

Untersuchung zur Culicidenfauna in
Deutschland mit besonderer
Berücksichtigung des *Culex*
pipiens-Komplexes und der Vektorkompetenz
für Nematoden und Protozoen

Dissertation

2013

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

vorgelegt von:
Christina Czajka
aus Ludwigsburg
Tag der mündlichen Prüfung:

Untersuchung zur Culicidenfauna in Deutschland mit besonderer Berücksichtigung des *Culex pipiens*-Komplexes und der Vektorkompetenz für Nematoden und Protozoen

Gutachter:

PD. Dr. Norbert Becker

Prof. Dr. med. Egbert Tannich

Danksagung

Ohne die Hilfe zahlreicher Personen wäre die vorliegende Arbeit nicht oder nur sehr schwer durchführbar gewesen, weshalb ich mich an dieser Stelle bei all jenen bedanken möchte, die mich während dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Zunächst möchte ich mich recht herzlich bei Professor Norbert Becker bedanken, der mich als Doktorandin angenommen und mir stets mit Rat und Tat beiseite gestanden hat. Ohne diese Unterstützung wäre die Arbeit vermutlich nicht zustande gekommen.

Weiter gilt mein Dank Professor Egbert Tannich, der mich immer wieder in seiner Abteilung für Molekulare Parasitologie am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg aufgenommen hat und der stets ein offenes Ohr für meine Fragen hatte. Ohne diese Zusammenarbeit wären die zahlreichen molekularen Analysen nicht möglich gewesen.

Auch möchte ich mich bei den Privatdozenten Dr. Dr. Jonas Schmidt-Chanasit, Dr. Andreas Krüger und Dr. Sven Poppert sowie Herrn Artur Jöst für die Hilfe während meiner Arbeit bedanken.

Ebenso gilt mein Dank Professor Dr. Volker Storch, der mir bei der Ideenformung für meine Arbeit geholfen hat.

Ganz besonders möchte ich mich bei Heidrun von Thien bedanken, denn ohne ihre erstklassige Unterstützung und engelsgleiche Geduld wäre ich das eine oder andere Mal sicherlich verzweifelt.

Ich danke Dr. Hanna Jöst für die gemeinsame Zeit beim Mücken-Fangen, viele schöne Gespräche und Anregungen und natürlich (der Dank geht auch an ihre Eltern bzw. ihren Bruder) für die Bereitstellung der Autos.

Bei Katrin Huber und Rooschi Foroutan möchte ich mich für drei lustige Jahre und unvergessliche Konferenzen bedanken.

Auch möchte ich mich bei meinen Kolleginnen aus Hamburg bedanken: Elena Helk, Anna Bachmann, Helena Dobbek und Hanna Bernin für guten Kaffee und schöne Pausen. Außerdem bei Jenny Matthiesen für die außerordentlich herzliche Aufnahme in Labor 4.

Natürlich geht mein Dank auch an meine Familie, die den Fortschritt meiner Arbeit und die daraus resultierende Launen am Telefon oder „live“ geduldig miterlebt hat.

Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei meinem Freund Michael Raggan für die Unterstützung, Geduld und das Verständnis, welche er in den letzten drei Jahren aufgebracht hat, bedanken.

Abstract

The present study was performed aiming to investigate a large number and a wide variety of mosquitoes from various regions of Germany for the presence of defined groups of parasites. Accordingly, during three successive years between 2010 and 2012, more than 140.000 mosquitoes, trapped at various sites in Germany, were characterized and analysed. The selected trapping sites, most of them located in southwest and northeast Germany, are known for their abundant occurrence of mosquitoes, such as the floodplains of the river Isar. In addition, some of them represent important stepping stones for migrating birds, such as the Lake Chiemsee or the Lake Constance.

The mosquitoes were characterized on the basis of morphological criteria. The results indicated, that the main autochthonous species generally present in Germany were trapped, in particular abundant species such as *Aedes vexans* and *Culex pipiens* s. l.. As morphological criteria do not allow the discrimination of members of the *Culex pipiens* complex or between females of *Culex pipiens* and *Culex torrentium*, a multiplex real-time PCR was developed for the rapid genetic differentiation of the various *Culex* species and biotypes. Using this method, hybrids of *Cx. pipiens pipiens* biotype *pipiens* and biotype *molestus* were detected in Germany for the first time. These hybrids are known as important bridge vectors for the transmission of West Nile virus from birds to humans.

To facilitate the detection of parasites in such a large number of mosquito samples within a reasonable period of time, further multiplex real-time PCR assays were developed to allow analyses of respective microbial DNAs by high-throughput screening. The results indicated that a considerable number of German mosquitoes are carrying filariae. In this context, a new filarial species was detected, occurring primarily in southern Germany. The reservoir of this new filarial species is probably birds, as it was detected mainly in ornithophilic mosquitoes. Studies on *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* as well as *Onchocerca lupi*, three zoonotic filarial species endemic in southern Europe and pathogenic for humans, revealed the detection of a focus of stable transmission of *D. repens* in the federal state of Brandenburg. This filarial species was detected in several mosquito catches from 2011 and 2012, along the Oder Valley in the vicinity of the town of Eberswalde.

As there were reports on cases of avian malaria in the zoo of Heidelberg in 2010 screening of mosquitoes was extended for the presence of Haemosporidia, such as *Haemoproteus* sp., *Leukocytozoon* sp. or *Plasmodium* sp.. A multiplex real-time PCR was developed able to detect nematodes as well as blood protozoans. Depending on the catchment area, more than 70 % of the mosquitoes were positive for at least one of the two groups of parasites.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte eine möglichst große Zahl und ein breites Spektrum an Stechmücken aus verschiedenen Regionen Deutschlands auf ihre Vektorkompetenz für ausgewählte Parasiten untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden in drei aufeinanderfolgenden Jahren zwischen 2010 und 2012 mehr als 140.000 Stechmücken an verschiedenen Standorten Deutschlands gefangen und typisiert

Die gewählten Fallenstandorte, vornehmlich in Südwest- und Nordostdeutschland gelegen, sind alle für ihr hohes Stechmückenaufkommen bekannt, wie zum Beispiel die Isarauen. Manche dienen zusätzlich als wichtige Zwischenstationen für Zugvögel, wie etwa der Chiemsee oder der Bodensee.

Die Typisierung der Mücken erfolgte auf der Grundlage morphologischer Kriterien. Die Ergebnisse zeigten, dass die Fänge die wichtigsten in Deutschland heimischen Stechmückenarten repräsentierten, insbesondere abundante Spezies wie *Aedes vexans* und *Culex pipiens* s. l.. Wegen fehlender morphologischer Unterscheidungsmerkmale innerhalb des *Culex pipiens*-Komplexes sowie zwischen weiblichen *Culex pipiens* und *Culex torrentium* wurde eine differentielle Multiplex Real-time PCR entwickelt zur schnellen genetischen Differenzierung der verschiedenen *Culex*-Arten und Biotypen. Mit dieser Methode konnten erstmals in Deutschland Hybride der Biotypen *Cx. pipiens pipiens* und *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* nachgewiesen werden, die als sogenannten Brückenvektoren für die Übertragung des West-Nil-Virus zwischen Vögeln und dem Menschen bekannt sind.

Um die große Zahl an Stechmücken in angemessener Zeit auf Parasiten untersuchen zu können, wurden weitere Multiplex Real-time PCR-Assays entwickelt, die eine Analyse entsprechender mikrobieller Nukleinsäuren im Hochdurchsatzverfahren ermöglichten. Die Untersuchungen ergaben, dass ein großer Teil der Stechmücken in Deutschland Träger von Filarien sind. In diesem Zusammenhang wurde eine neue, bisher nicht bekannte Filarienart vornehmlich in Süddeutschland nachgewiesen. Als Reservoir dienen vermutlich Vögel, da diese neue Filarienart vor allem in ornithophilen Stechmückenspezies gefunden wurde.

Untersuchungen auf *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* und *Onchocerca lupi*, drei zoonotische Filarienarten mit humanpathogener Bedeutung, die in Südeuropa endemisch sind, ergaben den überraschenden Befund eines Fokus mit stabiler Übertragung von *D. repens* in Brandenburg. Diese auch als Hundehautwurm bekannte Filarienspezies wurde wiederholt in mehreren Stechmückenfängen aus den Jahren 2011 und 2012 entlang der Oder in der Gegend um Eberswalde nachgewiesen.

Nachdem im Jahre 2010 Fälle von Vogel malaria aus dem Heidelberger Zoo bekannt geworden waren, wurden die Stechmückenuntersuchungen auf Haemosporidien wie *Haemoproteus* sp., *Leukocytozoon* sp. und *Plasmodium* sp. ausgeweitet. Auch hierzu wurde eine Multiplex Real-time PCR entwickelt, mit der sowohl Nematoden als auch Blutprotozoen detektiert werden können. Abhängig vom Fallenstandort wurden zum Teil bei über 70 % der Stechmückenfänge mindestens eine der beiden taxonomischen Gruppen Parasiten nachgewiesen.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	16
1. Ziel der Arbeit	17
2. Biologie und Ökologie von Stechmücken	18
2.1. Systematische Einordnung	18
2.2. Lebensweise	18
2.3. Habitate	19
2.3.1. Bruchwälder	19
2.3.2. Auwälder	20
2.3.3. Weitere-Standorte	21
2.4. Überblick über die wichtigsten Stechmückenarten	22
2.4.1. <i>Aedes (Aedimorphus) vexans</i> (MEIGEN, 1830)	22
2.4.2. <i>Ochlerotatus sticticus</i> (MEIGEN, 1838)	23
2.4.3. <i>Anopheles maculipennis</i> s. l.	23
2.4.4. Der <i>Culex pipiens</i> -Komplex	24
2.4.4.1. <i>Culex pipiens pipiens</i> (LINNAEUS 1758)	25
2.4.4.2. <i>Culex pipiens pipiens</i> biotyp <i>molestus</i> (FORSKAL 1775)	26
2.4.4.3. <i>Cx. p. pipiens</i> x <i>Cx. p. pipiens</i> biotyp <i>molestus</i>	26
2.4.4.4. <i>Culex torrentium</i> (MARTINI, 1925)	27
2.4.5. <i>Culiseta annulata</i> (SCHRANK, 1776)	27
3. Nematoden	29
3.1. Filarien / Nematoden in Europa	29
3.1.1. <i>Dirofilaria immitis</i> (LEIDY 1856) und <i>Dirofilaria repens</i> (RAILLIET & HENRY 1911) (Spirurida, Onchocercidae)	29
3.1.2. <i>Onchocerca lupi</i> (Spirurida, Onchocercidae)	31
3.1.3. <i>Setaria tundra</i>	31
4. Vogel malaria	32
II. Material und Methoden	35
5. Fallenarten	36
5.1. EVS-Traps	36
5.2. Gravid-Traps	37

5.3. BG-Sentinel-Traps	37
6. Vorstellung der Standorte	39
6.1. EVS-Standorte	39
6.1.1. Baden-Württemberg	39
6.1.1.1. Insel Rott, Knielinger See und Russheimer Altrhein	39
6.1.1.2. Waghäusel (Wagbachniederung)	40
6.1.1.3. Bodensee	40
6.1.2. Bayern	41
6.1.2.1. Chiemsee	41
6.1.2.2. Isar	42
6.1.2.3. Osterseen	42
6.1.3. Brandenburg - Oder	43
6.1.4. Mecklenburg-Vorpommern	43
6.1.4.1. Greifswald	43
6.1.4.2. Loissin	44
6.1.5. Rheinland-Pfalz	44
6.1.5.1. Alsheim	44
6.1.5.2. Haßloch	44
6.1.6. Hessen	45
6.1.6.1. Kühkopf	45
6.1.6.2. Strüth	45
6.1.7. Sachsen-Anhalt	45
6.1.7.1. Drömling	45
6.1.7.2. Elbe	45
6.2. Gravid-Trap-Standorte	46
6.2.1. Hauptstandorte	46
6.2.2. Weitere Standorte	47
6.3. BG-Trap-Standorte	47
7. Vorbereitung der Proben	49
7.1. Bestimmung der Stechmücken	49
7.2. Homogenisierung der Stechmücken	49
7.3. Extraktion der Nucleinsäuren	50
7.4. TOPO-Klonierung mit anschließender MiniPräp	50
7.4.1. TOPO-Klonierung	51
7.4.2. MiniPräp	52
8. PCRs	53
8.1. Grundlegendes zur PCR	53
8.1.1. Primer-Design	54
8.1.2. Agarose-Gelelektrophorese	55
8.1.3. Real-time quantitative PCR	55
8.1.3.1. Sondendesign	57

8.1.4. Multiplex-PCR	57
8.1.5. Nested-PCR	58
III. Ergebnisse	59
9. Ergebnisse der Fänge	60
9.1. EVS-Standorte	63
9.1.1. Baden-Württemberg	65
9.1.1.1. Bodensee	65
9.1.1.2. Karlsruhe	65
9.1.1.3. Waghäusel	67
9.1.2. Bayern	68
9.1.2.1. Chiemsee	68
9.1.2.2. Isar	68
9.1.2.3. Osterseen	69
9.1.3. Brandenburg - Oder	70
9.1.4. Hessen	70
9.1.4.1. Kühkopf	70
9.1.4.2. Strüth	71
9.1.5. Mecklenburg-Vorpommern	71
9.1.5.1. Greifswald	71
9.1.5.2. Loissin	72
9.1.6. Rheinland-Pfalz	73
9.1.6.1. Alsheim	73
9.1.6.2. Haßloch	73
9.1.7. Sachsen-Anhalt	74
9.1.7.1. Drömling	74
9.1.7.2. Elbe	74
9.2. GT-Standorte	75
9.2.1. Hauptstandorte	75
9.2.1.1. Heidelberg	75
9.2.1.2. Großsachsen	75
9.2.1.3. Weinheim	76
9.2.2. Weitere Standorte	77
9.3. BG-Standorte	77
10. Taxonomische Multiplex Real-time PCR zur Unterscheidung der Arten des <i>Cx. pipiens</i>-Komplexes	79
10.1. Etablierung der taxonomischen Multiplex Real-time PCR	79
10.2. Ergebnisse der taxonomischen Real-time PCR	81
11. Nematoden-Screening	85
11.1. 12s mitochondriale Real-time PCR zum Nachweis von Filarien	85
11.1.1. Ergebnisse der 12s Mito Real-time PCR zum Nachweis von Filarien	87

Inhaltsverzeichnis

11.1.2. Folge-PCRs für die Sequenzierung auf Filarien positiver Proben - Aufbau und Einstellung	88
11.1.3. Ergebnisse der Pan-Filarien Gel-PCRs	90
11.1.4. Sequenzierung der in den Pan-Filarien Gel-PCRs positiven Proben	90
11.2. Nachweis von <i>Setaria tundra</i> und einer Filarie mit einer bislang unbekanntem Sequenz	90
12. Vogel malaria-Screening	92
12.1. Aufbau und Durchführung auf Haemosporidien-DNA sensitiver Nested-PCRs	92
12.1.1. Ergebnisse der Nested-PCRs	94
13. Multiplex Real-time PCR FilaHaem	95
13.1. Etablierung der Multiplex Real-time PCR FilaHaem	95
13.2. Ergebnisse der Multiplex Real-time PCR FilaHaem	98
13.2.1. Ergebnisse des Screenings auf die 12s Mito Sequenz	99
13.2.2. Ergebnisse des Screenings auf die 18s Haem Sequenz	100
13.2.3. Ergebnisse des Screenings auf die Cytb Haem Sequenz	101
14. Multiplex Real-time PCR LuplmmRep	106
14.1. Etablierung der Multiplex Real-time PCR LuplmmRep	106
14.2. Ergebnisse der LuplmmRep	110
14.2.1. Untersuchungen zum Nachweis von <i>Dirofilaria repens</i>	111
IV. Diskussion	115
15. Ergebnisse der Fänge	116
16. Taxonomische Multiplex Real-time PCR zur Unterscheidung der Arten des <i>Cx. pipi-</i> <i>ens</i>-Komplexes	119
17. Multiplex Real-time PCR FilaHaem	123
17.1. Nematoden-Screening	123
17.1.1. Nachweis von <i>Setaria tundra</i>	124
17.1.2. Nachweis einer Filarien-Art mit einer bislang unbekanntem Sequenz	125
17.1.3. Vogel malaria-Screening	126
18. Multiplex Real-time PCR LuplmmRep	130
18.1. Nachweis von <i>D. repens</i>	131
19. Zusammenfassung und Ausblick	134
V. Anhang	146

Abbildungsverzeichnis

2.1. Gliederung einer Aue am Beispiel des Rheines (nach [Becker et al., 2010, S. 12]) . . .	20
3.1. Lebenszyklen von <i>Dirofilaria immitis</i> und <i>D. repens</i> (Quelle: [Simon et al., 2012]) . .	30
4.1. Inkaseschwalbe (<i>Larosterna inca</i>) (Quelle: [Haase, 2007])	32
4.2. Brillenpinguin (<i>Spheniscus demersus</i>) (Quelle: [tin tin, 2007])	33
4.3. Übersicht über den Lebenszyklus der Vogel malaria-Erreger am Beispiel von <i>Plasmodium spp.</i> . Links: Darstellung der sexuellen Reproduktion in der Stechmücke, rechts: asexuelle Vermehrung im Endwirt (aus [Huijben et al., 2007])	34
5.1. EVS-Trap.	36
5.2. Gravid-Trap.	37
5.3. BG-Sentinel-Trap.	38
6.1. Standort Waghäusel (Bild aus [Google Inc., 2003])	40
6.2. Die Standorte am Bodensee (Bild aus [Google Inc., 2003])	41
6.3. Standorte am Chiemsee (Bild aus [Google Inc., 2003])	42
6.4. Standort Plattling (Isar)	43
6.5. Standorte an der Oder (Bild aus [Google Inc., 2003])	43
6.6. Standort Loissin	44
6.7. Standort Elbe (Bild aus [Google Inc., 2003])	45
6.8. Die Fallenstandorte am Zoo (Bild aus [Google Inc., 2003])	46
7.1. map Topo-Vektor (Quelle: [Inv, 2012])	51
9.1. Geographische Verteilung der zwischen 2010 und 2012 gesammelten Stechmückenpools	61
9.2. Artverteilung 2010. Insgesamt wurden 68605 Stechmückenweibchen gefangen.	62
9.3. Artverteilung 2011. Es wurden insgesamt 49881 Stechmückenweibchen gefangen . . .	62
9.4. Artverteilung 2012. Insgesamt wurden 24666 Stechmückenweibchen gefangen	63
9.5. Anzahl der am Bodensee gefangenen Individuen 2010-2012	65
9.6. Überblick über die auf der Insel Rott gefangenen Individuen (2010-2012)	66
9.7. Überblick über die am Russheimer Altrhein gefangenen Individuen (2010-2012)	66
9.8. Überblick über die in Waghäusel gefangenen Individuen (2010-2012)	67
9.9. Überblick über die am Chiemsee gefangenen Individuen (2010-2012)	68
9.10. Überblick über die an der Isar gefangenen Individuen (2010-2012)	69
9.11. Anzahl der an den Osterseen gefangenen Individuen (2010-2012)	70
9.12. Überblick über die an der Oder gefangenen Individuen (2011+2012)	70
9.13. Überblick über die am Kühkopf gefangenen Stechmücken (2011+2012)	71

Abbildungsverzeichnis

9.14. Anzahl der in Greifswald gefangenen Individuen (2011+2012)	72
9.15. Anzahl der in Loissin gefangenen Individuen (2011+2012)	72
9.16. Überblick über die in Alsheim gefangenen Stechmücken (2010-2012)	73
9.17. Überblick über die in Haßloch gefangenen Stechmücken (2010+2011)	74
9.18. Überblick über die an der Elbe gefangenen Individuen (2010-2012)	74
9.19. Überblick über die in Heidelberg gefangenen Individuen (2011+2012)	75
9.20. Überblick über die in Großsachsen gefangenen Individuen (2010-2012)	76
9.21. Überblick über die in Weinheim gefangenen Individuen (2010-2012)	76
9.22. Anzahl der an den weiteren Standorten gefangenen Individuen (2012, insgesamt 3739 Individuen)	77
9.23. Anzahl der mit den BG-Traps gefangenen Individuen (2012, insgesamt 1306 Individuen)	77
10.1. Spezifität und Sensitivität der taxonomischen Real-time PCR (aus [Rudolf et al., 2013])	82
10.2. Verteilung aller untersuchten <i>Culex</i> -Pools (aus [Rudolf et al., 2013])	84
11.1. Verdünnungsreihe zur Ermittlung der einzusetzenden Konzentration der Positivkontrolle	87
11.2. Inhibitionskontrolle	87
11.3. Ergebnisse der 12s Mito Real-time PCR für Großsachsen und Weinheim (2010)	88
11.4. Chromatogramm des <i>S. tundra</i> positiven Pools 1259	91
12.1. Agarosegel der Einstellung der Positivkontrolle der Hepatocystis Cytochrom b-PCR	94
12.2. Agarosegel der Inhibitionskontrolle der Hepatocystis-Gel Cytochrom b-PCR. Links: Outer-PCR, rechts: Inner-PCR. Gel-Belegung: 1: P1, 2: P1+pos, 3: P2, 4: P2+pos, 5: P3, 6: P3+pos, 7: Negativkontrolle, 8: Positivkontrolle	94
13.1. Primerspezifität der FilaHaem Real-time PCR	97
13.2. Artverteilung der auf die 12s Mito Sequenz positiven Pools (2011+2012)	99
13.3. Deutschlandweite Verteilung der auf die 12s Mito Sequenz positiven Pools (2011+2012)	100
13.4. Artverteilung der auf die 18s Haem-Sequenz positiven Pools (2011+2012)	100
13.5. Artverteilung der auf die Cytb Haem Sequenz positiven Pools (2011+2012)	101
14.1. Alignment eines Abschnittes des COI-Gens der Arten <i>D. immitis</i> , <i>D. repens</i> und <i>O. lupi</i>	107
14.2. Spezifität der LuplmmRep-Primer	109
14.3. Überprüfung der Primersensitivität	110
14.4. <i>D. repens</i> positive Pools in der LuplmmRep-PCR	111
14.6. Auszug aus dem Alignment der nachgewiesenen <i>D. repens</i> -Sequenzen	113
14.5. Agarosegel der nematodenspezifischen PCR (M: 100 kb DNA-Ladder, 1: 3450, 2: 3508, 3: 5473, 4: 5745, 5: 5746, 6: <i>D. immitis</i> , 7: <i>D. repens</i> , 8: <i>O. lupi</i> , 9: <i>H₂O</i>	113
14.7. Fundorte von <i>Dirofilaria repens</i>	114
17.1. Phylogenetische Einordnung der gefundenen Sequenzen, basierend auf Teilen der 12s rDNA Sequenzen	125
17.3. Vergleich der Cytochrom b-positiven Pools im Zoo Heidelberg 2011+2012	127
17.2. Alignment einiger exemplarisch gewählter Sequenzen unbekanntem filarialem Ursprungs mit <i>O. suzukii</i>	129

Abbildungsverzeichnis

19.1. Anzahl der auf der Insel Rott gefangenen Individuen (2010-2012)	147
19.2. Anzahl der am Russheimer Altrhein gefangenen Individuen (2010-2012)	147
19.3. Anzahl der in Waghäusel gefangenen Individuen (2010-2012)	147
19.4. Anzahl der am Chiemsee gefangenen Individuen (2010-2012)	148
19.5. Anzahl der an der Isar gefangenen Individuen (2010-2012)	148
19.6. Anzahl der an der Oder gefangenen Individuen (2011+2012)	148
19.7. Anzahl der in Alsheim gefangenen Individuen (2010-2012)	149
19.8. Anzahl der in Haßloch gefangenen Individuen (2010+2011)	149
19.9. Anzahl der am Kühkopf gefangenen Individuen (2011+2012)	149
19.10 Anzahl der an der Elbe gefangenen Individuen (2010-2012)	150
19.11 Anzahl der in Heidelberg gefangenen Individuen (2011+2012)	150
19.12 Anzahl der in Großsachsen gefangenen Individuen (2010-2012)	150
19.13 Anzahl der in Weinheim gefangenen Individuen (2010-2012)	151

Tabellenverzeichnis

6.1. Übersicht über die untersuchten Fallenstandorte	48
8.1. Übersicht über die bei den PCRs eingesetzten Farbstoffe (R=Reporter, Q=Quencher, P=Passiver Referenzfarbstoff, A=Anregungs-, E=Emissionswellenlänge [nm], qr=quenching range)	58
9.1. Übersicht über Art und Anzahl der gefangenen Stechmücken	60
9.2. Übersicht über die in 2010, 2011 und 2012 gefangenen Stechmücken	64
10.1. Übersicht über die in der taxonomischen PCR verwendeten Oligonucleotide	80
10.2. Pipettierschema der taxonomischen Real-time PCR	81
10.3. Temperaturprofil der taxonomischen Real-time PCR	81
10.4. Ergebnisse der taxonomischen PCR	82
11.1. Eigenschaften der Oligonucleotidsequenzen der 12s mito Real-time PCR	85
11.2. Pipettierschema der 12s mito Real-time PCR. Beispiel für einen Ansatz mit 10 Proben. (V/R = Volumen pro Reaktion, V_{ges} =Gesamtvolumen, V_{pip} = zu pipettierendes Volumen)	86
11.3. Temperaturprofil der 12s mito Real-time PCR	86
11.4. Primersequenzen der Pan-Filarien Gel-PCRs	88
11.5. Pipettierschema für den Mastermix der Pan-Filarien Gel-PCRs, Beispiel für zehn Proben	89
11.6. Temperaturprofil der Pan-Filarien Gel-PCRs	89
12.1. Primersequenzen der Haemosporidien PCRs, GC-Gehalt, T_m und Amplifikatlänge nach Protokoll	93
12.2. Pipettierschema der Outer-PCRs, Beispiel für 10 Proben	93
12.3. Temperaturprofile der Nested-PCRs	93
13.1. Primer- und Sondensequenzen der Multiplex Real-time PCR FilaHaem, T_m nach Herstellerangabe (MWG), Amp.= Länge des Amplifikates	96
13.2. C_t -Werte der Positiv- und Inhibitionskontrollen	97
13.3. In der FilaHaem-PCR eingesetzte Oligonucleotidkonzentrationen	98
13.4. Temperaturprofil der FilaHaem-PCR	98
13.5. Pipettierschema der FilaHaem-PCR, Beispiel für 10 Reaktionen	99
13.6. Übersicht über die Ergebnisse der FilaHaem nach Standort (2011+2012). Dargestellt sind alle in der entsprechenden Kategorie pro Jahr positiven Pools (nu = Standort nicht untersucht)	102
13.7. Anzahl der auf die 12s Mito Sequenz positiven Pools (2011+2012)	103

Tabellenverzeichnis

13.8. Anzahl der auf die 18s Haem Sequenz positive Pools (2011+2012)	104
13.9. Anzahl der auf die Cytb Haem Sequenz positiven Pools (2011+2012)	105
14.1. Primersequenzen der Multiplex Real-time PCR LuplmmRep	106
14.2. Konzentrationen von Primer und Sonden der LuplmmRep	108
14.3. Pipettierschema der Multiplex Real-time PCR LuplmmRep	108
14.4. Temperaturprofil der LuplmmRep-PCR	108
14.5. Überprüfung der Primerspezifität	109
14.6. Nematoden-Primer, die zur Vorbereitung der Sequenzierung verwendet wurden	111
14.7. Pipettierschema der nematodenspezifischen Gel-PCR	112
14.8. Temperaturprofil der nematodenspezifischen Gel-PCR	112
19.1. Gesamtüberblick über die Arten, deren Häufigkeit und Infektion der zwischen 2010 und 2012 gefangenen Stechmücken - Teil 1	152
19.2. Gesamtüberblick über die Arten, deren Häufigkeit und Infektion der zwischen 2010 und 2012 gefangenen Stechmücken - Teil 2	153
19.3. Übersicht über die in 2010 gefangenen Stechmücken - Auflistung nach Standort . . .	154
19.4. Übersicht über die in 2011 gefangenen Stechmücken - Auflistung nach Standort . . .	155
19.5. Übersicht über die in 2012 gefangenen Stechmücken - Auflistung nach Standort (Teil 1)	156
19.6. Übersicht über die in 2012 gefangenen Stechmücken - Auflistung nach Standort (Teil 2)	157
19.7. Übersicht über die in 2012 gefangenen Stechmücken - Auflistung nach Standort (Teil 3)	158

Teil I.

Einleitung

1. Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein deutschlandweites Stechmückenmonitoring durchzuführen, um autochthone Stechmückenarten auf das Vorhandensein diverser ausgewählter Parasiten zu untersuchen.

In Zeiten des Klimawandels, der zunehmenden Globalisierung des internationalen Warenhandels und der vermehrten weltweiten Reisetätigkeit erschien es sinnvoll, heimische Stechmücken auf in Bezug auf Parasiten näher zu untersuchen, zumal eine solche Studie in Deutschland bislang noch nicht durchgeführt worden war.

Die Studie wurde zwischen den Jahren 2010 und 2012 in Zusammenarbeit mit der Kommunalen Aktionsgemeinschaft zur Bekämpfung der Schnakenplage e. V. in Waldsee und dem Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg durchgeführt. Angesichts der Tatsache, dass viele der Mückenfangorte an zwei oder sogar drei aufeinanderfolgenden Jahren beprobt wurden, spiegelt das für jeden Fangort ermittelte Artenspektrum die Vielfalt der dort vorkommenden häufigsten Culicidenarten wider.

Besonderes Augenmerk wurde beim Screening der Culiciden auf das Vorhandensein von Parasiten - insbesondere auf verschiedene humanpathogene Nematoden, wie *Dirofilaria repens*, *Dirofilaria immitis* und *Onchocerca lupi* - gelegt. Aber auch auf die Erreger der Vogel malaria wurden die Stechmückenweibchen untersucht. Letztere wurden aus aktuellem Anlass als Parasitengruppe hinzugenommen, nachdem im Zoo von Heidelberg mehrere Inkaseschwalben an Vogel malaria verstorben waren.

In Zusammenhang mit dem Screening der Stechmücken soll diese Arbeit die Entwicklung und Etablierung verschiedener Multiplex Real-time PCR Assays vorstellen, mit deren Hilfe sich verschiedene Nematoden- und Haemosporidienarten nachweisen lassen. Gleichzeitig soll der Einsatz der entwickelten PCR Assays als Hochdurchsatz-Analysemethode zur Untersuchung sehr großer Probenmengen in der praktischen Anwendung in Zusammenhang mit einem Stechmückenmonitoring gezeigt werden.

Neben dem Nachweis von Erregern in Stechmücken sollten gleichzeitig molekulare Methoden entwickelt werden, die die Auflösung eines Artkomplexes ermöglichen, wie der des *Culex pipiens*-Komplexes. Mitglieder dieses Komplexes lassen sich morphologisch nicht unterscheiden, obwohl sie in ihrem Verhalten zum Teil erhebliche biologische Unterschiede aufweisen.

2. Biologie und Ökologie von Stechmücken

2.1. Systematische Einordnung

Innerhalb des Stammes der Insekten (Insecta) und der Ordnung der Zweiflügler (Diptera) zählen Stechmücken zur Familie der Culicidae. Die mehr als 3500 Arten beinhaltende Familie wird in zwei Unterfamilien (Anophelinae und Culicinae) aufgeteilt [Becker et al., 2010, S. 5].

Von den in dieser Arbeit gesammelten Arten zählen lediglich die *Anopheles*-Arten (*Anopheles claviger*, *An. plumbeus* und die Arten des *Anopheles maculipennis*-Komplexes) zu den Anophelinae, alle anderen Taxa sind den Culicinae zuzuordnen. Innerhalb der Unterfamilie der Culicinae lassen sich 11 Triben unterscheiden. Die gesammelten Stechmücken gehören vier dieser Triben an (Aedini, Culicini, Culisetini und Mansoniini) [Becker et al., 2010, S. 3-8], [Clements, 1992, Introduction].

2.2. Lebensweise

Der Lebenszyklus von Stechmücken ist an Wasser gebunden, denn die larvale Entwicklung findet ausschließlich aquatisch statt.

Die Stechmückenweibchen legen je nach Art bis zu 500 Eier ab. In Bezug auf das Verhalten bei der Eiablage lassen sich im Wesentlichen zwei Gruppen von Stechmücken unterscheiden. Zur einen Gruppe zählen Arten, die ihre Eier auf die Wasseroberfläche ablegen, wobei dies einzeln (*Anopheles* Arten) oder als Eischiffchen, in dem hunderte von Eiern zusammengeklebt sind (z. B. Arten der Gattung *Culex*), möglich ist. Der anderen Gruppe werden Stechmückenarten zugerechnet, die ihre Eier in feuchtes Erdreich legen. Im Gegensatz zur ersten Gruppe, deren Larven schlüpfen, sobald die Embryonalentwicklung abgeschlossen ist, können die Embryonen in den Eiern der zweiten Stechmückengruppe eine gewisse Zeit überdauern. Da die Weibchen der zweiten Gruppe die befruchteten Eier in den noch feuchten Boden legen, der larvale Zyklus allerdings im Wasser stattfindet, sind die Embryonen dazu in der Lage, in eine Diapause oder Dormanz einzutreten und können so zum Teil auch noch nach einigen Jahren schlüpfen.

Die Geschwindigkeit der Entwicklung, ist in erster Linie temperaturabhängig und verläuft am schnellsten, wenn das (in der Regel recht warme) Optimum der jeweiligen Art erreicht ist, wobei die Überschwemmungsmückenarten ein höheres Temperaturoptimum besitzen als die Frühjahrsarten. Ist es zu warm oder zu kalt, so schlüpfen die Larven nicht.

Nach Abschluss der Embryonalentwicklung, die direkt nach der Eiablage beginnt, können die Larven schlüpfen.

Der Körper der Larven gliedert sich in Kopf (mit Mundwerkzeugen, Augen und Antennen), Thorax und Abdomen (insgesamt aus zehn Segmenten bestehend, von denen sieben gleich und die drei posterioren Segmenta unterschiedlich aufgebaut sind). Die posterioren Segmente besitzen vier anale Papillen, welche für die Regulation des Elektrolythaushalts verantwortlich sind. Das achte Abdominalsegment bildet bei Culicinen einen Siphon (Atemrohr), bei Anophelinen spirakulare Lobi aus, an denen

2. Biologie und Ökologie von Stechmücken

sich die Tracheen nach außen öffnen - beide Vorrichtungen dienen der Atmung. Die auf atmosphärischen Sauerstoff angewiesenen Larven liegen entweder horizontal dicht unter der Wasseroberfläche (*Anopheles*) oder sie hängen, wie die Larven der Culicinen, mit dem Kopf nach unten, wobei sich das Atemrohr an der Wasseroberfläche befindet. Lediglich Arten der Gattungen *Coquillettidia* und *Mansonia* können auch unter Wasser atmen, da sie einen Siphon besitzen, mit dem sie in der Lage sind Hydrophyten anzubohren und so das Aerenchym dieser Wasserpflanzen zur Sauerstoffaufnahme nutzen können.

Als Larven nehmen Stechmücken Mikroorganismen, wie Bakterien, Diatomeen oder Algen zu sich, die sich als Schwebepartikel im Wasser finden und die sie - je nach Art - mit Hilfe ihrer Mundbürsten einstrudeln oder von Oberflächen abweiden. Einige Larven sind Räuber und ernähren sich häufig von anderen Stechmückenlarven oder weiteren Insekten.

Als holometabole Insekten durchlaufen Stechmücken vier Larven- (L1-L4) und ein Puppenstadium, welche durch Häutung voneinander getrennt sind. Mit Beenden des L4-Stadiums wird die Verpupung eingeleitet, in der sich der Körper der Adulten durch Entwicklung der Imaginalscheiben formt und einige Teile der larvalen Organe abgebaut werden. Weiterhin aquatisch lebend, hängt sich die Puppe mit der Oberseite des Thorax an die Wasseroberfläche, während das Abdomen zur Fortbewegung genutzt wird.

Aus der Puppe schlüpft schließlich das adulte Insekt.

Sowohl Männchen als auch Weibchen ernähren sich mit Hilfe ihres Rüssels von Pflanzensäften, deren Zuckergehalt als Energiequelle dient. Allerdings benötigen die Weibchen der meisten Stechmückenarten zusätzlich noch Proteine zur Eiproduktion, welche sie nur durch die Aufnahme von Blut erhalten. Im Gegensatz zu diesen anautogenen Stechmücken gibt es auch noch autogene Arten, die unter Umständen dazu in der Lage sind Eier auch ohne eine Blutmahlzeit zu bilden, allerdings legen sie in einem solchen Fall deutlich weniger Eier. Die Paarung betreffend lassen sich ebenfalls zwei große Gruppen unterscheiden. So wird bei manchen Arten die Bildung von Paarungsschwärmen benötigt (Eurymagie, z. B. *Cx. pipiens pipiens*), während andere Arten stenogam sind und sich auch ohne Schwarmbildung paaren können (*Cx. p. pipiens biotyp molestus*) (alles aus [Becker et al., 2010, S. 9-24], [Clements, 1992, Introduction]).

2.3. Habitate

Stechmücken besiedeln eine Vielzahl von Habitaten - ob Auwälder, Brackwasserflächen, Baumhöhlen, mit Wasser gefüllte Reifenspuren oder künstliche Wasseransammlungen, wie etwa Regentonnen oder Friedhofsblumenvasen. Je nach Stechmückenart werden unterschiedliche Wasseransammlungen als Brutplatz angenommen.

Im Folgenden werden die für diese Arbeit wichtigsten Habitattypen kurz vorgestellt, da diese nicht nur Rückschlüsse auf die gefangenen Stechmückenarten zulassen, sondern mit Hilfe der Arten auch auf die Wahrscheinlichkeit, mit welcher diverse Pathogene nachgewiesen werden könnten.

