zeigt die spezifische Rot-Fluoreszenz des Sporozoiten unter Verwendung eines 546 nm Lasers. In Abschnitt **B** sind die Konturen der Hepatozyten im Durchlicht zu erkennen. **C** zeigt die spezifische Grün-Fluoreszenz des Parasiten, angeregt durch einen 488 nm Laser. **D** zeigt den Parasiten und die Hepatozyten unter Verwendung des 488 nm und des 546 nm Lasers bei gleichzeitigem Durchlicht.

3.3.6.2 Entwicklung invadierter *P. falciparum*-Sporozoiten in Leberzellen (Hepatozyten)

Im ersten Schritt konnte die Invasion der *Plasmodium falciparum*-Sporozoiten in Hepatozyten der Zelllinie Huh7 zweifelsfrei nachgewiesen werden. Darauf aufbauend sollte geklärt werden, ob die *in vitro* kultivierten Parasiten ihre Fähigkeit, sich in den Leberzellen zu entwickeln, beibehalten haben. Nach einem Inkubationsintervall von 72 Stunden wurden die Zellen mit -20°C kaltem Methanol fixiert. Der Entwicklungszeitraum von 72 Stunden zeigte sich als ideal für diese Fragestellung und den darauf basierenden Versuchsaufbau. Durch eine Immunfluoreszenzfärbung wurden die Parasiten zunächst mit dem primären anti-*PfCSP* Antikörper und anschließend mit dem sekundären Antikörper anti-Maus Alexa-Fluor 488 grün angefärbt. Abbildung 35 zeigt ein frühes Leberstadium, das angeregt von einem 488 nm Laser, in spezifischem grün fluoresziert. Deutlich sind die ebenfalls grün leuchtenden Konturen der Wirtszelle zu sehen. Im Gegensatz zu der Bananenform der Sporozoiten hat sich das frühe Leberstadium bereits abgerundet und so seine nächste Entwicklungsphase eingeleitet. Bei Sporozoiten, die nicht in Hepatozytenzellen invadierten, konnte keine Weiterentwicklung festgestellt werden (s. Abbildung 36).

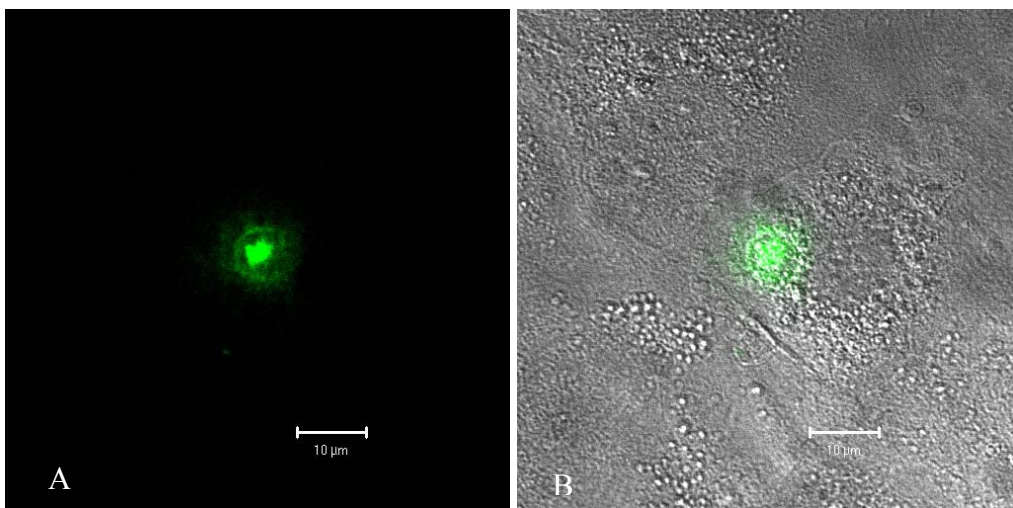


Abb. 35: *P. falciparum*-Leberstadium. Immunfluoreszenzfärbung mit anti-*PfCSP* Antikörper und sekundären Antikörpern anti-Maus Alexa-Fluor 488. **A** zeigt spezifische Grün-Fluoreszenz des Parasiten, angeregt durch einen 488 nm Laser. **B** zeigt den Parasiten und die Hepatozyten unter Verwendung des 488 nm Lasers bei gleichzeitigem Durchlicht.

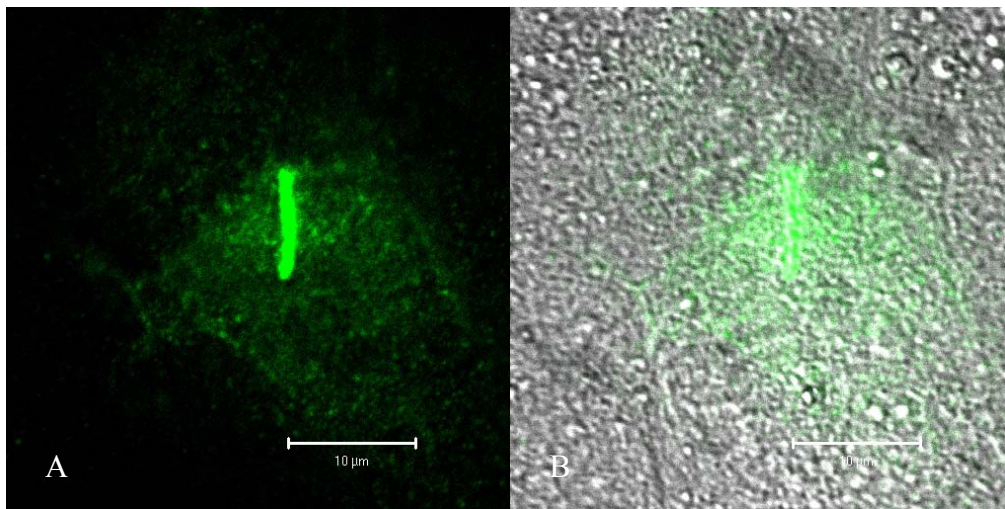


Abb. 36: Sporozoit, der nach 72 Stunden nicht in Hepatozyten invadiert war. Eine extrazelluläre Weiterentwicklung konnte nicht nachgewiesen werden. Angefärbt mit anti-*Pf*CSP Antikörper und sekundären Antikörpern anti-Maus Alexa-Fluor 488. **A** zeigt spezifische Grün-Fluoreszenz des Parasiten, angeregt durch einen 488 nm Laser. **B** zeigt den Parasiten und die umliegenden Hepatozyten unter Verwendung des 488 nm Lasers bei gleichzeitigem Durchlicht.

3.4 Diskussion

In diesem Teil der Studie, in dem die Vektorkompetenz untersucht wurde, konnte der Entwicklungszyklus des Erregers der Malaria tropica sowohl in den als Infektionskontrolle dienenden tropischen Anophelinen, als auch in der einheimischen *An. plumbeus* nachgewiesen werden.

Die wesentliche Grundlage für die erfolgreiche Infektion von Anophelinen mit dem Erreger der Malaria tropica ist die stetige Verfügbarkeit fertiler Gametozyten. Unter Einbeziehung der Ergebnisse von Ponnudurai *et al.* (1982, 1982 a, 1989 a) und Ifediba (1981) über die Gametozytenentwicklung bei *Plasmodium falciparum* wurde ein *in vitro*-Kultivierungsmodell entwickelt. Da kein automatisiertes Kultivierungssystem zur Verfügung stand, musste darauf geachtet werden, dass die abiotischen Parameter, insbesondere während der Versorgungsphasen, nicht von ihrem parasitenspezifischen Optimum abwichen.

Die Qualität der ausgereiften Gametozyten wurde mit Hilfe der Exflagellation der Mikrogameten untersucht. Diese Methode ist schnell und einfach durchzuführen, gibt allerdings ausschließlich Auskunft über die Qualität der männlichen Stadien. Es zeigte sich aber, dass sie als Grundlage für eine Bewertung der Fertilität der gesamten Gametozytencharge ausreicht. Exflagellieren die männlichen Gameten nicht in hinreichender Zahl, konnten in keinem Fall Oozysten im Mückendarm nachgewiesen werden. Damit *Anopheles*-Weibchen erfolgreich mit *P. falciparum* infiziert werden können, müssen durchschnittlich mindestens zwei Gameten pro Rasterfeld bei 60-facher Vergrößerung exflagellieren. Dieser Wert basiert dabei auf dem etablierten Verfahren, das an die individuellen Bedingungen des Labors angepasst ist. Ponnudurai (1989 a) gibt als Ergebnis seiner automatisierten Gametozytenkultivierung weitaus höhere Exflagellationsraten an. Anstelle des zur Verdünnung in Kapitel 3.2.4.11 angegebenen RPMI-Mediums, kann für die Exflagellationskontrolle auch FCS oder Humanserum verwendet werden. Im direkten Vergleich der drei konnte kein signifikanter Unterschied in den Exflagellationsraten der untersuchten Chargen festgestellt werden.