2.3.1. Bruchwälder

Der Baumbestand der Erlenbruchwälder (*Alnetea glutinosae*), wird vor allem durch die Schwarzerle (*Alnus glutinosa*) als häufigste Art, gemeinsam mit der Moorbirke (*Betula pubescens*) als Begleitart charakterisiert [Schubert et al., 2001, S. 46]. Bruchwälder entstehen in der Regel auf torfigem

2. Biologie und Ökologie von Stechmücken

Untergrund, welcher unter anderem bei Verlandung eutropher Seen entsteht. Entsprechend wird ein Bruchwald weniger von regelmäßiger Überflutung durch Fließgewässer, als vielmehr durch Niederschläge beeinflusst. Der torfige und damit ohnehin sehr feuchte Boden kann nur noch wenig Wasser speichern, sodass sich nach der Schneeschmelze und ergiebigen Regenfällen im Frühjahr schnell Tümpel bilden können [Becker et al., 1996, S. 47, 48], [Tischler, 1993, S. 300-302]. Da vor allem von der Schneeschmelze beeinflusst, sind für solche Gebiete die robusteren Frühjahrs- oder auch „Waldmückenarten“, wie etwa *Ochlerotatus rusticus* oder *Oc. cantans*, die teilweise noch im Herbst schlüpfen und in der Lage sind, in den Tümpeln als Larve zu überwintern, typisch. Des Weiteren zeigen die Waldmückenarten bereits im Frühjahr ihre größte Schlüpfbereitschaft und sind in der Lage bei sehr niedrigen Wassertemperaturen zu schlüpfen [Becker et al., 1996, S. 48].

In dieser Studie wurden an drei Standorten Bruchwälder beprobt. Der Bruchwald, welcher an Haßloch (Rheinland-Pfalz) angrenzt, wurde in den Jahren 2010 und 2011 beprobt und auch der lediglich im Jahr 2011 aufgesuchte Standort Drömling am Mittellandkanal in Sachsen-Anhalt zählt zu den *Alnetea glutinosae*.

2.3.2. Auwälder

Neben Bruchwäldern wurden - vor allem am Oberrhein und in Bayern - Auwälder als Standorte für die Fallenfänge gewählt. Bei einem Auwald handelt es sich um einen flussnah liegenden Vegetationstyp, der in mehr oder weniger regelmäßigen Abständen durch das Hochwasser des anliegenden Flusses geflutet wird. Voraussetzung hierfür sind Flussmäander, denen eine herannahende Hochwasserwelle nicht folgt, sondern den Bereich oberhalb der Mäanders flutet. Da aber der Großteil der deutschen Flüsse begradigt wurden, finden sich urtümliche Auwälder in solchen Inundationsgebieten unter anderem nur noch am Oberrhein oder der Donau [Walter et al., 1994, S. 144].

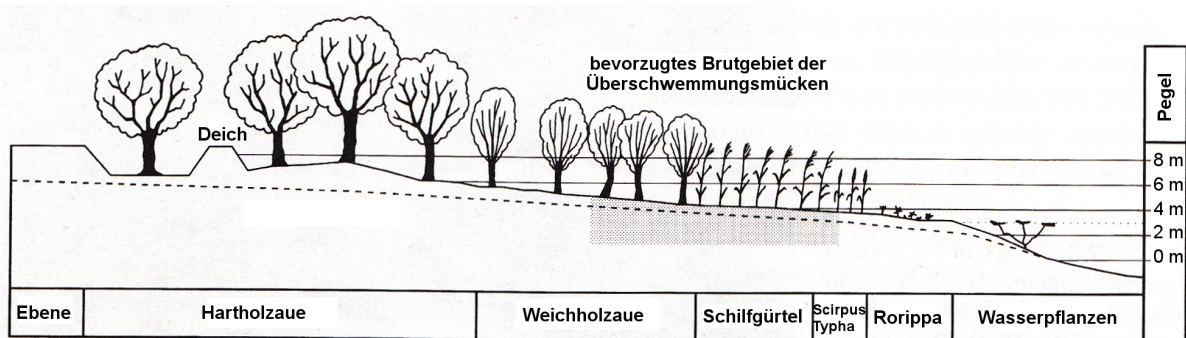


Abbildung 2.1.: Gliederung einer Aue am Beispiel des Rheines (nach [Becker et al., 2010, S. 12])

Ein Auwald lässt sich grob in Weich- und die Hartholzaue gliedern (vgl. Abbildung 2.1). Bei der Weichholzaue handelt es sich um den Bereich des Waldes, der in der Regel an die Ufervegetation des Flusses angrenzt. Sie liegt zudem verhältnismäßig niedrig und ist die Region der Inundationszone, die bei Hochwasserereignissen als erstes überschwemmt wird. Entsprechend ist der Baumbestand von Arten geprägt, die längere Nässe ertragen. Aber auch die Zugkräfte, welche durch die Strömung auf die Bäume und Sträucher einwirken, müssen durch das Holz kompensiert werden, weshalb in der Weichholzaue Bäume mit weichem Holz, wie etwa Silberweiden (*Salix alba*), Schwarzerle (*Alnus glutinosa*) oder Schwarzpappeln (*Populus nigra*) dominieren [Walter et al., 1994, S. 151, 152], [Tischler, 1993, S. 302, 303]. Die sich anschließende Hartholzaue wird, aufgrund ihrer weiteren Distanz zum Fluss und

2. Biologie und Ökologie von Stechmücken

ihrer höheren Lage nicht so schnell und häufig geflutet, wie die flusseinwärts gelegene Weichholzaue, weshalb hier der Baumbestand vor allem durch Hartholzarten geprägt ist, zu denen die Stieleiche (*Quercus robur*), die Flatterulme (*Ulmus laevis*) und die Gemeine Esche (*Fraxinus excelsior*) zählen.

Sowohl Weich- als auch Hartholzaue bieten optimale Brutbedingungen für die sogenannten Überschwemmungsmückenarten, deren vorherrschenden Vertreter in den untersuchten Gebieten *Aedes vexans* und *Ochlerotatus sticticus* sind. Die adulten Stechmückenweibchen legen die Eier in das noch feuchte Erdreich ab, wo diese mehrere Jahre überdauern können. Wird die Stelle geflutet, können die Larven schlüpfen und ihre Entwicklung über vier Larvenstadien bis hin zur Puppe im Wasser vollziehen.

Da Auwälder als Brutstätten für Stechmücken prädestiniert sind, wurden Standorte an einigen Flüssen Deutschlands (Rhein, Isar, Elbe und Oder) gewählt, die sich an Stellen befinden, an denen der Fluss besonders stark mäandriert (Hohenwutzen und Zollbrücke im Bereich Oderaue, Coswig an der Elbe). Der größte Teil des von der KABS kontrollierten Gebietes befindet sich in Auwäldern, aus denen die Standorte in Baden-Württemberg Insel Rott, das Elisabethenwörth (Rusheimer Altrhein) und das Gebiet Knielinger See bei Karlsruhe als Fallenstandorte gewählt wurden. Außerdem wurde in Hessen noch der Standort Kühkopf-Knoblochsaue, das Referenzgebiet der KABS für unbekämpfte Bereiche, beprobt. In Bayern wurde als Auenstandort das Gebiet um Plattling gewählt. Die Isar mündet hier in die Donau, sodass sich im Mündungsbereich noch Auwälder etablieren konnten. Weiter nach Norden hin wurden an einem stark mäandrierenden Abschnitt der Elbe, in der Nähe von Coswig, EVS-Fallen eingesetzt, da auch dieser Bereich eine Auencharakteristik aufweist. Schließlich wurden noch im Bereich Oderaue (genauer bei Hohenwutzen und Zollbrücke) Stechmücken mit EVS-Traps gefangen. An diesen Standorten gibt es zwar keine klassischen Auwälder, allerdings weist die Oder hier viele Schleifen auf, was sich vor Ort durch das Vorhandensein eines kleinen Bruchwaldes und vielen überfluteten Wiesen und Feldern bemerkbar macht.

2.3.3. Weitere-Standorte

Die Fallenstandorte am Bodensee (bei Radolfzell, Baden-Württemberg) und Chiemsee (bei Chieming, Bayern) wurden zum einen gewählt, weil sie eine wichtige Zwischenstation von Zugvögeln darstellen und gute Brutplätze für diese bieten. Gerade was die Vogel malaria-Erreger betrifft erschien diese Wahl sinnvoll. Zum anderen wurden diese Standorte auch deswegen herangezogen, weil sie durch ausgedehnte Schilfgebiete gute Brutgebiete für Stechmücken darstellen. Auch das Schilfgebiet und die Bruchwälder um die Osterseen (bei Iffeldorf, Bayern), südlich des Starnberger Sees sind für ihr hohes Stechmückenaufkommen in den Sommermonaten bekannt.

Schließlich wurde noch der Greifswalder Bodden mit den Standorten Greifswald-Eldena und Loissin (Mecklenburg-Vorpommern) in die Untersuchung mit einbezogen, da auch von dort Klagen der lokalen Bevölkerung über das Vorhandensein eines hohen Stechmückenvorkommens bekannt waren.

Die Fänge mit den BG-Sentinel Traps wurden in den Bereichen Hamburg und Schleswig-Holstein von Mitarbeitern des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin Hamburg, im Rahmen des deutschlandweiten Stechmückenmonitorings durchgeführt. Dabei wurden die BG-Traps nicht nur mit BG-Lure sondern auch mit einer CO_2 -Gasflasche ausgestattet, die immer für eine Nacht angeschlossen wurde, um die Stechmücken zusätzlich noch mittels Kohlenstoffdioxid anzulocken.

2.4. Überblick über die wichtigsten Stechmückenarten

Im Folgenden soll eine kurze Übersicht über die während dieser Studie am häufigsten gefangenen Stechmückenarten gegeben werden. Außerdem sollen für diese Arbeit besonders wichtige Arten vorgestellt werden.

Was die morphologische Charakterisierung angeht, so werden nur die prägnantesten Merkmale der adulten Weibchen vorgestellt, da nur weibliche Mücken gefangen wurden. Männchen und Larven wurden nicht gesammelt, da diese - im Gegensatz zu den Weibchen - keine Blutmahlzeiten zu sich nehmen und somit als keine Rolle als Überträger (humanpathogener) Parasiten spielen.

2.4.1. *Aedes (Aedimorphus) vexans* (Meigen, 1830)

Das Gattungsmerkmal der Aedinen - das zugespitzte Abdomen mit den sichtbaren Cerci - ist zusammen mit den geringelten Beine und den in der Mitte verengten weißen Basalbänder der dritten bis sechsten Tergite ein gutes Kriterium, *Ae. vexans*-Weibchen als solche zu bestimmen [Becker et al., 2010, S. 194], [Mohrig, 1969, S. 157].

Brutgebiete von *Ae. vexans* sind vor allem Wiesengebiete, Inundationszonen großer Flüsse sowie Brackwasserwiesen, seltener werden geschlossene Waldgebiete zur Eiablage aufgesucht. Besonders bevorzugt werden dabei temporäre Gewässer mit einem neutralen oder leicht alkalischen pH-Wert [Becker et al., 2010, S. 195], [Mohrig, 1969, S. 158]. Dennoch können die in großer Individuenzahl vorkommenden Mücken auch in Auwäldern und Parkanlagen vorgefunden werden [Mohrig, 1969, S. 159]. Als polyzyklische Art können sich je nach Witterung im Sommer mehrere Generationen entwickeln [Mohrig, 1969, S. 158]. Die am Boden zwischen Moos und Gras abgelegten Eier können, wenn sie nicht im darauffolgenden Jahr überflutet werden, durchaus einige Jahre überdauern [Becker et al., 2010, S. 195: mindestens fünf Jahre], wobei aber die Lebensfähigkeit nach zwei Jahren abnimmt [Mohrig, 1969, S. 158]. Der Schlüpfreiz wird ausgelöst, wenn das zur Ruhe gekommene Wasser mindestens eine Temperatur von etwa 9°C hat und der Sauerstoffgehalt etwas abgesunken ist [Becker et al., 2010, S. 195]. Im Gegensatz zu den Frühjahrsarten kann *Ae. vexans* als Sommerart angesprochen werden, deren larvales Entwicklungsoptimum bei etwa 30°C liegt - die Entwicklung vom Ausschlüpf bis zum Imago dauert dann etwa eine Woche [Becker et al., 2010, S. 195], [Mohrig, 1969, S. 158].

Häufig kann diese in hoher Individuenzahl vorkommende Spezies besonders in den Sommermonaten zur dominanten Art werden und ist oft für Stechmückenplagen verantwortlich [Becker et al., 2010, S. 195], da die Weibchen auf der Suche nach einer Blutmahlzeit und um dem Konkurrenzdruck zu entkommen Distanzen von bis zu 48 km [Mohrig, 1969, S. 159] überwinden können [Becker et al., 2010, S. 195: mindestens 15 km], wobei als Wirte Säugetiere präferiert werden [Becker et al., 2010, S. 195]. Die Eier, von denen ein Weibchen über 100 nach einer Blutmahlzeit legen kann [Becker et al., 2010, S. 195] werden etwa fünf bis acht Tage nach der Blutmahlzeit in feuchter Erde abgelegt [Becker et al., 2010, S. 195].

Durch ihre weite Verbreitung, ihr gehäuftes Vorkommen, das oft mit der Hauptaktivität diverser Viren übereinstimmt, und die Fähigkeit sowohl an Menschen als auch an anderen Säugetieren Blut zu saugen, wird *Ae. vexans* eine wichtige Rolle in der Übertragung diverser Pathogene zugesprochen [Reinert, 1973, S. 11-12]. So kann die Art etwa die viralen Erreger der Westlichen Pferdeenzephalomyelitis (engl. western equine encephalomyelitis, WEE), der Kalifornischen Enzephalitis (engl. California encephalitis, CE), in Europa das Tahyna-Virus aber auch Parasiten, wie *Dirofilaria immitis* übertragen

[Reinert, 1973, S. 12].

2.4.2. *Ochlerotatus sticticus* (Meigen, 1838)

Wie *Ae. vexans* besitzt auch *Oc. sticticus* ein zugespitztes Abdomen mit sichtbaren Cerci. Weitere Merkmale dieser Art sind die einfarbigen Beine und die weißen Seitendreiecke der Tergite (ab Tergit 4) [Mohrig, 1969, S. 122].

Typische Brutgebiete dieser polyzyklischen Art sind Inundationszonen größerer Flüsse und temporäre Gewässer, die schattig liegen [Becker et al., 2010, S. 256], [Mohrig, 1969, S. 123]. Vor allem in Auwäldern ist diese Stechmückenart anzutreffen, denn die Weibchen legen ihre Eier in den noch feuchten Erdboden, sodass bei einer Überflutung des Bodens die Larven in den zurückbleibenden Tümpeln schlüpfen [Mohrig, 1969, S. 123]. Obwohl regelmäßig gemeinsam mit *Ae. vexans* vorkommend, schlüpfen die Larven bereits bei geringerer Wassertemperatur [Becker et al., 2010, S. 256: <8°C]. Die Larven der ersten Generation eines Jahres entwickeln sich - aus überwinterten Eiern - langsamer als die der echten Frühjahrsarten [Mohrig, 1969, S. 123]. Etwa ab der zweiten Maihälfte sind die adulten Individuen anzutreffen. Das Temperaturoptimum, welches die Larven für die Entwicklung benötigen, liegt bei etwa 25°C. Die Entwicklung dauert dann ungefähr sechs bis acht Tage, weshalb *Oc. sticticus* vor allem in den Sommermonaten gehäuft auftritt [Becker et al., 2010, S. 256].

Die mammalophilen Weibchen, welche über 150 Eier auf einmal ablegen können, sind vor allem in der Dämmerung aktiv, können aber in schattigen Bereichen, etwa im Wald, auch tagsüber stechen [Becker et al., 2010, S. 256]. Angesichts der Tatsache, dass *Oc. sticticus* häufig in großen Massen vorkommt, wandern die Individuen, ähnlich wie *Ae. vexans*, je nach Literatur bis zu 16 km [Mohrig, 1969, S. 124] oder mehr als 20 km [Becker et al., 2010, S. 256] weit, um dem Konkurrenzdruck im Auwald zu entgehen und eine Blutmahlzeit zu finden.

2.4.3. *Anopheles maculipennis* s. l.

Weltweit gibt es mindestens 8 Arten, die dem *Anopheles maculipennis*-Komplex zugeordnet werden können, von denen in Deutschland drei vorkommen [Mohrig, 1969, S. 226]: *Anopheles atroparvus* (VAN THIEL 1927), *An. maculipennis* s. s. (MEIGEN 1818) und *An. messeae* (FALLERONI 1926) [Becker et al., 2010, S. 170-177]. Bei allen Angehörigen des Komplexes handelt es sich um Schwesterarten, deren Weibchen auf morphologischem Wege nicht voneinander unterschieden werden können, weshalb Individuen, die in den Charakteristika der Maculipennia-Gruppe übereinstimmen, in dieser Arbeit als *An. maculipennis* s. l. bezeichnet werden [Mohrig, 1969, S. 226-227].

Die Gattungsmerkmale der Anophelinen (lange Beine, die den Körper sehr zierlich wirken lassen und fünfgliedrige Palpen, die beinahe ebenso lang sind wie der Stechapparat) sind bei allen drei Arten zu finden. Hinzu kommen noch gefleckte Flügel, deren Fleckung durch das gehäufte Auftreten dunkler Schuppen an einigen Flügelstellen verursacht wird, die eine Unterscheidung von anderen autochthonen *Anopheles*-Arten eindeutig zulassen [Becker et al., 2010, S. 172], [Mohrig, 1969, S. 226].

Zur Eiablage benötigen alle in Deutschland vorkommenden Arten stehende Gewässer, wobei Unterschiede bezüglich der Präferenzen zwischen den einzelnen Komplexarten zu erkennen sind [Mohrig, 1969, S. 232-236].

So können Larven von *An. atroparvus* zwar in einer Vielzahl stehender oder zum Teil stehender Gewässer mit sauberem Wasser gefunden werden, jedoch wird zur Oviposition Brackwasser bevorzugt [Becker et al., 2010, S. 173], [Mohrig, 1969, S. 232-233]. Außerdem sind die Brutstätten noch häufig

2. Biologie und Ökologie von Stechmücken

durch hohen Algenbesatz und viel Sonne charakterisiert [Becker et al., 2010, S. 173]. Die adulten Weibchen zeigen eine unvollständige Diapause, die, abhängig von der Tageslänge, von September bis April oder lediglich von November bis Februar dauern kann [Becker et al., 2010, S. 173]. So überwintert die mammalophile Art zwar in Gebäuden, allerdings eher in Ställen als in Wohnhäusern, da *An. atroparvus* feuchteres Klima bevorzugt [Mohrig, 1969, S. 233]. Sie ist auch im Winter in der Lage, Blutmahlzeiten zu sich zu nehmen, was bis in die 1940er Jahre für Ausbrüche von Malaria im Winter sorgte, als es noch mehr Stallungen in der Nähe von Häusern gab [Becker et al., 2010, S. 173].

An. maculipennis s. s. kommt als Larve vorwiegend in klaren, kalten Gewässern vor [Becker et al., 2010, S. 174], [Mohrig, 1969, S. 233]. Gefunden werden kann sie in Kulturlandschaften wie etwa Reisfeldern, Teichen und vor allem in Abschnitten von Fließgewässern, in denen durch Bewuchs und Lage keine Strömung mehr vorhanden ist [Becker et al., 2010, S. 174], [Mohrig, 1969, S. 233]. Durch ihre Anpassungsfähigkeit an künstlich geschaffene Habitate und die Fähigkeit auch eutrophe Gewässer als Brutstätte zu nutzen, ist sie in landwirtschaftlich genutzten Gegenden immer häufiger anzutreffen [Becker et al., 2010, S. 174]. Im Gegensatz zu *An. atroparvus* zeigt *An. maculipennis* s. s. eine vollständige Diapause und überwintert oft in Gebäuden, in denen nicht zwangsläufig ein Wirt anzutreffen ist, da sie ohne Blutmahlzeit überwintert [Becker et al., 2010, S. 174], [Mohrig, 1969, S. 234]. Als endophile Art ist die Art vor und nach der Blutaufnahme in Gebäuden oder anderen geschützten Stellen anzutreffen.

Die Larven von *An. messeae* sind in stehenden Gewässern zu finden, die zum einen relativ kühl sind und zum anderen einen großzügigen Bewuchs des Gewässerbodens aufweisen [Becker et al., 2010, S. 175]. So können Larven der Art im Schwimmpflanzengürtel größerer Seen [Mohrig, 1969, S. 233], in Teichen, Sümpfen, Bewässerungsgräben oder auch Auwäldern gefunden werden. In Inundationszonen von Flüssen und Auwäldern stellt *An. messeae* die häufigste Art des *An. maculipennis*-Komplexes dar, während sie im Bergland oder entlang der Küste so gut wie gar nicht vorkommt [Becker et al., 2010, S. 175], [Mohrig, 1969, S. 235]. Wie *An. maculipennis* s. s. so durchläuft auch *An. messeae* eine vollständige Diapause [Becker et al., 2010, S. 175]. Die zoophilen Weibchen, die ein endophiles Verhalten aufweisen, stechen Menschen in der Regel nur, wenn das Angebot an tierischen Wirten knapp ist [Becker et al., 2010, S. 175].

An. atroparvus und *An. messeae* sind beide in der Lage, *Plasmodium vivax* und *P. ovale*, die Erreger der Malaria tertiana zu übertragen [Takken et al., 2007] und werden für die bis in die 1940er Jahre in Deutschland vorkommenden Malaria-Epidemien verantwortlich gemacht [Mohrig, 1969, S. 226, 233, 235], [Becker et al., 2010, S. 173].

2.4.4. Der *Culex pipiens*-Komplex

Die Weibchen der Gattung *Culex* lassen sich leicht an dem abgestumpften Abdomen und den kurzen, kaum sichtbaren Cerci ebenso wie den hellen Tergitbinden erkennen [Becker et al., 2010, S. 264]. Während die meisten *Culex*-Arten leicht zu unterscheiden sind, ist eine Differenzierung der weiblichen Imagines des *Culex pipiens*-Komplexes höchstens anhand der Flügeladerung möglich und auch dieses Merkmal ist nur bedingt geeignet, die Weibchen nach Art zu unterscheiden (vgl. [Weitzel et al., 2009], [Becker et al., 2010, S. 275]). Bei den Biotypen der Komplexes kommen als Unterscheidungskriterien noch einige Aspekte der Lebensweise hinzu [Mohrig, 1969, S. 199-200], [Becker et al., 2010, S. 275-278].

Bei den eben erwähnten *Culex*-Arten handelt es sich um zierliche Stechmücken, die eine eher un-

2. Biologie und Ökologie von Stechmücken

scheinbare, gelb-bräunliche Färbung aufweisen [Mohrig, 1969, S. 199]. Neben den charakteristischen Gattungsmerkmalen besitzen diese Arten helle Basalbinden auf den Tergiten [Mohrig, 1969, S. 199]. Da eine morphologische Unterscheidung dieser Schwester-Arten, wie bereits erwähnt, nahezu unmöglich ist, wurden selbige zunächst unter dem Pseudonym *Culex pipiens / torrentium* geführt und später mittels taxonomischer PCR genauer charakterisiert. Da es einen hinsichtlich Kosten- und Zeitaufwand nicht zu vertretenden Mehraufwand bedeutet hätte, alle Individuen einzeln zu untersuchen, wurden (wie bei den anderen Arten auch) bereits vor der Isolierung der Nucleinsäuren und den anschließenden PCRs bis zu 25 Individuen der Schwesterarten zu Pools zusammengefasst. Daher ist es auch nicht möglich zu sagen, wie viele Individuen der hier zusammengefassten Arten tatsächlich gefangen wurden.

Der *Culex pipiens*-Komplex beinhaltet verschiedene Arten, Unterarten, Formen, Rassen, physiologische Varianten oder Biotypen - die Zusammensetzung ist je nach Autor unterschiedlich und scheint sich recht häufig zu ändern. Im Folgenden findet die Zuordnung nach [Becker et al., 2010] statt. Zum Komplex zählen hier *Cx. pipiens pipiens* (LINNAEUS 1758), *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* (FORSKAL 1775), *Cx. p. quinquefasciatus* (SAY 1823), *Cx. p. pallens* (COQUILLET), *Cx. restuans* (THEOBALD), *Cx. torrentium* (MARTINI 1925), *Cx. australicus* (DOBROTORSKY) und *Cx. globocoxitus* (DOBROTORSKY), wobei für Europa lediglich *Cx. p. pipiens*, *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* und *Cx. torrentium* nachgewiesen sind [Knight and Stone, 1977].

Zusammen mit *Culistea annulata* werden einige Angehörige des *Culex pipiens*-Komplexes den Hausmücken zugeordnet und damit den freilebenden Arten gegenüber gestellt [Mohrig, 1969, S. 200]. Die Weibchen überwintern als Kulturfolger oft in Gebäuden, ihrem natürlichen Verhalten folgend aber auch in Baumhöhlen, Rissen oder Spalten [Mohrig, 1969, S. 200-201]. Im Frühjahr suchen die trächtigen Weibchen stehende Gewässer wie Tümpel, Teiche aber auch künstliche Wasseransammlungen, wie etwa Regentonnen auf, um ihre Eischiffchen auf der Wasseroberfläche abzusetzen [Mohrig, 1969, S. 201].

Da es den Rahmen und die Zielsetzung dieser Arbeit übersteigen würde, auf jedes Mitglied des Komplexes einzeln einzugehen, werden nur die wichtigsten Arten und Biotypen vorgestellt.

2.4.4.1. *Culex pipiens pipiens* (Linnaeus 1758)

Wie bereits erwähnt unterscheiden sich die Weibchen von *Cx. pipiens pipiens* morphologisch nicht von den anderen Arten des Komplexes, jedoch lassen sich im Verhalten durchaus Unterschiede feststellen.

Vor der Diapause nehmen die Weibchen in der Regel keine Blutmahlzeit mehr zu sich, da sich ansonsten die Lebensfähigkeit verringern würde [Becker et al., 2010, S. 276]. Ähnlich wie die bereits beschriebenen *Anopheles*-Arten, legen auch *Cx. p. pipiens*-Weibchen ihre Eier auf die Wasseroberfläche - bis zu 240 Eier sind zu einem Eischiffchen verbunden [Becker et al., 2010, S. 276]. Was die Qualität des Brutgewässers angeht, so ist die Art flexibel darin, welchen Grad der Eutrophierung das Wasser aufweist. So werden stehende Gewässer wie Teiche ebenso angenommen wie Reisfelder oder künstliche Gewässer, wie etwa Regentonnen oder Baugruben, aber auch leicht brackisches Wasser scheint kein Problem darzustellen [Becker et al., 2010, S. 276-277], [Mohrig, 1969, S. 201]. Je nach Temperatur können pro Jahr (im Gegensatz zu *Cx. torrentium*) mehrere Generationen auftreten [Mohrig, 1969, S. 201].

Die ornithophilen Weibchen von *Cx. p. pipiens* sind zur Eiproduktion auf Blutmahlzeiten angewiesen, eine der Eigenschaften die sie (wie auch die Eurygamie) vom Biotyp *molestus* unterscheidet [Becker

2. Biologie und Ökologie von Stechmücken

et al., 2010, S. 276-277], [Mohrig, 1969, S. 202].

In Europa scheint *Cx. p. pipiens* eine untergeordnete Rolle in der Übertragung humanpathogener Arboviren in Europa zu spielen, ist aber in der Lage das West-Nil-Virus (WNV) [Nicolescu, 1998], das Usutu Virus [Jöst et al., 2011] und das Ockelbo Virus zu übertragen [Becker et al., 2010, S. 277]. Auch Filarien und diverse Vogelmalaria-Erreger der Gattung *Plasmodium* können von *Cx. p. pipiens* übertragen werden [Farajollahi et al., 2011].

2.4.4.2. *Culex pipiens pipiens* biotyp *molestus* (Forskal 1775)

Auch *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* ist in der Morphologie der Weibchen nicht von den restlichen Arten des *Culex pipiens*-Komplexes zu unterscheiden. Allerdings lassen sich Unterschiede im Verhalten zu *Cx. p. pipiens* finden, weshalb *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* als Biotyp eingestuft wird.

Im Gegensatz zu *Cx. p. pipiens* sind Weibchen des Biotyps *molestus* autogen, also nicht zwingend auf eine Blutmahlzeit zur Eiproduktion angewiesen, jedoch werden ohne die Einnahme von Blut weniger Eier abgelegt [Becker et al., 2010, S. 278], [Mohrig, 1969, S. 202]. Des Weiteren gehen die Weibchen nicht zwingend in Diapause, sondern können sich durchaus auch im Winter in warmen, Wasser enthaltenden urbanen Habitaten fortpflanzen, wobei aber die Mortalität recht hoch ist [Becker et al., 2010, S. 278]. Männchen und unbefruchtete Weibchen überleben den Winter in der Regel nicht [Becker et al., 2010, S. 278]. Während *Cx. p. pipiens* eurygam ist, sind die Männchen von *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* stenogam, es ist also keine Schwarmbildung zur Befruchtung der Weibchen notwendig [Becker et al., 2010].

Als Brutstätten werden wie bei den anderen Arten des *Cx. pipiens*-Komplexes stehende Gewässer aufgesucht, allerdings befinden sich die Bruthabitate von *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* meist unterirdisch, sodass Larven etwa in Abwasserschächten gefunden werden können [Becker et al., 2010, S. 278], [Mohrig, 1969, S. 202].

Medizinisch spielt der biotyp *molestus* dahingehend eine Rolle, dass er mit *Cx. p. pipiens* hybridisieren kann und der daraus resultierende Hybrid einen optimaler Vektor des WNV darstellt [Kilpatrick et al., 2005].

2.4.4.3. *Cx. p. pipiens* x *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus*

Die Biotypen *Cx. p. pipiens* und *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* sind in der Lage, miteinander Hybride zu bilden [Fonesca et al., 2004]. Rein morphologisch betrachtet ist auch hier keine Unterscheidung der Weibchen von den restlichen Geschwisterarten des *Culex pipiens*-Komplexes möglich.

Je nachdem, wie hoch der Anteil an *Cx. p. pipiens*- bzw. *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* an der genetischen Zusammensetzung ist, zeigen die Hybride verstärkte Verhaltensmuster in die eine oder in die andere Richtung [Farajollahi et al., 2011].

Die Hybrid-Form ist also in der Lage, ihre Blutmahlzeiten sowohl am Menschen als auch an Vögeln vorzunehmen, weshalb *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* x *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* von großer medizinischer Bedeutung ist. Die West-Nil Viren können, durch die nicht vorhandene Wirtspräferenz, auf den Menschen übertragen werden, während durch das ornithophile Verhalten des eigentlichen Vektors *Cx. p. pipiens* eine natürlichen Übertragungsbarriere gegeben wäre. So ist der Hybrid gemeinsam mit *Cx. restuans* für etwa 80% aller WNV Infektionen im Nordosten der USA verantwortlich [Kilpatrick et al., 2005].

2.4.4.4. *Culex torrentium* (Martini, 1925)

Die Weibchen der Art *Culex torrentium* stimmen in ihrem Aussehen (bis auf die Flügeladerung) völlig mit ihren Schwesterarten des *Culex pipiens*-Komplexes überein, weshalb hier auch nicht noch einmal auf den Habitus der Weibchen eingegangen wird. Da die Flügeladerung auch nur bedingt zur Charakterisierung geeignet ist, wird dieser Ansatz ebenfalls nicht genauer ausgeführt.

Wie bereits in Kapitel 2.4.4 erklärt, wurden die weiblichen Individuen, welche sowohl *Cx. torrentium* als auch dem *Cx. pipiens*-Komplex angehören konnten, nach der Nucleinsäuren-Extraktion mittels taxonomischer PCR genauer untersucht.

Ähnlich wie ihre Schwesternart *Cx. p. pipiens*, nutzt auch *Cx. torrentium* stehende Gewässer unterschiedlicher Art und unterschiedlichen Eutrophierungsstadien zur Eiablage, sodass Eier an Seerändern, am Ufer langsam fließender Gewässer aber auch an künstlichen Wasserstellen abgelegt werden können [Becker et al., 2010, S. 280]. Da die Entwicklung verhältnismäßig lange dauert, gibt es in der Regel nur eine Generation pro Jahr. Die ornithophilen Weibchen nehmen zusätzlich (wie auch die Männchen) noch Nektar als Nahrung zu sich [Becker et al., 2010, S. 280].

Cx. torrentium ist in der Lage das Ockelbo Virus zu übertragen [Lundström, 1994].

2.4.5. *Culiseta annulata* (Schrank, 1776)

Bei *Cs. annulata*, der Ringelmücke oder Großen Hausmücke, handelt es sich um eine verhältnismäßig große, dunkelbraune Stechmückenart, deren Weibchen unter anderem neben hellen Zeichnungen an Abdomen und Beinen an den basal weiß gebänderten Tergiten zu erkennen sind, typisch ist ebenfalls das Vorhandensein eines weißen Rings am Femur [Mohrig, 1969, S. 171], [Becker et al., 2010, S. 300]. Charakteristisch ist der weiße Medianstreif auf dem zweiten Tergit, namensgebend sind die weiß geringelten Beine [Mohrig, 1969, S. 171]. Ein weiteres Erkennungsmerkmal sind die schwarzen, mit weißen Sprenkeln versehenen vorderen Flügeladern und die Fleckung der Flügel, die sich durch die Anhäufung von Schuppen an diesen Stellen ergibt [Mohrig, 1969, S. 172], [Becker et al., 2010, S. 300].

Die adulten Weibchen legen bis zu 200 Eier, als Eischiffchen verbunden, auf die Oberfläche stehender Gewässer unterschiedlichster Art ab [Mohrig, 1969, S. 174], [Becker et al., 2010, S. 301]. Bezüglich der Eutrophierung des Brutgewässers ist *Cs. annulata* sehr tolerant, weshalb Larven dieser euryöken Art, ähnlich wie die von *Cx. pipiens*, in Regentonnen, Parkteichen, Tümpeln, in den Randbereichen von Waldmooren oder anderen Gewässern mit hohem Nitratgehalt aber auch an leicht salinen Standorten zu finden sind [Mohrig, 1969, S. 174-175], [Becker et al., 2010, S. 301]. Die optimale Temperatur für die larvale Entwicklung liegt zwischen 24°C und 27°C und dauert etwa 16 Tage [Becker et al., 2010, S. 301]. Je nach Längengrad der Ausbreitung können bis zu drei Generationen in einem Jahr vorkommen, die größte Populationsdichte erreicht *Cs. annulata* in der Regel im September [Becker et al., 2010, S. 301].

Wie *Culex pipiens* so kann auch *Cs. annulata* als Hausmücke betrachtet werden, da sie häufig ab Herbstbeginn im Inneren von Gebäuden gefunden werden kann, wo die adulten Weibchen gerne in Kellern und Speicherräumen überwintern - Männchen überwintern nicht [Mohrig, 1969, S. 173]. Neben Häusern werden als natürliche Lebensräume auch Baumhöhlen oder andere geschützte Stellen zum Überwintern aufgesucht, in besonders milden Wintern ist auch eine Hibernation im larvalen Stadium möglich [Becker et al., 2010, S. 302]. Durch die nachtaktive Lebensweise während des Sommers fallen

2. *Biologie und Ökologie von Stechmücken*

die Individuen im Freien kaum auf, da sie ein endophiles Verhalten aufweisen und sich gerne in Häusern und Ställen aufhalten [Becker et al., 2010, S. 301]. Ab Herbst verlagert sich die Stechaktivität der mammalophilen Weibchen auch auf den Tag [Becker et al., 2010, S. 301].

Zu den von *Cs. annulata* übertragbaren Pathogenen gehören das Tahyna Virus und die Erreger der Vogel malaria [Becker et al., 2010, S. 302].

3. Nematoden

Der Stamm der Nematoden (Fadenwürmer) zählt zum Phylum der Aschelminthes (Rundwürmer) und beinhaltet etwa 16 000 Arten, die unterschiedliche Habitate besiedeln können. So treten sie marin, limnisch und in feuchter Erde in hoher Individuendichte auf. Viele Arten sind Parasiten von Tieren und Pflanzen und besiedeln im Wirtskörper unterschiedliche Regionen. Bei Chordaten findet man viele Parasiten, die Darm, Lungen, Blut- bzw. Lymphgefäßsystem, Nieren, verschiedene Gewebe und sogar Zellen besiedeln. Zu den wohl bekanntesten Parasiten innerhalb der Nematoden zählen *Wuchereria bancrofti*, einer der Erreger der lymphatischen Filariose (Elephantiasis) und *Onchocerca volvulus*, welcher die Flussblindheit hervorruft.

Oft gelangt der Parasit über einen Zwischenwirt in den eigentlichen Endwirt, wobei häufig blutsaugende Insekten, wie etwa Stechmücken (Culicidae), Zecken (Ixodida) oder Kriebelmücken (Simuliidae) als Zwischenwirte fungieren [Storch and Welsch, 2004, S. 139-151]. Durch Arthropoden übertragbare Nematoden-Infektionen werden auch als Arbonematoden bezeichnet [Gürtler et al., 2012].

3.1. Filarien / Nematoden in Europa

Im Folgenden sollen die für diese Arbeit relevanten Nematoden-Arten vorgestellt werden. Dabei handelt es sich um die Filarien, auf deren Vorhandensein hin die Stechmücken untersucht wurden: *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* und *Onchocerca lupi* sowie die Art *Setaria tundra*.

3.1.1. *Dirofilaria immitis* (Leidy 1856) und *Dirofilaria repens* (Railliet & Henry 1911) (Spirurida, Onchocercidae)

Der Lebenszyklus beider *Dirofilaria*-Arten beinhaltet einen Vertebraten als Endwirt und einen blutsaugenden Vektor. Als mögliche Vektoren werden Stechmückenarten innerhalb der Genera *Culex*, *Aedes* und *Anopheles* genannt, unter anderem *Ae. albopictus*, *Ae. vexans*, *An. maculipennis* s. l. und *Cx. pipiens* s. l.. Beide Nematoden-Arten sind am besten an Hunde als Endwirte angepasst, können aber auch bei anderen Wirbeltieren (Menschen oder Katzen) gefunden werden [Simon et al., 2012].

Während einer Blutmahlzeit injizieren Stechmücken mit *Dirofilaria* infizierte Hämolymph in den Endwirt, durch welche infektiöse L3 Filarien-Larven in den Körper des Vertebraten gelangen können. Etwa zwischen drei und zwölf Tage nach Infektion findet bei *Dirofilaria immitis* die Häutung zur L4-Larve statt, nach ca. 50 bis 70 Tage nach Infektion die Häutung, welche die präadulten Würmer hervorbringt. Ungefähr 70 bis 85 Tage nach der Infektion erreichen die ersten präadulten Filarien die Pulmonalarterie und das rechte Ventrikel des Wirtsherzens (daher auch Herzwurm), wo sie ca. 120 Tagen nach Infektion die Geschlechtsreife erlangen. Das erste Larvalstadium (L1, Mikrofilarie) wird von den Weibchen, die über sieben Jahre alt werden können, sechs bis neun Monate nach Infektion produziert. Die Mikrofilarien können bis zu zwei Jahre im Wirt leben.

3. Nematoden

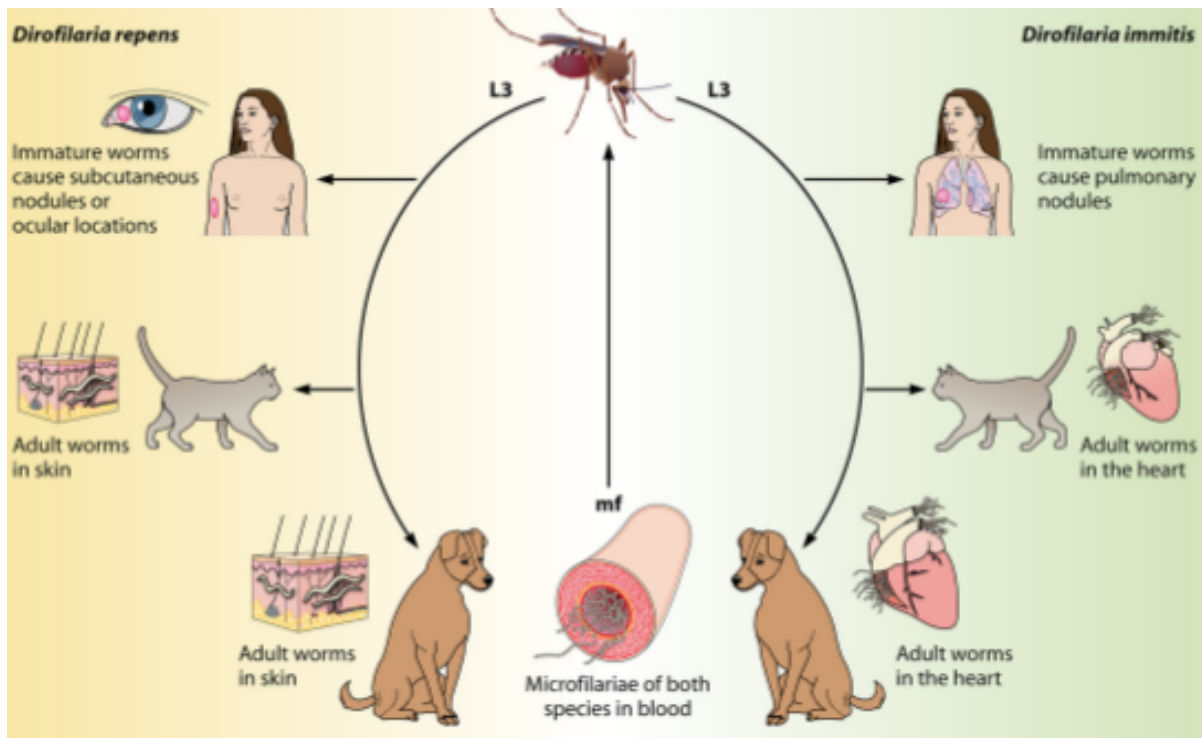


Abbildung 3.1.: Lebenszyklen von *Dirofilaria immitis* und *D. repens* (Quelle: [Simon et al., 2012])

Im Gegensatz zu *D. immitis* siedeln sich die adulten *D. repens* im subkutanen Gewebe des Endwirtes an (daher auch Hundehautwurm), können sich aber auch in der abdominalen Körperhöhle und innerhalb von konnektivem Muskelgewebe ansiedeln. Die Geschlechtsreife wird nach sechs bis neun Monaten erlangt.

Die Mikrofilarien beider Arten sind im Blut der Endwirte zu finden, wo sie vom Zwischenwirt bei einer Blutmahlzeit aufgenommen werden können. Bereits etwa 24 Stunden nach Aufnahme durch den Zwischenwirt sind die ersten Mikrofilarien in den Malpighischen Gefäßen zu finden, wo die Häutung zur L2-Larve acht bis zehn Tage nach Infektion stattfindet. Die Häutung zur infektiösen L3-Larve findet drei Tage später statt. Diese wandert zu den Speicheldrüsen des Vektors, wo sie bis zur nächsten Blutmahlzeit verbleibt und dann den nächsten Endwirt infizieren kann, indem sie dessen subkutanes Gewebe durchdringt.

Der Mensch ist kein geeigneter Wirt beider Parasiten: das menschliche Immunsystem verhindert in der Regel eine Entwicklung der Filarien zur adulten Form. Wird ein Mensch mit *D. immitis*-Larven infiziert können diese zwar einen Ast der Pulmonalarterie erreichen, rufen dort in der Regel eine Entzündung hervor, welche zur Ausbildung von pulmonalen Knötchen führen kann [Cordero et al., 1992], meist aber zur Vernichtung des Wurmes führt. Bei einer Infektion durch *D. repens* können subkutane Knötchen gebildet werden. Beide Nematoden sind auch in der Lage, sich im Auge anzusiedeln [Otranto and Eberhard, 2011], [Moorhouse, 1978].

D. immitis ist in tropischen und gemäßigten Regionen weltweit zu finden, während *D. repens* weltweit, mit Ausnahme des amerikanischen Kontinents vorkommt. In Europa sind beide Arten vertreten, wobei sich das Vorkommen auf Südeuropa konzentriert, nach Norden hin nimmt die Häufigkeit ab. *Dirofilaria immitis* wurde in folgenden europäischen Ländern nachgewiesen: Spanien [Simon et al., 1996], [Montoya et al., 2006], [Montoya-Alonso et al., 2010] Ungarn [Jacsó et al., 2009], Italien [Otranto et al., 2009], [Mazzariol et al., 2010] Albanien [Rapti and Rehbein, 2010], Bulgarien, Ru-

3. Nematoden

mänien [Ciocan et al., 2009], Serbien [Tasic et al., 2008], Tschechische Republik [Svobodová et al., 2006] und der Schweiz [Simon et al., 2012]. *D. repens* konnte bereits in Italien [Cancrini et al., 2003a], [Cancrini et al., 2003b], [Otranto et al., 2009], Frankreich [Therizol-Ferly et al., 1996], [Argy et al., 2011] Österreich [Auer and Susani, 2008], Polen [Wesolowska et al., 2010], Russland [Kramer et al., 2007], Serbien [Tasic et al., 2008], Ungarn [Szenasi et al., 2008], Schweiz [Simon et al., 2012], der Tschechischen Republik [Svobodová et al., 2006] und in Deutschland [Pantchev et al., 2009], [Sassnau et al., 2009] nachgewiesen werden.

Auch wenn der Mensch in beiden Fällen als Fehlwirt fungiert, können dennoch in seltenen Fällen Symptome, wie etwa eine okuläre Dirofilariose, bei der die adulten Parasiten ins Auge wandern ([Wesolowska et al., 2010], [Argy et al., 2011]) oder im Extremfall Sprachstörungen hervorrufen, wenn die Nematoden sich im Sprachzentrum des Gehirns ansiedeln, beobachtet werden [Poppert et al., 2009].

3.1.2. *Onchocerca lupi* (Spirurida, Onchocercidae)

Onchocerca lupi ist bisher kaum wissenschaftlich untersucht worden. Man weiß, dass der Nematode bei Hunden die Bildung von Knötchen unter der Binde- und Lederhaut induzieren kann [Otranto et al., 2013], aber auch von humanen *O. lupi*-Infektionen (etwa in der Türkei und Tunesien) wird berichtet [Otranto et al., 2012], wobei diese sehr selten zu sein scheinen [Sreter et al., 2002].

Über den Lebenszyklus oder mögliche Vektoren ist bislang ebenfalls kaum etwas bekannt, wobei zumindest *Simulium reptans* als potentieller Überträger diskutiert wird [Otranto et al., 2013], da er in Gegenden vorkommt, in denen *Onchocerca lupi* in Hunden nachgewiesen werden konnte, wie etwa Portugal [Faisca et al., 2010], Schweiz, Deutschland [Hermosilla et al., 2005] und Ungarn [Szell et al., 2001], [Egyed et al., 2001].

3.1.3. *Setaria tundra*

Auch das Wissen um den Nematoden *Setaria tundra* ist sehr spärlich.

Es ist bekannt, dass eine Infektion mit der Filarie bei Rentieren und Elchen zu einer oftmals tödlich verlaufende Bauchfellentzündung führt und der Nematode dadurch in Finnland und Lapland in den Jahren 1973 und 2003-2005 bereits beträchtliche wirtschaftliche Schäden verursachte [Laaksonen et al., 2009a], [Laaksonen et al., 2010].

Der Lebenszyklus ist mit dem der bereits vorgestellten Filarien-Arten vergleichbar, lediglich siedeln sich bei *S. tundra* die adulten Individuen im Bauchfell an.

Als Vektoren sind bisher die Stechmückenarten *Ochlerotatus communis*, *Oc. punctor* und *Oc. hexodontus* bekannt gewesen [?].

Über das Verbreitungsgebiet dieses Nematoden scheint außer den bereits aufgeführten Ländern Finnland, Lapland und Deutschland nicht viel bekannt zu sein.

4. Vogelmalaria

Bei der Vogelmalaria handelt es sich um eine gängige aviäre Infektion, die bei heimischen Vögeln kein Krankheitsbild hervorzurufen scheint, wohingegen eine Neueinführung des Erregers dieser Krankheit (verschiedene Arten der Gattungen *Haemoproteus*, *Leukocytozoon* und *Plasmodium*) zur Dezimierung eines Vogelbestandes führen kann. So war das Einführen invasiver Stechmückenarten nach Hawaii, die in der Lage waren Vogelmalaria-Erreger von Zugvögeln auf endemische Arten zu übertragen Auslöser dafür, dass sich zu Beginn des zwanzigsten Jahrhunderts die Vogelmalaria über die Inseln verbreiten konnte und zum Aussterben von 23 der 71 endemischen Vogelarten beitrug [Huijben et al., 2007].

Aber auch in Zoos stellt die Vogelmalaria ein immer häufigeres Problem dar, wenn nicht-heimische Zootiere mit den Erregern infiziert werden. So kommt die Infektion etwa bei Inkaseeschwalben (*Larosterna inca* BLYTH 1852, vgl. Abbildung 4.1) [Stockklausner et al., 2013] oder Brillenpinguinen (*Spheniscus demersus*) [Cranfield et al., 1994] recht häufig vor.

Die Erreger der Vogelmalaria gehören der Ordnung Haemosporidia an, die dem Stamm der Apicomplexa zugeordnet wird. Die Erreger sind in den Gattungen *Haemoproteus*, *Leucozytozoon* und *Plasmodium* anzutreffen [Haberkorn, 1984], [Santiago-Alarcon et al., 2012]. Scheinbar ist die Zahl infektiöser Arten innerhalb der einzelnen Gattungen so hoch, dass in der Literatur in der Regel auf eine genauere Artbestimmung verzichtet wird (vgl. [Bensch et al., 2000], [Gediminas Valkiunas and Bensch, 2008], [Hellgren et al., 2004], [J. Waldenström and Östman, 2004]). So führt [Santiago-Alarcon et al., 2012] über 50 *Plasmodium*-Arten und -Linien als Erreger aviärer Malaria auf, von denen aber zum Beispiel *Plasmodium relictum* auch häufiger in anderen Veröffentlichungen zu finden ist (z. B. [Cranfield et al., 1994], [Huijben et al., 2007]).

Die Vogelmalaria-Erreger der Gattung *Plasmodium* können von Culiciden unterschiedlicher Arten übertragen werden, wie etwa *Culex quinquefasciatus*, *Cx. pipiens*, *Cx. territans*, *Culiseta annulata* oder *Aedes vexans*.

Als Vektoren der Gattung *Haemoproteus* zählen Lausfliegen (Hippoboscidae) und Gnitzen (Ceratopogonidae), während *Leukoytozoon* von Kriebelmücken (Simuliidae) übertragen werden kann [?].

In Abbildung 4.3 ist der Lebenszyklus der Vogelmalaria-Erreger dargestellt.

Auf der linken Seite der Abbildung ist die sexuelle Reproduktion des Erregers gezeigt, welche im Mitteldarm der Stechmücke stattfindet. So fusionieren zunächst männliche und weibliche Gameten (10) zur Zygote, welche sich zu einem mobilen Ookineten weiterentwickelt (11). Dieser penetriert die Wand des Mitteldarms, um dort eine Oocyste zu bilden (12). Innerhalb der Oocyste werden zahlreiche Sporozoiten produziert, bis die Membran der Oocyste bricht (13) und die Sporozoiten auf diese Weise die Möglichkeit bekommen, in die Speicheldrüsen der Stechmücke zu wandern.



Abbildung 4.1.: Inkaseeschwalbe (*Larosterna inca*) (Quelle: [Haase, 2007])

4. Vogelmalaria

Nimmt die Mücke eine Blutmahlzeit zu sich, können die Sporozoiten auf den Vogel übertragen werden, in dem die asexuelle Vermehrung stattfindet (vgl. Abbildung 4.3, rechts). Die Sporozoiten dringen in die Fibroblasten verschiedener Organe (etwa der Milz) und in andere Gewebe ein, wo sie sich zu Cryptozoiten weiterentwickeln (1). Innerhalb dieser Cryptozoiten findet die Bildung der Merozoiten statt (Schizogonie, 2), die erneut Fibroblasten und Gewebe befallen und sich zu Cryptozoiten entwickeln müssen (A: primärer exoerythrocytärer Zyklus: 3 und 4), bevor durch sie eine Infektion der Makrophagen stattfinden kann. Nach dem primären exoerythrocytären Zyklus können die Merozoiten entweder wieder in einen exoerythrocytären Zyklus eintreten (sekundärer exoerythrocytärer Zyklus, C mit 7 und 8) oder rote Blutkörperchen (also Erythrozyten) befallen, um sich zu Gameten (9) weiterzuentwickeln (B mit 5 und 6). Auch die sogenannten Phanerozoiten des sekundären exoerythrocytären Zykluses sind in der Lage, sich zu Gameten auszubilden [Huijben et al., 2007].

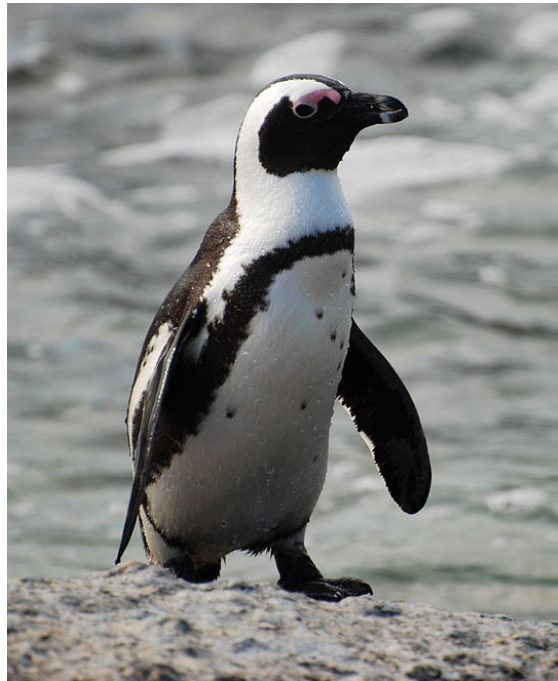


Abbildung 4.2.: Brillenpinguin (*Spheniscus demersus*) (Quelle: [tin tin, 2007])

4. Vogelmalaria

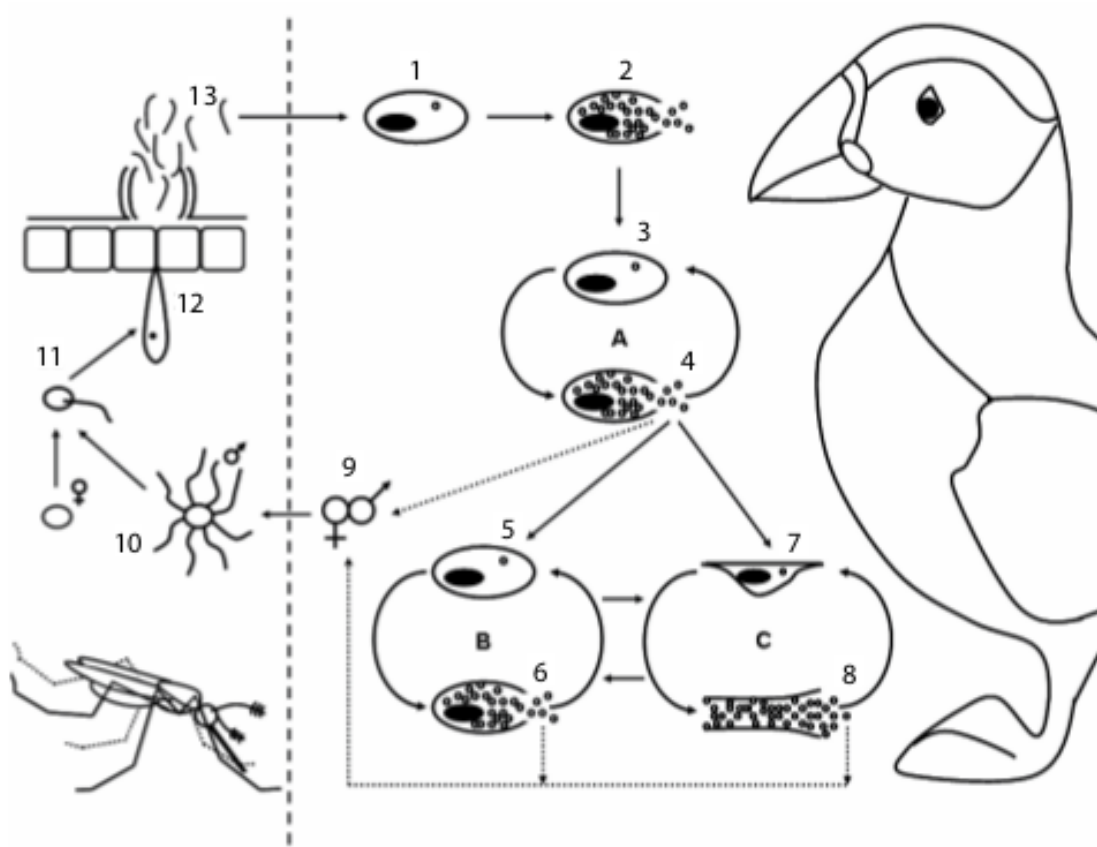


Abbildung 4.3.: Übersicht über den Lebenszyklus der Vogelmalaria-Erreger am Beispiel von *Plasmodium spp.* Links: Darstellung der sexuellen Reproduktion in der Stechmücke, rechts: asexuelle Vermehrung im Endwirt (aus [Huijben et al., 2007])

Teil II.

Material und Methoden

5. Fallenarten

In diesem Monitoring wurden 3 Fallentypen verwendet, die alle auf dem Prinzip der Anlockung durch olfaktorische und zum Teil auch visuelle Reize basieren. Während EVS-Traps an Standorten eingesetzt wurden, die in der Regel nur einmal in jeder Saison beprobt wurden, wurden Gravid-Traps an Standorten verwendet, an denen ein durchgehendes Monitoring von Mai bis September stattfand. Eine Ausnahme bilden einige Standorte in Baden-Württemberg, Hessen und Rheinland-Pfalz, die ursprünglich für eine andere Studie gedacht waren und die lediglich vier Wochen lang im Jahr 2012 mit Gravid-Traps beprobt wurden. Des Weiteren wurden noch BG-Sentinel-Traps verwendet, die allerdings nur in der Fangregion Hamburg eingesetzt wurden.

5.1. EVS-Traps

Die EVS-Trap ist die Standardfalle, welche von der KABS in ihrem Routinemonitoring verwendet wird, weshalb sie auch in dem hier vorgestellten Monitoring neben der Gravid-Trap am häufigsten eingesetzt wurde. Entwickelt und eingeführt wurde diese Fallenart im Wesentlichen von Mitarbeitern des Orange County Vector Control Districts in Kalifornien, USA ([Rohe and Fall, 1979] nach[Becker et al., 2010]). In EVS-Traps (**E**ncephalitis **V**ector **S**urveillance-Traps) wird als Lockstoff Kohlenstoffdioxid in Form von Trockeneis eingesetzt.

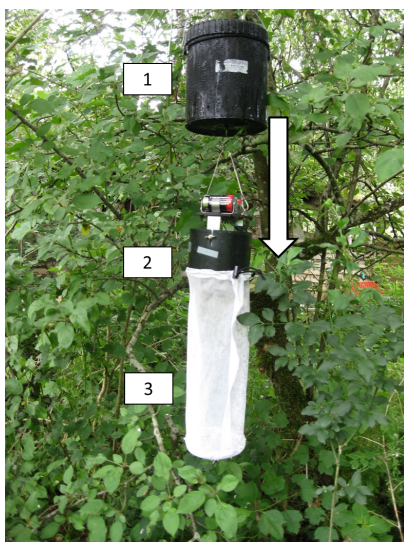


Abbildung 5.1.: 1 Trockeneisbehälter,
2 Motorblock mit Ventilator,
3 Fangnetz

Die Falle besteht aus drei Teilen: einem Trockeneisbehälter, einem Motor, welcher einen Ventilator antreibt und einem Fangnetz (Abbildung 5.1).

Bei dem Trockeneisbehälter (1) handelt es sich um einen isolierten Plastikeimer, an dessen unteren Rand sich mehrere Löcher befinden. Durch diese Löcher kann das sublimierende CO_2 nach unten entweichen. Unter dem Trockeneisbehälter ist ein mit 3 Mono-D-Batterien bestückter Motorblock angebracht (2), der einen Ventilator betreibt, welcher einen nach unten gerichteten Luftstrom erzeugt (Pfeil). Stechmückenweibchen, die auf der Suche nach einer Blutmahlzeit sind, werden durch das ausströmende CO_2 angelockt [Chen et al., 2011] und geraten in den Luftstrom, der sie in das Fangnetz drückt (3), welches sich unter dem Ventilator befindet. EVS-Traps werden in der Regel in Bäumen oder Sträuchern aufgehängt, sodass sich der Behälter mit dem Trockeneis auf einer Höhe zwischen 1,5 und 2,0 m befindet. Um auch dämmerungsaktive Stechmückenarten fangen zu können, werden die Fallen zwischen Spätnachmittag und frühem Abend angebracht.

5. Fallenarten

Am folgenden Morgen werden die Fallen abgehängt und die in den Netzen gefangenen Insekten durch Einfrieren mittels Trockeneis getötet [Becker et al., 1996, S. 94-96].

Häufig werden mit dieser Fallenart vor allem Überschwemmungsmückenarten, wie etwa *Ae. vexans* oder *Oc. sticticus*, aber auch Frühjahrsarten gefangen, zu denen unter anderem die Art *Oc. rusticus* gehört.

5.2. Gravid-Traps

Die in diesem Monitoring verwendeten Gravid-Traps sind dem Fallenmodell von Reiter und Cummings nachempfunden (BioQuip Products, CA, USA, [Reiter, 1983]).

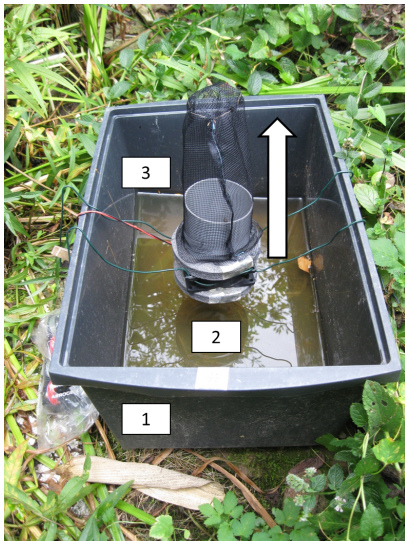


Abbildung 5.2.: 1 Wanne mit Heuaufguss,
2 Ventilator, 3 Fangnetz

Über einer schwarzen, mit Heuaufguss gefüllten Plastikwanne (1) ist ein Ventilator angebracht (2), der einen nach oben gerichteten Luftstrom in ein darüber angebrachtes Fangnetz erzeugt (3) (Abbildung 5.2). Trächtige Stechmückenweibchen auf der Suche nach einer Möglichkeit zur Eiablage werden durch den Geruch des Heuaufgusses angelockt. Bei dem Versuch, ihre Eier auf der Wasseroberfläche oder dem Wannenrand abzulegen, werden die Weibchen von dem Luftstrom erfasst und durch diesen in das Fangnetz gedrückt.

Die Gravid-Traps wurden in der Regel von Mai bis September an den Fallenstandorten aufgestellt, die gefangenen Weibchen alle zwei bis drei Tage in den Netzen abgesammelt und mittels Trockeneis getötet. Um sicherzustellen, dass es zu keinem längeren Fallenausfall kommt, wurde der Heuaufguss, ebenso wie die Batterien, einmal wöchentlich gewechselt. Zudem wurden fehlfunktionierende Fallen aus-

getauscht, sobald ein Defekt festgestellt wurde.

Mit dieser Fallenart, fängt man Stechmückenarten, deren Weibchen ihre Eier auf die Wasseroberfläche oder an Teile von Pflanzen bzw Gegenständen, die ins Wasser reichen, ablegen. Sie dient also als Immitation einer Brutstätte für bestimmte Arten. Ursprünglich wurde die Fallen zum Fangen trächtiger *Culex*-Weibchen entwickelt, man kann mit ihr aber ebenso *Culiseta annulata*, *Anopheles claviger*, *An. maculipennis* s. l., *An. plumbeus* und seltener *Mansonia richiardii* fangen [Reiter, 1983].

5.3. BG-Sentinel-Traps

Die BG-Sentinel-Trap wurde lediglich im Großbereich Hamburg, im Zuge des UBA-Projektes, bei dem es im Wesentlichen um das Monitoring einwandernder Stechmückenarten geht, eingesetzt.

Bei der BG-Trap handelt es sich um eine weiße, tonnenförmige Konstruktion (2) mit einem schwarzen, nach innen reichenden Fangtrichter (1), der auf der Oberseite angebracht ist (Abbildung 5.3).

Als Attraktantien dienen ein spezieller Duftstoff, der unter anderem Milchsäure enthält (BG-Lure) und optional CO_2 (Gasflasche). Höhlenbrüter, wie etwa *Aedes albopictus*, werden außerdem visuell durch den schwarzen Fangtrichter angelockt, welcher auf sie wie eine Möglichkeit zur Eiablage

5. Fallenarten

wirkt. Innerhalb der Tonne, unter dem mit zwei entgegengerichteten Fangnetzen bestückten Trichter, befindet sich ein Ventilator, der einen Luftstrom nach unten erzeugt [Rose et al., 2006].



Während sowohl die Gravid- als auch die EVS-Trap lediglich mit drei bzw. vier Mono-D-Batterien laufen, benötigt die BG-Sentinel-Trap entweder eine Motorrad-Batterie oder einen Stromanschluss (3). In Kombination mit der Tatsache, dass für den Betrieb der BG-Trap mit CO_2 (optional) eine Gasflasche benötigt wird und die Falle an sich schon verhältnismäßig groß ist (Höhe etwa 50 cm) war eine Verwendung der Falle für das deutschlandweite Monitoring aus logistischen und betriebswirtschaftlichen Gründen keine Option.

Abbildung 5.3.: 1 Fangtrichter mit Netzen, 2 Fallenverschalung, 3 Stromanschluss

6. Vorstellung der Standorte

In den Untersuchungsjahren 2010 bis 2012 wurde das Monitoring an unterschiedlichen Standorten Deutschlands durchgeführt, die aus diversen Gründen zur Untersuchung herangezogen worden sind. In Tabelle 6.1 sind alle Fallenstandorte mit den dazugehörigen Koordinaten nach Bundesland aufgeführt. Zudem sind für jeden Standort die Fallenart und die Untersuchungsjahre aufgeführt, da nicht alle Regionen durchgehend beprobt worden sind. Unter mehreren Nummern aufgeführte Standorte stellen zusammengehörende Standorte dar, an denen an unterschiedlichen Stellen gefangen wurde, die teilweise auch mehrere Kilometer voneinander entfernt waren (z. B. Chiemsee 1-4).

Im Wesentlichen sind Standorte zu unterscheiden, an denen mit Gravid-Traps, mit EVS-Fallen oder mit BG-Sentinel Traps Stechmücken gefangen wurden.

Die folgenden Kapitel sollen zum einen einen Überblick über die untersuchten Standorte geben, zum anderen die Kriterien aufzeigen, anhand derer die Standorte für das Monitoring gewählt wurden.

6.1. EVS-Standorte

Die EVS-Traps wurden in sechs Bundesländern an insgesamt 18 Standorten eingesetzt. Die Standorte wurden in der Regel nur einmal pro Jahr aufgesucht und dann mit zehn Fallen beprobt. Ausgewählt wurden die Standorte aus unterschiedlichen Gründen.

Generell war es wichtig, für dieses Monitoring möglichst viele Stechmückenweibchen zu fangen, da davon ausgegangen wurde, dass die Infektionsrate nicht sonderlich hoch sein würde. Aus diesem Grund wurden Gebiete gewählt, bei denen von einem hohen Stechmückenaufkommen ausgegangen werden konnte, weil sich dort große Schilfgebiete befinden oder weil es sich um Flussauen oder Bruchwälder handelt. Teilweise waren dies Gebiete, in denen die KABS auch die Stechmückenbekämpfung durchführt [Becker et al., 1996, S. 124,125].

6.1.1. Baden-Württemberg

Bei den in Baden-Württemberg aufgesuchten EVS-Standorten handelt es sich um den Bodensee und fünf Standorte im Bereich um Karlsruhe: Insel Rott, Knielinger See, Russheimer Altrhein, Stutensee-Staffort sowie Waghäusel.

6.1.1.1. Insel Rott, Knielinger See und Russheimer Altrhein

Die Standorte Insel Rott, Knielinger See und Russheimer Altrhein liegen alle entlang des Rheines (vgl. Tabelle 6.1) und wurden ausgewählt, weil es sich um Auwälder handelt, die alle im Einsatzgebiet der KABS liegen. Aus diesem Grund war die Tendenz eines hohen Stechmückenaufkommens bei entsprechender Witterung bekannt. Der Standort Stutensee wurde lediglich im Jahr 2010 untersucht und liegt an einem See. Auch der Knielinger See, wurde nur in einem Jahr (2011) beprobt, an den Standorten Insel Rott und Russheimer Altrhein fanden hingegen in allen Untersuchungsjahren Fänge statt. Bis

6. Vorstellung der Standorte

auf Stutensee handelte es sich um eine typische Auevegetation, wie sie in Kapitel 2.3.2 beschrieben wurde, wobei die Stellen, an denen die Fallen aufgehängt wurden, in einem Übergangsbereich zwischen Weich- und Hartholzaue hingen. Der morastige Boden wies Bewuchs von Brennnesseln (*Urtica dioica*) und Indischem Springkraut (*Impatiens glandulifera*) auf. Die Baumschicht bestand aus Weiden (*Salix spec.*), Bastard-Schwarz-Pappeln (*Populus x canadensis*) und teilweise auch Gemeinen Eschen (*Fraxinus excelsior*).

6.1.1.2. Waghäusel (Wagbachniederung)

Der in allen drei Jahren untersuchte Standort Waghäusel wurde gewählt, weil sich an den dort vorhandenen Dauergewässern viele Zugvögel versammeln, die auf ihrer Wanderung theoretisch verschiedene Pathogene einführen könnten.

Die Wagbachniederung befindet sich in der Nähe des Rheins und im Satellitenbild lässt sich eine ehemalige Rheinschleife erkennen (vgl. Abbildung 6.1). Der daraus resultierende verhältnismäßig hohe Grundwasserspiegel begünstigt nach Niederschlägen die Bildung von Tümpeln. Das zusätzliche Vorhandensein von Dauergewässern und die damit verbundene Anzahl an Kleintlebewesen, vor allem Insekten aber auch die Vegetation, die Schilf und viele Gebüsche beinhaltet, bieten für viele Zugvögel ideale Brutbedingungen. Die Dauergewässer wiederum bilden den Lebensraum bestimmter Stechmückenlarven, wie etwa der der *Anopheles*-, *Culex*- oder *Culiseta*-Arten. Außerdem können sich in den Tümpeln noch Überschwemmungsmückenlarven entwickeln.

Die Fallen hingen an Stellen, die sich alle in einer Gebüschreihe in der Nähe der Seeufer befanden. Das Gebüsch bestand aus Weißdorn (*Crataegus spec.*) und Kratzbeeren (*Rubus caesius*), der Untergrund war zum Teil sehr kiesig.



Abbildung 6.1.: Standort Waghäusel (Bild aus [Google Inc., 2003])

6.1.1.3. Bodensee

Als weiterer EVS-Fallenstandort in Baden-Württemberg wurde der Bodensee im Bereich der Halbinsel Mettnau gewählt (vgl. Tabelle 6.1), der 2010, 2011 und 2012 untersucht wurde.

Das Bodensee-Ufer ist in diesem Bereich durch einen sehr breiten Schilfgürtel geprägt, der Brutplätze für viele Zugvögel bietet. Die Fallen wurden hier an drei verschiedenen Stellen aufgehängt (Parkplatz, BMX-Bahn und Klärwerk, vgl. Abbildung 6.2).

Der Parkplatz befindet sich direkt am See, die EVS-Fallen hingen in einem relativ lichten Gebüsch. Die Baumschicht bestand aus Hainbuche (*Carpinus betulus*), Eingriffeligem Weißdorn (*Crataegus monogyna*), Moor-Birken (*Betula pubescens*) und Silber-Weiden (*S. alba*). In der Strauchschicht fanden sich Kratzbeeren, während in der Krautschicht viele Seggen (*Carex spec.*) wuchsen. Zusammen mit der Tatsache, dass der Untergrund bei allen Besuchen morastig war, teilweise sogar noch Wasser stand, deutet alles darauf hin, dass es sich um einen Erlenbruch handelt, der (bezogen auf die

6. Vorstellung der Standorte

Pflanzengesellschaft) aber nicht genauer bestimmt wurde.

Auch der Standort am Klärwerk war durch einen feuchten Untergrund geprägt und stimmt in der Baumschicht bis auf das Fehlen von Moor-Birken mit der Baumschicht des Standortes Parkplatz überein. Die Krautschicht wurde von Einjährigem Rispengras (*Poa annua*) dominiert, es wurde aber auch Stinkender Storchschnabel (*Geranium robertianum*), Brennnessel und Fingerkraut (*Potentilla spec.*) in relativ hoher Dichte gefunden was darauf hindeutet, dass dieser Bereich zwar feucht ist, dass dort aber selten Wasser steht.

Die dritte am Bodensee beprobte Stelle war ein Gebüsch, das sich am Rand einer BMX-Bahn befand. Der Untergrund wurde durch viel Kies, Totholz und Scherben gebildet, auf dem Spitz-Ahorn (*Acer platanoides*), Eberesche (*Sorbus aucuparia*), Rosskastanie (*Aesculus hippocastanum*), Berg-Ahorn (*A. pseudoplatanus*) und Birke (*Betula spec.*) wuchsen. Die Krautschicht wurde dominiert von Efeu (*Hedera helix*), aber auch Kratzbeere und Eingriffeliger Weißdorn wurden bestimmt. Der Standort war bei allen Besuchen trocken und anhand der vorhandenen Vegetation ist zu vermuten, dass dort nie stehendes Wasser zu finden ist.

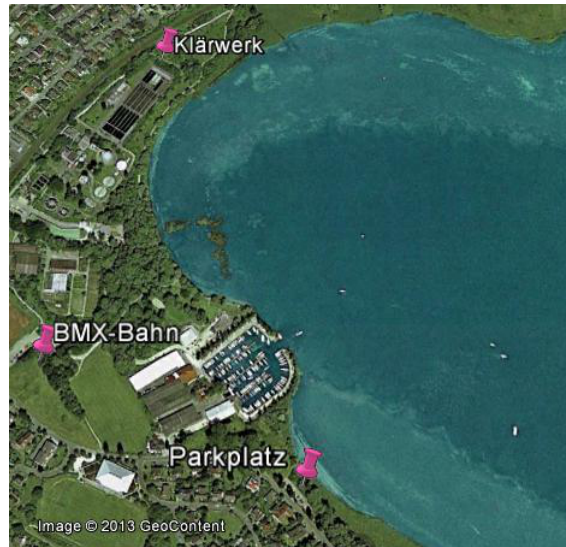


Abbildung 6.2.: Die Standorte am Bodensee (Bild aus [Google Inc., 2003])

6.1.2. Bayern

In Bayern wurden an drei verschiedenen Großstandorten in allen Jahren des Monitorings Stechmückenfänge durchgeführt. Alle - Chiemsee, Isar und Osterseen - wurden gewählt, weil das periodische Vorhandensein eines hohen Stechmückenaufkommens bekannt war. Der Chiemsee wurde zusätzlich gewählt, weil er für Zugvögel ein wichtigen Brut-Zwischenstopp ist, zudem wird auch dort mit Larviziden gegen Stechmücken vorgegangen.

6.1.2.1. Chiemsee

Am Chiemsee wurden an den Standorten Hirschauer Bucht, Klinik Alpenhof und Campingplatz Seehäusel EVS-Traps aufgehängt (vgl. Abbildung 6.3, Tabelle 6.1). Die Untersuchungen fanden in den Jahren 2010, 2011 und 2012 statt.

Die im südlichen Bereich des Sees liegende Hirschauer Bucht ist ein Naturschutzgebiet, in dem die Tiroler Achen in den Chiemsee mündet.

Geprägt ist die Umgebende Landschaft von vielen Schilf-Flächen, die auf einen hohen Grundwasserspiegel und häufige Überflutung dieser Stellen hindeuten. Der Standort selbst zeichnet sich durch das Vorhandensein von Schwarz- und Grau-Erlen (*Alnus incana*), Silber-Weiden (*Salix alba*), Bastard-Schwarz-Pappeln (*Populus x canadensis*) und Stiel-Eichen (*Quercus robur*) in der Baumschicht, Kratzbeeren, Seggen, Brennnesseln, Indischem Springkraut und Schilfrohr (*Phragmites australis*) in der Krautschicht aus. In der Strauchschicht waren viele junge Hainbuchen und Hopfen (*Homulus lupus*)

6. Vorstellung der Standorte

zu finden. Bei allen Arten handelt es sich um Pflanzen, die an feuchten Standorten vorkommen, vor allem die Baumschicht spiegelt die Zusammensetzung eines Erlenbruchwaldes wider.

Auch bei dem Standort Campingplatz Seehäusel handelt es sich um einen Erlenbruch, nur dass hier noch zusätzlich Eberesche, Roter Hartriegel (*Cornus sanguinea*) und Gewöhnliche Hasel (*Corylus avellana*) gefunden wurden.

Das dritte am Chiemsee beprobte Gebiet ist von Ebereschen und Birken (*Betula spec.*), sowie vereinzelt auch durch Kiefern (*Pinus sylvestris*) geprägt.