Asexuelle Entwicklungsstadien zeigten sich weitaus unempfindlicher gegenüber Temperatur unterhalb des Optimums von 37° C. Auch pH-Wert-Schwankungen, ausgelöst durch ein ungünstiges O₂/CO₂-Verhältnis der umgebenden Atmosphäre, beeinflussten die Vermehrungsrate nicht wesentlich. Dagegen führte eine unzureichende Nährstoffversorgung während der Zellteilungsphasen, in Verbindung mit einer zu hohen Konzentration an

Stoffwechselabbauprodukten binnen kurzer Zeit zum Tod der vegetativen Stadien. Im Gegensatz dazu zeigten Gametozyten mit fortschreitender Entwicklung, bedingt durch ihre geringere Stoffwechselaktivität, eine weitaus höhere Toleranz gegenüber ungünstigeren Konzentrationen an Nährstoffen und Abbauprodukten. Während der Gametozytenreifung müssen Temperaturen und pH-Werte konstant gehalten werden, da bereits geringe Schwankungen die Fertilität dieser Stadien negativ beeinflussen. Eine zuverlässige Qualitätsprüfung kann nur nach abgeschlossener Entwicklung der Gametozyten durch die Bestimmung der Exflagellationsrate erfolgen. Während ihrer Entwicklung war mit der angewandten mikroskopisch gestützten Begutachtung keine zuverlässige Qualitätsbewertung möglich.

Die Kultivierung der Gametozyten erfolgte in gasdichten Zellkulturflaschen. Mit dieser Methode konnte die notwendige Atmosphäre möglichst lange aufrechterhalten werden und diese nach dem Mediumswechsel durch Flutung mit der idealen Gaszusammensetzung direkt wieder hergestellt werden. Petrischalen erwiesen sich unter den vorhandenen Bedingungen zur Kultivierung qualitativ hochwertiger Gametozyten als gänzlich ungeeignet. Auch Zellkulturflaschen mit gasdurchlässigem Deckel zeigten nur dann eine gute Eignung, wenn atmosphärische Bedingungen im gasgesteuerten Inkubator konstant gehalten werden konnten. Häufiges Türöffnen, welches zusätzlich zu Abweichungen der eingestellten Gaskonzentration und zu Schwankungen der Temperatur führte, wirkte sich dabei ungünstig auf die Gametozytenentwicklung aus.

Mit den Gametozyten wurden 14 Tage nach Kultivierungsbeginn und erfolgreicher Qualitätsprüfung Mückenweibchen über eine Membran infiziert. Von der Entnahme der Gametozytenkultur aus dem Inkubator bis zum Befüllen der Infektionsapparatur durften nicht mehr als drei Minuten vergehen. Dabei war es essentiell, dass alle Medien die mit den Gametozyten in Kontakt kamen, auf 37° C angewärmt wurde. Dadurch konnten die durch sinkende Temperaturen ausgelösten vorzeitigen Exflagellationen weitestgehend verhindert werden.

Die abzentrifugierte Gametozytenkultur wurde je nach Niederschlag im Verhältnis 1:3 bis maximal 1:5 mit frisch gewonnenen Erythrozyten bei einem Hämatokrit von 60 verdünnt. Eine geringere Verdünnung der Parasiten führte zur Ablehnung durch die Mücken, die zwar anfliegen und durch die Membran stachen, aber nur unzureichend saugten. Eine Steigerung der Saugrate konnte auch nicht, wie bei Beuthner (1991) beschrieben, durch Zugabe von ATP erzielt werden. Eine höhere Verdünnung der Gametozytenkultur mit frischen Erythrozyten erhöhte zwar die Akzeptanz durch die Mücken, führte aber zu schlechten Infektionsraten.

Die Glasfütterglocken (s. Abbildung 28) haben die Aufgabe, die Parasiten während der Aufnahme durch die Mücken auf konstante 37° C zu erwärmen. In ihrer Konstruktion müssen sie wichtige Kriterien erfüllen. Damit die Mücken beim Anfliegen und Saugen sich nicht gegenseitig stören, muss die Membranfläche der Blutkammer möglichst groß sein. Das Blutkammervolumen muss gleichmäßig durchwärmt werden. Um einen vertikalen Temperaturgradient zu minimieren, muss die Distanz von dem Heizkörper zur Membran möglichst gering gehalten werden. Neben der Temperatur beeinflusst der pH-Wert in der Blutkammer den Infektionserfolg. Um einer schnellen Änderung des pH-Wertes entgegenzuwirken, muss die Grenzfläche der Blutkultur zur Luft so klein wie möglich gehalten werden. Im Vergleich der zur Verfügung stehenden Fütterglocken der Typen I und II war das letztgenannte Kriterium maßgebend für die Auswahl. Es zeigte sich, dass mit der nach Ponnudurai (1989a) gefertigten Fütterglocke vom Typ II unter den gegebenen Bedingungen eine höhere Infektionsrate zu erzielen ist.

Die Auswahl der verwendeten Membran, dem Parafilm[®], basierte auf einem Kompromiss. Es zeigte sich, dass der für die Blutfütterung zur Eiproduktion verwendete gereinigte Schweinedarm sich trotz seiner großen mückenspezifischen Attraktivität nicht als Membran für die Infektionsversuche eignete. Seine unbehandelte Oberfläche bietet unerwünschten Mikroorganismen ideale Wachstumsbedingungen. Diese werden mit der Gametozytenkultur aufgenommen und wirken sich negativ auf die Infektion des Mückenweibchens mit *P. falciparum* aus. Durch eine Desinfektion mit 70 prozentigem Ethanol wird die Keimzahl zwar reduziert, verändert aber auch die Struktur der natürlichen Membran und die Mücken benötigen zu lange, bis sie den Darm durchdringen um, die angebotenen Parasiten aufzunehmen. Der Vorteil des Parafilms[®] ist seine adhärente Eigenschaft durch die er dicht an der Glasfütterglocke anhaftet. Seine für Mücken geringe Eigenattraktivität wird durch die Wahl des richtigen Infektionscontainers kompensiert. Die Mücken werden bei der Verwendung des Parafilms[®] nicht olfaktorisch, sondern alleine durch die über die künstliche Membran abgestrahlte Wärme angelockt. Die Temperatur des Wasserkreislaufes wurde so gewählt, dass die Gametozytenkultur auf idealen 37° C (+/- 1° C) konstant gehalten wird. In diesem Temperaturbereich, zwischen 36 ° C und 38° C, konnten Cosgrove und Wood (1995) eine hohe Saugbereitschaft von *An. stephensi* beobachten. Grossman und Pappas (1991) zeigten, dass die Zeit, welche *Aedes aegypti* für einen Blutmahlzeit benötigt, abhängig ist von der Hauttemperatur. Beide Beobachtungen können durch die Ergebnisse der Versuche für *An. plumbeus*, *An. stephensi* sowie *An. albimanus* ergänzt bzw. bestätigt werden.

Mit Abschluss der aufwendigen Vorarbeiten, wurde neben einem erfolgreichen *in vitro*-Kultivierungsmodell für fertile *P. falciparum*-Gametozyten auch ein effizientes Membranfütterungssystem zur Infektion von Anophelinen mit dem Erreger der Malaria tropica etabliert.

In ersten Versuchsreihen konnten in Abhängigkeit der Testcharge zwischen 12% und 60 % der bereitgestellten *An. stephensi*-Weibchen mit *P. falciparum* infiziert werden, dabei lag die Infektionsrate bei durchschnittlich 31,5 %. Der im Vergleich mit Ponnudurai *et al.* (1989 a), die *An. stephensi* mit einer Rate über 90 % infizierten, geringere Infektionserfolg resultiert aus der Kultivierungsmethode der Parasiten. Ein sicherer Bewertungsmaßstab für die Qualität der Gametozytenkultur ist die Exflagellationsrate. Ebenso ist eine hohe Dichte an exflagellierenden Mikrogameten wiederum die Grundlage für eine erfolgreiche Infektion. So basiert in dieser Versuchsreihe die höchste Infektionsrate von 60,8 % auf einer durchschnittlichen Exflagellationsdichte von acht in zehn ausgezählten Rasterfeldern bei 60-facher Vergrößerung. In der Parasitencharge, die mit nur 12 % den geringste Anteil an Mücken infizierte, exflagellierten durchschnittlich pro Raster nur zwei Mikrogameten. Gametozyten, die mit der automatisierten Methode nach Ponnudurai *et al.* (1986) kultiviert wurden, erzielten nach eigenen Beobachtungen Exflagellationsraten > 15 pro Raster. Die Exflagellationsdichte wirkt sich dabei nicht nur auf die durchschnittliche Infektionsrate, sondern auch auf die Infektionsstärke der einzelnen Mücke aus. Am Beispiel der Oozysten Zahlen der Mitteldärme lässt sich das leicht darstellen. In der Charge mit einer Rate von acht Exflagellationen wurden pro Mitteldarm bis zu 42 Oozysten gezählt, in der Charge mit durchschnittlichen zwei Exflagellationen waren maximal fünf Oozysten entwickelt. Ponnudurai *et al.* (1989 a) gibt bei gleicher Verdünnung (1:3) der aus automatisiert kultivierten Gametozyten durchschnittlich 228 Oozysten pro Mitteldarm an.