6.1.2.2. Isar

Die Isar wurde in die Untersuchung mit aufgenommen und in den Jahren 2010, 2011 und 2012 beprobt, weil es im Mündungsgebiet der Isar in die Donau noch Auwälder gibt.

Der Standort befand sich allerdings nicht im Auwald, sondern gehörte zu der Gemeinde Schiltorn bei Plattling (vgl. Tabelle 6.1).

Bei dem untersuchten Waldstück handelt es sich um einen bewirtschafteten Mischwald, der aus Feld-Ahorn (*Acer campestre*), Stiel-Eichen aber auch Tannen (*Abies spec.*) zusammengesetzt ist (vgl. Abbildung 6.4) und auf der Ortseite des Damms liegt. In der Krautschicht konnten Kratzbeeren, Echtes Springkraut (*Impatiens noli-tangere*), Brennnesseln und Gundermann (*Glechoma hederacea*) gefunden werden.

Die hier gefangenen Stechmücken sind mit hoher Wahrscheinlichkeit aus den Isarauen (auf der anderen Dammseite) zum Standort gewandert.

6.1.2.3. Osterseen

Bei den Osterseen handelt es sich um ein Netzwerk aus mehreren Seen, die alle miteinander verbunden sind und deren nördlichster See einen direkten Zufluss zum Starnberger See besitzt. Der Standort Iffeldorf befindet sich an der südlichsten Seespitze des Fohnsees (vgl. Tabelle 6.1).

Wie die anderen beiden Standorte in Bayern, so wurde auch der Standort Osterseen in allen drei Untersuchungsjahren beprobt. Die EVS-Traps wurden hier an zwei Stellen aufgehängt, die durch einen Forstweg voneinander getrennt sind.

Zum einen wurden die Fallen in einem Mischwald platziert, der einen hohen Anteil an Coniferen (Tannen) aufwies, in dem aber auch Rot-Buchen (*Fagus sylvatica*) zu finden waren. Die Krautschicht bestand aus Klee (*Trifolium spec.*), Wald-Trespe (*Bromus ramosus*), Indischem Springkraut und Gewöhnlicher Pestwurz (*Petasites hybridus*).

Bei dem gegenüberliegenden Waldstück handelte es sich um einen klassischen Erlenbruchwald, in dem bei den Untersuchungen immer einige Flächen unter Wasser standen.

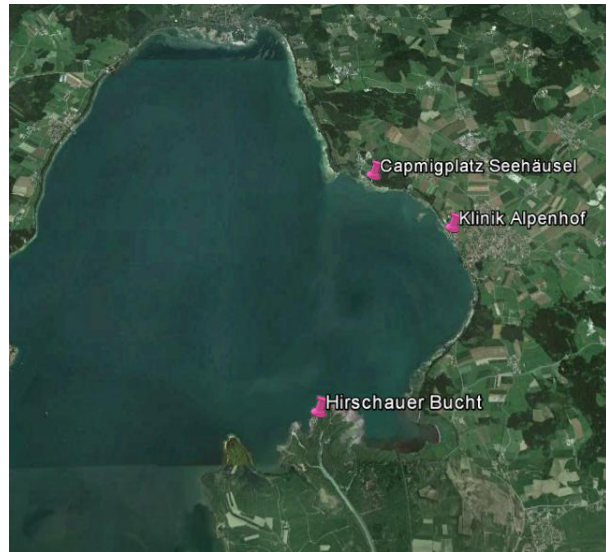


Abbildung 6.3.: Standorte am Chiemsee (Bild aus [Google Inc., 2003])

6. Vorstellung der Standorte

Es ist davon auszugehen, dass die Stechmücken, welche im Mischwald gefangen wurden aus dem Erlbruch oder den Schilfgebieten des Sees entstammen.

6.1.3. Brandenburg - Oder

An der Oder wurden die Fänge mit EVS-Traps an den Standorten Hohenwutzen und Zollbrücke in den Jahren 2011 und 2012 durchgeführt (vgl. Tabelle 6.1). Beide liegen im Bereich Oderaue in unmittelbarer Nähe zum Fluss. Wie Abbildung 6.5 zu entnehmen ist, ist die Oderaue durch viele Auwiesen geprägt.

Der Standort Zollbrücke befindet sich zwischen einer kleinen Siedlung und einer Weide, auf der sich ein kleiner Tümpel befindet. In der Baumschicht sind Silber-Weiden, Eschen, Hainbuchen und Linden (*Tilia spec.*) zu finden, die Krautschicht wird von Kratzbeeren dominiert. Neben Gewöhnlicher Hasel gibt es in der Strauchschicht auch Eingriffeligen Weißdorn.

Hohenwutzen liegt etwa 14 km nördlich des Standorts Zollbrücke. Bei diesem Standort handelt es sich um ein Waldstück, dessen Baumschicht von Schwarz-Pappeln geprägt ist. Bei der Hauptart der Krautschicht handelt es sich um Land-Reitgras (*Calamagrostis epigejos*), aber auch Brennnesseln und Schilfrohr waren zu finden.

6.1.4. Mecklenburg-Vorpommern

Die Untersuchungsgebiete Greifswald und Loissin liegen beide an der Ostsee, genauer am Greifswalder Bodden und wurden in den Jahren 2011 und 2012 aufgesucht (vgl. Tabelle 6.1).

Zwischen beiden Standorten und im Umland befinden sich viele mit Wasser gefüllte Gräben, Tümpel und kleinere Seen, was durch die direkte Lage am Meer und den damit verbundenen, erhöhten Grundwasserspiegel zu erklären ist.

6.1.4.1. Greifswald

In Greifswald wurden im Stadtteil Eldena, direkt am Strandbad an zwei Stellen EVS-Traps aufgehängt, die in der Liste allerdings als einer aufgeführt sind (vgl. Tabelle 6.1).



Abbildung 6.4.: Standort Plattling (Isar)



Abbildung 6.5.: Standorte an der Oder (Bild aus [Google Inc., 2003])

6. Vorstellung der Standorte

Zum einen wurde eine bepflanzte Baumreihe mit einem angrenzenden Gebüsch beprobt. Vor allem Spitz-Ahorn (*Acer platanoides*) und Gemeine Esche waren in der Baumschicht zu finden. Auch die Strauchschicht war von jungen Spitz-Ahorn-Bäumen geprägt.

Der andere Standort in Greifswald befand sich hinter dem Deich, direkt am Meer. Es handelte sich um ein Waldstück, dessen Baumschicht von Schwarz-Pappeln dominiert wurde. Ansonsten waren noch Gewöhnliche Hasel und Gemeine Esche zu finden. Im Gegensatz zum ersten Standort ist davon auszugehen, dass dieser häufiger unter Wasser steht.

6.1.4.2. Loissin

Vor allem Gemeine Eschen und Hainbuchen waren am Standort Loissin in der Baumschicht zu finden. Die Krautschicht des lichten Wäldchens bestand vorwiegend aus Echtem Springkraut und Flatter-Binsen (*Juncus effusus*). Auch Lilien wuchsen auf dem feuchten Boden.

Wie in Abbildung 6.6 zu erkennen ist, befanden sich in diesem Waldstück häufiger kleinere Tümpel.

6.1.5. Rheinland-Pfalz

6.1.5.1. Alsheim

Der Standort Alsheim befindet sich in der Nähe eines Sees, der in die Untersuchung mit aufgenommen wurde, nachdem es dort Meldungen über das Vorhandensein vieler *Culex*- und *Culiseta*-Mücken gab.

Es handelt sich um eine Fläche, die sich zwischen Schrebergärten und Weinbergen befindet. In unmittelbarer Nähe an den Fallenstandort liegt ein See, der vermutlich als Brutstätte der dort vorkommenden Stechmücken dient (vgl. Abbildung 6.1).



Abbildung 6.6.: Standort Loissin

6.1.5.2. Haßloch

Der bei Haßloch in Jahren 2011 und 2012 beprobte Bruchwald ist ein Gebiet, in dem die KABS die Stechmückenbekämpfung durchführt (vgl. Tabelle 6.1).

Er besitzt keinen direkten Anschluss an den Rhein, wird aber von vielen Gräben durchzogen.

Die Bildung der vielen kleinen Tümpel auf dem morastigen Untergrund findet nach der Schneeschmelze im Frühjahr und später durch Regenfälle statt. Meist jedoch kommt es vor allem zu Beginn der Stechmückensaison zu einem vermehrten Stechmückenaufkommen, wobei es sich in erster Linie um Frühjahrsarten handelt.

6.1.6. Hessen

6.1.6.1. Kühkopf

Das Referenzgebiet der KABS - das Gebiet Kühkopf-Knoblochsau - wurde ebenfalls in die Untersuchung der Jahre 2011 und 2012 mit einbezogen (vgl. Tabelle 6.1).

Bei diesem Standort handelt es sich (wie auch bei den Gebieten um Karlsruhe) um eine typische Auevegetation, wie sie auch schon in Kapitel 2.3.2) beschrieben wurde. Obwohl zum Gebiet der KABS gehörend, findet im Naturschutzgebiet Kühkopf-Knoblochsau keine bzw. nur eine sehr eingeschränkte Stechmückenbekämpfung statt, da es ein sehr großes Schilfgebiet enthält, welches Brutraum für viele Vogelarten bietet. Da in großen Teilen keine Bekämpfung durchgeführt wird, dient der Kühkopf als Referenzgebiet für die KABS.

6.1.6.2. Strüth

Der Standort Strüth wurde lediglich im Jahr 2012 beprobt, weil sich Anwohner bei der KABS über ein hohes Stechmückenaufkommen beschwert hatten. Die Fallen wurden auf einem alten Bauernhof, in der Nähe einer Sickergrube angebracht (vgl. Tabelle 6.1).

6.1.7. Sachsen-Anhalt

6.1.7.1. Drömling

Der Drömling ist ein großer Naturpark, der sich am Mittellandkanal befindet (vgl. Tabelle 6.1). Der zur Beprobung gewählte Standort liegt im westlichen Teil des Parks, in unmittelbarer Nähe zur niedersächsischen Bundeslandgrenze.

Er wurde im Jahr 2011 beprobt, da es dort besonders viele Frühjahrs- und Sommermückenarten geben sollte. Allerdings war das Wäldchen, das beprobt wurde, sehr trocken, der Baumbestand aufgeforschet, sodass beschlossen wurde, keine weiteren Untersuchungen an diesem Standort vorzunehmen.

6.1.7.2. Elbe

Vor allem Gemeine Eschen aber auch einige Stieleichen waren in der Baumschicht des Standorts Elbe zu finden, während die Krautschicht von Brennnesseln und Segen geprägt war.

Es wurde ein Bereich gewählt, der an einer stark mäandrierenden Stelle des Flusses liegt (vgl. Tabelle 6.1, Abbildung 6.7).

Zudem ist der Auwald von vielen Gräben durchzogen, ebenso sind zahlreiche Tümpel zu finden, die als Brutstätten verschiedener Arten genutzt werden können.



Abbildung 6.7.: Standort Elbe (Bild aus [Google Inc., 2003])

6.2. Gravid-Trap-Standorte

Die Gravid-Traps wurden in drei Bundesländern eingesetzt, wobei ein Schwerpunkt auf dem nördlichen Baden-Württemberg, genauer der Metropolregion Rhein-Neckar lag.

6.2.1. Hauptstandorte

Da die Gravid-Trap Standorte alle zwei bis drei Tage zum Wechseln der Netze aufgesucht wurden, wurden zumindest die Standorte, die die ganze Saison beprobt wurden so gewählt, dass sie gut zu erreichen waren.

Um einen reibungslosen Ablauf zu garantieren und die Ausbeute an Mücken so hoch wie möglich zu halten, wurden die Fallen an Standorten aufgestellt, die zum einen windgeschützt lagen und sich zum anderen in der Regel in unmittelbarer Nähe zu dichtem Bewuchs (Gebüsche, Sträucher oder hohes Gras) befanden. Zudem wurden der Heuaufguss ebenso wie die Batterien einmal wöchentlich gewechselt. Defekte Fallen wurden in der Regel noch vor Ort durch funktionierende ersetzt. Die Fangnetze wurden alle zwei bis drei Tage gewechselt.

Da in Gravid-Traps ein Bruthabitat imitiert wird und die in den Fallen gefangenen Stechmückenarten vorwiegend der Gattung *Culex* angehörten, wird darauf verzichtet, die Vegetation der Standorte zu beschreiben.

Bereits im Jahr 2009 fand ein erfolgreiches Stechmückenmonitoring statt, in dem Stechmücken auf das Vorhandensein von Viren untersucht wurden und das Sindbis-Virus nachgewiesen werden konnte [Jöst, 2010]. Da diese Untersuchung fortgeführt werden sollte, wurden die entsprechenden Gravid-Trap-Standorte in Großsachsen und Weinheim übernommen (vgl. Tabelle 6.1). Beide Stellen befinden sich in Gärten, wobei es sich um einen in der Stadt gelegenen Garten handelt, während der andere am Waldrand in Hanglage zu finden ist. Sowohl Großsachsen als auch Weinheim wurden von 2010 bis 2012 untersucht.

Im Jahr 2011 kam als weiterer Standort der Zoo in Heidelberg hinzu, der auch noch im Jahr 2012 beprobt wurde (vgl. Tabelle 6.1). Nachdem im Jahr 2010 acht Inkaseeschwalben an Vogel malaria verstorben waren [Stockklausner et al., 2013] wurde beschlossen, das Monitoring auch auf das Vorhandensein von Vogel malaria-Erreger hin zu erweitern.

Im Zoo wurden fünf Fallen aufgestellt: zwei bei den Hundezwingern und jeweils eine am Elefanten-Gehege, am Yellow-Stone-See und im Gehege der Inka-Seeschwalben (vgl. Abbildung 6.8).



Abbildung 6.8.: Die Fallenstandorte am Zoo (Bild aus [Google Inc., 2003])

6.2.2. Weitere Standorte

Aufgrund einer angegliederten Studie wurden im Jahr 2012 noch 12 weitere Standorte hinzugezogen, die allerdings nur von Ende Juli bis Ende August beprobt wurden.

So wurden in Baden-Württemberg neben Großsachsen, Heidelberg und Weinheim auch noch Hemsbach, Neckargerach und Sandhausen untersucht (vgl. Tabelle 6.1).

In Rheinland-Pfalz wurden Gravid-Traps in Bad Dürkheim, Bobenheim-Roxheim, Dirmstein, Mettenheim, Neustadt an der Weinstraße und Römerberg aufgestellt (vgl. Tabelle 6.1).

Zusätzlich wurden in diesem Zeitraum noch in Hessen in den Ortschaften Beerfelden, Eberstadt und Mümling-Grumbach Stechmücken gesammelt (vgl. Tabelle 6.1).

Als Standorte wurden dicht bewachsene Stellen gewählt, sodass die Gravid-Traps in hohes Gras oder in Gebüsch gestellt werden konnten. Es wurde darauf geachtet, dass mögliche Brutplätze bereits vorhanden waren, weshalb die Fallen zum Teil auf oder direkt an Friedhöfen platziert wurden.

6.3. BG-Trap-Standorte

Die BG-Trap-Standorte wurden im Rahmen des deutschlandweiten Stechmückenmonitorings, welches durch das Umweltbundesamt finanziert wird, um invasive Stechmückenarten nachzuweisen, eingesetzt. Es wurden nur einige Individuen, welche im Bereich um Hamburg, Niedersachsen und Schleswig-Holstein von Mitarbeitern des BNI gesammelt wurden, in diese Untersuchung einbezogen.

Die BG-Traps befanden sich im Großbereich Hamburg an den Standorten Hamburg-Ohlsdorf, Hamburg-Ohlstedt, Hamburg-Poppenbüttel und Stelle-Ashausen.

Zudem wurden noch in Schleswig-Holstein die Standorte Warwerort bei Büsum (Dithmarschen), das Gut Wulksfelde (Tangstedt) und Wyk auf Föhr beprobt.

Die Standorte wurden von den Mitarbeitern des BNI im Rahmen des vom Umweltbundesamt finanzierten Stechmückenmonitorings gewählt und betreut. Die Koordinaten können Tabelle 6.1 entnommen werden.

6. Vorstellung der Standorte

Bundesland	Standort	Koordinaten	Anmerkung	Untersuchte Jahre
Baden-Württemberg	Bodensee 1+3	N 47° 43', E 08° 59'	EVS-Trap, Mettnau Parkplatz + Klärwerk	2010-2012
	Bodensee 2	N 47° 43', E 08° 58'	EVS-Trap, Mettnau BMX-Bahn	2010-2012
	Großsachsen	N 49° 31', E 08° 40'	Gravid-Trap	2010-2012
	Heidelberg	N 49° 24', E 08° 39'	Gravid-Trap, Zoo	2011-2012
	Hemsbach	N 49° 35', E 08° 39'	Gravid-Traps	2012
	Karlsruhe 1	N 49° 09', E 08° 23'	EVS-Trap, Insel Rott	2010-2012
	Karlsruhe 2	N 49° 02', E 08° 18'	EVS-Trap, Knielinger See	2011
	Karlsruhe 3	N 49° 11', E 08° 25'	EVS-Trap, Russheimer Altrhein	2010-2012
	Karlsruhe 4	N 49° 05', E 08° 30'	EVS-Trap, Stutensee-Staffort	2010
	Neckargerach	N 49° 23', E 09° 04'	Gravid-Trap	2012
	Sandhausen	N 49° 20', E 08° 39'	Gravid-Trap	2012
	Waghäusel	N 49° 15', E 08° 31'	EVS-Trap	2010-2012
	Weinheim 1	N 49° 33', E 08° 40'	Gravid-Trap	2010-2012
	Weinheim 2	N 49° 31', E 08° 40'	Gravid-Trap	2012
	Weinheim 3	N 49° 31', E 08° 38'	Gravid-Trap	2012
	Weinheim 4	N 49° 34', E 08° 40'	Gravid-Trap, Nächstenbach	2012
Weinheim 5	N 49° 33', E 08° 41'	Gravid-Trap, Birkenau	2012	
Bayern	Chiemsee 1+2	N 47° 51', E 12° 31'	EVS-Trap, Hirschauer Bucht + Turm	2010-2012
	Chiemsee 3	N 47° 53', E 12° 31'	EVS-Trap, Klinik Alpenhof	2010-2012
	Chiemsee 4	N 47° 45', E 12° 31'	EVS-Trap, Campingplatz Seehäusel	2010-2012
	Isar	N 48° 47', E 12° 55'	EVS-Trap, Schiltorn (Plattling)	2010-2012
	Osterseen 1+2	N 47° 46', E 11° 18'	EVS-Trap, Nadelwald + Pappelwald (Iffeldorf)	2010-2012
Brandenburg	Oder 1	N 52° 47', E 14° 14'	EVS-Trap, Zollbrücke	2011-2012
	Oder 2	N 52° 51', E 14° 7'	EVS-Trap, Hohenwutzen	2011-2012
Hamburg	HH-Ohlsdorf	N 53° 43', E 10° 02'	BG-Trap	2012
	HH-Ohlstedt	N 53° 41', E 10° 08'	EVS-Trap	2012
	HH-Poppenbüttel	N 53° 39', E 10° 05'	BG-, EVS-Trap	2012
	Stelle-Ashausen	N 53° 21', E 10° 06'	BG-Trap	2012
Hessen	Beerfelden	N 49° 33', E 08° 57'	Gravid-Trap	2012
	Eberstadt	N 49° 48', E 08° 38'	Gravid-Trap	2012
	Kühkopf	N 49° 49', E 08° 24'	EVS-Trap	2011-2012
	Mümling-Grumbach	N 49° 46', E 08° 59'	Gravid-Trap	2012
	Strüth	N 50° 08', E 07° 53'	EVS-Trap	2012
Mecklenburg-Vorpommern (Ostsee)	Greifswald 1+2	N 54° 05', E 13° 27'	EVS-Trap, Eldena+Deich	2011-2012
	Loissin	N 54° 07', E 13° 30'	EVS-Trap	2011-2012
Rheinland-Pfalz	Alsheim	N 49° 45', E 08° 18'	EVS-Trap	2010-2012
	Bad-Dürkheim	N 49° 27', E 08° 09'	Gravid-Trap	2012
	Bobenheim-Roxheim	N 49° 34', E 08° 21'	Gravid-Trap	2012
	Dirmstein	N 49° 34', E 08° 14'	Gravid-Trap	2012
	Haßloch	N 49° 18', E 08° 17'	EVS-Trap	2010-2011
	Mettenheim	N 49° 44', E 08° 49'	Gravid-Trap	2012
	Neustadt a. d. Weinstraße	N 49° 22', E 08° 08'	Gravid-Trap	2012
	Römerberg 1	N 49° 17', E 08° 24'	Gravid-Trap	2012
	Römerberg 2	N 49° 17', E 08° 23'	Gravid-Trap	2012
	Römerberg 3	N 49° 16', E 08° 24'	Gravid-Trap	2012
	Römerberg 4+5	N 49° 17', E 08° 25'	Gravid-Trap	2012
	Waldsee	N 49° 23', E 08° 26'	Exhauster	2012
	Sachsen-Anhalt	Drömling	N 52° 26', E 11° 06'	EVS-Trap
Elbe		N 51° 51', E 12° 26'	EVS-Trap	2010-2012
Schleswig-Holstein	Warwerort	N 54° 08', E 08° 55'	BG-Trap	2012
	Wulksfelde	N 53° 43', E 10° 06'	BG-Trap	2012
	Wyk	N 54° 41', E 08° 33'	BG-Trap	2012

Tabelle 6.1.: Übersicht über die untersuchten Fallenstandorte

7. Vorbereitung der Proben

7.1. Bestimmung der Stechmücken

Soweit es möglich war, wurden die Stechmückenweibchen zunächst anhand morphologischer Merkmale auf die Art genau bestimmt. Zur Klassifizierung der Spezies wurden folgende Bestimmungsschlüssel herangezogen:

- [Becker et al., 2010]
- [Mohrig, 1969]
- [Schaffner et al., 2001]

Da die Unterscheidung der Weibchen der Arten *Culex p. pipiens*, *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* und *Cx. torrentium* anhand morphologischer Charakteristika nicht möglich ist, wurden Angehörige dieser Schwesterarten später mittels einer taxonomischen PCR unterschieden (vgl. Kapitel 10).

Um die Laboruntersuchungen zu erleichtern und die Probenzahl zu verringern, wurden die Stechmücken in Pools sortiert. Jeder Pool bestand aus bis zu 25 Individuen einer Art, die alle am selben Tag und am selben Standort gefangen wurden. Die Individuen eines Pools wurden gemeinsam in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben.

Aufgrund der Tatsache, dass die Stechmücken in einer anderen Untersuchung auch auf das Vorhandensein unterschiedlicher Viren getestet werden sollten, wurde die Bestimmung auf einer gekühlten Unterlage durchgeführt. Die Kühlvorrichtung bestand aus einer offenen, mit Trockeneis befüllten Styroporbox, auf die eine weiße Fließe gelegt wurde, auf welcher die Individuen bestimmt wurden. Um den Kontrast zu erhöhen (etwa um weiße Ringe an den Beinen besser erkennen zu können) wurde z. T. zusätzlich eine schwarze Unterlage unter die zu bestimmenden Stechmücken gelegt. War es nicht möglich zur Bestimmung relevante Merkmale mit bloßem Auge zu erkennen, wurden eine Lupe oder ein Binokular (Bresseler, 40-fache Vergrößerung) verwendet.

Bis zur weiteren Verarbeitung im Labor wurden die Stechmücken bei mindestens -20°C bis -40°C im Gefrierschrank, teilweise auch in Flüssigstickstoff (-196°C) aufbewahrt.

7.2. Homogenisierung der Stechmücken

Damit im Weiteren die Stechmücken-DNA untersucht werden konnte, mussten die Mücken zunächst homogenisiert werden.

Zu jedem Stechmückenpool wurden 500 µl DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma Aldrich)), mit 10% Hitze-inaktiviertem fötalem Rinderserum, 100 U/ml Penicillin, 10 µg/ml Streptomycin und 2,5 µg/ml Amphotericin B) und 2 Stahlkügelchen (stainless steel beads, 5 mm, Qiagen) gegeben. Bei 50 Oszillationen/s wurden die Stechmücken im TissueLyser (Qiagen) zerkleinert.

7. Vorbereitung der Proben

Das Homogenat wurde 1 min bei 8000 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet verworfen. Ein Teil des Homogenats wurde direkt für die Nucleinsäuren-Extraktion verwendet, der Rest wurde eingefroren und für mögliche spätere Zellkultur-Untersuchungen aufbewahrt.

7.3. Extraktion der Nucleinsäuren

Die Extraktion der Nucleinsäuren wurde mit Hilfe des QiAmp viral RNA-kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt [QIA, 2005, Spin Protocol]. Diese Säulchen-Extraktion besteht aus mehreren Teilschritten:

Lyse: Zunächst müssen die Zellen lysiert werden, weshalb vom Homogenat sofort 140 µl in 560 µl AVL-Puffer (+carrier-RNA) überführt werden. Man vortext die Lösung für einige Sekunden und lässt sie dann 10 min bei Raumtemperatur inkubieren. Anschließend werden jeweils 560 µl Ethanol (96-100%) hinzugegeben und die Lösung wird erneut mit Hilfe eines Vortex gemischt.

Bindung: Im Anschluss an die Lyse sollen die freigesetzten Nucleinsäure an die Matrix der Extraktions-Säule binden. Hierzu werden 630 µl des Gemisches auf die Extraktions-Säule gegeben und 1 min bei 8000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und die Säule auf ein neues Extraktions-Tube gesteckt. Dieser Schritt wird einmal wiederholt. Die Nucleinsäuren haben nun an die Matrix gebunden, der Durchfluss kann wieder verworfen werden.

Waschen: In diesem Schritt werden die extrahierten Nucleinsäuren gewaschen. Zunächst werden 500 µl AW1 (Waschpuffer 1) auf die Säule gegeben und die Proben 1 min bei 8000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und das Säulchen auf ein neues Extraktions-Tube gesteckt. Auch dieser Schritt wird wiederholt, allerdings verwendet man nun AW2 (Waschpuffer 2) anstelle von AW1. Im Anschluss werden die Proben noch 1 min bei 20000 x g zentrifugiert, um zu gewährleisten, dass keine Flüssigkeit mehr an der Matrix haftet. Wieder wird das Extraktions-Tube mit möglichem Durchfluss entsorgt und das Säulchen auf ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt.

Eluieren: 60 µl auf 70°C erhitzter AVE-Puffer werden auf die Säulchen-Matrix gegeben und 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Probe 1 min bei 8000 x g zentrifugiert. Die eluierten Nucleinsäuren befinden sich als Durchfluss im Reaktionsgefäß.

Für die anstehenden PCRs wurde von jeder Probe ein 20 µl Aliquot auf eine 96-Well-Platte vorgelegt. Jede Platte beinhaltete 68 Proben, die alle in einem PCR-Lauf eingesetzt werden konnten.

7.4. TOPO-Klonierung mit anschließender MiniPräp

Die TOPO-Ligation (Klonierung) ist eine Möglichkeit, um DNA zu vervielfältigen. Diese Technik wurde genutzt, um die kurzen Amplifikate der Real-Time PCRs mittels Sequenzierung überprüfen zu können. Da bei der Sequenzierung die Randnucleotide der Sequenz verloren gehen können, ist es bei kurzen Nucleotidsequenzen, wie Real-Time-PCR-Amplifikaten von Vorteil, diese zunächst in einen Vektor (hier TOPO-Vektor) zu klonieren.

7. Vorbereitung der Proben

In die PCR wird hierzu nach dem Cycling ein zusätzlicher Schritt über 10 Minuten bei 72°C eingefügt, in welchem die taq-Polymerase eine zusätzliche Adenin-Base an das 3'-Ende der Amplifikate einfügt. Diese wird benötigt, damit die Amplifikate während der TOPO-Ligation in den Vektor eingebaut werden können, welcher einen entsprechend komplementären T-Überhang besitzt (vgl. Abbildung 7.1).

Im Anschluss an die Klonierung muss die DNA mittels einer MiniPräp wieder aus dem Vektor entfernt werden, damit sie sauber sequenziert werden kann.

7.4.1. TOPO-Klonierung

Für die TOPO-Ligation gibt man zu 1 µl Amplifikat 1µl Salz, 1µl TOPO-Vektor und 3 µl Wasser (der Ansatz und die Durchführung entsprechen den Angaben des Herstellers [Inv, 2012]). Die Lösung inkubiert 5 min bei Raumtemperatur und anschließend noch 5 min auf Eis. Am Ende dieses Vorgangs hat das PCR-Amplifikat (aufgrund des A-Überhangs) als Insert in den Vektor ligiert.

Für die darauf folgende Transformation werden 2 µl des Ligations-Gemisches zu 50 µl kompetenter TOP 10 Zellen gegeben und 30 min auf Eis inkubiert, damit der Vektor an die Zellen binden kann. Anschließend folgt ein Hitzeschock von 30 s bei 42°C, der dafür sorgt, dass der Vektor in die Zelle hineinwandert. Um zu verhindern, dass der Vektor durch die Zelle hindurch wandert, folgt eine Inkubation von 3 min auf Eis. Die kompetenten Zellen, welche zu diesem Zeitpunkt bereits den Vektor beinhalten, werden zu 250 µl SOC-Medium gegeben und 1 Stunde bei 37°C geschüttelt.

Da der Erfolg der Klonierung mittels Blau-/Weiß-Selektion überprüft werden soll, werden jeweils 40 µl X-Gal hinzugegeben und der gesamte Ansatz auf LB-Amp-Platten ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank aufbewahrt.

Der eingesetzte Vektor (pUC 19-Plasmid, vgl. Abbildung 7.1) trägt in seiner multiple cloning-site einen Teil des β -Galactosidase Gens ($lacZ\alpha$ -Fragment), das für die Produktion von β -Galactosidase, welche Lactose spaltet, verantwortlich ist. Der andere Teil des Gens befindet sich im Bakteriengenom der kompetenten TOPO-Zellen. Das eingesetzte X-Gal ist ein Lactose-Analog, bei dessen Abbau ein blauer Farbstoff entsteht. Befindet sich das Insert im Vektor ist das $lacZ$ -Gen inaktiviert, die β -Galactose-Produktion unterbunden und das X-Gal wird somit nicht gespalten. Kompetente Zellen, die ein Plasmid aufgenommen haben, erscheinen als weiße Kolonie auf dem Nährboden, während Zellen, bei denen die Transformation nicht erfolgreich war, als blaue Kolonie erscheinen, weil dort die Spaltung des X-Gals stattfinden kann.

Von den über Nacht gewachsenen Zellkulturen werden mit Hilfe einer Pipettenspitze jeweils mehrere weiße Klonhaufen pro Probe gepickt. Jede Spitze wird in ein mit 2 ml LB-Medium (+Amp) gefülltes Falcon gegeben, welches bei etwa 110 rpm und 37°C über Nacht in den Schüttler gestellt wird, damit die Bakterien sich weiter vermehren können.

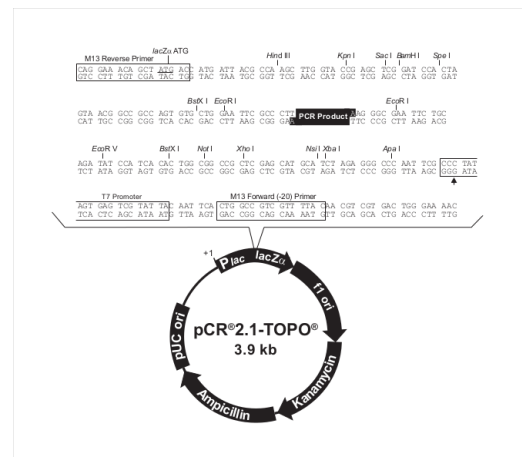


Abbildung 7.1.: map Topo-Vektor (Quelle: [Inv, 2012])

7.4.2. MiniPräp

Nachdem die Bakterienkulturen mit dem Insert gut gewachsen sind und dieses somit vermehrt haben, wird die eingefügte DNA wieder aus dem Plasmid entfernt. Diese Aufreinigung wurde mit Hilfe des Fast Plasmid Mini Kits von Prime nach Angaben des Herstellers durchgeführt [5PR, 2007].

Hierzu werden der Übernachtskultur jeweils 1,5 ml entnommen, in ein Reaktionsgefäß gegeben und abzentrifugiert. Während der Überstand verworfen wird, werden zum Pellet 400 µl kalte „complete lysis solution“ gegeben und das Pellet mit Hilfe eines Vortex gelöst. Die Lösung wird im Anschluss 3 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann wird das Lysat auf ein Aufreinigungssäulchen gegeben und 30-60 s zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und das Säulchen, mit der an die Säulchenmatrix gebundenen DNA auf ein neues Tube gesteckt. Zur Reinigung der DNA werden 400 µl „Wash-Buffer“ auf die Matrix gegeben und 30-60 s zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen, das Säulchen auf ein neues Tube gesteckt und die DNA durch 30-60 s Zentrifugation getrocknet. Erneut wird der Durchfluss verworfen und die Säule auf ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt. Die aufgereinigte DNA wird durch Zugabe von 50 µl Elutions-Buffer und 30-60 s Zentrifugation von der Matrix gelöst und befindet sich nun im Durchfluss.

8. PCRs

Für die vorliegende Arbeit wurden drei Multiplex-Real-Time PCRs entwickelt. Da es das Ziel der Studie war, Stechmücken auf das Vorhandensein von Nematoden, insbesondere *Dirofilaria immitis* und *D. repens* zu untersuchen, wurden zunächst Panfilarien Primer verwendet [Schmidt-Chanasit, 2010, unveröffentlicht]. Nachdem im Sommer 2010 mehrere Inka-Seeschwalben im Heidelberger Zoo an Vogel malaria verstarben, wurde das Screening auf Haemosporidien zu erweitern. Hierzu wurde die Multiplex-Real-Time PCR „FilaHaem“ entwickelt.

Die in dieser PCR verwendeten Primer-Grundlage für die Nematoden waren Panfilarien-Primer, mit deren Hilfe man zwar Nematoden bzw. Filarien im Allgemeinen nachweisen kann, die allerdings nicht in der Lage sind, einzelne Arten voneinander zu unterscheiden. Für den Nachweis dreier humanpathogener Filarien-Arten wurde eine zusätzliche PCR („LupImmRep“) entwickelt, mit deren Hilfe man *D. immitis*, *D. repens* und *Onchocerca lupi* nachweisen kann.

Des Weiteren wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Molekulare Entomologie des Bernhard-Nocht-Institutes für Tropenmedizin in Hamburg, insbesondere mit Martin Rudolf, eine taxonomische PCR entwickelt, um die Culex-Arten *Cx. p. pipiens*, *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* und *Cx. torrentium* zu unterscheiden.

8.1. Grundlegendes zur PCR

Die PCR (Polymerase-Kettenreaktion, engl.: **polymerase chain reaction**) ist eine Standardmethode der Molekularbiologie zur Vervielfältigung eines DNA-Fragments (template), die dazu dient, auch geringe Mengen DNA einer Ausgangsprobe nachweisen zu können.

Der zu vermehrende DNA-Abschnitt wird so gewählt, dass er spezifisch für den nachzuweisenden Genabschnitt ist und befindet sich zwischen zwei Oligonucleotid-Primern, welche komplementär zu den Strängen der Ziel-DNA sind und dementsprechend unter bestimmten Voraussetzungen an diese binden können.

Um spezifische Primer herstellen zu können, benötigt man Kenntnisse über die Nucleotidsequenzen zu beiden Seiten des zu vermehrenden Abschnittes.

Eine typische PCR besteht aus drei Schritten - Denaturierung, Annealing und Elongation - die 30 bis 50 mal wiederholt werden.

Während des Denaturierungs-Schrittes trennen sich, bei etwa 94°C, die beiden DNA-Doppelstränge der template-DNA. Daraufhin wird die Temperatur gesenkt (auf etwa 55°C), sodass die Primer die Möglichkeit haben, an die Einzelstränge zu hybridisieren (Annealing). Im anschließenden Elongations-Schritt wird die Temperatur auf 72°C erhöht, sodass die taq-Polymerase die Primer verlängern kann (in 5'-3'-Richtung), bis wieder doppelsträngige DNA vorliegt. Da die Verlängerung der Primer entlang der template-DNA geschieht, liegt am Ende des Elongations-Schrittes eine exakte Kopie der Ausgangs-DNA vor. Angesichts der Tatsache, dass die Elongation am Forward- und am Reverse-Strang der

template-DNA stattfindet, verdoppelt sich mit jedem Zyklus die template-Menge [Mülhardt, 2009, S. 84-96].

8.1.1. Primer-Design

Die PCR beruht auf der Vermehrung von DNA-Fragmenten, die zwischen zwei Primersequenzen liegen. Will man eine spezifische PCR entwickeln, so müssen die Oligonucleotid-Sequenzen von Forward- und Reverse-Primer (F- und R-Primer) entsprechend spezifisch für den nachzuweisenden Organismus sein.

Bei der Wahl der Primer-Sequenzen sollte man zunächst darauf achten, ein sogenanntes multi-copy-gene, also ein Gen, das in einer hohen Kopienzahl im Organismus vorliegt, als Grundlage dient. Im Optimalfall wird eine Sequenz der nachzuweisenden Art ausgewählt, von der es viele Referenz-Sequenzen (der nachzuweisenden Art aber auch nah verwandter Arten) in den entsprechenden Datenbanken, wie etwa „BLAST“ (Basic Local Alignment Search Tool, [Gertz, 2005]) zu finden gibt. Diese Sequenzen können nun zu einem Alignment zusammengefügt werden, welches unter anderem als Grundlage für das Design von Primern herangezogen werden kann. Alignments werden in der Regel mit Hilfe von Computerprogrammen, wie CLC-Sequence-Viewer [CLC, 2013] oder BioEdit [Hall, 1999] erstellt. Bei einem Alignment werden anhand bestimmter Algorithmen viele Sequenzen des gleichen Genabschnittes so platziert, dass die Regionen mit den meisten Übereinstimmungen untereinander stehen. Auf diese Weise ist zu erkennen, welche Stellen des gewählten Genabschnittes innerhalb einer Art gut konserviert sind und welche nicht. Für artspezifische Primer wird man die Oligonucleotid-Sequenzen so wählen, dass sie in Regionen liegen, die innerhalb einer Art gut konserviert sind, in denen es also so gut wie keine Basenaustausche zwischen den Sequenzen einzelner Individuen gibt, die aber Unterschiede zu anderen Arten aufweisen. Des Weiteren sollten die Sequenzen einzigartig sein und an keiner anderen Stelle im Genom oder in anderen Organismen vorkommen. Dies lässt sich überprüfen, indem man nach den gewählten Sequenzen in „BLAST“ suchen lässt.

Der Wahl von Primersequenzen liegen einige Regeln zu Grunde, welche im Folgenden aufgeführt und erläutert werden und welche im Wesentlichen [Raymaekers et al., 2009], [Reineke, 2004, S. 90-94] und [Mülhardt, 2009] entnommen sind.

Die Länge der Primer-Oligonucleotidsequenzen sollte zwischen 18 - 30 Basen betragen, denn eine kürzere Sequenz würde eine stabiler Hybridisierung der Primer an die template-DNA gewährleisten. Der Gehalt an Guanin- und Cytosin-Nucleotiden sollte zwischen 40 und 60% betragen. Sowohl die Länge der Primer als auch der GC-Gehalt beeinflussen die Schmelztemperatur (T_m) der Primer, die wiederum für die zu wählende Annealing-Temperatur wichtig ist. Für eine erste Einschätzung der Schmelztemperatur lässt sich folgende Formel verwenden:

$$T_m = 4 * (\text{Anzahl G bzw. C}) + 2 * (\text{Anzahl A bzw. T})$$

Die genaue Schmelztemperatur wird vom Hersteller der Oligonucleotide angegeben. Sie sollte zwischen 55 und 80°C betragen, damit eine ausreichend hohe Annealing-Temperatur gewählt werden kann. Oft ist es nicht möglich (vor allem bei Multiplex-PCRs) Primer zu wählen, die die gleichen Schmelztemperaturen besitzen. In solch einem Fall muss die optimale Annealing-Temperatur empirisch ermittelt werden.

Des Weiteren sollten die Primer nicht mehr als vier gleiche Basen hintereinander besitzen, um Fehlhybridisierungen oder „Frameshifts“ (Verschiebungen des Leserasters) zu vermeiden. Auch sollten die Sequenzen so gewählt werden, dass interne Strukturen wie „Hairpins“, vermieden werden, da diese sonst die Hybridisierung der Primer an die DNA verhindern können. Zudem sollten die Primersequenzen

8. PCRs

keine Strukturen besitzen, die zu anderen Primern komplementär sind. Denn eine Hybridisierung der Primer miteinander (Primer-Dimer) hätte zur Folge, dass zu wenig Primer übrig blieben, welche mit der DNA hybridisieren könnten.

Außerdem sollte eine möglichst gute Bindung der Primer an die zu amplifizierende DNA gewährleistet sein, weshalb am 3'-Ende der Oligonucleotide ein G oder ein C liegen sollte.

8.1.2. Agarose-Gelelektrophorese

In der Agarose-Gelelektrophorese werden Nucleinsäuren nach Größe aufgetrennt. Diese Methode wird unter anderem verwendet, um zu überprüfen, ob bei einer PCR ein Fragment in der gewünschten Größe amplifiziert wurde. Das Prinzip einer Elektrophorese beruht auf der Tatsache, dass DNA-Moleküle aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppe in einem elektrischen Feld vom Minus- zum Pluspol wandern. Diese Technik wird verwendet, um DNA-Moleküle der Größe nach zu trennen.

Dabei fungiert das Agarose-Gel als eine Art Sieb, das umso feinmaschiger wird, je höher die Agarosekonzentration ist.

Bei Agarose handelt es sich um ein aus Rotalgen isoliertes, gelierfähiges Polysaccharid. Die Agarose (pulverförmig oder als Tablette) wird in einem für die Elektrophorese geeigneten, ionischen Puffer geschmolzen. Zum Erkalten wird die Agarose-Puffer-Lösung in einen Gelschlitten gegeben, der zuvor mit einem Gelkamm bestückt wurde, gegeben. Beim Erkalten wird die Agarose fest - an den Stellen, an denen sich der Kamm befunden hat, bleiben Vertiefungen im Agarosegel zurück, die auch als Taschen bezeichnet werden.

Das fest gewordene Agarosegel wird in eine Gelkammer gegeben, in die Elektrophoresepuffer (z. B. TAE-Puffer = Tris-Acetat-EDTA-Puffer) hinzugegeben wird, bis das Gel bedeckt ist. Zu den zu untersuchenden Proben wird jeweils etwas Ladepuffer gegeben, damit die DNA-Lösung, welche in etwa die gleiche Dichte besitzen, wie der Elektrophoresepuffer, nach unten sinkt, wenn sie in die Tasche pipettiert wird.

Wird nun Spannung angelegt, bewegt sich die DNA aufgrund ihrer negativen Ladung in Richtung des Pluspols, dabei wird die DNA der Größe nach aufgetrennt. In der gleichen Zeit laufen kleine DNA-Fragmente weiter als größere und anhand der Agarosekonzentration lässt sich schon beim Ansetzen des Gels die Porengröße und somit die Trennfähigkeit regulieren. Die DNA-Fragmente gleicher Größe sammeln sich an den gleichen Stellen im Gel und bilden so eine Bande, die durch Zugabe verschiedener Farbstoffe sichtbar gemacht werden kann. Der am häufigsten genutzte Farbstoff ist Ethidiumbromid, welcher in DNA interkaliert und unter UV-Licht eine orangene Färbung zeigt [Nicholl, 2002, S. 36-38], [Reineke, 2004, S. 62-69], [Mülhardt, 2009, S. 58-66].

8.1.3. Real-time quantitative PCR

Im Gegensatz zur konventionellen PCR, bei der das Amplifikat auf ein Gel aufgetragen werden muss um zu sehen, ob ein DNA-Fragment in der gewünschten Größe während der PCR amplifiziert wurde, kann man bei der Real-time quantitativen PCR direkt mitverfolgen, ob eine - im Sinne der PCR - erwünschte Amplifikation stattfindet oder nicht [Mülhardt, 2009, S. 109-114], [Reineke, 2004, S. 101-104].

Während es bei einer Gel-PCR ausreicht F- und R-Primer einzusetzen, werden bei einer Real-time-PCR zusätzlich noch fluoreszenzmarkierte Sonden verwendet, weshalb ein Cycler verwendet werden

8. PCRs

muss, der Fluoreszenz detektieren kann. Die Real-time Sonden sind - ebenso wie Primer - Oligonucleotide, deren Sequenz sich in der Regel zwischen F- und R-Primer befinden, bei denen sich allerdings sowohl am 3'- als auch am 5'-Ende ein Fluorochrom befindet.

Ausgenutzt wird hierbei der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET), der sich wie folgt erklären lässt. Ein Fluorochrom F1 kann mit Licht der Wellenlänge A1 angeregt werden und emittiert die aufgenommene Energie in Form von Licht der Wellenlänge E1. Dabei sind für jeden Fluoreszenzfarbstoff Anregungs- und Emissionsspektrum charakteristisch. Bringt man nun ein Fluorochrom F2, dessen Anregungsspektrum (A2) dem Emissionsspektrum (E1) von F1 entspricht, in ausreichende Nähe zueinander, so kann F2 mit E1 angeregt werden und gibt die aufgenommene Energie wiederum in Form von Licht der Wellenlänge E2 ab.

Zur Messung der Emission kann an unterschiedlichen Punkten angesetzt werden, in dem hier vorliegenden Fall wurde E1 gemessen. Dabei wird das erste Fluorochrom F1 als Reporter (report = berichten), F2 als Quencher (quench = löschen) bezeichnet.

Mit molecular beacons, hybridization probes und dem TaqMan-Prinzip existieren momentan drei FRET-basierte Nachweismethoden, von denen im Folgenden das TaqMan-Prinzip, da es die Grundlage der hier vorliegenden Real-time PCRs bildet, genauer erläutert wird.

Beim TaqMan-Prinzip wird, neben dem Einsatz einer fluoreszenzmarkierten Sonde, zusätzlich noch die 5'-3'-Exonuclease Aktivität der taq-Polymerase ausgenutzt [Holland et al., 1991]. Reporter und Quencher befinden sich auf demselben Nucleotid (TaqMan Sonde) und zwar am 5'- und 3'-Ende. Zusätzlich besitzt die TaqMan-Sonde noch einen Phosphatrest, der am 3'-Ende sitzt und somit die Hydroxygruppe blockiert. Ist die Sonde intakt, wird das emittierende Licht von F1 direkt vom Quencher aufgenommen. Da E1 gemessen wird, ist die vom Cycler detektierte Lichtstärke gering. Während der Hybridisierung bindet die Sonde, ebenso wie F- und R-Primer, sequenzspezifisch an die zu amplifizierende DNA. Bei der Verlängerung des DNA-Strangs trifft die Taq-Polymerase nicht nur auf die Primer, sondern auch auf die Sonde und beginnt diese zu verdrängen. Hierbei entsteht eine Y-förmige Sekundärstruktur, welche die 5'-3'-Exonuclease Aktivität der Polymerase aktiviert: die Sonde wird hydrolysiert. Dadurch, dass die Sonde geschnitten wird, geht die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher verloren. E1 wird nicht mehr vom Quencher aufgenommen, weshalb ein Anstieg dieser Fluoreszenz gemessen werden kann, welcher proportional zur Menge des hergestellten Amplifikates ist. Da Moleküle verdrängt werden, die nicht zu einhundert Prozent binden, ist das gemessene Signal spezifisch.

Für die Quantifizierung der PCR-Produkte wird nicht die absolute Amplifikatmenge gemessen, sondern es wird die Kinetik der PCR genutzt.

In den frühen Cyclen der PCR findet eine exponentielle Vermehrung der DNA statt. Reichert sich das Amplifikat an, gewinnen immer mehr störende Faktoren an Einfluss. So können etwa die Polymerase und die Nucleotide aufgrund der hohen Temperaturen Schäden davontragen oder die zur Amplifikation benötigten Primer und Nucleotide werden zu sehr verbraucht, sodass nicht mehr genügend vorhanden sind. Als Richtwert wird daher der sogenannte C_t -Wert herangezogen, welcher die Zykluszahl darstellt, bei der sich das Fluoreszenzsignal gerade deutlich vom Hintergrund abhebt, da zu diesem Zeitpunkt die Vermehrung noch exponentiell ist. Vergleicht man diesen Wert nun mit dem Wert einer Probe, bei der die Ausgangsmenge an DNA bekannt war, so kann man (mit Hilfe aus der Referenzprobe erstellter Standardkurven) auf die Ausgangsmenge der DNA in der Probe zurück- bzw. auf die nach der PCR vorhandene Template-Menge hochrechnen.

8. PCRs

Eine quantitative Bestimmung der zu Beginn vorhandenen DNA-Menge wurde in dieser Arbeit allerdings nicht durchgeführt.

8.1.3.1. Sondendesign

Die TaqMan-Sonde trägt am 5'-Ende einen Reporter-, am 3'-Ende den Quencher-Farbstoff. In Tabelle 8.1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Sondenfarbstoffe aufgeführt. Während man, entsprechend der Absorptions- und Emissionsspektren, die in der Tabelle als Reporter aufgeführten Fluorophore teilweise auch als Quencher einsetzen könnte, wurden in dieser Arbeit ausschließlich die sogenannten „Black Hole Quencher“ zum Unterdrücken des Reportersignals eingesetzt, da diese vom Hersteller so entwickelt wurden, dass sie nicht nur eine Wellenlänge, sondern einen ganzen Bereich quenchen können.

Für das Design von TaqMan-Sonden gelten im Wesentlichen die gleichen Regeln wie für das bereits beschriebene Designen von Primern (vgl. Kapitel 8.1.1 sowie [Schild,] und [Raymaekers et al., 2009]). So sollte auch die Länge von Sonden zwischen 20 und 30 Basen betragen, ebenso sollte ein GC-Gehalt von 40 bis 60% eingehalten werden. Wie auch bei Primern, so sind auch bei Sonden Bereiche mit mehr als drei Basen der gleichen Art zu vermeiden. Selbes gilt für Sequenzen, die Sekundärstrukturen wie hairpins oder Ähnliche begünstigen könnten. Natürlich ist auch darauf zu achten, dass die Sonden weder mit sich selbst oder den Primern, sondern ausschließlich mit der Zielsequenz hybridisieren können.

Des Weiteren sollte die Schmelztemperatur der TaqMan-Sonde etwa 5 bis 10°C über der T_m der Primer liegen. Beim Sonden-Template-Hybrid kommt es - im Gegensatz zum Primer-Template-Hybrid - zu keiner Extension, da die Sonde (im Gegensatz zu den Primern) nicht eingebaut, sondern durch die Exonuclease-Funktion der Polymerase hydrolysiert wird, damit es zur räumlichen Trennung von Reporter und Quencher kommen kann. Mit der höheren Schmelztemperatur der TaqMan-Sonde kann die stabilere Anbindung der Primer an das Template kompensiert werden.

Der Quencher sollte am 3'-Ende der Sonde platziert werden, da die Sondenhydrolyse nur nachgewiesen werden kann, wenn die Hydrolyse zwischen Reporter und Quencher stattfinden kann. Auch sollte ein G am 5'-Ende der Sonde vermieden werden, da dieses theoretisch das Signal des am 5'-Ende liegenden Reporters unterdrücken könnte.

Des Weiteren sollte der Strang ausgewählt werden (sofern es denn möglich ist, den komplementären Strang zu verwenden), der mehr Cs aufweist. Auch ist es von Vorteil, wenn das 5'-Ende der Sonde relativ nahe am 3'-Ende des Primers liegt.

Das Design der Primer erfolgt nach den gleichen Regeln wie auch das Design von Primern einer Gel-PCR, jedoch sollte zusätzlich darauf geachtet werden, dass das Amplifikat eine Länge von 150 bp nicht übersteigt [Schild,].

8.1.4. Multiplex-PCR

Eine Multiplex-PCR wird verwendet, um mehrere, unterschiedliche DNA-Sequenzen gleichzeitig zu amplifizieren. Die PCR als solche unterscheidet sich von einer Standard-PCR nicht, es werden lediglich (je nach Anzahl der nachzuweisenden Amplifikate) zusätzliche Primer (bei einer Real-time PCR auch Sonden) benötigt. Beim Design der Oligonucleotide sollte darauf geachtet werden, dass Sequenzen mit ähnlichen Schmelztemperaturen gewählt werden, da ansonsten die Wahl einer Annealing-Temperatur, die für alle Primer und Sonden passend ist, zu schwierig bzw. nahezu unmöglich wird.

8. PCRs

Farbstoff	chemische Bezeichnung	Typ	A	E
BHQ1	Black Hole Quencher	Q	534	480-580 (qr)
BHQ2	Black Hole Quencher	Q	579	550-650 (qr)
Cy5	Cyanin-Farbstoff	R	649	670
FAM	6-Carboxy-Fluorescein	R	488	518
HEX	Hexachloro-6-carboxy-fluorescein	R	488	556
JOE	2,7-Dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxyfluorescein	R	488	554
ROX	6-Carboxy-X-rhodamin	R	488	602
TAMRA	6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin	R	488	582

Tabelle 8.1.: Übersicht über die bei den PCRs eingesetzten Farbstoffe (R=Reporter, Q=Quencher, P=Passiver Referenzfarbstoff, A=Anregungs-, E=Emissionswellenlänge [nm], qr=quenching range)

Des Weiteren sollten die Primer keine homologen Sequenzen amplifizieren, weil es ansonsten zu Fehlannealing bei Primern und Produkten kommen kann [Mülhardt, 2009, S. 100].

8.1.5. Nested-PCR

Eine Nested-PCR, welche eine Art verschachtelte PCR darstellt, wird eingesetzt, um auch kleinste DNA-Mengen im Ausgangstemplate nachzuweisen, etwa wenn die Methode zur Extraktion der Nucleinsäuren nicht effektiv genug war oder generell davon ausgegangen werden kann, dass im Ausgangstemplate eine zum Nachweis per konventioneller PCR zu geringe Menge der nachzuweisenden Nucleinsäure enthalten ist.

Bei der Nested-PCR wird zunächst (mit entsprechenden Primern) eine PCR durchgeführt (outer), deren Amplifikat verhältnismäßig lang ist. Das PCR-Produkt wird nun als Ausgangsmaterial für eine zweite PCR (inner) eingesetzt. Die Primer für die inner-PCR werden dabei so gewählt, dass sie innerhalb der Sequenz des Amplifikats der outer-PCR liegen. Auf diese Art ist es möglich zum einen geringe DNA-Mengen nachzuweisen, zum anderen aber auch die Zahl an Fehlhybridisierungen (welche vor allem in den letzten Zyklen einer PCR auftreten können) möglichst gering zu halten, da Fehlhybridisierungen, welche während der outer-PCR entstanden sind, in der inner-PCR wieder wegfallen.

Der Nachteil einer Nested-PCR besteht allerdings darin, dass es durch das Öffnen des Reaktions tubes (um an die Amplifikate der outer-PCR für die inner-PCR zu gelangen) zu Kontaminationen und damit zu falsch positiven Ergebnissen kommen kann. Um die Kontaminationsgefahr so gering wie möglich zu halten und damit der Reaktionsansatz nicht verdampfen kann, wird der fertige Ansatz in der Regel noch mit etwas Öl überschichtet, bevor man die PCR startet.

Im Anschluss an die inner-PCR werden die Amplifikate auf ein Agarose-Gel (der entsprechenden Konzentration) aufgetragen um zu überprüfen, ob die PCR erfolgreich war. Es ist auch möglich bereits nach der outer-PCR die Amplifikate auf ein Gel aufzutragen - allerdings wird man in der Regel nur bei hohen Konzentrationen des nachzuweisenden Oligonucleotids im Ausgangstemplate Banden bekommen [Mülhardt, 2009, S. 99].

Teil III.

Ergebnisse

9. Ergebnisse der Fänge

In dem in dieser Arbeit durchgeführten deutschlandweiten Stechmückenmonitoring wurden an 42 Standorten insgesamt 143 152 weibliche Stechmücken gefangen und nach Art bestimmt. Diese wurden für die Weiterverarbeitung in 7084 Pools einsortiert, wobei immer bis zu 25 Individuen der gleichen Art, welche am selben Tag und am selben Standort gefangen worden sind zu einem Pool zusammengefasst wurden (vgl. Tabellen 9.1 und 9.2).

Anhand morphologischer Kriterien konnten 18 autochthone Stechmückenarten unterschieden werden.

Vier Pools wurden unter der Bezeichnung *Oc. cantans* / *Oc. annulipes* festgehalten, da sie weder der einen noch der anderen Art eindeutig zugeordnet werden konnten.

Zudem wurden die Schwesterarten *Cx. torrentium*, *Cx. p. pipiens*, *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* und die Hybridform *Cx. p. pipiens* x *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* zunächst unter der Bezeichnung *Cx. pipiens* / *torrentium* zusammengefasst. Die genaue Bestimmung einiger dieser Pools folgte im Labor mit Hilfe molekularbiologischer Methoden (vgl. Kapitel 10).

Art	Individuen (Pools) 2010-2012	Individuen (Pools) [%] 2010-2012
<i>Ae. cinereus</i>	5624 (293)	3,93 (4,14)
<i>Ae. rossicus</i>	40 (6)	0,03 (0,08)
<i>Ae. vexans</i>	59123 (2461)	41,30 (34,74)
<i>An. claviger</i>	561 (65)	0,39 (0,92)
<i>An. maculipennis</i> s. l.	748 (120)	0,52 (1,69)
<i>An. plumbeus</i>	501 (47)	0,35 (0,66)
<i>Cs. annulata</i>	744 (145)	0,52 (2,05)
<i>Cx. modestus</i>	2 (1)	0,00 (0,01)
<i>Cx. pipiens</i> / <i>torrentium</i>	45168 (2476)	31,55 (34,95)
<i>Cx. territans</i>	47 (6)	0,03 (0,08)
<i>Ma. richiardii</i>	227 (34)	0,16 (0,48)
<i>Oc. annulipes</i>	304 (58)	0,21 (0,82)
<i>Oc. cantans</i>	1955 (146)	1,37 (2,06)
<i>Oc. cantans</i> / <i>Oc. annulipes</i>	4 (4)	0,00 (0,06)
<i>Oc. caspius</i>	85 (10)	0,06 (0,14)
<i>Oc. communis</i>	118 (11)	0,08 (0,16)
<i>Oc. flavescens</i>	48 (8)	0,03 (0,11)
<i>Oc. geniculatus</i>	63 (12)	0,04 (0,17)
<i>Oc. punctor</i>	338 (29)	0,24 (0,41)
<i>Oc. rusticus</i>	2488 (114)	1,74 (1,61)
<i>Oc. sticticus</i>	24964 (1038)	17,44 (14,65)
Gesamt	143152 (7084)	

Tabelle 9.1.: Übersicht über Art und Anzahl der gefangenen Stechmücken

Auch die Weibchen der Arten des *Anopheles maculipennis* Komplexes können morphologisch nicht differenziert werden, weshalb diese zu „*An. maculipennis* s. l.“ zusammengefasst wurden.

9. Ergebnisse der Fänge

Insgesamt konnten also 21 Stechmückenarten, beide Biotypen von *Cx. pipiens* und Hybride zwischen diesen, identifiziert werden.

Die Fänge wurden jeweils im Frühjahr und Sommer der Jahre 2010 bis 2012 durchgeführt, wobei nicht immer alle Standorte beprobt wurden.

Abbildung 9.1 zeigt die geographische Verteilung aller in den drei Untersuchungs Jahren gesammelten Stechmückenpools. Zur besseren Übersicht wurden die Standorte entsprechend der Bundesländer zusammengefasst, wobei der Bodensee aufgrund der Entfernung zu den weiteren Standorten Baden-Württembergs getrennt von diesen in die Darstellung aufgenommen wurde. Mit 2461 und 2476 Pools und 59 123 bzw. 45 168 Individuen waren die Arten der Gattung *Culex* und die Überschwemmungsmückenart *Ae. vexans* die am häufigsten gefangenen Stechmücken. Weiterhin ist der hohe Anteil an den bayerischen Standorten von *Oc. sticticus* hervorzuheben - diese Culicidenart ist neben *Ae. vexans* die häufigste Überschwemmungsmückenart, die im Laufe der Studie gefunden werden konnte.

Im Jahr 2010 wurden 68 605 Stechmückenweibchen an 14 Standorten gefangen und in 2971 Pools sortiert. Bis auf die Standorte Großsachsen und Weinheim, die mittels Gravid-Traps beprobt wurden, wurden an allen anderen Fallenstandorten EVS-Traps verwendet. Die Fänge mittels Gravid-Trap wurden von Anfang Mai bis Mitte September durchgeführt und die Stechmücken, die an diesen Standorten gefangen wurden, alle zwei bis drei Tage abgesammelt. Die Standorte der EVS-Fänge wurden, bis auf die Standorte Waghäusel und Kühkopf, welche zwei Mal beprobt wurden, nur einmal aufgesucht.

Der Abbildung 9.2 ist zu entnehmen, dass der Großteil der gefangenen Individuen den Überschwemmungsmückenarten *Ae. vexans* und *Oc. sticticus* zuzuordnen ist, die mit 49,70% und 34,87% über die Hälfte der gesammelten Stechmücken ausmachen. Die Schwesterarten *Cx. pipiens / torrentium* machen mit 7,87% aller in 2010 gefangenen Individuen zwar nur einen relativ geringen Anteil aus. Sie haben allerdings in den Gravid-Traps in Weinheim und Großsachsen, in denen sie vorwiegend gefangen wurden, mit 4902 Individuen in 258 Pools einen Anteil von 99,7%.

Im Jahr 2011 wurde beschlossen, die geographische Ausdehnung der Untersuchung zu erweitern und auch einige Standorte in Mittel-, Ost- und Norddeutschland in das Monitoring einzubeziehen. Daher wurden zusätzliche EVS-Fallen an den Standorten Drömling, Hohenwutzen und Zollbrücke (beide an der Oder), Greifswald und Loissin aufgehängt. Des Weiteren wurde das Referenzgebiet der KABS für nicht mit Bti bekämpfte Flächen, der Kühkopf, ebenfalls neu dazugenommen und an fünf Terminen beprobt. Durch die Kooperation mit dem Heidelberger Zoo wurden ab 2011 mehrere Gravid-Traps

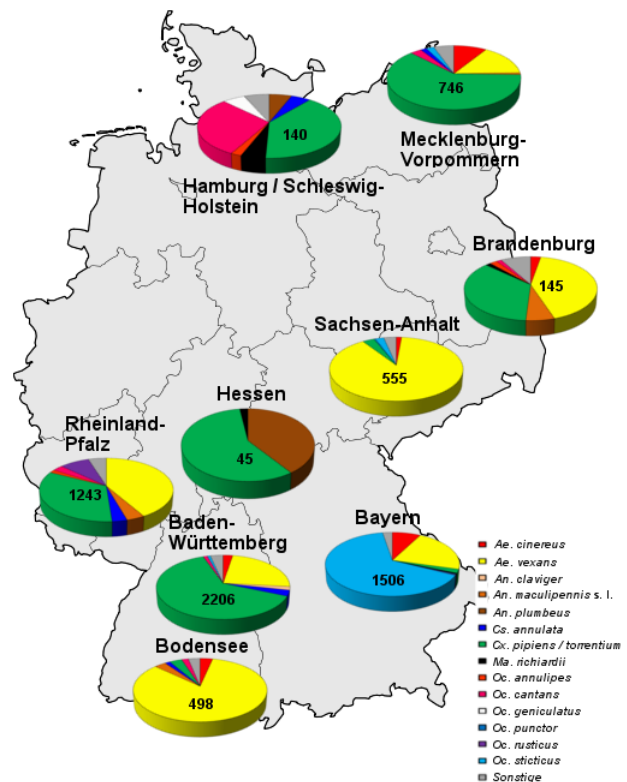


Abbildung 9.1.: Geographische Verteilung der zwischen 2010 und 2012 gesammelten Stechmückenpools

9. Ergebnisse der Fänge

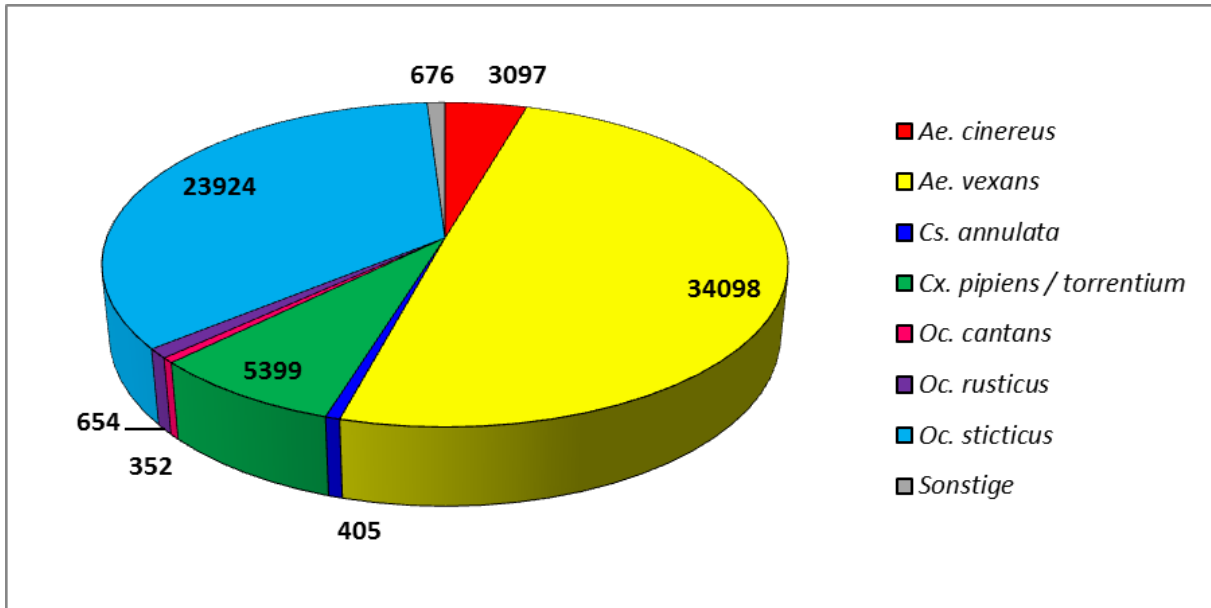


Abbildung 9.2.: Artverteilung 2010. Insgesamt wurden 68605 Stechmückenweibchen gefangen.

von Anfang Mai bis Ende September an diesem Standort aufgestellt.

An den 19 Standorten wurden 49 881 Stechmückenweibchen gefangen, die in 2379 Pools einsortiert wurden. Den Hauptteil der 20 gesammelten Stechmückenarten nehmen mit 30 811 Individuen in 1367 Pools die Schwesterarten *Cx. pipiens / torrentium* ein. Die Überschwemmungsmückenart *Ae. vexans* (12 244 Individuen in 510 Pools) und die Art *Ae. cinereus* (2232 Individuen in 110 Pools) machen zusammen zwar auch beinahe 30% aus, dennoch sind es lediglich nur halb so viel, wie *Cx. pipiens / torrentium* (etwa 62%) (vgl. Abbildung 9.3).

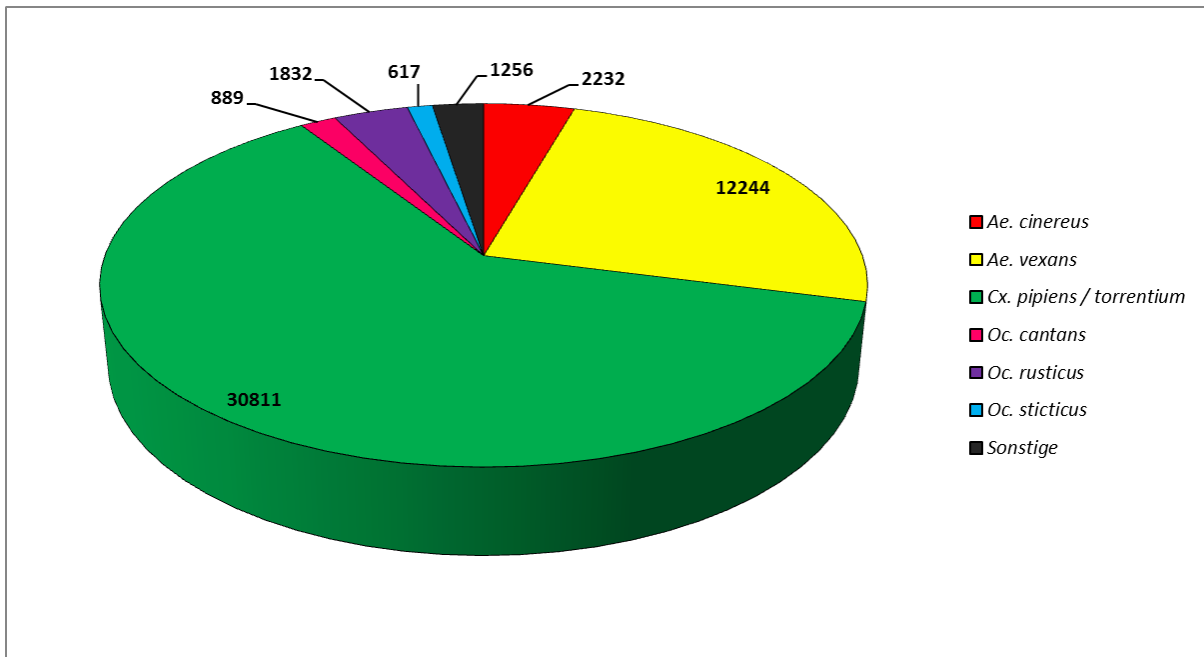


Abbildung 9.3.: Artverteilung 2011. Es wurden insgesamt 49881 Stechmückenweibchen gefangen

Im letzten Jahr des Monitorings, 2012 wurden an 38 Standorten 24 666 Stechmücken gefangen, die in 1734 Pools einsortiert wurden (vgl. Abbildung 9.4). Als neue Fallenstandorte kamen in Schleswig-

9. Ergebnisse der Fänge

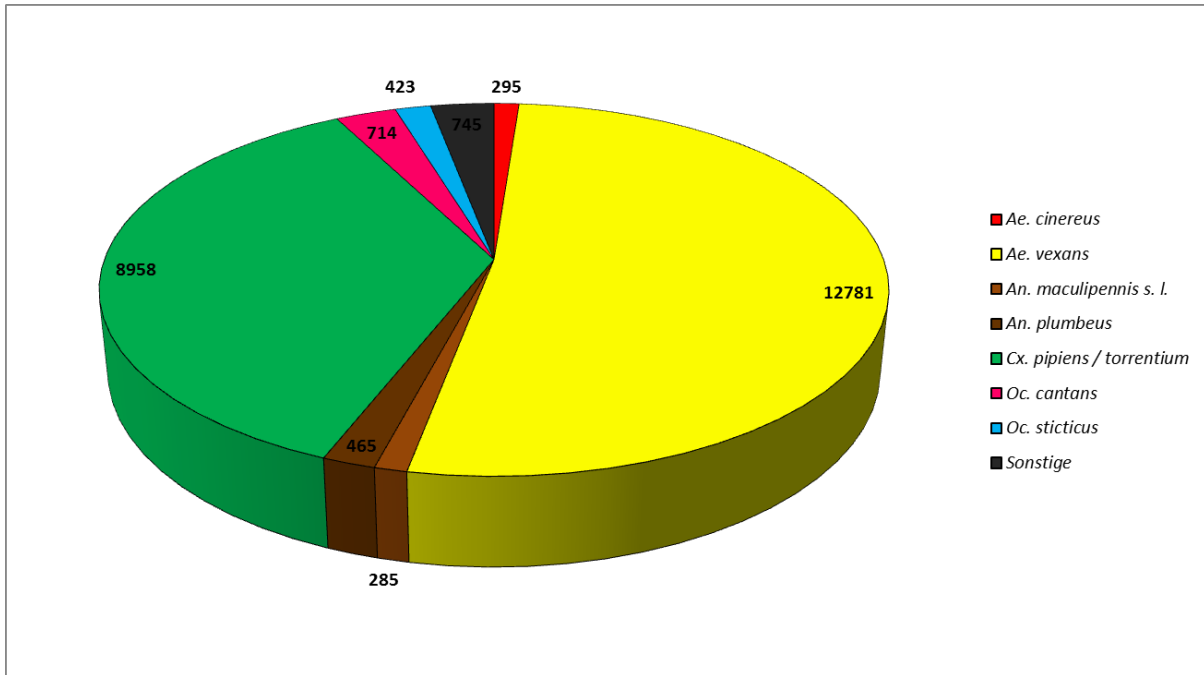


Abbildung 9.4.: Artverteilung 2012. Insgesamt wurden 24666 Stechmückenweibchen gefangen

Holstein Warwerort, Wulksfelde und Wyk ebenso wie in Hamburg bzw. im Landkreis Hamburg Ohlstedt, Ohlsdorf, Poppenbüttel und Stelle-Ashausen hinzu, die alle von den Hamburgern Kollegen des BNI beprobt wurden, wobei die Beprobung größtenteils mit BG-Traps aber auch mit EVS-Traps, Gravid-Traps und human bait durchgeführt wurde.

Außerdem kamen im Rahmen einer angegliederten Studie von Dr. Hanna Jöst noch 12 Gravid-Trap Standorte (Bad Dürkheim, Beerfelden, Bobenheim-Roxheim, Dirmstein, Eberstadt, Hemsbach, Mettenheim, Mümling-Grumbach, Neckargerach, Neustadt an der Weinstraße, Römerberg und Sandhausen) hinzu, die vier Wochen lang beprobt wurden (von Ende Juli bis Ende August).

Des Weiteren wurden noch einmalige Fänge in Waldsee (Exhauster) und Strüth (EVS-Traps) durchgeführt.

Ansonsten waren die EVS-Standorte bis auf den Bruchwald bei Haßloch, der nicht mehr untersucht wurde, die selben wie im Vorjahr.

Es wurden insgesamt 18 Stechmückenarten gefangen, wobei nebe den *Culex p. pipiens* und dem Biotypen *molestus* auch erstmals 4 Hybride dieser Biotypen, *Cx. p. pipiens* x *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus*, nachgewiesen werden konnten.

Etwas über die Hälfte (51%) der gefangenen Stechmückenweibchen gehören mit 12781 Individuen in 578 Pools der Überschwemmungsmückenart *Ae. vexans* an. Auch hier haben die Schwesterarten *Cx. pipiens / torrentium* mit 8958 Individuen in 803 und über 36% einen großen Anteil an der gesamten Artzusammensetzung.

9.1. EVS-Standorte

Im Folgenden werden die Fallenfänge der EVS-Standorte vorgestellt. Vollständige Listen eines jeden Fangjahres, inklusive aller Standorte mit den dazugehörigen Ergebnissen der Fänge findet sich im Anhang (vgl. Tabellen 19.3, 19.4, 19.5, 19.6 und 19.7).

9. Ergebnisse der Fänge

Art	Individuen (Pools) 2010	Individuen (Pools) 2010 [%]	Individuen (Pools) 2011	Individuen (Pools) 2011 [%]	Individuen (Pools) 2012	Individuen (Pools) 2012 [%]
<i>Ae. cinereus</i>	3097 (149)	4,51 (5,02)	2232 (110)	4,47 (4,62)	295 (34)	1,20 (1,96)
<i>Ae. rossicus</i>			39 (5)	0,08 (0,21)	1 (1)	0,00 (0,06)
<i>Ae. vexans</i>	34098 (1373)	49,70 (46,21)	12244 (510)	24,54 (21,43)	12781 (578)	51,82 (33,33)
<i>An. claviger</i>	281 (25)	0,41 (0,84)	184 (27)	0,37 (1,13)	96 (13)	0,39 (0,75)
<i>An. maculipennis</i> s. l.	207 (27)	0,30 (0,91)	256 (44)	0,51 (1,85)	285 (49)	1,16 (2,83)
<i>An. plumbeus</i>	33 (9)	0,05 (0,30)	3 (2)	0,01 (0,08)	465 (36)	1,89 (2,08)
<i>Cs. annulata</i>	405 (38)	0,59 (1,28)	165 (59)	0,33 (2,48)	174 (48)	0,71 (2,77)
<i>Cx. modestus</i>			2 (1)	0,00 (0,04)		
<i>Cx. pipiens / torrentium</i>	5399 (306)	7,87 (10,30)	30811 (1367)	61,78 (57,48)	8958 (803)	36,32 (46,31)
<i>Cx. territans</i>			47 (6)	0,09 (0,25)		
<i>Ma. richiardii</i>			33 (6)	0,07 (0,25)	194 (28)	0,79 (1,61)
<i>Oc. annulipes</i>	32 (2)	0,05 (0,07)	115 (24)	0,23 (1,01)	157 (32)	0,64 (1,85)
<i>Oc. cantans</i>	352 (29)	0,51 (0,98)	889 (59)	1,78 (2,48)	714 (58)	2,89 (3,34)
<i>Oc. cantans / Oc. annulipes</i>					4 (4)	0,02 (0,23)
<i>Oc. caspius</i>			80 (8)	0,16 (0,34)	5 (2)	0,02 (0,12)
<i>Oc. communis</i>	82 (7)	0,12 (0,24)	27 (2)	0,05 (0,08)	9 (2)	0,04 (0,12)
<i>Oc. flavescens</i>			48 (8)	0,10 (0,34)		
<i>Oc. geniculatus</i>					63 (12)	0,26 (0,69)
<i>Oc. punctor</i>	41 (2)	0,06 (0,07)	257 (22)	0,52 (0,92)	40 (5)	0,16 (0,29)
<i>Oc. rusticus</i>	654 (28)	0,95 (0,94)	1832 (85)	3,67 (3,57)	2 (1)	0,01 (0,06)
<i>Oc. sticticus</i>	23924 (976)	34,87 (32,85)	617 (34)	1,24 (1,43)	423 (28)	1,71 (1,61)
Gesamt	68605 (2971)		49881 (2379)		24666 (1734)	

Tabelle 9.2.: Übersicht über die in 2010, 2011 und 2012 gefangenen Stechmücken

9. Ergebnisse der Fänge

9.1.1. Baden-Württemberg

9.1.1.1. Bodensee

Am Bodensee wurden insgesamt 11 101 Individuen gefangen, die in 498 Pools einsortiert wurden. Dabei unterscheiden sich die Fänge der einzelnen Jahre in Bezug auf die Anzahl der gefangenen Individuen wesentlich (vgl. Abbildung 9.5).