In einer parallel angelegten Versuchsreihe mit zwei Wiederholungen wurden *An. albimanus* und *An. stephensi* jeweils mit Gametozyten aus der gleichen Charge infiziert. Nach 7 Tagen wurden bei 42,9 % der *An. stephensi*- und 4,5 % der *An. albimanus*-Weibchen Oozysten nachgewiesen. Die Individuen beider Arten saugten unmittelbar nach Exposition der Gametozytenkultur an dem angebotenen Blutmahl. Da es sich bei dem verwendeten *An. stephensi*-Stamm, im Gegensatz zu dem *An. albimanus*-Stamm, um einen *P. falciparum* sensiblen Stamm handelt, war dieser Unterschied, wenn auch nicht in so deutlicher Ausprägung, zu erwarten.

Für die Infektionsversuche mit *An. plumbeus* wurden Individuen aus baumhöhlenbrütenden Populationen sowie aus Grubenvorkommen vorbereitet. Die Infektion der Weibchen erfolgte

14 Tage nach deren Schlupf aus der Puppe. Von den insgesamt 130 Weibchen aus vier Chargen bzw. Herkunftsbereichen, wurden 7 Tage nach der Infektion 110 Individuen auf Oozysten untersucht. Im Gesamtdurchschnitt waren 17 % der seziierten Mitteldärme mit *P. falciparum* infiziert. Parallel dazu wurde als Kontrolle mit der gleichen Gametozytenkultur die Referenzart *An. stephensi* mit einem Erfolg von 29,8 % infiziert. In der Charge, bei der im Vorfeld in der Gametozytenkultur eine Exflagellationsrate von zwei ermittelt wurde, erfolgte bei *An. plumbeus* keine Infektion, auch bei *An. stephensi* fiel die Infektionsrate mit 11 % gering aus. Ergänzend kam hinzu, dass in dieser Charge nur 37 % der *An. plumbeus*-Weibchen saugten, damit lagen sie weit hinter der durchschnittlichen Saugrate von 81 % zurück. Bei *An. stephensi* lag die Rate der vollgesogenen Weibchen bei durchschnittlichen 63 %.

In der ersten Versuchsreihe zeigte sich, dass Individuen aus der Baumhöhlenpopulation infiziert werden konnten. Die verwendete Gametozytencharge wies dabei eine Exflagellationsrate von vier auf und bildete so eine geeignete Infektionsbasis. Nach sieben Tagen waren 16,7 % der seziierten Weibchen mit bis zu zwei Oozysten pro Mitteldarm infiziert. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam die Studie von Marchant *et al.* (1998), dort konnten drei von fünf Weibchen, nach der Infektion über eine Membran mit *P. falciparum*, Oozysten ausbilden. Die Gametozyten wurden hierbei mit dem von Ponnudurai *et al.* (1986) entwickelten automatisierten System kultiviert.

Nach einer Inkubationszeit von 14 Tagen bei 26° C wurden die Speicheldrüsen und Mitteldärme auf Parasiten untersucht. Dabei konnte erstmalig die Vollendung des Infektionszyklus von *P. falciparum* in *An. plumbeus* nachgewiesen werden. So trug eine von acht herauspräparierten Speicheldrüsen Sporoziten. Ihre Anzahl konnte dabei mindestens der Infektionskategorie "B" zugeordnet werden. Einem weiteres Weibchen, bei dem keine Speicheldrüsen sporoziten vorhanden waren, war mit fünf Oozysten infiziert. Da die Oozysten für diese zeitliche Entwicklungsphase nur unzureichend ausgebildet waren, kann davon ausgegangen werden, dass der Parasit nicht weiter entwickelt hätte. Die Kontrollinfektion von *An. stephensi* zeigte mit 37,5 % infizierter Mitteldärme und 43 % sporozitentragender Speicheldrüsen eine zu erwartende Infektionsrate. Ihre Speicheldrüsen waren dabei mit den Sporozitenzahlen der Kategorien "B" und "C" infiziert. Das Fehlen weiterer Oozysten am Tag 14 zeigt, dass alle Plasmodien ihre Entwicklung im Mitteldarm erfolgreich vollenden konnten und bewies damit die gute Adaption des Parasiten an diesen Vektor. Entsprechend kann die spärliche Infektion der *An. plumbeus*-Speicheldrüsen und das Vorhandensein

unvollständig entwickelter Oozysten als mangelnde Anpassung an die Mückenart gedeutet werden.

Da bewiesen wurde, dass die Mücken Baumhöhlen brütender *An. plumbeus*-Vorkommen eine Übertragungskompetenz für *P. falciparum* zeigten, wurden in weiterführenden Versuchen die Individuen grubenbrütender Populationen auf ihre Vektorkompetenz hin untersucht. Die sich in den anthropogen geschaffenen Brutplätzen und damit in unmittelbarer Nachbarschaft massenhaft vermehrende *An. plumbeus*-Mücke könnte ein größeres Risiko darstellen als die aus den individuenschwachen Baumhöhlenpopulationen.

Mit 20 % und 14 % infizierter Mitteldärme konnten 7 Tage nach der Infektion mit *P. falciparum* erstmalig Oozysten bei Weibchen aus Grubenvorkommen nachgewiesen werden. Die Infektionsrate der Kontrolle, also die von *An. stephensi*, war mit 38 % und 13 % durchaus mit der von *An. plumbeus* vergleichbar. Auch bei der Anzahl an Oozysten pro infiziertem Mitteldarm unterschieden sich beide Arten kaum von einander. Bemerkenswert war dabei die Ausprägung der Infektion einer *An. plumbeus*-Mücke, an deren Mitteldarm sich 41 Oozysten entwickelten. Aus dieser Infektionscharge wurden die Parasiten für weitere 7 Tage in beiden Mückenarten inkubiert. Analog zu den Infektionsergebnissen der Baumhöhlenvorkommen wurden auch bei Individuen der Grubenpopulationen Sporoziten in den Speicheldrüsen gefunden, die ihrer Anzahl nach mindestens der Infektionskategorie "C" zuzuordnen sind. Zusätzlich waren auch 14 Tage nach der Infektion nicht vollständig entwickelte Oozysten an den Mitteldärmen beider *Anopheles*-Arten präsent.

So konnte ergänzend zu den oben diskutierten Ergebnissen auch für grubenbrütende *An. plumbeus*-Vorkommen erstmalig, durch *in vitro*-Infektion über eine Membran, die vollständige Entwicklung von *P. falciparum* in der Mücke nachgewiesen werden.

Mit Hilfe des *P. berghei*-Nagermalaria-modells wurde die Effektivität der Membranfütterung im Vergleich mit der Parasitenaufnahme direkt am Zwischenwirt untersucht. Dabei konnte in vier Versuchsansätzen durch die *in vivo*-Infektion eine annähernd doppelt so hohe Zahl an *An. stephensi*-Weibchen infiziert werden als durch die *in vitro*-Membranmethode. Noch offensichtlicher zeigte sich der Unterschied im Vergleich der Oozystenzahlen pro Mitteldarm. Während in drei von vier Versuchsreihen der *in vivo*-Fütterung mehr als 20 Oozysten bis zu 89 Oozysten sich pro Mitteldarm entwickelten, konnten bei der *in vitro*-Methode einmalig 17 Oozysten in alle anderen infizierten Mücken maximal neun parasitäre Entwicklungsstadien gezählt werden.

Kombiniert man dieses Ergebnis mit den oben diskutierten Infektionen, ist unter definiert idealen Laborbedingungen die Kompetenz von *An. plumbeus* als Vektor für *P. falciparum*

weitaus höher einzustufen. Sie liegt aber auch bei diesem Vergleich hinter dem auf eine *P. falciparum*-Transmission selektionierten Vektor *An. stephensi* zurück.