So wurden im Juli 2010 10082 Stechmückenweibchen gesammelt, die zehn unterschiedlichen Arten zugeordnet werden konnten. Die Schwesterarten *Cx. pipiens pipiens* und *Cx. torrentium* wurden mittels PCR nicht näher bestimmt, weshalb sie in diesem Jahr als eine Art in diese Auswertung einfließen. Die dominante Spezies war mit 9528 Individuen (~95%) die Überschwemmungsart *Ae. vexans*. Ihr folgte mit 175 Individuen *Ae. cinereus* und 132 Weibchen des *An. maculipennis*-Komplexes. Die weiteren Arten sind in Abbildung 9.5 aufgeführt, wobei sich hinter „Sonstige“ vier Individuen der Art *An. claviger*, zwei *An. plumbeus* und 18 Individuen der Art *Oc. communis* verbergen.

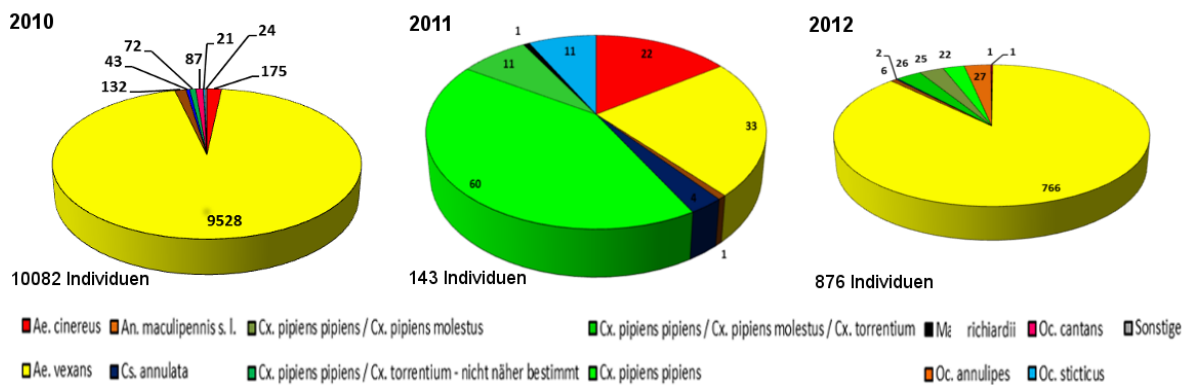


Abbildung 9.5.: Anzahl der am Bodensee gefangenen Individuen 2010-2012

Das Stechmückenaufkommen der folgenden Jahre war wesentlich geringer. Anfang August 2011 wurden lediglich 143 Individuen gefangen, die in 13 Pools einsortiert wurden. Den Hauptteil nahm hier die Art *Cx. pipiens pipiens* mit etwa 42 % ein, gefolgt von *Ae. vexans* mit 23 %. Die Anzahl der gefangenen *Culex*-Arten war mit insgesamt 71 Individuen fast gleich, wie im Jahr 2010 - hier wurden 72 Individuen dieser Gattung gefangen.

Im letzten Jahr der Untersuchung (Ende Juni 2012) wurden 876 Stechmückenweibchen gefangen und in 44 Pools einsortiert. Es dominierten mit 766 von 876 gefangenen Individuen wieder die Überschwemmungsmücke *Ae. vexans* (~87%). Die *Culex*-Arten *Cx. pipiens pipiens*, *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* und *Cx. torrentium* konnten alle nachgewiesen werden und machten zusammen - wieder vergleichbar mit den Jahren zuvor - 73 Individuen aus. Des Weiteren wurden noch 27 Individuen der Art *Ochlerotatus annulipes* gefunden.

9.1.1.2. Karlsruhe

Von den im Karlsruher Einzugsgebiet beprobten Standorten wurden lediglich die Gebiete Russheimer Altrhein und Insel Rott in allen drei Untersuchungsjahren aufgesucht.

Das Gebiet Stutensee-Staffort wurde nur im Jahr 2010 untersucht. Es wurden drei Individuen gefangen, die in zwei Pools sortiert wurden. Es handelt sich um zwei Individuen der Schwesterarten *Cx. pipiens* / *torrentium* (eine weitere Bestimmung fand nicht statt) und ein Weibchen der Art

9. Ergebnisse der Fänge

Anopheles claviger.

Bei den am Standort Knielinger See gesammelten Stechmücken handelt es sich um vier Arten. In dem einzigen Jahr der Untersuchung (2010) wurden 13 Stechmücken gefangen, die den Arten *Ae. cinereus* (2), *Ae. vexans* (8), *Cx. pipiens / torrentium* (2) und *Oc. sticticus* (1) angehörten. Auch hier fand keine nähere Bestimmung der Gattung *Culex* statt.

Am Standort Insel Rott wurden insgesamt 12855 Culiciden gesammelt. Mit 89% und 11428 Individuen war die Überschwemmungsmückenart *Ae. vexans* die häufigste Spezies, gefolgt von *Ae. cinereus* mit 1071 Individuen. Die weiteren Arten (vgl. Abbildung 9.6) waren nur zu einem sehr geringen Prozentsatz vertreten. Die Artverteilung stellt sich für die einzelnen Untersuchungsjahre immer recht ähnlich dar.

Im Jahr 2010 konnten auf der Insel Rott 11960 Stechmückenweibchen gefangen werden (vgl. Abbildung 19.1), wobei *Ae. vexans* mit 10646 Individuen die dominante Art darstellte (89%). Auch *Ae. cinereus* kam mit 1045 Mücken noch recht häufig vor. Selten hingegen waren *An. claviger* (20 Weibchen), *An. maculipennis* s. l. (12), *Cs. annulata* (39), die nicht weiter bestimmten Schwesterarten *Cx. pipiens / torrentium* (98), *Oc. cantans* (17) und die Überschwemmungsart *Oc. sticticus* (83).

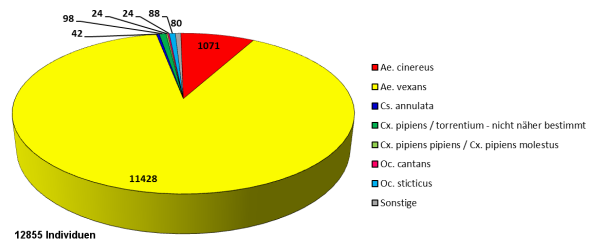


Abbildung 9.6.: Überblick über die auf der Insel Rott gefangenen Individuen (2010-2012)

Im zweiten Jahr der Untersuchung auf der Insel Rott wurden 182 Individuen gefangen und in 15 Pools sortiert. 75 % (137 Weibchen) der Stechmücken gehörten der Art *Ae. vexans* an. 16 Individuen wurden als *Cx. territans*, zehn als *An. maculipennis* s. l. bestimmt. Die restlichen Stechmückenweibchen verteilten sich auf die Arten *Ae. cinereus*, *An. claviger* (1), *Cx. annulata* (3), *Oc. cantans* (6) und *Oc. sticticus* (4).

Im Jahr 2012 wurden mit 713 Individuen in 34 Pools beinahe vier mal so viele Mücken wie im Vorjahr gefangen. Auch in diesem Jahr war die Überschwemmungsmückenart *Ae. vexans* mit 645 Individuen (90%) dominierend. Ihr folgte die Gattung *Culex* mit den *Cx. pipiens*-biotypen *pipiens* und *molestus* und deren Schwesterart *Cx. torrentium* mit insgesamt 43 Individuen. Des Weiteren wurden noch die Arten *Ae. cinereus* (21), *Ma. richiardii* (2), *Oc. cantans* (1) und *Oc. sticticus* (1) gefunden.

In den Fängen am Russheimer Altrhein hat sich die Anzahl der gefangenen Mücken von 2010 bis 2012 immer gesteigert, jedoch war das Verhältnis der Arten immer ähnlich (vgl. Abbildung 9.7). So war mit 1160 Individuen der Anteil der Überschwemmungsmückenart *Ae. vexans* am höchsten (78%). Auch die Arten des *Culex pipiens*-Komplexes und *Cx. torrentium* waren mit insgesamt 17% noch recht häufig vertreten.

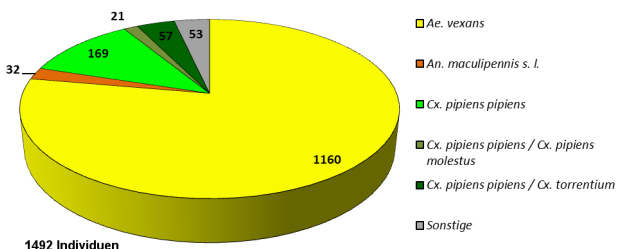


Abbildung 9.7.: Überblick über die am Russheimer Altrhein gefangenen Individuen (2010-2012)

Im Jahr 2010 wurden 84 Stechmücken gefangen, die in 7 Pools eingeordnet wurden. 81% der Individuen (68) gehörten der Art *Ae. vexans* an.

9. Ergebnisse der Fänge

Die Gattung *Culex* mit den nicht näher bestimmten Schwesterarten *Cx. pipiens / torrentium* nahm einen Anteil von 12% (10 Individuen) ein, des Weiteren wurden noch *Ae. cinereus* (2), *An. claviger* (2) und *Cs. annulata* (2) gefunden.

Das Artenspektrum erweiterte sich im Jahr 2011 um die Frühjahrsarten *Oc. annulipes* (1), *Oc. cantans* (3) und die Überschwemmungsart *Oc. sticticus* (9 Individuen), sodass Ende Juli acht Arten nachgewiesen werden konnten. Weiterhin vorherrschend war die Art *Ae. vexans* mit 75% (275), gefolgt von *Cx. pipiens pipiens* (10%) und *An. maculipennis s. l.* (7%). Außerdem wurden noch 6 Individuen der Art *Ae. cinereus* gefunden.

Neun Arten konnten Anfang Juli 2012 in den Fallen beobachtet werden. Mit 1041 Individuen wurden in diesem Jahr am Standort Russheimer Altrhein die meisten Mücken gefangen. Wie schon in den Jahren zuvor war auch hier *Ae. vexans* mit 78% (entspricht 817 Individuen) bestandbestimmend, gefolgt von den Schwesterarten der Gattung *Culex* mit zusammen etwa 20%. Auch *Ae. cinereus* (3 Individuen), *An. maculipennis s. l.* (5) und *Cs. annulata* (4) waren wieder vertreten. Zusätzlich wurden noch *An. plumbeus* und *Ma. richiardii* mit jeweils einem Individuum nachgewiesen.

9.1.1.3. Waghäusel

In der Artverteilung des Standortes Waghäusel fallen vor allem Culiciden-Arten auf, deren Weibchen ihr Eier auf der Wasseroberfläche diverser Gewässer ablegen (vgl. Abbildung 9.8). So nehmen die Art *An. claviger* einen Anteil von 26%, *Cs. annulata* einen von 5% und die *Culex*-Arten einen Anteil von 11% ein. Weiterhin konnten noch die Waldmückenarten *Oc. cantans* (304 Individuen) und *Oc. annulipes* (102 Individuen) gefunden werden. Auch die Überschwemmungsart *Ae. vexans* konnte mit 395 Individuen noch recht häufig gefunden werden, wobei 380 davon im Jahr 2012 gefunden wurden.

Im Jahr 2010 wurden in Waghäusel 678 Individuen (41 Pools) gefangen, die 9 Arten zugeordnet wurden. Zwischen den Schwesterarten der Gattung *Culex* wurde nicht unterschieden (*Cx. pipiens / torrentium*) und umfasste 120 Individuen (18%). Die dominierende Art war *An. claviger* mit 247 Individuen (36%). Auch die Art *Oc. cantans* kam mit 136 recht häufig vor. Des Weiteren wurden im Jahr 2010 noch *Ae. cinereus* (38) gefunden. Aber auch die Arten *Ae. vexans* (15 Individuen), *An. maculipennis s. l.* (16), *Oc. rusticus* und *Oc. sticticus* (mit jeweils 24 Weibchen) konnten nachgewiesen werden.

Auch im Jahr 2011 stellt die Anzahl an Anophelinen einen hohen Anteil in der Gesamtzusammensetzung der Arten am Standort Waghäusel dar. So war zwar die Frühjahrsart *Oc. cantans* mit 168 Individuen (38%) die häufigste, ihr folgt aber *An. claviger* mit 125 gefangenen Weibchen (29%). Zu den Anophelinen zählt zudem *An. maculipennis s. l.* (20). Auch *Oc. annulipes* wurde häufig gefunden (45). Mit 19 und zwei Mal 16 Individuen tragen *Ae. rossicus*, *Cs. annulata* und *Cx. pipiens / torrentium* - negativ oder unbekannt zur Zusammensetzung der gesammelten Arten bei. Weiterhin konnte noch *Cx. pipiens pipiens*, *Cx. territans* und *Ma. richiardii* nachgewiesen werden.

Die Artzusammensetzung des Jahres 2012 wurde von *Ae. vexans* (380 Individuen) dominiert. Ins-

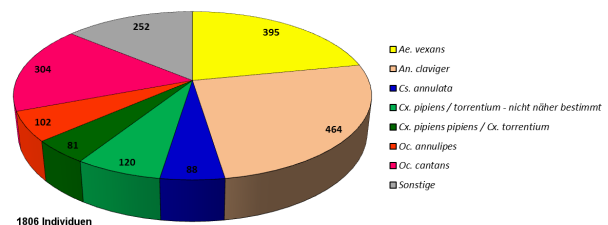


Abbildung 9.8.: Überblick über die in Waghäusel gefangenen Individuen (2010-2012)

9. Ergebnisse der Fänge

gesamt wurden 691 Stechmückenweibchen (65 Pools) bestimmt. Auch die Art *An. claviger* ist mit 92 Individuen häufig vertreten, gefolgt von den Schwesterarten *Cx. pipiens pipiens* und *Cx. torrentium* (66) und *Oc. annulipes* (57 Individuen). Des Weiteren wurden noch die Arten *Cs. annulata* (14) und *Cx. pipiens pipiens* (19) und die *Culex*-Arten in den Kombinationen *Cx. pipiens pipiens*, *Cx. p. pipiens molestus* (30), *Cx. pipiens pipiens*, *Cx. p. pipiens biotyp molestus* und *Cx. torrentium* (25) gefunden. Als weitere Arten konnten *Ae. cinereus* (1), *An. maculipennis* s. l. (5), *Ma. richiardii* (1) und *Oc. punctator* (1) nachgewiesen werden.

9.1.2. Bayern

9.1.2.1. Chiemsee

Am Chiemsee wurden insgesamt 17 906 Stechmückenweibchen in 757 Pools gefangen, der Großteil davon im ersten Fangjahr (vgl. Abbildung 19.4). Die häufigsten Arten waren die Überschwemmungsmücken *Oc. sticticus* (84%) und *Ae. vexans* (9%), auch die Waldmückenart *Ae. cinereus* wurde mit 6% noch öfter gefunden.

Die Anzahl der in 2010 gefangenen Stechmücken betrug 16 583, wobei 87% der Art *Oc. sticticus* angehörten, am zweit häufigsten wurde ebenfalls eine Überschwemmungsart - *Ae. vexans* - gefunden, allerdings nur mit 1254 Individuen (~8%). Auch *Ae. cinereus* trat mit 869 Weibchen noch verhältnismäßig oft auf. Der Rest der Individuen verteilt sich auf die Arten *An. claviger* (3), *An. maculipennis* s. l. (5), *An. plumbeus* (4) und *Oc. cantans* (6).

In den Jahren 2011 und 2012 war die Anzahl der gesammelten Stechmücken mit 678 Individuen in 32 Pools und 645 Individuen in 45 Pools sehr ähnlich.

2011 wurden acht verschiedene Arten gefunden. Die Überschwemmungsmückenarten *Oc. sticticus* (226 Individuen) und *Ae. vexans* (265) halten sich hierbei die Waage. Häufig kamen noch *Ae. cinereus* mit 85 Weibchen (ca. 13%) und die Gattung *Culex* in der Kombination *Cx. pipiens pipiens*, *Cx. p. pipiens biotyp molestus*, *Cx. torrentium* (ca. 14%) vor. Zudem wurden *An. claviger* (1) und *Cs. annulata* (1) gefunden.

Im Jahr 2012 war *Oc. sticticus* mit 338 Individuen die dominierende Art (52%). Auch die Überschwemmungsmückenart *Ae. vexans* wurde mit 157 Individuen häufig gefunden. Ebenfalls recht oft mit 81 Weibchen war die Art *Ae. cinereus* vertreten. Die restlichen Funde verteilen sich auf *An. maculipennis* s. l. (2), *Cs. annulata* (3), die Kombinationen *Cx. pipiens pipiens*, *Cx. pipiens molestus* (9) und *Cx. pipiens pipiens*, *Cx. torrentium* (11), *Cx. pipiens pipiens* (2), *Oc. annulipes* (7) und *Oc. punctator* (35).

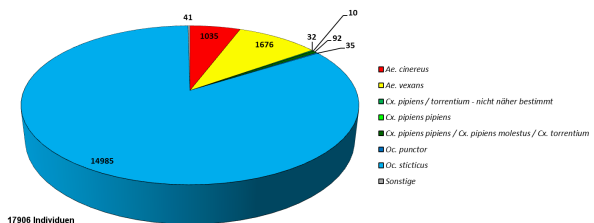


Abbildung 9.9.: Überblick über die am Chiemsee gefangenen Individuen (2010-2012)

9.1.2.2. Isar

An der Isar konnten in den drei Untersuchungsjahren insgesamt 7998 Culicidenweibchen gesammelt werden. Mit 5149 Individuen der Art *Ae. vexans* (64%) und 1990 Weibchen der Art *Oc. sticticus* (25%)

9. Ergebnisse der Fänge

dominierten an diesem Auenstandort eindeutig die Überschwemmungsmückenarten (vgl. Abbildung 9.10).

Die im Jahr 2010 dominierende Art an der Isar war *Oc. sticticus* mit 1908 von 3314 gefangenen Individuen, gefolgt von der anderen Überschwemmungsmückenart *Ae. vexans* mit 1037. Die dritthäufigste der gefangenen Arten war *Ae. cinereus* (292), zudem waren noch *An. plumbeus* und die nicht näher bestimmten Arten *Cx. pipiens / torrentium* zu finden (22 und 33 Individuen). Sonstige in 2010 gesammelte Arten an der Isar waren *An. maculipennis* s. l. (7), *Cs. annulata* (10) und *Oc. cantans* (5).

Mit 594 gesammelten Individuen war das Jahr 2011 das individuenärmste an der Isar. 68% davon (402 Weibchen) gehörten der Art *Ae. vexans* an, während die zweithäufigste in diesem Jahr die Frühjahrsart *Oc. rusticus* mit 88 Individuen war. *Cx. pipiens pipiens* wurde mit 41 Weibchen noch häufiger gefunden, *Ae. cinereus* (15) und *Oc. sticticus* (13) hingegen selten. Zudem konnten im Jahr 2011 die Arten *An. claviger*, *An. maculipennis* s. l. und *Cs. annulata* (4) nachgewiesen werden.

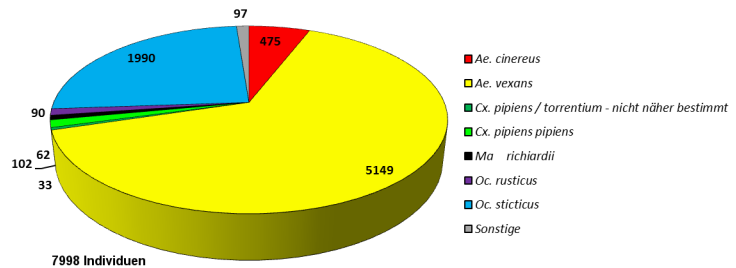


Abbildung 9.10.: Überblick über die an der Isar gefangenen Individuen (2010-2012)

Im Jahr 2012 wurden an der Isar die meisten Stechmücken gesammelt - 4090 Individuen in 220 Pools. Wie bereits im Vorjahr so war auch hier *Ae. vexans* die dominante Art mit 3710 Individuen (~91%). Mit nur 168 Weibchen kam *Ae. cinereus* am zweithäufigsten vor, während *Oc. sticticus* mit 69 Individuen auf dem dritten und *Cx. pipiens pipiens* auf dem vierten Platz zu finden sind (61). Zudem wurden noch 37 Individuen der Art *Ma. richiardii*, 15 der Kombination *Cx. pipiens pipiens*, *Cx. torrentium* und 8 *An. maculipennis* s. l. gefangen. An weiteren Mückenarten sind noch *An. claviger*, *Cs. annulata*, die Kombination *Cx. pipiens pipiens*, *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* sowie die Frühjahrsarten *Oc. cantans* (6) und *Oc. rusticus* (2) zu nennen.

9.1.2.3. Osterseen

Am Standort Iffeldorf an den Osterseen wurden 12 Arten nachgewiesen (vgl. Abbildung 9.11).

Der individuenreichste Fang mit 8030 Weibchen in 331 Pools fand im Jahr 2010 statt. Bei der dominanten Art mit 7204 Individuen (~90%) handelte es sich um *Oc. sticticus*. Ihr folgten mit 7% und etwa 3% die Arten *Ae. cinereus* und *Ae. vexans*. Zudem konnten noch die Spezies *An. plumbeus* (1), *Cs. annulata* (2), die nicht näher untersuchten Schwesterarten *Cx. pipiens / torrentium* (1) und *Oc. cantans* (9) bestimmt werden.

Im Jahr 2011 stellte *Ae. cinereus* mit 380 von insgesamt 533 Individuen die häufigste Art dar. Von der Überschwemmungsmückenart *Ae. vexans* konnten 97, von *Cx. pipiens pipiens* 41 Weibchen nachgewiesen werden. Zudem wurden noch *An. claviger* (1), *Cs. annulata* (3), *Ma. richiardii* (2), *Oc. cantans* (1) und *Oc. punctor* (8 Individuen) gefunden werden.

Lediglich 15 Individuen aus fünf Arten wurden 2012 gefangen. Je fünf Individuen gehörten *Ae. cinereus* und *Ae. vexans* an, je zwei *An. maculipennis* s. l. und *Oc. sticticus*, das letzte Weibchen konnte *Cx. pipiens pipiens* zugeordnet werden.

9. Ergebnisse der Fänge

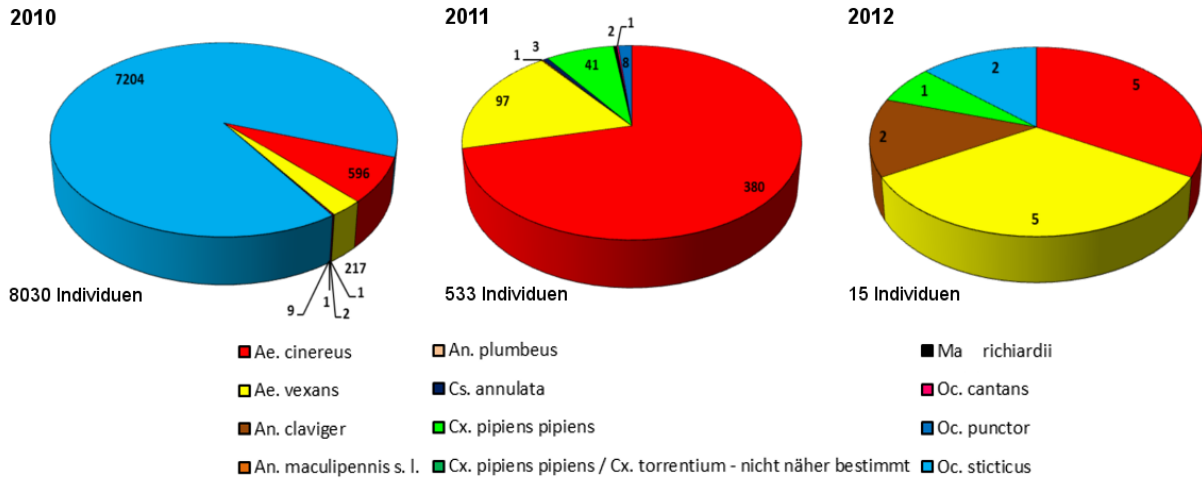


Abbildung 9.11.: Anzahl der an den Osterseen gefangenen Individuen (2010-2012)

9.1.3. Brandenburg - Oder

Die Fänge an der Oder fanden in den Jahren 2011 und 2012 statt. Insgesamt konnten 16 Spezies an diesem artenreichen Standort nachgewiesen werden. Etwa 46% der gefundenen Individuen zählten zur Art *Ae. vexans*. Auch die Arten der Gattung *Culex* machten mit insgesamt 41% einen Großteil der gefangenen Culicidenweibchen aus (vgl. Abbildung 9.12).

Die Artzusammensetzung in beiden Fangjahren war ähnlich. Im Jahr 2011 war die Überschwemmungsmücke *Ae. vexans* mit 1107 Individuen die häufigste am Standort Oder gefangene Stechmückenart. Die zweithäufigste stellt die Art *Cx. pipiens pipiens* mit 878 gefangenen Weibchen dar, gefolgt von der Kombination *Cx. pipiens pipiens*, *Cx. torrentium* mit 125 Individuen. Weiterhin konnten *Ae. cinereus* (67 Weibchen), *Oc. annulipes* (55) und *Cs. annulata* (16) gefunden werden. Zu den sonstigen Arten zählen unter anderem mit je sechs Individuen *Ae. rossicus* und *Oc. rusticus* und mit je vier *Oc. flavescens* und *Oc. punctator*.

829 Individuen wurden im Jahr 2012 gefunden. Erneut war *Ae. vexans* die häufigste Art (mit 343 Weibchen), gefolgt von *Cx. pipiens pipiens* (147), der Kombination *Cx. pipiens pipiens*, *Cx. torrentium* (125) und *An. maculipennis s. l.* (114). Des Weiteren wurden 34 Individuen der Art *Ma. richiardii* gefunden und 13 von *Cs. annulata*. Zudem wurden noch 24 Individuen gefangen, die den Arten *Ae. cinereus* (2), *An. claviger* (1), *Oc. cantans* (12), *Oc. caspius* (5) und *Oc. punctator* (4) angehörten.

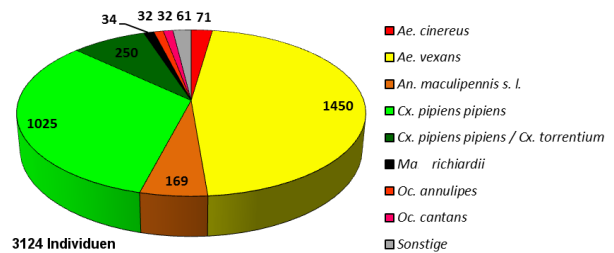


Abbildung 9.12.: Überblick über die an der Oder gefangenen Individuen (2011+2012)

9.1.4. Hessen

9.1.4.1. Kühkopf

Die in den Jahren 2011 und 2012 am Kühkopf durchgeführten Fänge lassen sich sowohl in Bezug auf die Individuenzahl als auch auf die Artzusammensetzung vergleichen (vgl. Abbildung 19.9). Mit

9. Ergebnisse der Fänge

12 063 von 12 847 gefangenen Weibchen (94%) war die Überschwemmungsmückenart *Ae. vexans* eindeutig die am häufigsten vorkommende Art an diesem Standort. Die weiteren 6% setzen sich unter anderem aus *An. maculipennis* s. l., *Cs. annulata* und *Cx. pipiens pipiens* zusammen (vgl. Abbildung 9.13).

Mit 6237 von 6541 gefangene Individuen bildete *Ae. vexans* die dominante Art im Jahr 2011. Von der Art *Cx. pipiens pipiens* wurden 180 Weibchen gefunden, von *An. maculipennis* s. l. 45, 23 von *Cs. annulata* und 18 von *Ae. cinereus*. Die weiteren Stechmückenweibchen verteilen sich auf die Arten *Oc. cantans* und *An. plumbeus* wurden (mit je zwei Individuen), ebenso wie *An. claviger* (5), *Cx. pipiens pipiens*, *Cx. torrentium* (3) und *Oc. annulipes* (1).

Wie bereits erwähnt ergab sich für die Artzusammensetzung des Jahres 2012 ein ähnliches Bild. 5826 der 6306 gefangenen Stechmückenweibchen zählten zur Art *Ae. vexans*, weiter wurden 128 Individuen der Spezies *An. maculipennis* s. l., 102 der Art *Cx. pipiens pipiens*, 73 der Kombination *Cx. pipiens pipiens* / *Cx. torrentium* und 61 der Art *Cs. annulata* gefunden. Weiterhin wurden die *Cx. pipiens pipiens*-Biotypen *pipiens* und *molestus* nachgewiesen ebenso wie *Ma. richiardii*. Weiterhin konnten noch die Arten *Ae. cinereus* (9), *Ae. rossicus* (1), *An. plumbeus* (8), *Cx. torrentium* (1), die Kombination *Cx. pipiens pipiens* / *Cx. torrentium*-unbekannt oder negativ (1) und *Oc. sticticus* (13) nachgewiesen werden.

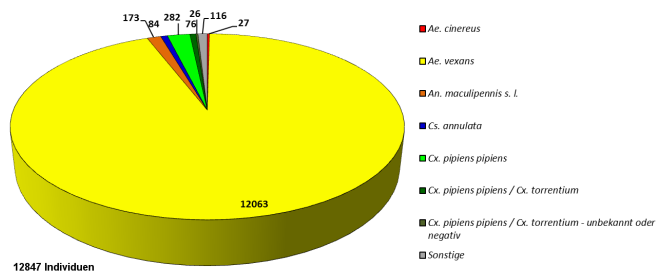


Abbildung 9.13.: Überblick über die am Kühkopf gefangenen Stechmücken (2011+2012)

9.1.4.2. Strüth

Der Standort Strüth wurde lediglich im Jahr 2012 beprobt, wobei 407 Individuen der Art *An. plumbeus* in 18 Pools und ein (wohl verunreinigter) Pool *Cx. pipiens pipiens*, *Cx. torrentium* gefangen wurden.

9.1.5. Mecklenburg-Vorpommern

9.1.5.1. Greifswald

Der Unterschied zwischen den Jahren 2011 und 2012 war, bezüglich der Anzahl der gefangenen Stechmücken, sehr groß (vgl. Abbildung 9.14).

Während 2011 12 124 Individuen gesammelt wurden, die in 520 Pools sortiert wurden, betrug die Anzahl der Individuen im Jahr 2012 lediglich 135.

Mit 5479 gefangenen Weibchen war der Anteil der Art *Cx. pipiens pipiens* sehr hoch (45%). Auch betrug der Anteil der Kombination *Cx. pipiens pipiens*, unbekannt beinahe 18%. Häufig wurden auch die Arten *Ae. vexans* (1834 Arten), *Ae. cinereus* (1148) und die Zusammenstellung *Cx. pipiens pipiens* / *Cx. torrentium* - negativ oder unbekannt (534) gefangen. Weniger oft waren die Arten *Oc. cantans* (205 Weibchen) und *Oc. sticticus* (273) in den Fallen zu finden. Ebenso traten die unter „Sonstige“ zusammengefasste Arten im Verhältnis nur sehr selten auf. Zu ihnen zählen *Ae. rossicus* (4 Individuen), *An. claviger* (29), *An. maculipennis* s. l. (73), *Cs. annulata* (25), die Arten *Cx. pipiens pipiens* / *Cx.*

9. Ergebnisse der Fänge

torrentium (50), *Oc. annulipes* (10), *Oc. caspius* (53), *Oc. communis* (16), *Oc. flavescens* (42), *Oc. punctor* (181) und *Oc. rusticus* (16).

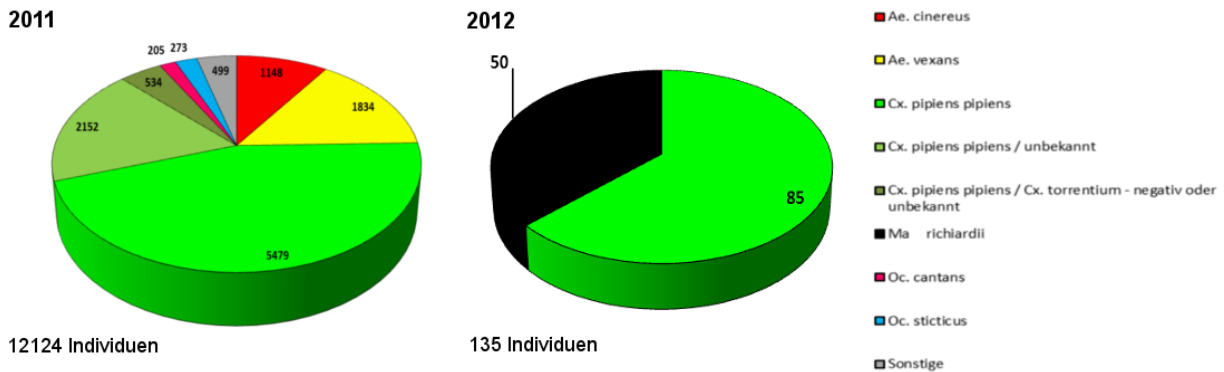


Abbildung 9.14.: Anzahl der in Greifswald gefangenen Individuen (2011+2012)

2012 konnten lediglich zwei Arten in Greifswald gefunden werden: *Cx. pipiens pipiens* mit 85 und *Ma. richiardii* mit 50 Individuen.

9.1.5.2. Loissin

Auch in Loissin unterschied sich die Anzahl zwischen den in 2011 und den im Jahr 2012 gefangenen Individuen enorm (vgl. Abbildung 9.15).

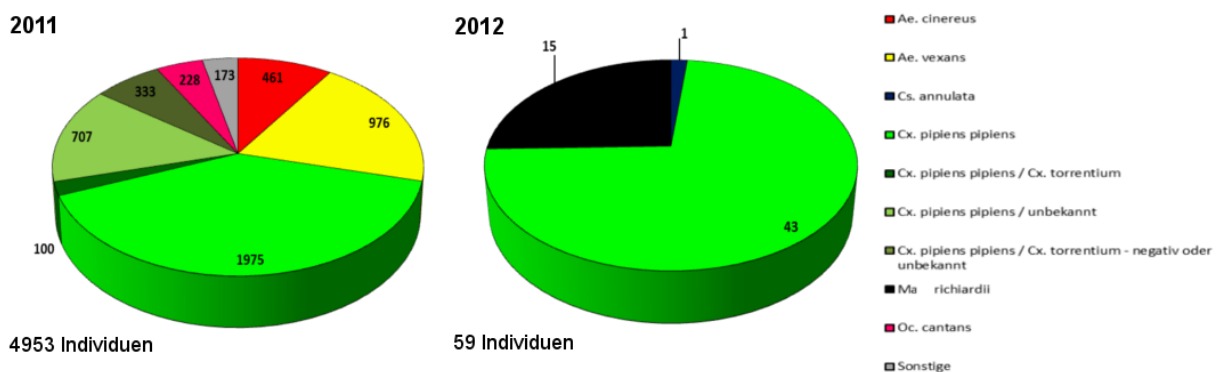


Abbildung 9.15.: Anzahl der in Loissin gefangenen Individuen (2011+2012)

Im Untersuchungsjahr 2011 wurden 4953 Individuen gefangen, die 15 Arten angehörten.

Mit einem Anteil von etwa 40% war *Cx. pipiens pipiens* die häufigste Art, gefolgt von *Ae. vexans* mit 20% (976 Weibchen). Auch die Kombination *Cx. pipiens pipiens* / unbekannt kam mit 707 Individuen häufig vor, ebenso wie *Ae. cinereus* (461). *Cx. pipiens pipiens* gemeinsam mit einer unbekannten Art (333), die Kombination *Cx. pipiens pipiens*, *Cx. torrentium* (100) und *Oc. cantans* (228) kamen schon seltener vor. Unter dem Begriff „Sonstige“ sind die Arten *An. claviger* (14), *An. maculipennis* s. l. (5), *Cs. annulata* (6), *Oc. annulipes* (3), *Oc. caspius* (26), *Oc. flavescens* (1), *Oc. punctor* (44), *Oc. rusticus* (1) und *Oc. sticticus* (73) zusammengefasst.

Bei den 59 im Folgejahr gefundenen Individuen handelte es sich um die Arten *Cs. annulata* (1), *Cx. pipiens pipiens* (43) und *Ma. richiardii* (15).

9. Ergebnisse der Fänge

9.1.6. Rheinland-Pfalz

9.1.6.1. Alsheim

In Alsheim konnten insgesamt neun Stechmückenarten nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 19.7).

Im Jahr 2010 wurden mit 356 Individuen noch verhältnismäßig viele Stechmücken gefangen. Der Großteil gehörte der Art *Cs. annulata* (232) an, gefolgt von den nicht weiter bestimmten Schwesterarten *Cx. pipiens pipiens* / *Cx. torrentium*. Außerdem konnten noch 32 Weibchen der Art *Oc. cantans*, 19 des Komplexes *An. maculipennis* s. l., 12 der Art *Ae. vexans* und ein Individuum *Ae. cinereus* gefunden werden.