Abschließend musste die Frage nach der Infektiosität der Speicheldrüsen Sporozoiten des *in vitro*-kultivierten *P. falciparum*-Stammes NF54 für den Menschen als Zwischenwirt gestellt werden. Hier konnte mit Hilfe von *in vitro*-Infektionsassays einwandfrei gezeigt werden, dass Sporozoiten in Hepatozyten der Zelllinie Huh7 invadieren und in diesen ihre Entwicklung fortsetzen. Diese Versuche wurden aus Gründen der Verfügbarkeit mit Sporozoiten aus *An. stephensi*-Speicheldrüsen durchgeführt. Da der seit 1979 in Kultur gehaltene *P. falciparum*-Stamm NF54 in *An. stephensi* prinzipiell infektiöse Speicheldrüsen Sporozoiten hervorbringt, ist davon auszugehen, dass auch die in den Speicheldrüsen anderer Anophelinen entwickelten Sporozoiten auf die gleiche Weise infektiös sind.

4 Zusammenfassende Diskussion

Im ersten Teil der Arbeit wurde das erfolgreiche Ausbreiten von *An. plumbeus* vor dem Hintergrund der Besiedelung neuer, anthropogener Brutstätten, unter Berücksichtigung artspezifischer bionomischer Besonderheiten, untersucht. Ferner konnte unter definierten Laborbedingungen die Vektorkompetenz von *An. plumbeus* für den *in vitro*-kultivierten *P. falciparum* Stamm NF54 nachgewiesen werden. Abschließend muss die Frage der Vektorkapazität von *An. plumbeus*, also die Übertragungswahrscheinlichkeit des Parasiten unter Berücksichtigung der Vektorbionomie, erörtert werden.

Die in Deutschland öffentlich kontrovers kommentierte Klimaentwicklung der letzten Jahre resultierte aus den immer extremeren ausgeprägten Wetterlagen. Lokale Starkregenereignisse, in denen die durchschnittliche Monatsniederschlagsmenge in wenigen Tagen abregnete, wurden von anhaltenden Trockenperioden mit überdurchschnittlich warmen Temperaturen abgelöst. Die damit einhergehenden hydrologischen Verhältnisse spiegelten sich auch qualitativ und quantitativ in der lokalen Zusammensetzung der Stechmückenpopulationen wieder. Diese extrem schwankenden Grundwasserstände beeinträchtigten zusätzlich die bereits durch andere Umwelteinflüsse geschädigten Baumbestände. Infolge der geltenden Sicherheitsbestimmungen mussten die zumeist alten, mit Dendrothelemen bestückten Bäume gefällt werden. Ein Verschwinden geeigneter Baumhöhlen als Brutstätten schwächt in diesen Gebieten das von Natur aus geringe *An. plumbeus*-Vorkommen.

Die unterirdischen Brutstätten stellen ein enormes Besiedlungspotential dar. So waren gerade 10 % der insgesamt 256 überprüften Gruben mit *An. plumbeus* besiedelt. Hat die Mücke diese Brutstätte erstmal zur Reproduktion erschlossen, kann sie sich unter den idealen Bedingungen rasend und meist unbemerkt vermehren. Gesundheitliche Risiken gehen dabei eher vom Mückenspeichel aus, der nach dem Stich zu starker Schwellung und Juckreiz führt. Das ausgelöste Kratzen begünstigt durch Verletzung der Oberhaut Sekundärinfektionen, die lokal die Haut stärker schädigen als der Stich selbst. Eine *An. plumbeus*-Plage kann nach erfolgreicher Ursachenforschung, also dem Entdecken des Larvenhabitates, durch ein einfaches Abdichten der Brutstätte schnell und effektiv beseitigt werden.

Eine starke *An. plumbeus*-Population in der Nähe des Menschen wäre eher als Vektor human pathogener Malariaerreger geeignet, als ein spärliches Vorkommen im Wald. Eine epidemiologische Bedeutung kommt der Mücke derzeit nicht zu. Auch wenn die Vollendung des Entwicklungszykluses von *P. falciparum* in seinem Endwirt, der *An. plumbeus*-Mücke,

unter idealen Laborbedingungen nachgewiesen werden konnte, also *Anophels plumbeus* als Vektor kompetent ist, muss die Vektorkapazität als sehr niedrig eingestuft werden. Die fehlende Anpassung des Parasiten an seinen vermeintlichen Vektor stellt dabei das größte Hindernis dar. Insbesondere kann der Ursprung des *An. plumbeus*-Vorkommens aufgrund der spezifischen Ansprüche an ihr Brutbiotop leicht gefunden werden und geeignete Maßnahmen zur Bestandsregulierung einleiten werden. Eine epidemiologische Bedeutung kommt der Mücke daher nicht zu, da immer nur isolierte Massenvorkommen kartiert wurden.

Auch ein weiterer Anstieg der Jahresdurchschnittstemperaturen, wie dies in den letzten Dekaden der Fall war (Luterbach *et al.*, 2004), bildet nicht die Voraussetzung für die erneute Ausbreitung der humanpathogenen Malaria in Deutschland. Wie Reiter (2000) anschaulich zusammenfasst, war die Malaria während der so genannten "kleinen Eiszeit", der kältesten Periode Europas in den vergangenen 2000 Jahren, auch in England für Krankheit und Tod verantwortlich. Der Rückgang der Malaria begann zu Zeiten, in denen die Temperatur bereits wieder anstieg. Die Reduktion der als Hauptvektoren geltenden Arten des *An. maculipennis*-Komplexes war ein wesentlicher Grund für die Ausrottung der Malaria in Deutschland. *An. plumbeus* könnte nur dann als Malariaüberträger in Frage kommen, wenn bedingt durch die Transmission der Hauptvektoren bereits eine hohe Erregerdichte in der Bevölkerung etabliert ist.

5 Literatur

- Abraham E., Jacobs-Lorena M. (2004) Mosquito midgut barriers to malaria parasite development. *Insect Biochem Mol Biol.* **34**: 667-671.
- Armbruster P., et al. (2000) Equivalent inbreeding depression under laboratory and field conditions in a tree-hole-breeding mosquito. *Proc R Soc Lond.* **267**: 1939-1945.
- Aslamkhan M, Laven H. (1970) Inheritance of autogeny in the *Culex pipiens* complex. *Pakistan J Zool.* **2** (2): 121-147.
- Aslamkhan M., Laven H. (1970) Inheritance of autogeny in *Culex pipiens* complex. *Pakistan J Zool.* **2** (2): 121-147.
- Ballou R., et al. (2004) Update on the clinical development of candidate malaria vaccines. *Am J Trop Med Hyg.* **71**: 239-247.
- Becker N. (1989) Life strategies of mosquitoes as an adaptation to their habitats. *Bull Soc Vector Ecol.* **14** (1): 6-25.
- Becker N., et al. (2003) Mosquitoes and their control. *Kluwer Academic/ Plenum Publishers. New York.*
- Becker N., Ludwig H. W. (1983) Mosquito control in West Germany. *Bull Soc Vector Ecol.* **8** (2): 85-93.
- Becker N., Margalit J. (1993) Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquitoes and blackflies. In: Entwistle P. F., Cory J. S., Bailey M.J. und Higgs S. (Hersg.). *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice 147-170.
- Becker N., Rettich F. (1994) Protocol for the introduction of new *Bacillus thuringiensis israelensis* products into the routine mosquito control program in Germany. *J Am Mosq Control Assoc.* **10** (4): 527-533.
- Benzon G., Apperson C. (1987) An electrically heated membrane blood-feeding device for mosquito colony maintenance. *J Am Mosq Control Assoc.* **3** (2): 322-324.
- Beuthner D. (1991) Untersuchungen von Faktoren, die den Infektionsverlauf von Malariaerregern in Culiciden beeinflussen. *Dissertation Universität Bonn.*
- Billker O., et al. (1998) Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature.* **392**: 289-292.
- Blacklock B. (1921) Notes on a case of indigenous infection with *P. falciparum*. *Ann Trop Med and Parasit.* **X-XIV**:59-72.
- Blacklock B., Carter H. (1920a) Further experiments with *Anopheles plumbeus*, Stephens ; its infection with *P. falciparum* in England; also notes on the apparatus and technique employed. *Ann Trop Med and Parasit.* **IX**: 275-283.

- Blacklock B., Carter H. (1920b) The experimental infection in England of *Anopheles plumbeus*, Stephens and *Anopheles bifurcatus*, L. with *Plasmodium vivax*. *Ann Trop Med and Parasit.* **XIII**: 413-420.
- Blacklock B., Carter H. (1920c) Observations on *Anopheles (Coelodiazesis) plumbeus*, Stephens with special references to its breeding-places. *Ann Trop Med and Parasit.* 421-453.
- Briegel H. (1990) Fecundity, metabolism, and body size in *Anopheles* (Diptera: Culicidae), vectors of malaria. *J Med Entomol.* **27 (5)**: 839-850.
- Briegel H., Hörlner E. (1993) Multiple blood meals as a reproductive strategy in *Anopheles* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* **30 (6)**: 975-985.
- Bruce M., et al. (1990) Commitment of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* to sexual and asexual development. *Parasitology.* **100**: 191-200.
- Carter R., Miller L (1979) Evidence for environmental modulation of gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum* in continuous culture. *Bull o WHO.* **57 (1)**: 37-52.
- Christophers S. (1916) An Indian tree-hole breeding *Anopheles*, *A. bariensis*, James A. (*Coelodiazesis plumbeus* Haliday. *Ind Journ Med Res.* **3**: 489-496.
- Ciba Foundation Symposium 200 (1996) Olfaction in mosquito-host interactions. *John Wiley & Sons.*
- Clements A. (1992) The biology of mosquitoes. Chapman & Hall/ London.
- Cosgrove J., et al. (1994) Convenient mosquito membrane feeding system. *J Am Mosq Control Assoc.* **10 (3)**: 434-436.
- Cosgrove J., Wood R. (1995) Probing and gorging of three mosquito species to a membrane feeding system at a range of temperatures. *J Am Mosq Control Assoc.* **11 (3)**: 339-342.
- Dearsly A., et al. (1990) Sexual development in malaria parasites: gametocyte production, fertility and infectivity to the mosquito vector. *Parasitology.* **100**: 359-368.
- Dobson M. (1994) Malaria in England: a geographical and historical perspective. *Parassitologia.* **36**: 35-60.
- Edwards, F. (1912) Notes on the british mosquitoes (Culicinae). *The Entomologist.* **45**: 193-194.
- Feldmann A., Ponnunurai T. (1989) Selection on *Anopheles stephensi* for refractoriness and susceptibility to *Plasmodium falciparum*. *Med V Entomol.* **3**: 41-52.
- Frevert U. (1994) Malaria sporozoite-hepatocyte interactions. *Exp Parasitol.* **79**: 206-210.
- Frevert U. (2004) Sneaking in through the back entrance: the biology of malaria liver stages. *Trends Parasitol.* **20(9)**: 417-424.
- Frevert U., Nardin E. (2005) Arrest in the liver-a genetically defined malaria vaccine? *N Engl J Med.* **352 (15)**: 1600-1602.

- Frevert U., *et al.* (1996) Cell surface glycosaminoglycans are not obligatory for *Plasmodium berghei* sporozoite invasion *in vitro*. *Mol Biochem Parasitol.* **76**:257-266.
- Ghosh A., *et al.* (2000) The journey of the malaria parasite in the mosquito: hopes for the new century. *Parasitol Today.* **16 (5)**: 196-201.
- Golenda C., *et al.* (1990) The distribution of circumsporozoite protein (CS) in *Anopheles stephensi* mosquitoes infected with *Plasmodium falciparum* malaria. *The Journal of histochemistry and cytochemistry.* **58(4)**: 475-481.
- Golenda C., *et al.* (1992) Immunoenzymatic labelling of multiple plasmodial salivary gland sporozoites in a single test. *Am J Trop Med Hyg.* **46(3)**: 314-319.
- Grossman G., Pappas L. (1991) Human skin temperature and mosquito (Diptera: Culicidae) blood feeding rate. *J Med Entomol.* **28 (3)**: 456-460.
- Hagen H., Grunewald J. (1990) Routine blood-feeding of *Aedes aegypti* via a new membrane. *J Am Mosq Control Assoc.* **6**: 535-536.
- Hassler D. (2001) Brennpunkt Infektiologie: Geschichten aus der faszinierenden Welt der Mikroben. Zett-Verlag, Steinen.
- Henn W., *et al.* (1998) The amino acid composition of *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) infected with *Nosema algerae* (Microsporida: Nosematidae). *J. Invertebr. Pathol.* **71**: 42-47.
- Hollingdale M.R., Leland P., Schwartz A.L. (1983) *In vitro* cultivation of the exoerythrocytic stage of *Plasmodium berghei* in a hepatoma cell line. *Am J Trop Med Hyg.* **32**:682-684.
- Hörlner E., Briegel H. (1995) Proteolytic enzymes of female *Anopheles*: Biphasic synthesis, regulation and multiple feeding. *Arch Insect Biochem Physiol.* **28**: 189–205.
- Hormann H. (1949) Malaria in Deutschland 1945-1947. *Zschr Tropenmed.* **1**: 32-91.
- Horsfall William R. (1955) Mosquitoes. Constable and Company Limited, London.
- Ifediba T., Vanderberg J. (1981) Complete *in vitro* maturation of *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Nature.* **294**: 364-366.
- Ijumba J., Lindsay S. (2001) Impact of irrigation on malaria in Africa: paddies paradox. *Med Vet Entomol.* **15**:1-11.
- Inselburg J. (1983) Gametocyte formation by the progeny of single *Plasmodium falciparum* schizonts. *J Parasitol.* **69(3)**: 584-591.
- Jain S. *et al.* (2005) Nosocomial malaria and saline flush. *Emerging Infectious Diseases.* **11 (7)**: 1097-1099.
- Jelinek T., *et al.* (2002) Imported *Falciparum* malaria in Europe: sentinel surveillance data from the european network on surveillance of imported infection diseases. *CID.* **34**: 572-576.
- Jetten T., Takken W. (1994) Anophelism without malaria in Europe. *Wageningen Agricultural University Papers.* **94(5)**.

- Jones J. (1979) Die Ernährungsweise der Moskitos. *Spektrum*. **1**: 26-32.
- Kappe S. H, Kaiser K, Matuschewski K. (2003) The *Plasmodium* sporozoite journey: a rite of passage. *Trends Parasitol*. **19(3)**:135-43.
- Karch S. (1995) Breeding of *Anopheles plumbeus* in Tires in France. *Journal of Vector Ecology*. **21 (2)**: 201.
- Kaufmann C., Briegel H. (2004) Flight performance of the malaria vectors *Anopheles gambiae* and *Anopheles atroparvus*. *Vector Ecol*. **29 (1)**: 140-153.
- Kettle D. (1995) Medical and veterinary entomology. *CAB International*.
- Klowden M., Briegel H. (1994) Mosquito gonotrophic cycle and multiple feeding potential: contrasts between *Anopheles* and *Aedes* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. **31 (4)**: 618-622.
- Koghan P. (1990) Substitute blood meal for investigating and maintaining *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. **27 (4)**: 709-712.
- Kommunale Aktionsgemeinschaft zur Bekämpfung der Schnakenplage (KABS). (1996) Biologische Stechmückenbekämpfung am Oberrhein.
- Krüger *et al.* (2001) Two cases of autochthonous *Plasmodium falciparum* malaria in Germany with evidenc for local transmission by indigenous *Anopheles plumbeus*. *Trop Med int H*. **6 (12)**: 983-985.
- Kuhn R. (1998) An affordable and handy "membrane mouse" (MM). *Acta Parasitológica Portuguesa*. **5 (1)**: 15.
- Lal A., *et al.* (1989) Ribosomal RNA-based diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria. *Mol Biochem Parasitol*. **36**: 67-72.
- Lehane M. (1991) Biology of blood-sucking insects. Harper Collins Academic, London.
- Lindl T. (2000) Zell-und Gewebekultur. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Lombardi S., *et al.* (1987) Detection abd anatomical localization of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein and sporozoites in the afrotropical malaria. *Am J Trop Med Hyg*. **37(3)**: 491-494.
- Lounibos L., *et al.* (1998) Egg maturation in neotropical malaria vectors: one bloodmeal is usually enough. *Journal of Vector Ecology*. **23 (2)**: 195-201.
- Luterbacher J., *et al.* (2004) European seasonal and annual temperature variability, trends and extremes since 1500. *Science*. **303**: 1499-1503.
- Marchant P., *et al.* (1998) Could British mosquitoes transmit falciparum malaria? *Parasitology Today*. **14 (9)**: 344-345.
- Martini E. (1920) *Anopheles* in Niedersachsen und die Malariagefahr. *Hyg Rundschau*. **20**.
- Martini E. (1952) Lehrbuch der medizinischen Entomologie. Verlag Gustav Fischer/ Jena.