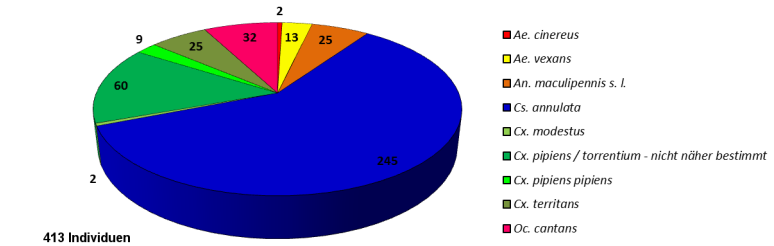


Abbildung 9.16.: Überblick über die in Alsheim gefangenen Stechmücken (2010-2012)

Die Anzahl der in 2011 gefangenen Individuen betrug nur noch 56. Es konnten 25 Individuen der Art *Cx. modestus* und 13 der Art *Cs. annulata* nachgewiesen werden. Weiter wurden 8 zur Spezies *Cx. pipiens pipiens* gehörenden Weibchen, sechs des Komplexes *An. maculipennis* s. l., zwei *Cx. territans* und je einmal *Ae. cinereus* und *Ae. vexans* nachgewiesen werden.

Im Jahr 2012 wurde lediglich eine, zur Art *Cx. pipiens pipiens* gehörende Stechmücke gefangen.

Insgesamt war die Art *Cs. annulata* mit 60% die häufigste aber auch die Gattung *Culex* mit den Arten *Cx. modestus*, *Cx. pipiens pipiens*, *Cx. torrentium* und nicht näher bestimmten Individuen der Schwesterarten war mit 23% sehr häufig vertreten (vgl. Abbildung 9.16).

9.1.6.2. Haßloch

Die Fänge in Haßloch fanden lediglich in den Jahren 2010 und 2011 statt, wobei insgesamt 3000 Stechmücken gefangen wurden. Die Frühjahrsart *Oc. rusticus* war mit 78% die häufigste Art, ihr folgte mit 10% *Oc. cantans* - ebenfalls eine Art, die bereits im Frühjahr anzutreffen ist (vgl. Abbildung 9.17).

Im ersten Jahr (2010) wurden 2112 Individuen gefangen, die in 134 Pools sortiert wurden. Den Hauptteil der Mücken bildete die Frühjahrsart *Oc. rusticus* mit 629 Individuen. Weiter wurden noch *Oc. communis* (64), *Oc. cantans* (53), *Oc. annulipes* (32) und die nicht näher bestimmten Arten *Cx. pipiens pipiens* / *Cx. torrentium* (35) gefunden. Andere Arten wurden seltener gefunden. Zu ihnen zählten *Ae. cinereus* (19), *Ae. vexans* und *An. maculipennis* s. l. mit je 13 Individuen, *Cs. annulata* mit 12 und *Oc. sticticus* mit 16 Weibchen. Weiterhin konnten noch die Anophelinen *An. claviger* und *An. plumbeus* mit je einem Individuum gefunden werden.

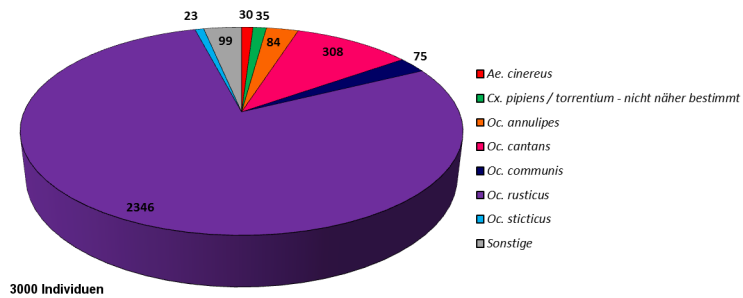
Auch im Jahr 2011 war *Oc. rusticus* die prägende Art (81%). Ihr folgten mit 255 Individuen *Oc. cantans* und *Oc. annulipes* mit 52 Individuen. Zudem konnten noch *Ae. cinereus* und *Oc. communis* mit je 11 Individuen, *Ae. rossicus* mit zehn und *Oc. punctator* mit 11 Individuen nachgewiesen werden. Mit 9 Individuen wurde *An. maculipennis* s. l. verhältnismäßig selten gefunden, ebenso wie *Ae. vexans* (8), *Oc. sticticus* (7), *Cs. annulata* (6), *Cx. pipiens pipiens* (4) und 3 Individuen nicht näher bestimmter *Cx. pipiens pipiens* / *Cx. torrentium*.

9. Ergebnisse der Fänge

9.1.7. Sachsen-Anhalt

9.1.7.1. Drömling

Im Jahr 2011 - dem einzigen, an dem der Standort Drömling untersucht wurde, konnten 29 Individuen gefunden werden, die den Arten *Cx. pipiens pipiens* (29), *Ae. vexans* (9), *Ae. cinereus* (3), *Oc. rusticus* (2) und *Cs. annulata* (1) angehörten.



9.1.7.2. Elbe

Abbildung 9.17.: Überblick über die in Haßloch gefangenen Stechmücken (2010+2011)

Die Fänge an der Elbe unterscheiden sich zwischen den Jahren vor allem in Bezug auf die Anzahl der gefangenen Culiciden.

Ae. vexans war mit 95% die häufigste Spezies, die an der Elbe gesammelt wurde, die weiteren Arten, wie etwa *Ae. cinereus* oder *Oc. sticticus* fallen dabei kaum ins Gewicht (vgl. Abbildung 9.18).

Im ersten Jahr der Untersuchung (2010) wurden an der Elbe mit 11 698 Individuen in 484 Pools die meisten Stechmücken gefangen.

Mit 11 300 Weibchen wurde die Art *Ae. vexans* am häufigsten gefunden, gefolgt von *Oc. sticticus* (235), *Ae. cinereus* (58), den nicht näher bestimmten Schwesterarten *Cx. pipiens pipiens / Cx. torrentium* (43) und *Oc. punctator* (41). Des Weiteren konnten noch einige Individuen folgender Arten nachgewiesen werden: *An. claviger* und *An. maculipennis* s. l. (je 3), *Cs. annulata* und *Oc. cantans* (je 7) sowie *Oc. rusticus* (1).

Im Jahr 2011 wurden nur noch 1069 Individuen gefangen, die in 48 Pools sortiert wurden. Auch hier war die dominante Spezies mit 863 gesammelten Weibchen *Ae. vexans*. Ihr folgte *Cx. pipiens pipiens* mit 144 Individuen (13%) und die Kombination *Cx. pipiens pipiens / Cx. torrentium* mit 50 Individuen in 2 Pools. Zudem wurden noch *Ae. cinereus* (8), *An. maculipennis* s. l. (2) sowie *Cs. annulata* und *Oc. flavescens* mit je einem Individuum gefunden.

Mit 235 Weibchen wurden im letzten Jahr der Untersuchung die wenigsten Mücken gefangen. Nach wie vor dominierte die Überschwemmungsmückenart *Ae. vexans* mit 132 Individuen (57%). Ihr folgte wiederum *Cx. pipiens pipiens* (31%). Bei den darüber hinaus nachgewiesenen Arten handelte es sich um *Ae. cinereus* (2 Weibchen), *An. maculipennis* s. l. (12), *Cs. annulata* (1), *Ma. richiardii* (5) und *Oc. cantans* (9).

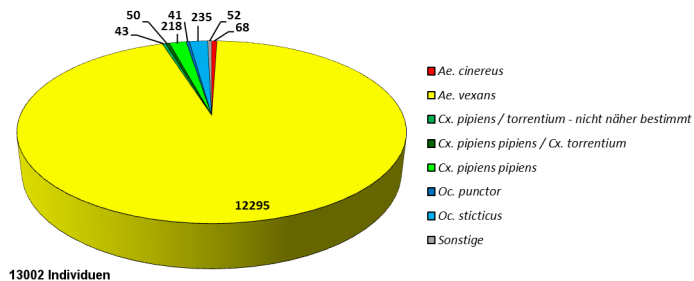


Abbildung 9.18.: Überblick über die an der Elbe gefangenen Individuen (2010-2012)

9.2. GT-Standorte

9.2.1. Hauptstandorte

9.2.1.1. Heidelberg

Im Zoo Heidelberg fanden die Fänge mit den Gravid-Traps nur in den Jahren 2011 und 2012 statt. Die Artverteilung beider Jahre war vergleichbar - es wurden hauptsächlich Stechmücken der Gattung *Culex* gefangen, wobei die Kombination *Cx. pipiens pipiens* / *Cx. torrentium* mit 64% die Häufigste war (vgl. Abbildung 9.19).

Mit 9393 Individuen in 438 Pools wurden in der Saison 2011 beinahe zehn mal so viele Stechmückenweibchen gesammelt, wie im Folgejahr. 6031 Individuen, die in gemischten Pools der Arten *Cx. pipiens pipiens* / *Cx. torrentium* zu finden waren, bildeten den Großteil der gefangenen Mücken (64%). Weiterhin wurden noch 2040 Weibchen der Art *Cx. pipiens pipiens* gefangen. 672 Stechmückenindividuen befanden sich in gemischten Pools, die

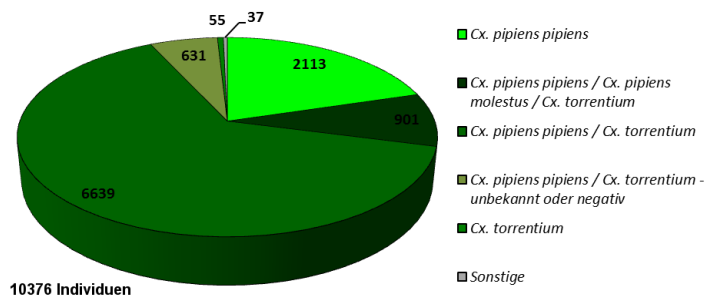


Abbildung 9.19.: Überblick über die in Heidelberg gefangenen Individuen (2011+2012)

aus *Cx. pipiens pipiens*, *Cx. pipiens molestus* und *Cx. torrentium* bestanden. 625 Stechmücken, die zusammen in 32 Pools zu finden waren, konnten zwar der Gattung *Culex* zugeordnet werden, die weitere Bestimmung mittels PCR ergab das Ergebnis „unbekannt“ bzw. „negativ“. Zudem konnten noch einige wenige Individuen der Arten *An. claviger* und *An. maculipennis* s. l. (je 2), *Cs. annulata* (3), *Cx. torrentium* (4) und *Oc. cantans* (1), gefunden werden. Weiterhin wurde noch die Kombination *Cx. pipiens* / unbekannt (ein Pool mit 13 Individuen) nachgewiesen.

Im Jahr 2012 konnten lediglich 983 Individuen gefangen werden, welche in 90 Pools einsortiert wurden. Auch hier konnten die meisten Individuen in gemischten Pools der Arten *Cx. pipiens pipiens* / *torrentium* gefunden werden (608), gefolgt von gemischten Pools, welche die Schwesterarten *Cx. pipiens pipiens*, *Cx. torrentium* und *Cx. pipiens molestus* beinhalteten (229 Individuen in 14 Pools). Außerdem konnte noch ein *Cx. pipiens pipiens* biotyp *pipiens* x *Cx. pipiens pipiens* biotyp *molestus* - Hybrid nachgewiesen werden.

9.2.1.2. Großsachsen

Die Fänge in Großsachsen fanden in allen drei Untersuchungsjahren statt, wobei insgesamt 8886 Individuen gefangen wurden. Auch hier war die Gattung *Culex* dominierend (vgl. Abbildung 9.20).

3327 Individuen wurden im Jahr 2010 gesammelt, die in 174 Pools einsortiert wurden. Mit 99% gehörte der Hauptteil der Mücken den nicht näher bestimmten Schwesterarten *Cx. pipiens pipiens* / *Cx. torrentium* an. Ansonsten wurden noch 3 Individuen der Art *An. plumbeus* und 10 der Art *Oc. sticticus* gefunden.

Im darauffolgenden Jahr wurden mit 4992 Individuen mehr Stechmücken gefangen. Auch diese gehörten bis auf je ein Individuum der Arten *An. claviger*, *An. plumbeus* und *Oc. punctator* alle der

9. Ergebnisse der Fänge

Gattung *Culex* an. Die häufigste Kombination, die gefunden wurden, war *Cx. pipiens pipiens* / *Cx. torrentium* mit 3612 Weibchen in 156 Pools. 97 waren in der Zusammenstellung *Cx. pipiens pipiens*, *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* und *Cx. torrentium* in 4 Pools zu finden. Des Weiteren konnten noch 25 Individuen der Art *Cx. pipiens pipiens* und 925 der Art *Cx. torrentium* nachgewiesen werden. 15 Pools mit 319 Individuen ergaben in der PCR das Ergebnis negativ oder unbekannt.

Das letzte Jahr der Untersuchung war mit 567 Individuen zwar weniger ertragreich, dennoch gehörten auch hier wieder der Großteil der Individuen der Gattung *Culex* an. 327 Weibchen (58%) fanden sich in gemischten Pools aus *Cx. pipiens pipiens* und *Cx. torrentium*. Weiterhin wurden noch 4 gemischte Pools mit insgesamt 75 Individuen gefunden, die aus den Arten *Cx. pipiens pipiens*, *Cx. pipiens molestus* und *Cx. torrentium* bestanden. Außerdem gab es noch die Kombination *Cx. torrentium*, *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* (70 Individuen in 4 Pools) und 20 Individuen in 2 Pools, die das Ergebnis „unbekannt“ oder „negativ“ in der taxonomischen PCR erbrachten. Mit einem und drei Individuen wurden noch *An. plumbeus* und *Oc. geniculatus* nachgewiesen.

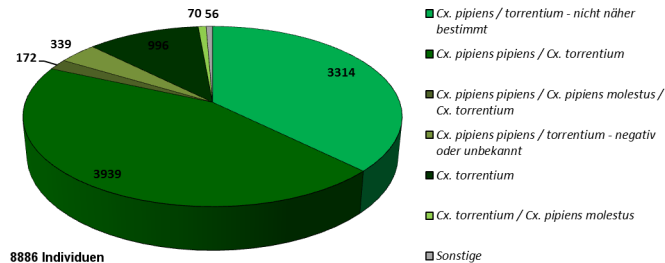


Abbildung 9.20.: Überblick über die in Großsachsen gefangenen Individuen (2010-2012)

Außerdem gab es noch die Kombination *Cx. torrentium*, *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* (70 Individuen in 4 Pools) und 20 Individuen in 2 Pools, die das Ergebnis „unbekannt“ oder „negativ“ in der taxonomischen PCR erbrachten. Mit einem und drei Individuen wurden noch *An. plumbeus* und *Oc. geniculatus* nachgewiesen.

9.2.1.3. Weinheim

Auch in Weinheim fanden die Untersuchungen in allen drei Jahren statt und auch hier war die dominierende Gattung *Culex* (vgl. Abbildung 9.21). Insgesamt wurden 6999 Stechmückenweibchen gesammelt.

1589 Individuen wurden im Jahr 2010 gefangen, wobei ein Individuum *Oc. sticticus* gefunden wurde, während alle anderen den nicht näher bestimmten Schwesterarten *Cx. pipiens pipiens* / *Cx. torrentium* angehörten.

Im folgenden Jahr wurden mit 3383 deutlich mehr Individuen als im Vorjahr gesammelt. 3098 Individuen (92%) waren in 146 aus *Cx. pipiens pipiens* und *Cx. torrentium* zusammengesetzten Pools zu finden. Zudem wurden noch 147 Individuen in aus *Cx. pipiens pipiens*, *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* und *Cx. torrentium* bestehenden Pools gefunden. 52 Weibchen mit dem Ergebnis „negativ“ oder „unbekannt“ wurden in 3 Pools gefunden. Weiterhin konnten noch 63 Individuen der Art *Cx. torrentium* und zwei der Art *Cx. pipiens pipiens* nachgewiesen werden. Abgesehen von Tieren der Gattung *Culex* wurden noch *Cs. annulata* (20) und *Ma. richiardi* (1) gesammelt.

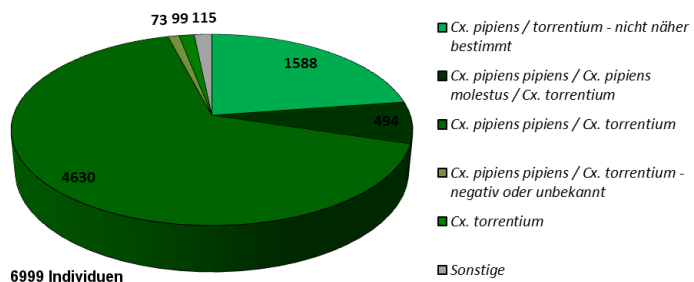


Abbildung 9.21.: Überblick über die in Weinheim gefangenen Individuen (2010-2012)

Abgesehen von Tieren der Gattung *Culex* wurden noch *Cs. annulata* (20) und *Ma. richiardi* (1) gesammelt.

Auch im letzten Jahr der Untersuchung wurden wieder überwiegend Arten der Gattung *Culex* gefunden. Den Hauptteil stellten auch hier wieder aus *Cx. pipiens pipiens* und *Cx. torrentium* zusam-

9. Ergebnisse der Fänge

mengesetzte Pools (1532 Individuen, 80 Pools). Auch die Kombination *Cx. pipiens pipiens*, *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* und *Cx. torrentium* (347 in 18 Pools) war wieder vertreten. Des Weiteren konnte noch ein Pool der Art *Cx. pipiens pipiens* biotyp *molestus*, 37 der Art *Cx. pipiens pipiens* und 36 der Art *Cx. torrentium* gefunden werden. Zusätzlich waren noch die Kombinationen *Cx. torrentium*, *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* (38 Individuen in 2 Pools) und *Cx. pipiens pipiens* - negativ oder unbekannt (21 Individuen in 3 Pools) zu finden. Darüber hinaus wurden noch *An. plumbeus* und *Oc. geniculatus* mit je zwei Individuen nachgewiesen.

9.2.2. Weitere Standorte

Die Standorte Bad Dürkheim, Beerfelden, Bodenheim-Roxheim, Dirmstein, Eberstadt, Hemsbach, Mettenheim, Mümling-Grumbach, Neckargerach, Neustadt an der Weinstraße, Römerberg und Sandhausen wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit zusammengefasst.

Pools mit der Kombination *Cx. pipiens pipiens*, *Cx. torrentium* (2675 Individuen in 135 Pools) waren am häufigsten zu finden, aber auch die Kombinationen *Cx. pipiens pipiens*, *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* und *Cx. torrentium* (590 Individuen) konnten gefunden werden. Weiterhin wurden noch 343 Individuen der Art *Cx. pipiens pipiens*, und 54 der Art *Cx. torrentium* gesammelt.

Wieder waren 46 Individuen in 11 Pools dabei, bei denen das Ergebnis der taxonomischen PCR negativ oder unbekannt war.

Es konnten drei Hybride zwischen *Cx. pipiens pipiens* biotyp *pipiens* und *Cx. pipiens pipiens* biotyp *molestus* nachgewiesen werden. Zudem gab es noch in sechs Pools mit 14 Individuen die Kombination *Cx. pipiens pipiens*, *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus*. Außerdem wurden noch die Arten *An. plumbeus* (4), *Cs. annulata* (4) und *Ma. richiardii* (1) gefunden.

9.3. BG-Standorte

Die Standorte, an denen mit BG-Traps gefangen wurde, wurden zur Auswertung alle zusammengefasst.

Die dominierende Art war *Oc. cantans* mit 663 Individuen, gefolgt von den in 177 gemischten Pools gefundenen 301 Individuen der Schwesterarten *Cx. pipiens pipiens*, *Cx. torrentium*. Weiterhin wurden 108 Weibchen der Art *Cx. pipiens pipiens*, ebenso wie 58 der Art *Oc. geniculatus*, 41 der Art *An. plumbeus* und 53 der Art *Cs. annulata*.

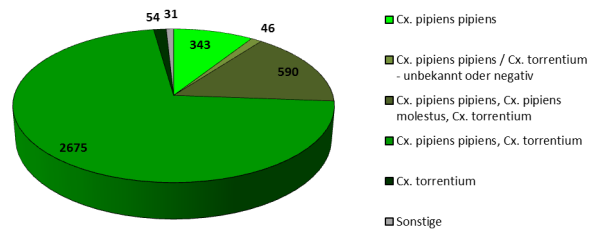


Abbildung 9.22.: Anzahl der an den weiteren Standorten gefangenen Individuen (2012, insgesamt 3739 Individuen)

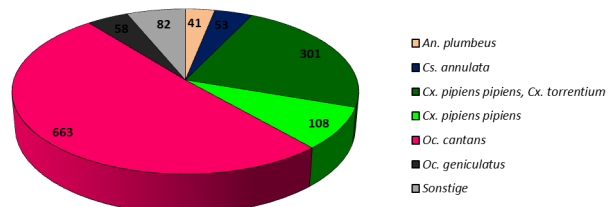


Abbildung 9.23.: Anzahl der mit den BG-Traps gefangenen Individuen (2012, insgesamt 1306 Individuen)

9. Ergebnisse der Fänge

Unter der Kategorie „Sonstige“ wurden die Arten *Ae. cinereus* (2), *An. maculipennis* s. l. (2), *Cx. torrentium* (18), *Ma. richiardi* (23), *Oc. annulipes* (21) und *Oc. communis* (9) zusammengefasst. Vier Individuen gehörten entweder der Art *Oc. annulipes* oder *Oc. cantans* an, wobei diese nicht weiter bestimmt werden konnten.

10. Taxonomische Multiplex Real-time PCR zur Unterscheidung der Arten des *Cx. pipiens*-Komplexes

Die Weibchen des *Culex pipiens*-Komplexes (*Cx. p. pipiens*, *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus*) und *Cx. torrentium* sind anhand morphologischer Merkmale nicht zu unterscheiden. Bislang konnten die Weibchen dieser Schwesterarten mittels Enzymelektrophorese unterschieden werden [Weitzel et al., 2009], jedoch ist dieser Ansatz verhältnismäßig aufwendig in der Durchführung, da zur Artbestimmung das Stechmückenhomogenat mit drei verschiedenen Enzymen verdaut werden muss. Zusätzlich müssen die Agarose-Gele während der Elektrophorese gekühlt werden, damit die Enzyme in den Puffern nicht denaturieren. Obwohl die Enzymelektrophorese zur Unterscheidung der Arten ein an der KABS etabliertes und funktionierendes System darstellt wurde dennoch beschlossen, eine Multiplex Real-time PCR zu etablieren, die eine molekularbiologische Bestimmung der Schwesterarten in kürzester Zeit erlaubt.

Bereits die im Jahr 2011 gefangenen Weibchen des *Culex pipiens*-Komplexes wurden mit einer neu entwickelten taxonomischen PCR untersucht, welche einen SNP innerhalb des Cytochromoxidase I-Gens zur Unterscheidung der Arten *Cx. pipiens pipiens* und *Cx. torrentium* zur Differenzierung der Arten verwendete. Die Auswertung erfolgte im Anschluss an die PCR mit einer Schmelzkurvenanalyse. Diese erwies sich jedoch in der Praxisanwendung als zu ungenau, da einige der untersuchten *Culex*-Pools nach der Schmelzkurvenanalyse nicht genau eingeordnet werden konnten. Entsprechende Pools wurden als „*Cx. pipiens* / *Cx. torrentium* - unbekannt oder negativ“ bezeichnet. Weiterhin war mittels dieser PCR lediglich eine Unterscheidung der Arten *Cx. pipiens pipiens* und *Cx. torrentium* möglich, während *Cx. pipiens pipiens* biotyp *molestus* oder gar Hybride der Biotypen *pipiens* und *molestus* nicht detektierbar waren. Für ein grobes Screening erwies sich diese PCR zwar bedingt als ausreichend, für eine genauere Artbestimmung hingegen nicht. Aus diesem Grund wurde die SNP-PCR wieder verworfen, die Ergebnisse dieser allerdings zum Teil in die Auswertung der vorliegenden Arbeit mit einbezogen, da es zeitlich nicht möglich war, alle bereits in 2011 untersuchten Pools, welche der Gattung *Culex* angehörten, mit der im Folgenden entwickelten taxonomischen real-time PCR erneut zu charakterisieren.

10.1. Etablierung der taxonomischen Multiplex Real-time PCR

Die Herausforderung, die sich aus der SNP-PCR ergab (nicht alle Arten des Komplexes nachweisen zu können) wurde mit der taxonomischen Multiplex Real-time PCR gelöst. Zudem ist die - vor allem von Dipl. Biologe Martin Rudolf (Abteilung Molekulare Entomologie, BNI, Hamburg) etablierte PCR in der Lage, ein DNA-Gemisch aller drei Arten des Komplexes zu verarbeiten [Rudolf et al., 2013]. Weiterhin erlaubt die neu entwickelte taxonomische PCR den Nachweis von Hybriden der *Culex pipiens*

10. Taxonomische Multiplex Real-time PCR zur Unterscheidung der Arten des *Cx. pipiens*-Komplexes

Biotypen *pipiens* und *molestus*. Durch die Geschwindigkeit, Sensitivität und Spezifität, mit welcher diese PCR arbeitet ist es erstmals möglich, ein artbezogenes Screening mit einem hohen Probendurchsatz in verhältnismäßig kurzer Zeit und ohne den Einsatz weiterer Untersuchungsmethoden (wie etwa Gelelektrophoresen) durchzuführen.

Die zur Einstellung der PCR verwendete DNA wurde aus Stechmücken gewonnen, die aus im Freiland gesammelten Stechmückeneiern stammten, welche im Labor zum Ausschluß gebracht wurden. Im Falle von *Cx. torrentium* wurden eindeutig bestimmte Männchen zur Gewinnung der DNA für die Positivkontrolle verwendet. Die Stechmücken der Biotypen *molestus* und *pipiens* wurden anhand der Biotyp-spezifischen Merkmale (Stenogamie, Autogamie, Anthropophilie) sortiert. Die so vorsortierten Biotypen wurden getrennt hochgezogen und immer wieder auf die Merkmale hin überprüft, bis sie eindeutig entweder *Cx. p. pipiens* oder *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* zugeordnet werden konnten, deren DNA schließlich als Positivkontrolle der entsprechenden Art eingesetzt werden konnte.

Oligonucleotid	Zielsequenz	Name	Sequenz (5'→3')	T_m
F-Primer	Microsatelliten-Lokus CQ11	Cx20F (#1725)	GCG GCC AAA TAT TGA GAC TT	55,3°C
R-Primer	Microsatelliten-Lokus CQ11	Cx20R (#1726)	CGT CCT CAA ACA TCC AGA CA	57,3°C
TaqMan Sonde	Microsatelliten-Lokus CQ11	all-S20 (#1727)	Cy5.5 - GGA ACA TGT TGA GCT TCG GK - BHQ1	58,3°C
TaqMan Sonde	Microsatelliten-Lokus CQ11	pip-S20 (#1728)	JOE - GCT TCG GTG AAG GTT TGT GT - BHQ1	57,3°C
TaqMan Sonde	Microsatelliten-Lokus CQ11	mol-S27 (#1729)	ROX - TGA ACC CTC CAG TAA GGT ATC AAC TAC - BHQ2	63,4°C
F-Primer	Ace 2-Gen	OSM_78	GAC ACA GGA CGA CAG AAA	53,7°C
R-Primer	Ace 2-Gen	OSM_79	GCC TAC GCA ACT ACT AAA	51,4°C
TaqMan Sonde	Ace 2-Gen	OSM_82	FAM - CGA TGA TGC CTG TGC TAC CA - BHQ1	59,4°C

Tabelle 10.1.: Übersicht über die in der taxonomischen PCR verwendeten Oligonucleotide

Als Positivkontrolle des *Cx. p. pipiens* x *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* Hybrids wurde DNA von F1-Nachkommen aus entsprechenden Laborkreuzungen verwendet.

Für die *Cx. pipiens* all-Sonde (all-S20) wurde zudem aus Stechmücken der Art *Cx. quinquefasciatus* DNA extrahiert und diese als Positivkontrolle genutzt.

Die gewählten Zielsequenzen befanden sich zum einen innerhalb des Microsatelliten-Lokus CQ11 (Primer und Sonden der *Cx. pipiens*-Arten), zum anderen innerhalb des ACE2-Gens (Primer und Sonde für *Cx. torrentium*). Die Sonden der *Cx. pipiens*-Arten liegen alle innerhalb der gemeinsamen Primer-Sequenzen, wobei die *Cx. pipiens* all-Sonde (all-S20) in der Lage ist, alle *Cx. pipiens*-Arten zu detektieren, während die Sonden *Cx. p. pipiens* (pip-S20) und *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* (mol-S27) spezifisch in Bezug auf die nachzuweisenden Biotypen sind. Durchgeführt wurden die PCRs mit dem HotStarTaq Master Mix Kit, das Pipettierschema mit den verwendeten Primerkonzentrationen ist in Tabelle 10.2 dargestellt. Als finale Konzentration wurden, wie auch schon für die bereits vorgestellten Real-time PCRs, 20 µl gewählt, wobei zu 18 µl Mastermix jeweils 2 µl der zu untersuchenden Probe gegeben wurden.

Das Temperaturprofil folgte dem üblichen Schema mit einer initialen Denaturierung (15 min bei 95°C), gefolgt von 50 Zyklen, in denen sich Denaturierung (15 s, 95°C), Annealing (20 s, beginnend mit einer Temperatur von 65°C, wobei pro Zyklus 0,5°C abgezogen wurde, bis der Touchdown bei einer finalen Annealing-Temperatur von 60°C endete) und Extension (30 s bei 72°C) abwechselten. Abschließend wurde noch ein Hold-Schritt von 30 s bei 40°C eingefügt (vgl. Tabelle 10.3).

10. Taxonomische Multiplex Real-time PCR zur Unterscheidung der Arten des *Cx. pipiens*-Komplexes

Reagens	$Konz_{Stock}$	$Konz_{Gesamt}$	$V_{Reaktion} [\mu l]$
HotStarTaq Mastermix 2x			10,00
$MgCl_2$	25 mM	4 mM	2,00
F-Primer (1725)	30 pmol/ μl	300 nM	0,20
R-Primer (1726)	30 pmol/ μl	300 nM	0,20
All-Probe (1727)	20 pmol/ μl	200 nM	0,20
Pip-Probe (1728)	20 pmol/ μl	200 nM	0,20
Mol-Probe (1729)	20 pmol/ μl	200 nM	0,20
F-Primer (OSM_78)	10 pmol/ μl	450 nM	0,90
R-Primer (OSM_79)	10 pmol/ μl	500 nM	1,00
Tor-Probe (OSM_82)	10 pmol/ μl	200 nM	0,40
H_2O			2,70
DNA			2,00
Gesamt			20,00

Tabelle 10.2.: Pipettierschema der taxonomischen Real-time PCR

Die PCR wurde mit über 350 Individuen getestet, unter anderem wurden im Labor gezüchtete Hybride untersucht, und die PCR für spezifisch befunden [Rudolf et al., 2013] (vgl. auch Abbildung 10.1).

Ob es sich um einen Hybrid zwischen den Biotypen *pipiens* und *molestus* handelt, lässt sich allerdings nur mit Sicherheit feststellen, wenn ein einzelnes Individuum untersucht wird, da für den Hybriden Signale in zwei Kanälen (im *Cx. p. pipiens* und im *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* Kanal) zu sehen sein müssen. Ist die DNA mehrerer Individuen in einem Reaktionsgefäß vermischt, kann man von einem Signal in beiden Kanälen nicht mehr auf einen Hybrid schließen, da diese Signale auch durch einzelne Individuen der Biotypen *Cx. p. pipiens* und *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* hervorgerufen werden.

Zur Überprüfung der Sensitivität der PCR wurden die Positivkontrollen in unterschiedlichen Verhältnissen zueinander in einer gemeinsamen Reaktion eingesetzt. Auch wenn die DNAs unterschiedlicher Arten zusammengemischt wurden, konnten dennoch klare Signale in allen relevanten Kanälen gesehen werden (vgl. Abbildung 10.1).

Phase	Dauer	Temperatur
Initiale Denaturierung	15 min	95°C
Denaturierung	15 s	95°C
Annealing	20 s	65°C (-10*0,5°C Touchdown / Zyklus)
Extension	30 s	72°C
Hold	30 s	40°C

Tabelle 10.3.: Temperaturprofil der taxonomischen Real-time PCR

10.2. Ergebnisse der taxonomischen Real-time PCR

Mit der taxonomischen Real-time PCR wurden alle *Culex*-Pools, welche im Jahr 2012 gesammelt wurden und ein Großteil der in 2011 gefundenen Pools untersucht. So wurden etwa von den *Culex*-Pools der Standorte Greifswald und Loissin aus den im Jahr 2011 gesammelten Stechmückenpools

10. Taxonomische Multiplex Real-time PCR zur Unterscheidung der Arten des *Cx. pipiens*-Komplexes

nur einige Stichproben mit der neu etablierten taxonomischen Real-time PCR untersucht,

Insgesamt wurden in dieser Arbeit 17 464 Individuen in 1137 Pools mit dieser PCR getestet (vgl. Tabelle 10.4).

Es konnten reine *Cx. p. pipiens*-, *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus*- und *Cx. torrentium*-Pools festgestellt werden, ebenso wie gemischte Pools, die aus den unterschiedlichen Kombinationen der nachgewiesenen Arten zusammengesetzt waren, weiterhin wurde noch vier Hybride zwischen den Biotypen *Cx. p. pipiens* und *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* nachgewiesen.

117 Individuen in 18 Pools konnten nicht weiter zugeordnet werden.

Bei dem Großteil der untersuchten Proben (42%) handelte es sich um gemischte Pools, die aus den Arten *Cx. p. pipiens* und *Cx. torrentium* bestanden (482), gefolgt von 401 reinen Pools aus *Cx. p. pipiens* (35%). Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass der Biotyp *Cx. p. pipiens* am häufigsten gefangen wurde (lediglich etwa 8% aller untersuchten Pools waren reine *Cx. torrentium*-Pools).

Abbildung 10.2 zeigt die Artverteilung aller mit dieser PCR untersuchten Pools. Die in [Rudolf et al., 2013] dargestellten Zahlen weichen von denen in dieser Arbeit genannten ab, da nur einige der Proben des BNI (Schleswig-Holstein und Hamburg) in die Auswertung dieser Studie eingeflossen sind.

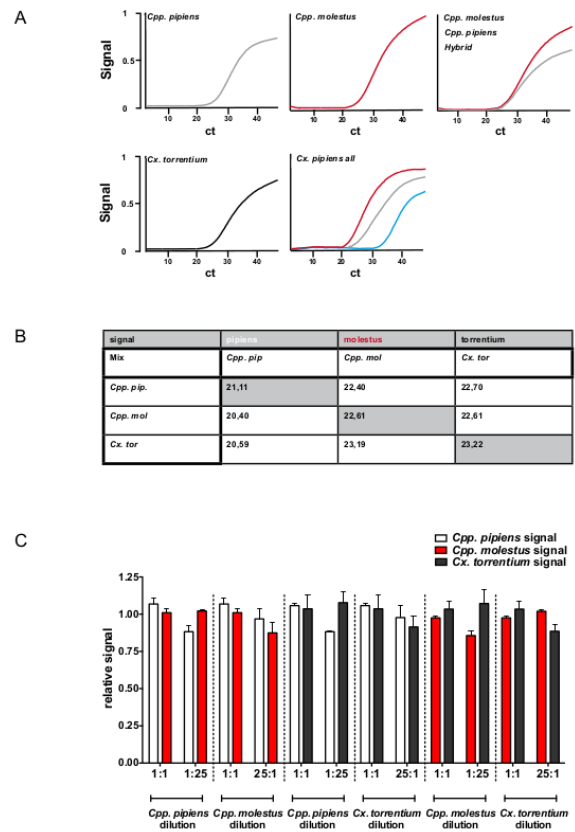


Abbildung 10.1.: Spezifität und Sensitivität der taxonomischen Real-time PCR (aus [Rudolf et al., 2013])

Art	Anzahl Individuen	Anzahl Pools
unbekannt oder negativ	117	18
<i>Cx. pipiens molestus</i>	2	2
<i>Cx. p. pipiens</i> biotyp <i>molestus</i> , <i>Cx. torrentium</i>	113	7
<i>Cx. pipiens pipiens</i>	4859	401
<i>Cx. pipiens pipiens</i> x <i>Cx. p. pipiens</i> biotyp <i>molestus</i>	4	4
<i>Cx. pipiens pipiens</i> , <i>Cx. p. pipiens</i> biotyp <i>molestus</i>	251	24
<i>Cx. pipiens pipiens</i> , <i>Cx. p. pipiens</i> biotyp <i>molestus</i> , <i>Cx. torrentium</i>	2199	113
<i>Cx. pipiens pipiens</i> , <i>Cx. torrentium</i>	9688	482
<i>Cx. torrentium</i>	231	86
Gesamt	17464	1137

Tabelle 10.4.: Ergebnisse der taxonomischen PCR

10. Taxonomische Multiplex Real-time PCR zur Unterscheidung der Arten des *Cx. pipiens*-Komplexes

An den Standorten Bobenheim-Roxheim, Dirmstein und Heidelberg konnten im Untersuchungsjahr 2012 insgesamt 4 Hybride zwischen *Cx. p. pipiens* x *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* nachgewiesen werden (zwei in Dirmstein, an den Fallenstandorten Bobenheim-Roxheim und Heidelberg jeweils einer). In [Rudolf et al., 2013] ist zudem ein Hybrid in der Metropolregion Hamburg festgestellt worden. Diese Nachweise sind dahingehend von Bedeutung, dass *Cx. p. pipiens* x *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* für Europa bislang nicht nachgewiesen war und zudem in den USA als Überträger des West-Nil-Virus gilt.

Immerhin 24 weitere Pools setzten sich nur aus den Biotypen *pipiens* und *molestus* zusammen. Des Weiteren konnte in 113 Pools DNA aller drei Arten (*Cx. p. pipiens*, biotyp *pipiens*, *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* und *Cx. torrentium*) nachgewiesen werden. Allein die Anzahl der gemischten Pools und damit die Tatsache, dass beide Biotypen offensichtlich regelmäßig am selben Standort vorkommen, lassen den Schluss zu, dass es sich bei der Hybridisierung zwischen den Biotypen um kein seltenes Ereignis handelt, sondern dass die Wahrscheinlichkeit einer Hybridisierung sogar relativ groß ist.

Betrachtet man die regionale Verteilung der Arten so fällt zudem auf, dass im Norden und Osten Deutschlands die Zahl der reinen *Cx. p. pipiens* Pools überwiegt, während nach Süden hin die Anzahl an *Cx. torrentium* (entweder in reinen oder gemischten Pools) deutlich zunimmt. So wurden von den 401 reinen *Cx. pipiens pipiens*-Pools alleine an den Standorten Greifswald und Loissin zusammen 305 Pools gesammelt, sodass davon ausgegangen werden kann, dass es sich bei dem Großteil der an der Ostsee gefangenen *Culex*-Arten um *Cx. pipiens pipiens* biotyp *pipiens* handelt.