- Meis J. F., *et al.* (1983) Malaria parasites-discovery of the early liver form. *Nature*. **302**:424-426.
- Mitchell C., Briegel H. (1989) Fate of the blood meal in force-fed diapausing *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* **26** (4): 332.
- Mitchell C., Briegel H. (1989) Inability of diapausing *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) to use blood for producing lipid reserves for overwinter survivals. *J Med Entomol.* **26** (4): 318-326.
- Mohrig W. (1969) Die Culiciden Deutschlands. *Parasitologische Schriftreihe*. 18: 260 pp.
- Mühlens P. (1916) Über Malariagefahren und die Verhütung durch Chininprophylaxe und Chininbehandlung. *Münch med Wochenschr.* **63**.
- Mühlens P. (1919) Verhütung und Bekämpfung der Malaria in der Heimat und im Felde. *Dtsch med Wochenschr.* **45**.
- Neidl F. (1950) Mosquito control in the British sector of Berlin-Summer 1949. *J Roy Army Med Corps.* **95** 222-229.
- Novak M., *et al.* (1991) Comparison of four membranes for artificially bloodfeeding mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc.* **7** (2): 409-411.
- Olzscha R. (1943) Mitteilungen über das Vorkommen von *Anopheles maculipennis* im Warthegau, mit Angabe einer einfachen Methode der Blutfütterung von Mücken bei ihrer Haltung in Einzelhaft. *Cent f Bakt Parasi u Infektionskr.* **1** (150): 215-217.
- Ponnudurai T., *et al.* (1982) The production of mature gametocytes of *Plasmodium falciparum* in continuous cultures of different isolates infective to mosquitoes. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **76**(2): 242-250.
- Ponnudurai T., *et al.* (1982a) Cultivation of fertile *Plasmodium falciparum* gametocytes in semiautomated systems. 1. Static cultures. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **76**(6): 812-818.
- Ponnudurai T., *et al.* (1986) Synchronisation of *Plasmodium falciparum* gametocytes using an automated suspension culture system. *Parasitology.* **93**: 263-274.
- Ponnudurai T., *et al.* (1989 a) Infectivity of cultures *Plasmodium falciparum* gametocytes to mosquitoes. *Parasitology.* **98**: 165-173.
- Ponnudurai T., *et al.* (1989 b) Sporozoite load of mosquitoes infected with *Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **83**: 67-70.
- Pradel G., *et al.* (2004) A multidomain adhesion protein family expressed in *Plasmodium falciparum* is essential for transmission of the mosquito. *J Exp Med.* **199**(11): 1533-1544.
- Priest F. (1992) Biological control of mosquitoes and other biting flies by *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis*. *J Appl Bacteriol.* **72**: 357-369.
- Ramasamy M., *et al.* (1997) Interactions of human malaria parasites, *Plasmodium vivax* and *P. falciparum*, with the midgut of Anopheles mosquitoes. *Med V Entomol.* **11**: 290-296.

- Ramsdale C., Coluzzi M. (1975) Studies on the infectivity of tropical strains of *Plasmodium falciparum* to some southern European vectors of malaria. *Parassitologia*. **12**: 39-48.
- Reiter P. (2000) From Shakespeare to Defoe: malaria in England in the little ice age. *Emerging Infectious Diseases*. **6 (1)**: 1-11.
- Renia L., et al. (1988) Malaria sporozoite penetration. A new approach by double staining. *J Immunol Methods*. **112**:201-205.
- Robert Koch Institut (2003) Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2002.
- Robert Koch Institut (2005) Zur Situation bei wichtigen Infektionskrankheiten in Deutschland: Reiseassoziierte infektionsbedingte Erkrankungen im Jahr 2004. *Epidemiologisches Bulletin*. **35**: 317-321.
- Robertson J. L., Preisler H. K. (1992) Pesticide Bioassays with Arthropods.
- Rosenberg R., et al. (1990) An estimation of the number of malaria sporozoites ejected by a feeding mosquito. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. **84**:209-212.
- Samish M., et al. (1995) Factors affecting membrane feeding of *Anopheles stephensi*. *J Am Mosq Control Assoc*. **11 (4)**: 408-415.
- Savage K., et al. (1980) Mass rearing of *Anopheles albimanus*. *Mosquito News*. **40 (2)**: 185-190.
- Schaffner F et al. (2001) The mosquitoes of Europe. *IRD Édition*.
- Schriefer M., et al. (1991) Detection of polymerase chain reaction-Amplified Malaria in infected blood and individual mosquitoes. *Exp Parasitol*. **73**: 311-316.
- Schuberg A. (1927) Das gegenwärtige und frühere Vorkommen der Malaria und die Verbreitung der Anophelesmücke im Gebiet des deutschen Reiches. *Arb Reichsgesd.amt Berlin*. **59**: 1-427.
- Shahabuddin M., et al. (1995) *Plasmodium gallinaceum*: Mosquito peritrophic matrix and the parasite-vector compatibility. *Exp Parasitol*. **81**: 386-393.
- Shute P. (1940) Failure to infect english specimens of *Anopheles maculipennis* var. *atroparvus* with certain strains of *Plasmodium falciparum* of tropical origin. *J Trop Med Hyg*. **43 (13)**: 175-178.
- Shute P., Maryon M (1974) Malaria in England past, present and future. *R S H*. **1**: 23-29.
- Sinden R. (1987) Progress in in-vitro culture of the malaria life cycle. *Parasitol Today*. **3**: 292.
- Sinden R., Billingsley P. (2001) Plasmodium invasion of mosquito cells: hawk or dove? *Trends Parasitol*. **17(5)**: 209-211.
- Sinden R., Croll N. (1975) Cytology and kinetics of microgametogenesis and fertilization in *Plasmodium yoelii nigeriensis*. *Parasitology*. **70**: 53-65.

- Snounou G., *et al.* (1993) Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol.* **58**: 283-292.
- Stark K., James A. (1996) Salivary gland anticoagulants in culicine and anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* **33 (4)**: 645-650.
- Storch V., Welsch K. (1994) Kurzes Lehrbuch der Zoologie. *Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York.*
- Tadei W., *et al.* (1998) Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* **59(2)**: 325-335.
- Tadei W., Thatcher B. (2000) Malaria vectors in the Brazilian Amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus*. *Rev Inst Med Trop S Paulo.* **42(2)**: 87-94.
- Timmermann S., Briegel H. (1993) Water depth and larval density affect development and accumulation of reserves in laboratory populations of mosquitoes. *Bull Soc Vector Ecol.* **18**: 174-187.
- Vanderberg J. P. (1977) *Plasmodium berghei*: quantitation of sporozoites injected by mosquitoes feeding on a rodent host. *Exp Parasitol.* **42**:169-181.
- Vaughan J., Azad A. (1993) Patterns of erythrocyte digestion by bloodsucking insects: constraints on vector competence. **30 (1)**: 214-216.
- Vaughan J., *et al.* (1991) Concentration of human erythrocytes by anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae) during feeding. *J Med Entomol.* **28 (6)**: 780-786.
- Vavra J., Undeen A. (1970) *Nosema algerae* n.sp. (Cnidospora, Microsporida) a pathogen in a laboratory colony of *Anopheles stephensi* Liston (Diptera, Culicidae). *J. Protozool.* **17**, 149-240.
- Vogel R. (1940) Zur Kenntnis der Stechmücken (Culicinae) Württembergs. III. Teil. *Jh Ver vaterl Naturkd Württ.* **96**: 97-116.
- Warrell D., Gilles H. (2002) Essential Malariology. *Arnold, London, New York, New Delhi.*
- Wernsdorfer H., McGregor I. (1988) Malaria, principles and practice of malariology. Churchill Livingstone; Edinburgh, London, Melbourne und New York.
- Weyer F. (1937) Das Verhalten von *Anopheles maculipennis* im Winter. *Verh Dtsch Zool Ges.* **1937**: 99-106.
- Weyer F. (1956) Bemerkung zum Erlöschen der ostfriesischen Malaria und zu *Anopheles*-Lage in Deutschland. *Z Tropmed Parasitol.* **7**: 219-228.
- WHO (1975) Manual on practical entomology in malaria. Part II; methods and techniques.
- WHO (1982) Data sheet on the biological control agent *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 (de Barajac 1978).
- WHO (1992) Vector resistance to pesticides. Fifteenth Report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control.

WHO (1993) A global strategy for malaria control.

WHO (2005) World malaria report 2005.

WHO. (1996) Report of the WHO Informal consultation on the evaluation and testing of insecticides.

Wilkerson R., Strickmann D. (1990) Illustrated key to the female anopheline mosquitoes of Central America and Mexico. *J Am Mosq Control Assoc.* **6(1)**: 7-33.

Wirtz R., Burkot T. (1991) Detection of malaria parasites in mosquitoes. 77-106. in: Advances in Disease Vector Research. Volume 8. *Springer-Verlag New York*.

Wirtz R., Rutledge L. (1980) Reconstituted collagen sausage casings for the blood feeding of mosquitoes. *Mosquito News.* **40 (2)**: 287-290.

Yates M. (1979) The biology of the tree-hole breeding mosquito *Aedes geniculatus* (Oliver) (Diptera: Culicidae) in southern England. *Bull ent Res.* **69**: 611-628.

Yoeli M. (1938) Note on the experimental infection on *Anopheles elutus* with *Plasmodium falciparum* by feeding through a prepared animal membrane. *Riv di Malariologia.***14**: 62-66.

Zavala F., *et al.* (1982) Monoclonal antibodies to circumsporozoite proteins identify the species of malaria parasite in infected mosquitoes. *Nature.* **299**: 737-738.

6 Anhang

6.1 Materialliste

6.1.1 Laborausstattung

Analytische Waage	Sartorius GmbH, Göttingen BL510
Brutschränke:	
Hera Cell	Heraeus Instruments, Hanau
Memmert	
Computer-Hardware	
PC	diverse Hersteller
Computer-Software	
Adobe Photoshop®	Adobe Systems Inc, USA
MS Word 2003	Microsoft Corporation, CA, USA
MS Excel 2003	Microsoft Corporation, CA, USA
Paint Shop Pro 7	Jasc Software, USA
Drucker	
HP Deskjet 895Cxi	Hewlett-Packard, USA
HP Laserjet 4100	Hewlett-Packard, USA
Eismaschine AF30	Scotsman
Elektrophoreseapparaturen	GibcoBRL
	Hofer, HE33
Exhaustor	Eigenproduktion
Feinwaage	Sartorius GmbH, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 100M	Zeiss, Jena
Gefrierschränke	Liebherr
Gefrierschrank -80°C	Sanyo
Heizplatte nach Kuhn	Dr. Kuhn, Uni. Mainz
Heizblock	Alpha Laboratories, DB1010
Konfokales Laserscanning Mikroskop LSM 510	Zeiss, Jena
Kamera Mikroskopfotografie	Canon Digital

Kühlschränke	Liebherr
Kühlzentrifuge	Heraeus sepatech, Hanau
Lichtmikroskop Axiolab	Zeiss, Jena
Magnetheizrührer	Heidolph, MR 3001
Mikrowelle	Philips cooktronic M716
Moskito-Käfige	BioQuip Products Inc, USA
Netzgerät Power Supply	Amersham Pharmacia Biotech, Electrophoresis Power Supply, EPS301, Stuart
pH-Meter	Inolab
Pipetman Gilson P10,P20,P200,P1000	Abimed, Langenfeld
Pipettierhilfe Pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Sterile Werkbank: Herasafe	Heraeus Instruments, Hanau
Stickstofftank	CBS, USA
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415 R, Eppendorf
Vortex-Genie	Scientific Industries
Wasserbad Julabo 7A	Julabo
Zählkammer: Neubauer	Labotec, Labor-Technik, Göttingen
Zentrifuge J2-MC	Beckman
Zentrifuge RC5Bplus	Sorvall
Zentrifuge Megafuge	Heraeus Instruments, Hanau
Glasfeeder Typ I	Eigenbau
Glasfeeder Typ II	Eigenbau
Wasserstrahlpumpe	
Wasserpumpe	Eheim

6.1.2 Verbrauchsmaterialien

Cellstar Top Flaschen, 250ml	Greiner
Chamberslides	LabTek

Blutentnahmeröhrchen NH ₄	Sarstedt
Pappbecher 0,25 l	Pappstar
Plastikbecher 0,2 l	Aro
Mercuchrom 2%	Krewel GmbH
Mückengaze	Tesa
Atuoklavierband	Neo Lab, Heidelberg
Brekkis Katzenfutter	Whiskas
Micromin	Tetramin
Kollagen Kunstdarm	Naturin, Weinheim
Schweinedarm	FVZ Mannheim
Schraubdeckelröhrchen 15 und 50 ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Deckgläschen	Knittel
Einmalröhrchen, Polystyren-6,0/38mm	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Einmalröhrchen, Polypropylen-12/75mm	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Faltenfilter	Schleicher und Schuell, Einbeck
Frischhaltefolie Saran	Roth, Karlsruhe
Handschuhe	VZM, Heidelberg
Immersionsöl	Zeiss, Jena
Kanülen	BD Microlance, Becton Dickinson
Kryogefäße	NALGENE®
Objektträger	Menzel
8-well	Medco
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging
Pasteurpipetten	WU Mainz
Petrischalen	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen, gestopft	Greiner Labortechnik, Nütringen
Rundfilter 40 ml	Roth, Karlsruhe
Serologische Pipetten (1,2,5,10 und 25 ml)	Corning Incorporation, Bodenheim
Sterilfilter (0,2 µm, 0,4 µm)	Millipore®
Sterilfiltrationseinheiten	NALGENE®
Spritzen	BD Diskardit, Becton Dickinson
Wattepads	Diverse Hersteller
Whatman™ 3MM paper	Firma Whatman Paper Company

6.1.3 Chemikalien

Soweit nicht näher bezeichnet wurden Chemikalien von den Firmen Roth, Merck, Sigma, Serva und AppliChem über die Chemikalienausgabe des Theoretikums der medizinischen Fakultät Heidelberg bezogen.

ATP	Roth, Karlsruhe
BSA (Bovine Serum Albumin)	Roth, Karlsruhe
Bti-IPS 82	Institut Pasteur
Diethylether	Riedel-de Haen
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DMEM-Medium	GibcoBRL, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
EDTA	Roth, Karlsruhe
FCS, zertifiziert (USA)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
FCS (Fötale Kälberserum)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Gentamycin	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Giemsa (0,4%,w/v)	BDH Laboratory Supplies
Glass beads	Sigma, Taufkirchen
D-(+) Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Heparin-Natrium 25000i.E.	Braun
Hepes	Merck, Darmstadt
Hypoxanthin 10 %ige Lösung	c.c.pro, Neustadt
Hypoxanthin Kristallin	Roth, Karlsruhe
Ketamin (10%)	VFW
Natriumbicarbonat	c.c.pro, Neustadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	JT Baker,Niederlande
Natriumhydroxid	JT Baker, Niederlande
PBS	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
PBS-Tabletten	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Pyrimethamin	Sigma, Taufkirchen
RPMI 1640-Medium, flüssig	GibcoBRL, Karlsruhe

RPMI 1640-Medium, pulver	GibcoBRL, Karlsruhe
Saponin	Sigma, Taufkirchen
SDS (Sodium Dodecyl Sulfat)	Merck, Darmstadt
Staurosporin	Sigma, Taufkirchen
Tetracyclin	Sigma, Taufkirchen
Xylazinhydrochlorid (2% Xylazin)	Rompun [®] , Bayer

6.1.4 Lösungen

Ampicillin Stock	100 mg/ml Ampicillin in ddH ₂ O
Tetracyclin Stock	5 mg/ml Tetracyclin in 70 % Ethanol
Chloramphenicol Stock	30 mg/ml Chloramphenicol in ddH ₂ O
Kanamycin Stock	50 mg/ml Kanamycin in ddH ₂ O
100 x Round-Up	60mg Penicillin, 100mg Kanamycin, 50mg Fluo- cytosin, 10mg Chlor- amphenicol, sterilfiltriert

6.1.5 Antikörper

Maus-anti-CSP (<i>P.falciparum</i>)	Nussenzweig RS, New York
Ziege-anti-Maus-Alexa Fluor 488	Molecular Probes, NL
Ziege-anti-Maus-Alexa Fluor 546	Molecular Probes, NL

6.2 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad–Celsius, Maßeinheit der Temperatur
α	Anti, gegen
μ	Mikro-; Vorsatzzeichen, das den Faktor 10^{-6} angibt
♂♂	Männchen
♀♀	Weibchen
²	Quadratzahl
Abb.	Abbildung
<i>An albimanus</i>	<i>Anopheles albimanus</i>
<i>An. algeriensis</i>	<i>Anopheles algeriensis</i>
<i>An. atroparvus</i>	<i>Anopheles atroparvus</i>
<i>An. claviger</i>	<i>Anopheles claviger</i>
<i>An. gambiae</i>	<i>Anopheles gambiae</i>
<i>An. maculipennis</i>	<i>Anopheles maculipennis</i>
<i>An. messeae</i>	<i>Anopheles messeae</i>
<i>An. plumbeus</i>	<i>Anopheles plumbeus</i>
<i>An. stephensi</i>	<i>Anopheles stephensi</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserum-Albumin
Bti	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> (Serotyp H-14)
CO ₂	Kohlendioxid
CSP-Protein	Circumsporoziten-Oberflächenprotein
<i>Cx. pipiens</i>	<i>Culex pipiens</i>
d	Tag.
Da	Dalton
dm	Dezimeter
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EEF	Exo-erythrozytäre-Form
FCS	Fötale Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
Gy	Gray, Einheit der Energiedosis

h	Stunde
Huh7	Humanen Hepatoma Zelllinie 7
IPS 82	Institut Pasteur Strain 82, Standard der die Aktivität gemessen in ITU von <i>Bacillus thuringiensis var. israelensis</i> (Serotyp H-14) gegenüber <i>Aedes aegypti</i> mit 15.000 Einheit vorgibt
ITU	International Toxical Units, Einheit welche die Aktivität eines Bti-Präparates angibt
k	Kilo-, Vorsatzzeichen, das den Faktor 10^3 angibt
LC	Letale Konzentration
LC 50	Konzentration eines Wirkstoffes, bei der 50% der Versuchsorganismen sterben
LD	Letale Dosis
M	Molar
m	Milli-; Vorsatzzeichen, das den Faktor 10^{-3} angibt
m	Meter
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
n	Anzahl der verwendeten Organismen
N ₂	Stickstoff
n	Nano-; Vorsatzzeichen, das den Faktor 10^{-9} angibt
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
NMRI	Naval Medical Research Institute
O ₂	Sauerstoff
<i>Oc. geniculatus</i>	<i>Ochlerotatus geniculatus</i>
<i>P. berghei</i>	<i>Plasmodium berghei</i>
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PBS	Phosphate buffered saline
pH	Potentia hydrogenii, Maßzahl für die in Lösungen enthaltene Konzentration an Wasserstoffionen bzw. Hydroniumionen

ppm	Parts per million, Bezeichnung zur Angabe des Anteils einer Substanz in 1.000.000 Teilen der Gesamtsubstanz
rpm	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
<i>s. l.</i>	<i>sensu lato</i> , im weiteren Sinne; benannt ist hier ein Artkomplex
<i>s. str.</i>	<i>sensu stricto</i> , im engeren Sinne; benannt ist hier eine Art
SD	Standardabweichung
<i>spec.</i>	Spécies, Art
T	Zeitpunkt.
Tab.	Tabelle
ÜN	über Nacht
var.	Variation
WT	Wildtyp

6.3 Log-Probit Bti-Berechnungsprotokolle

6.3.1 Mortalität nach 24 h

AN PLUMB.24H

01/2005

Bacillus thuringiensis serotyp H14/ IPS 82

N	Killed	Total	Dose
1	24	180	0.00800
2	52	180	0.01000
3	56	180	0.02000
4	79	180	0.03000
5	67	180	0.04000
6	99	180	0.05000
7	126	180	0.07500
8	152	180	0.10000

6.3.2 Mortalität nach 48 h

AN PLUMB.48H

01/2005

Bacillus thuringiensis serotyp H14/ IPS 82

N	Killed	Total	Dose
1	57	180	0.00800
2	93	180	0.01000
3	105	180	0.02000
4	116	180	0.03000
5	120	180	0.04000
6	148	180	0.05000
7	168	180	0.07500
8	173	180	0.10000

6.3.3 Log-Probit Analyse nach 24 h

Name of the file: AN PLUMB.24H
 01/2005
 Bacillus thuringiensis serotyp H14/ IPS 82

n	Dose	Mort. corr (%)	probit	Total treated	Killed	Killed expected	CHI2 contribution
1	0.0080	11.6	3.813562	180	24	27.46	0.5671
2	0.0100	27.5	4.405891	180	52	33.96	12.6647
3	0.0200	29.7	4.472317	180	56	60.42	0.4979
4	0.0300	42.8	4.820916	180	79	79.28	0.0018
5	0.0400	36.0	4.644476	180	67	93.35	15.4309
6	0.0500	54.1	5.104993	180	99	104.24	0.6223
7	0.0750	69.4	5.508539	180	126	123.10	0.2142
8	0.1000	84.1	6.001219	180	152	135.15	8.3203

Mortality in the control: 0 %

CHI2= 38.31924 df= 6
 Prob= .9999992

LC	Level of Confidence	Range
1 = 0.00138	.95	0.00035 < LC < 0.00523
2 = 0.00204	.95	0.00061 < LC < 0.00664
3 = 0.00261	.95	0.00086 < LC < 0.00772
4 = 0.00315	.95	0.00112 < LC < 0.00866
5 = 0.00366	.95	0.00138 < LC < 0.00951
10 = 0.00616	.95	0.00285 < LC < 0.01316
20 = 0.01159	.95	0.00671 < LC < 0.01984
30 = 0.01827	.95	0.01213 < LC < 0.02737
40 = 0.02695	.95	0.01929 < LC < 0.03757
50 = 0.03873	.95	0.02798 < LC < 0.05366
60 = 0.05566	.95	0.03811 < LC < 0.08162
70 = 0.08210	.95	0.05070 < LC < 0.13391
80 = 0.12942	.95	0.06878 < LC < 0.24622
90 = 0.24330	.95	0.10267 < LC < 0.58600
95 = 0.40972	.95	0.14167 < LC < 1.20947
96 = 0.47688	.95	0.15546 < LC < 1.49491
97 = 0.57470	.95	0.17421 < LC < 1.94040
98 = 0.73646	.95	0.20258 < LC < 2.74590
99 = 1.08866	.95	0.25669 < LC < 4.75042

Regression line: $Y = A + \text{Slope} * (X - M)$

A= 4.902547 +/- 3.605791E-02 4.866489 < A < 4.938605
 Slope= 1.605947 +/- .2675967 1.33835 < B < 1.873544
 M= 8.527354

Variance of the LC50= 5.201343E-04

6.3.4 Log-Probit Analyse nach 48 h

Name of the file: AN PLUMB.48H
 01/2005
 Bacillus thuringiensis serotyp H14/ IPS 82

n	Dose	Mort. corr (%)	probit	Total treated	Killed	Killed expected	CHI2 contribution
1	0.0080	24.0	4.308593	180	57	62.41	0.8182
2	0.0100	46.3	4.914046	180	93	72.33	10.6504
3	0.0200	53.7	5.098609	180	105	106.69	0.0644
4	0.0300	60.5	5.270898	180	116	126.42	2.7234
5	0.0400	63.0	5.335373	180	120	138.95	10.5434
6	0.0500	80.2	5.853905	180	148	147.49	0.0090
7	0.0750	92.6	6.449044	180	168	160.00	3.2856
8	0.1000	95.7	6.717352	180	173	166.52	3.0555

Mortality in the control: 9.444444 %
 Estimation of the natural mortality: 10 %
 Number of iterations: 3

CHI2= 31.14992 df= 6
 Prob= .9999759

LC	Level of Confidence	Range
1 = 0.00089	.95	0.00024 < LC < 0.00314
2 = 0.00126	.95	0.00039 < LC < 0.00394
3 = 0.00157	.95	0.00053 < LC < 0.00455
4 = 0.00185	.95	0.00066 < LC < 0.00507
5 = 0.00212	.95	0.00079 < LC < 0.00555
10 = 0.00336	.95	0.00147 < LC < 0.00754
20 = 0.00589	.95	0.00311 < LC < 0.01099
30 = 0.00882	.95	0.00529 < LC < 0.01455
40 = 0.01246	.95	0.00825 < LC < 0.01868
50 = 0.01719	.95	0.01226 < LC < 0.02399
60 = 0.02372	.95	0.01769 < LC < 0.03174
70 = 0.03349	.95	0.02499 < LC < 0.04495
80 = 0.05016	.95	0.03525 < LC < 0.07178
90 = 0.08783	.95	0.05341 < LC < 0.14603
95 = 0.13949	.95	0.07359 < LC < 0.26853
96 = 0.15960	.95	0.08063 < LC < 0.32128
97 = 0.18835	.95	0.09014 < LC < 0.40084
98 = 0.23472	.95	0.10444 < LC < 0.53847
99 = 0.33206	.95	0.13146 < LC < 0.85896

Regression line: $Y = A + \text{Slope} * (X - M)$

A= 5.382028 +/- 4.022724E-02 5.3418 < A < 5.422255
 Slope= 1.809442 +/- .265712 1.54373 < B < 2.075154
 M= 8.446428

Variance of the LC50= 6.794065E-04