Des Weiteren wird in Abbildung 10.2 die anteilige Zunahme von *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* nach Süden hin deutlich. So konnten in den Bundesländern Schleswig-Holstein, Mecklenburg-Vorpommern, Brandenburg, Hessen und Sachsen-Anhalt keine Pools, welche den Biotypen *molestus* beinhalteten, nachgewiesen werden, während in Bayern (mit den Standorten Isar, Osterseen und Chiemsee) der Anteil der *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* in reinen und gemischten Pools bezogen auf die Gattung *Culex* sogar überwiegt. Mit 62 von insgesamt 144 *Culex*-Pools ist auch am Bodensee die Anzahl an Pools hoch, in denen die DNA beider Biotypen zu finden war.

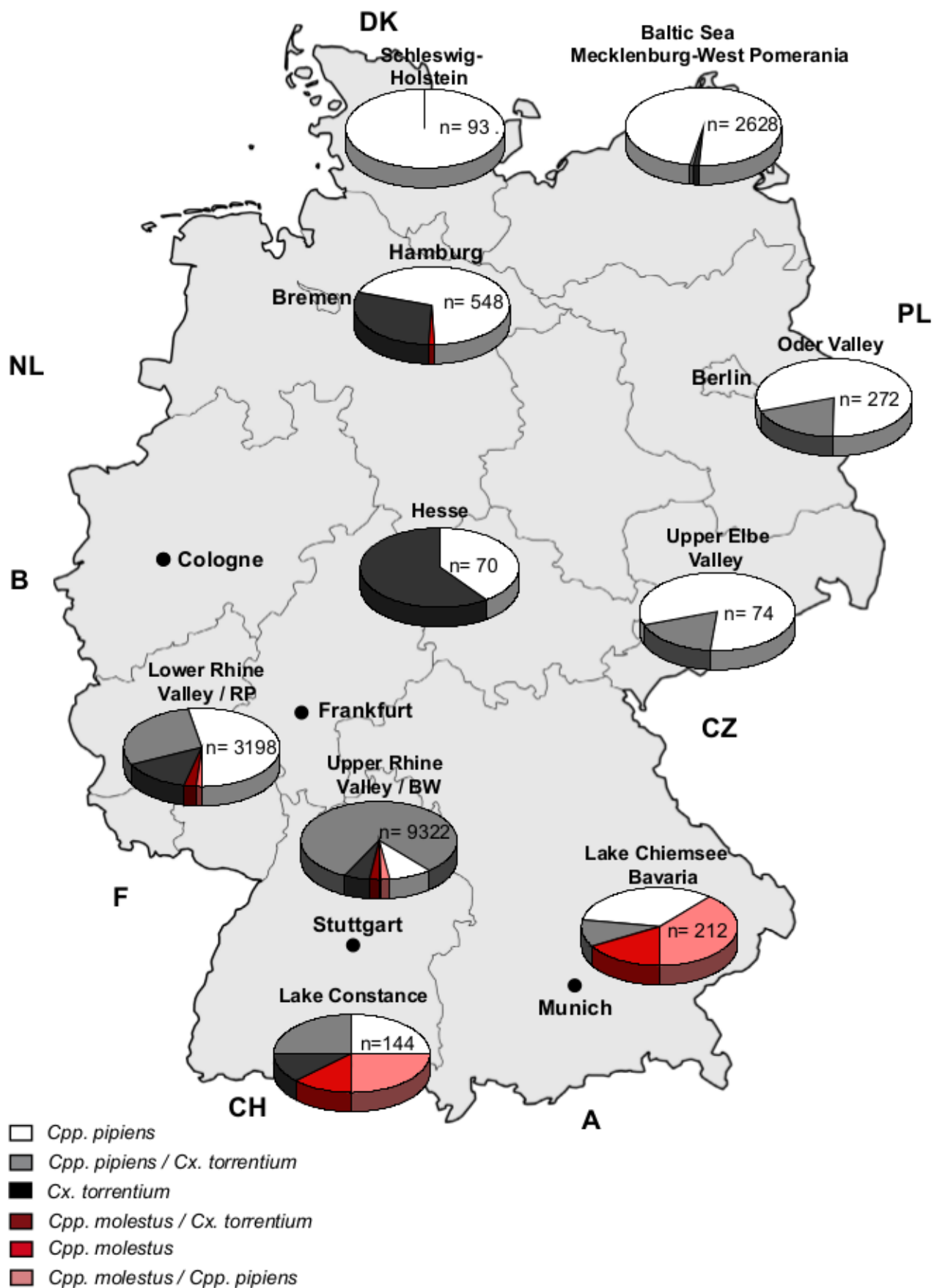


Abbildung 10.2.: Verteilung aller untersuchten *Culex*-Pools (aus [Rudolf et al., 2013])

11. Nematoden-Screening

Die Multiplex Real-time PCR Fila-Haem wurde im Winter 2011 entwickelt, weshalb zum Screening der Stechmücken-DNA auf das Vorhandensein von parasitären Nematoden vorher eine normale Real-time PCR eingesetzt wurde.

11.1. 12s mitochondriale Real-time PCR zum Nachweis von Filarien

Aufbau und Einstellung der 12s mitochondrialen Real-time PCR zum Nachweis von Filarien

Die Sequenzen der 12s mitochondrialen Real-time PCR (im Folgenden 12s mito Real-time PCR) von Primern und Sonde entstammen, ebenso wie das zugehörige Protokoll der virologischen Arbeitsgruppe Schmidt-Chanasit [Schmidt-Chanasit, 2010].

Als Zielsequenz wurde ein Abschnitt mitochondrialer DNA gewählt, die für ribosomale RNA codiert und innerhalb eines multicopy Gens, dem 12s rRNA Gen, innerhalb des mitochondrialen Genoms liegt. Wie für Real-time PCRs üblich, so ist auch hier die Länge des Amplikons mit 94 bp verhältnismäßig gering.

Tabelle 11.1 zeigt die Sequenzen der F- und R-Primer (FILA F und FILA R), ebenso wie die Probe-Sequenz (FILA P). Die taqman-Sonde ist am 5'-Ende mit FAM und am 3'-Ende mit dem Black Hole Quencher BHQ1 gelabelt. Mit 64°C liegt die Schmelztemperatur der Sonde, wie vorgeschrieben, über der T_m der beiden Primer.

Oligonucleotid	Sequenz (5'→3')	Länge	T_m	GC-Gehalt
FILA F	TGG ATT AGT ACC CAG GTA ATC	21 bp	57°C	43%
FILA R	CCA AAG AAA AAT CTA AAG TCA GTC	24 bp	57°C	33%
FILA P	FAM - AAC AAA ACT TTA CTC CCG A - BHQ1	19 bp	64°C	39%

Tabelle 11.1.: Eigenschaften der Oligonucleotidsequenzen der 12s mito Real-time PCR

Die Zielsequenz wurde so gewählt, dass Nematoden spezifisch erkannt werden, während andere Tier- oder Pflanzengruppen von der PCR nicht erfasst werden. Es handelt sich um eine Pan-PCR, welche unterschiedliche Filarien-Arten detektieren kann, die also spezifisch für den Nachweis Nematoden ist, mit der zunächst aber keine genauere Aussage bezüglich der nachgewiesenen Art gemacht werden kann.

Das Reaktionsvolumen wurde auf 20 µl festgelegt, weshalb das Pipettierschema (vgl. Tabelle 11.2) so aufgesetzt wurde, dass pro Reaktion ein Mastermix-Volumen von 18 µl erreicht werden konnte. Um Volumenverlust durch Ungenauigkeiten beim Pipettiervorgang entgegenzuwirken, wurden beim Zusammengeben der einzelnen Reagenzien jeweils 10 % des eigentlichen Volumens aufgeschlagen, wobei von der zu untersuchenden DNA jeweils 2 µl eingesetzt wurde.

11. Nematoden-Screening

Reagens	Konz. Stock [μM]	Konz. Ansatz [μM]	V/R [μl]	V_{ges} [μl]	V_{pip} [μl]
2 x QuantiFast Probe Mix	2 x	1 x	10	100	110
FILA F	10	0,6	1,2	12	13,2
FILA R	10	0,6	1,2	12	13,2
FILA P	10	0,2	0,4	4	4,4
Wasser			5,2	52	57,2

Tabelle 11.2.: Pipettierschema der 12s mito Real-time PCR. Beispiel für einen Ansatz mit 10 Proben. (V/R= Volumen pro Reaktion, V_{ges} =Gesamtvolumen, V_{pip} = zu pipettierendes Volumen)

Die PCR wurde im LightCycler 480 (Roche Applied Science) durchgeführt, wobei 96 well-Platten verwendet wurden, um möglichst viele Proben gleichzeitig untersuchen zu können.

Das Temperaturprofil (vgl. Tabelle 11.3) wird mit einem „hot start“, also einer Art Hitzeschock von 3 min bei 95°C eingeleitet. Ihm schließen sich 45 Zyklen an, in denen 10 s Denaturierung bei 95°C, 15 s Annealing bei 60°C und 15 s Elongation bei 72°C aufeinander folgen.

Da es sich um eine Real-time PCR handelt, kann die Amplifikation direkt am Monitor mitverfolgt werden.

Für jeden PCR-Lauf wurden - neben den zu untersuchenden Proben - noch jeweils eine Negativkontrolle in Form von Wasser und eine Positivkontrolle mit untersucht. Als Positivkontrolle wurde extrahierte DNA von *D. repens* eingesetzt.

Um die optimale Verdünnung der Positivkontrolle zu ermitteln, wurde hierzu zunächst eine Verdünnungsreihe angefertigt, die sieben Verdünnungen enthielt. Bei einer Verdünnungsreihe wird zunächst die unverdünnte Probe in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt (18 μl Wasser + 2 μl Probe). Von der 1:10-Verdünnung wurden anschließend 10 μl zu 90 μl Wasser gegeben, um eine 1:100-Verdünnung zu erhalten. Von dieser wurden wiederum 10 μl zu 90 μl Wasser gegeben, dieser Vorgang wurde wiederholt, bis eine Verdünnung von 1:10⁶ erreicht war.

Temperatur	Dauer
95°C	3 min
95°C	10 s
60°C	15 s
72°C	15 s

Tabelle 11.3.: Temperaturprofil der 12s mito Real-time PCR

Gemeinsam mit der Negativkontrolle wurden die Verdünnungen mittels PCR untersucht.

Da man die Positivkontrolle in der Regel eher niedrig dosiert einsetzt, um möglichen Kontaminationen so weit wie möglich vorzubeugen, wird eine Konzentration gewählt, bei der die Probe gerade noch als positiv erscheint, weshalb für diese Arbeit die 1:100-Verdünnung gewählt wurde (vgl. Abbildung 11.1).

Neben der Austitrierung der Positivkontrolle wurde noch eine Inhibitionskontrolle durchgeführt. Dies wird vorgenommen, um falschnegative Ergebnisse auszuschließen, da es theoretisch möglich wäre, dass die zu untersuchende Probe einen inhibitorischen Effekt auf die PCR hat und somit eigentlich positive Proben als negativ erscheinen. Eine Inhibitionskontrolle führt man folgendermaßen durch: zu einem Mastermix, in dem sich schon zu untersuchende DNA befindet, wird noch die gleiche Menge (also 2 μl) Positivkontrolle hinzugegeben. Ist die Kontrolle erfolgreich, darf das positive Signal nicht unterdrückt werden, das DNA-Gemisch muss also in der PCR positiv erscheinen. Abbildung 11.2 zeigt die in diesem Versuch erfolgreich durchgeführte Inhibitionskontrolle.

11. Nematoden-Screening

Durchführung der 12s mito Real-time PCR zum Nachweis von Filarien Die 12s Mito Real-time PCR wurde lediglich 2010 als Einzel-PCR durchgeführt, da anschließend die Multiplex real-time PCR FilaHaem entwickelt wurde.

Zu Beginn wurden die Pools, welche aus bis zu 25 Individuen bestanden, zu „Super-Pools“ zusammengefasst. Hierzu wurden Aliquots von jeweils fünf Pools zusammengefasst. Dies erschien sinnvoll, da die Probenanzahl mit 2971 Pools sehr groß war. Durch das Poolen reduzierte sich die Anzahl der Proben auf 612 Super-Pools.

Da die zunächst gewählte 1:30 Verdünnung der einzelnen Proben zu hoch war, wurden alle Proben im Verhältnis 1:10 verdünnt.

Um den Vorgang effizienter zu gestalten, wurden für jeden Super-Pool 65 µl H_2O in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und jeweils 5 µl der im Super-Pool enthaltenen Proben hinzugegeben, sodass man auf ein Endvolumen von $65 \mu\text{l} + 5 \cdot 5 \mu\text{l} = 100 \mu\text{l}$ kam.

War ein Super-Pool positiv, so wurde auf die darin enthaltenen Pools (die als Stock aufbewahrt wurden) zurückgegriffen und diese erneut mit der 12s mito Real-time PCR untersucht (weiterhin mit einer 1:10-Verdünnung).

Waren auch die untersuchten Einzelproben positiv, so wurden diese anschließend mit drei unterschiedlichen Gel-PCRs untersucht, die jeweils auf unterschiedliche Zielgene ausgerichtet waren.

11.1.1. Ergebnisse der 12s Mito Real-time PCR zum Nachweis von Filarien

Von den insgesamt 2971 untersuchten Pools zeigten 149 ein positives Signal in der Real-time PCR. 139 Davon waren Pools, welche aus *Cx. pipiens* / *torrentium* bestanden, 5 Pools beinhalteten *Ae. vexans*, bei jeweils zwei Pools handelte es sich um *An. claviger* und *Cs. annulata*, während der letzte Pool aus Individuen der Art *Oc. sticticus* bestand.

99 der positiven *Cx. pipiens* / *torrentium* Pools stammte aus Gravid-Traps, die in Großsachsen aufgestellt wurden, die anderen 40 aus Weinheim.

Wie Abbildung 11.3 zu entnehmen ist, waren 60% der aus Großsachsen und 42% der aus Weinheim untersuchten *Cx. pipiens* / *torrentium* Pools positiv. Drei der positiven *Ae. vexans* Pools stammten aus Fängen auf der Insel Rott, die anderen beiden aus Fängen am Bodensee und an der Elbe.

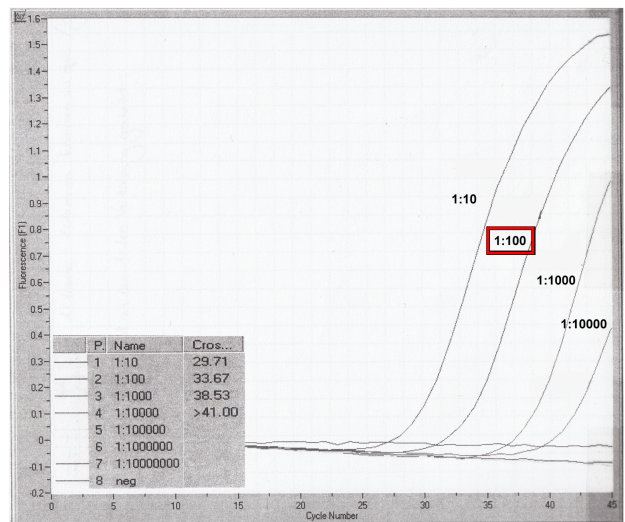


Abbildung 11.1.: Verdünnungsreihe zur Ermittlung der einzusetzenden Konzentration der Positivkontrolle

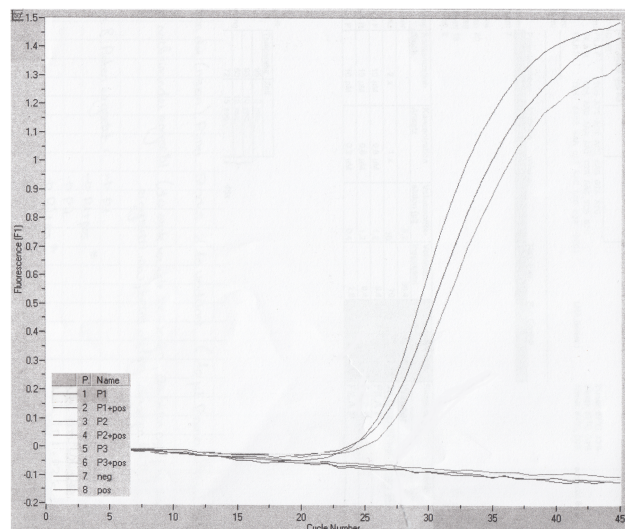


Abbildung 11.2.: Inhibitionskontrolle

11. Nematoden-Screening

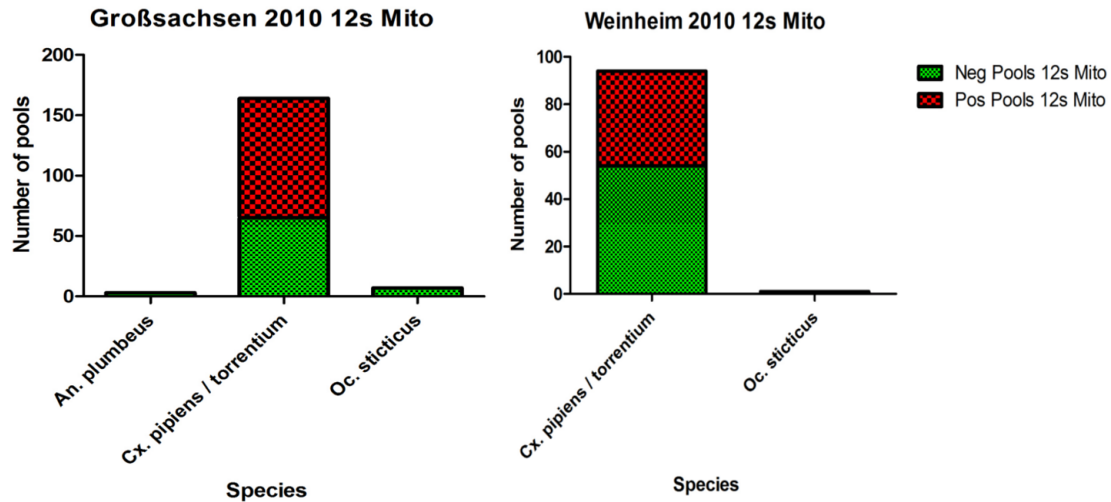


Abbildung 11.3.: Ergebnisse der 12s Mito Real-time PCR für Großsachsen und Weinheim (2010)

Die positiven *Cs. annulata* und *An. claviger* Pools wurden alle in Waghäusel gesammelt, der *Oc. sticticus* Pool stammte aus Fallen, die am Chiemsee aufgehängt wurden.

11.1.2. Folge-PCRs für die Sequenzierung auf Filarien positiver Proben - Aufbau und Einstellung

Im Anschluss an die Real-time PCR wurden alle 149 in der Real-time PCR positiven Pools mit drei nematodenspezifischen Pan-Filarien Gel-PCRs untersucht, denen unterschiedliche Zielgene (12s, 16s und COI) zugrunde lagen. Diese PCRs wurden gewählt, da die jeweils etwa 500 bp langen Amplifikate für eine Sequenzierung zur Überprüfung der positiven Sequenzen optimal sind (vgl. Tabelle 11.4).

Oligonucleotid	Sequenz (5'→3')	Länge	T_m	GC-Gehalt	Amplifikat
F-Primer (#1412)	GTT CCA GAA TAA TCG GCT A	19 bp	54°C	42%	509 bp
R-Primer (#1413)	ATT GAC GGA TGR TTT GTA CC	20 bp	56°-58°C	40-45%	
F-Primer (16s OvB)	ACC CAC ATT GCA TTC CTT	18 bp	52°C	44%	487 bp
R-Primer (16s OvC)	AGC CTT AGC GTG ATG GCA TA	20 bp	60°C	56%	
F-Primer (CO1-F)	CTC CTG AGA TGG GGT TTC C	19 bp	60°C	58%	538 bp
R-Primer (CO1-R)	CCA AAC AAA CGA TCC TTA TC	20 bp	56°C	40%	

Tabelle 11.4.: Primersequenzen der Pan-Filarien Gel-PCRs

Die Protokolle und Primersequenzen wurden jeweils von der AG Molekulare Parasitologie des BNI übernommen.

Das Pipettierschema ist für alle drei Gel-PCRs das gleiche und auf ein Reaktionsvolumen von 20 µl ausgelegt, wobei zu 18 µl Mastermix jeweils 2 µl der zu untersuchenden DNA hinzugegeben wurden (vgl. Tabelle 11.5).

Auch das Temperaturprofil der unterschiedlichen Pan-Filarien Gel-PCRs unterscheidet sich nicht. Jede PCR beginnt mit einem fünf minütigen hot start von 95°C. Anschließend folgen 50 Zyklen, in denen sich Denaturierung (30 s bei 95°C), Annealing (30 s bei 50°C) und Elongation (1 min bei 72°C) abwechseln (vgl. Tabelle 11.6).

11. Nematoden-Screening

Reagens	Konz. Stock	Konz. Ansatz	V/R [μ l]	V_{ges}	V_{pip}
2x HotStarTaq Plus Master Mix (Qiagen)	2x	1x	10	100	110
F-Primer	10 μ M	0,5 μ M	1	10	11
R-Primer	10 μ M	0,5 μ M	1	10	11
Wasser			6	60	66

Tabelle 11.5.: Pipettierschema für den Mastermix der Pan-Filarien Gel-PCRs, Beispiel für zehn Proben

Im Anschluss an die PCRs wurden die Amplifikate mittels Agarose-Gel-Elektrophorese überprüft. Hierzu wurden die PCR-Produkte auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen, wobei die Gele in der Regel etwa 30 min bei 90 V liefen. Als Marker wurde der GeneRuler 1kb DNA-Ladder (Invitrogen) eingesetzt.

Als Positivkontrolle wurde *D. repens*-DNA in unterschiedlichen Verdünnungen (PCR-abhängig) verwendet.

Temperatur	Dauer
95°C	5 min
95°C	30 s
50°C	30 s
72°C	1 min

Tabelle 11.6.: Temperaturprofil der Pan-Filarien Gel-PCRs

Pan-Filarien 12s Gel-PCR Forward- und Reverse-Primer der Pan-Filarien 12s Gel-PCR (#1412, #1413) sind Sequenzen des 12s rRNA Gens des mitochondrialen Genoms und amplifizieren eine Sequenz von 509 bp (vgl. Tabelle 11.4).

Die Schmelztemperatur und der GC-Gehalt des R-Primers können aufgrund des Wobbles „R“, an dessen Stelle ein Adenin oder ein Guanin stehen kann, nur geschätzt werden und beträgt zwischen 56°C und 58°C.

Als Positivkontrolle für die Agarose-Gel-Elektrophorese wurde *D. repens*-DNA in einer 1:100-Verdünnung verwendet.

Pan-Filarien 16s Gel-PCR Eine weitere PCR, mit welcher die in der Real-time PCR positiven Pools untersucht wurden, ist die Pan-Filarien 16s Gel-PCR.

Die Primersequenzen 16s OvB (F-Primer) und 16s OvC (R-Primer) amplifizieren ein Fragment von 487 bp Länge, das innerhalb des 16s rRNA Gens des mitochondrialen Genoms liegt (vgl. Tabelle 11.4).

Pipettierschema und Temperaturprofil dieser PCR stimmen mit den Protokollen der anderen Pan-Filarien PCRs (vgl. Tabellen 11.5 und 11.6).

Die PCR wurde nach Protokoll durchgeführt, wobei pro Reaktion 18 μ l Mastermix und 2 μ l Probe eingesetzt wurden. Auch hier wurde die zuvor verwendete *D. repens*-DNA eingesetzt, allerdings unverdünnt, da nur diese in den Testläufen ein positives Signal gab.

Im Anschluss an die PCR wurden die PCR-Produkte auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen (30 min bei 90 V).

Pan-Filarien COI Gel-PCR Das Amplifikat der Pan-Filarien COI Gel-PCR liegt im Cytochromoxidase I-Gen (COI) und hat eine Länge von 538 bp. Pipettierschema, Reaktionsvolumen und Temperaturprofil entsprechen auch hier den beiden anderen Gel-PCRs (vgl. Tabellen 11.5 und 11.6).

Ebenso wurde wieder *D. repens*-DNA als Positivkontrolle verwendet (diesmal in einer 1:10⁶-Verdünnung) und auch hier wurden im Anschluss an die PCR die Amplifikate auf ein 1,5%iges Agarosegel (30 min, 90 V) aufgetragen.

11.1.3. Ergebnisse der Pan-Filarien Gel-PCRs

Mit der Pan-Filarien 12s Gel-PCR wurden alle 149 in der Real-time PCR positiven Stechmückenpools auf das Vorhandensein filarialer DNA untersucht, wobei lediglich 42 der zuvor positiven Pools das positive Signal beibehielten. Es handelte sich hierbei um 38 *Cx. pipiens / torrentium*-, einen *Cs. annulata*- und einen *Oc. sticticus*-Pool (Waghäusel bzw. Chiemsee). 29 der positiven *Cx. pipiens / torrentium* Pools stammten aus Großsachsen, der Rest aus Weinheim.

Lediglich acht der 149 untersuchten Stechmückenpools zeigten ein positives Signal in der 16s Gel-PCR wobei sich alle Pools aus Stechmücken der Arten *Cx. pipiens / torrentium* zusammensetzten, die aus Weinheim (zwei Pools) und Großsachsen stammten (sechs Pools).

41 der 149 mit der COI Gel-PCR untersuchten Proben waren positiv, wobei 40 den Arten *Cx. pipiens / torrentium* und ein Pool der Art *An. claviger* (Waghäusel) angehören. Die *Cx. pipiens / torrentium* Pools stammten zu einem großen Teil aus Großsachsen (32), 8 kamen aus Weinheim.

11.1.4. Sequenzierung der in den Pan-Filarien Gel-PCRs positiven Proben

Im Anschluss an die Gel-PCRs wurden die in den Pan-Filarien Gel-PCRs positiven Proben mit dem NucleoSpin Extract II Kit aufgereinigt, um möglicherweise noch vorhandene Primer zu entfernen und die Amplifikate für die Sequenzierung vorzubereiten.

Zum PCR-Produkt wurden 200 µl Binding Buffer gegeben und das Gemisch anschließend auf eine Extraktionssäule aufgetragen. Anschließend wurde zentrifugiert, der Durchfluss verworfen, 700 µl Washing Buffer auf die Säule geladen und wieder zentrifugiert. Auch dieser Durchfluss wurde verworfen und das Säulchen mit der daran gebundenen DNA per Zentrifugation getrocknet. Mit 20 µl Elution Buffer und erneutem Zentrifugieren wurde die DNA eluiert.

Zuletzt wurden 5 µl der aufgereinigten Probe zusammen mit 2 µl des entsprechenden F-Primers zum Sequenzieren geschickt (Seqlab, Göttingen).

11.2. Nachweis von *Setaria tundra* und einer Filarie mit einer bislang unbekanntem Sequenz

Es konnten in zwei Pools Sequenzen von *Setaria tundra* (Nematoda: Filarioidea) nachgewiesen werden, einer Filarienart, die häufig bei Rentieren und anderem Rotwild vorkommt.

Die Stechmücken des einen positiven Pools (Poolnr. 502) gehören der Art *Oc. sticticus* an und wurden am 29./30.06.2010 mittels EVS-Fallen am Chiemsee gesammelt. Der zweite positive Pool (1259) stammt von der Insel Rott bei Karlsruhe (12./13.08.2010) und besteht aus *Ae. vexans*. Diese Sequenz ist in GenBank unter der Nummer JN228378 zu finden.

Das Chromatogramm in Abbildung 11.4 zeigt das Ergebnis der Sequenzierung des *Setaria tundra* positiven Stechmückenpools 1259. Wie zu erkennen ist, nimmt die Qualität der Sequenz ab Base 230 stark ab (die Peaks, welche die Wahrscheinlichkeit des Einbaus der entsprechenden Base angeben werden kleiner), allerdings genügt der Abschnitt vorher bereits, um die Fremd-DNA in Pool 1259 eindeutig als *Setaria tundra*-DNA zu identifizieren.

Zusätzlich wurden noch 25 weitere Sequenzen gefunden, die alle in *Cx. pipiens / torrentium* Pools nachgewiesen werden konnten. Lediglich eine der 25 gefundenen Sequenzen (Pool 43) wurde in die Datenbank eingegeben und kann dort unter der Nummer JN228379 abgerufen werden. In [Czajka

11. Nematoden-Screening

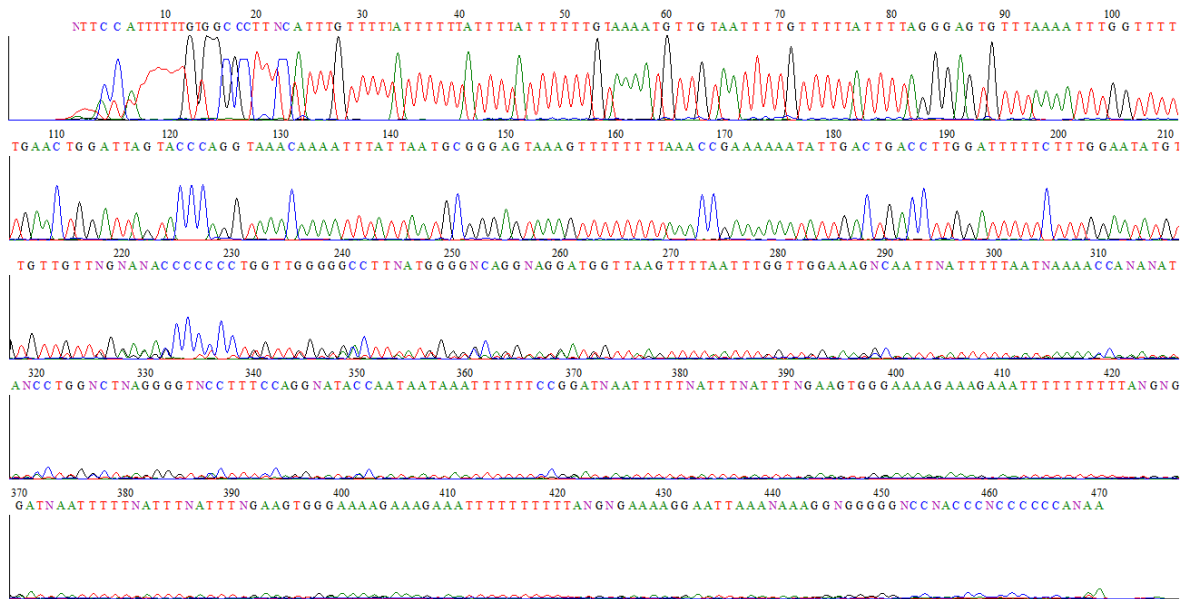


Abbildung 11.4.: Chromatogramm des *S. tundra* positiven Pools 1259

et al., 2012] werden weitere Sequenzen genannt, die mit den Unbekannten übereinstimmen und sich in der Datenbank befinden, allerdings werden diese in der vorliegenden Arbeit nicht in die Auswertung mit aufgenommen, da sie aus Stechmücken einer Studie von 2009 stammen.

12. Vogelmalaria-Screening

Die Erreger der Vogelmalaria (*Plasmodium spec.*, *Haemoproteus*, *Leukozytozoon*) treten auch bei heimischen Singvögeln häufig auf, lösen bei ihnen nach bisherigem Kenntnisstand keine Symptome aus [Huijben et al., 2007].

Im Sommer 2010 starben mehrere Inkaseeschwalben (*Larosterna inca* BLYTH 1852) im Heidelberger Zoo an Vogelmalaria (Dr. Stockklausner, mündlich), weshalb das Screening der Stechmücken auf Haemosporidien, welche die aviäre Malaria auslösen, ausgeweitet wurde.

12.1. Aufbau und Durchführung auf Haemosporidien-DNA sensitiver Nested-PCRs

Im Winter 2010 wurden die ersten PCRs, die dem Nachweis von Vogelmalaria dienen sollten, durchgeführt.

Zur ersten Untersuchung der Proben auf das Vorhandensein von haemosporidialer DNA im Winter 2010 wurden zwei PCRs (Hepatocystis-Gel Cytochrom b und Hepatocystis-Gel Cytochromoxidase I) eingesetzt, die zusammen alle potentiellen Vogelmalaria-Erreger abdecken sollten. Bei beiden PCRs handelt es sich um Nested-PCRs, d. h. pro Zielgen wurden jeweils zwei PCRs durchgeführt, wobei die Amplifikate der ersten PCR-Runde (Outer-PCR) als Ausgangsproben für die zweite PCR-Runde (Inner-PCR) herangezogen wurden, deren Zielsequenz innerhalb des Outer-Amplifikates liegt. Die Protokolle und Primersequenzen dieser PCRs wurden von der ehemaligen AG Drostes des BNI übernommen.

In Tabelle 12.1 sind die Primersequenzen der Inner- und Outer-PCRs aufgeführt. Da es sich bei den beiden Nested-PCRs um Gel-PCRs handelt, wurden lange Fragmente amplifiziert (hier zwischen 674 bp und 1285 bp), die im Anschluss auf ein Agarosegel aufgetragen werden sollten.

Für den Primer COI Inner F ist bei der Schmelztemperatur ein Intervall (49,3 - 52,4°C) angegeben, welches aufgrund der in der Primersequenz vorhandenen Wobbles zustande kommt. R (puRine) kann hierbei für Adenin (A) oder Guanin (G), Y (pYrimidine) für Cytosin (C) oder Thymin (T) und W (Weak) für A oder T codieren.

Die Pipettierschemata der Outer- und der Inner-PCRs sind jeweils gleich und auf ein Reaktionsvolumen von 20 µl ausgerichtet. Während bei den Outer-PCRs 18 µl Mastermix und 2 µl Probe eingesetzt wurden, wurden für die Inner-PCRs 19,5 µl Mastermix und 0,5 µl Amplifikat der Outer-PCR verwendet. Die zusätzlichen 1,5 µl Mastermix pro Reaktion wurden durch ein entsprechendes Volumen an Wasser kompensiert (vgl. Tabelle 12.2).

Bezüglich der Temperaturprofile der PCRs gab es Unterschiede sowohl in der Annealing-Temperatur, als auch in der Zeit, die für das Annealing und die Elongation vorgesehen waren. In Tabelle 12.3 sind die verschiedenen Profile aufgeführt. Einem Hot Start von 5 min bei 95°C folgen jeweils 40 Zyklen, in denen sich Denaturierung, Annealing und Elongation abwechseln.

Im Anschluss an die PCRs (und zwar nach Inner und Outer) wurden die Amplifikate auf ein 1,5%iges

12. Vogel malaria-Screening

Oligonucleotid	Sequenz (5'→3')	T_m	Amplifikat
Cytb Outer F	TAA TGC CTA GAC GTA TTC CTG ATT ATC CAG	56,15°C	1253 bp
Cytb Outer R	TGT TTG CTT GGG AGC TGT AAT CAT AAT GTG	28,23°C	
Cytb Inner F	TCA ACA ATG ACT TTA TTT GG	43,80°C	674 bp
Cytb Inner R	TGC TGT ATC ATA CCC TAA AG	45,98°C	
COI Outer F	CTA TTT ATG GTT TTC ATT TTT ATT TGG TA	48,57°C	1285 bp
COI Outer R	AGG AAT ACG TCT AGG CAT TAC ATT AAA TCC	55,30°C	
COI Inner F	ATG ATA TTT ACA RTT CAY GGW ATT ATT ATG	49,3 - 52,4°C	~1000 bp
COI Inner R	GTA TTT TCT CGT AAT GTT TTA CCA AAG AA	52,8°C	

Tabelle 12.1.: Primersequenzen der Haemosporidien PCRs, GC-Gehalt, T_m und Amplifikatlänge nach Protokoll

Reagens	Konz. Stock	Konz. Ansatz	V/R [μ l]	V_{ges} [μ l]	V_{pip} [μ l]
Wasser			7 (8,5)	70 (85)	77 (93,5)
2x HotStarTaq Plus Master Mix	2x	1x	10	100	110
F-Primer (Outer)	10 μ M	0,5 μ M	0,5	5	5,5
R-Primer (Outer)	10 μ M	0,5 μ M	0,5	5	5,5

Tabelle 12.2.: Pipettierschema der Outer-PCRs, Beispiel für 10 Proben

Agarosegel aufgetragen, um zu überprüfen, ob die PCR funktioniert hat und wenn ja, ob eine der Proben positiv war. Da die Amplifikatmenge nach der Outer-PCR nie ausreichend groß war, um als Bande auf dem Gel zu erscheinen, wurde im Anschluss immer noch die Inner-PCR durchgeführt.

Temperatur (Outer)	Temperatur (Inner)	Zeit (Cytb O)	Zeit (Cytb I)	Zeit (COI O)	Zeit (COI I)
95°C	95°C	5 min	5 min	5 min	5 min
95°C	95°C	30 s	30 s	30 s	30 s
56°C	46°C	30 s	30 s	30 s	60 s
72°C	72°C	1,5 min	1 min	2 min	2 min

Tabelle 12.3.: Temperaturprofile der Nested-PCRs

Einstellung der Nested-PCRs Bevor mit dem Screening der Proben begonnen werden konnte, wurde noch die Positivkontrolle (*Plasmodium falciparum*-DNA) eingestellt und Inhibitionskontrollen durchgeführt.

Für die Hepatocystis-Gel Cytochrom b-PCR wurde *P. falciparum*-DNA in einer Verdünnung von 1 : 10⁴ eingesetzt, für die Hepatocystis-Gel Cytochromoxidase-PCR wurde eine 1:10-Verdünnung der DNA gewählt (vgl. Abbildung 12.1).

Zur Durchführung der Inhibitionskontrollen wurden drei Stechmücken-Super-Pools (P1, P2 und P3) als Proben eingesetzt. Diese wurden jeweils einzeln und mit zugefügter Positivkontrolle (pos) in der PCR untersucht. Als Negativkontrolle wurde Wasser verwendet.

Im Anschluss an die PCRs wurden die Proben auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen und 30 min bei 90 V laufen gelassen.

Das rechte Gel in Abbildung 12.2, das Ergebnis der Inner-PCR, zeigt vier Banden auf der erwarteten Höhe von etwa 600-700 bp (das Amplifikat hat eine erwartete Größe von 674 bp). Die Banden in den Spuren zwei, vier und sechs spiegeln das Ergebnis der Inhibitionskontrolle wider: obwohl die

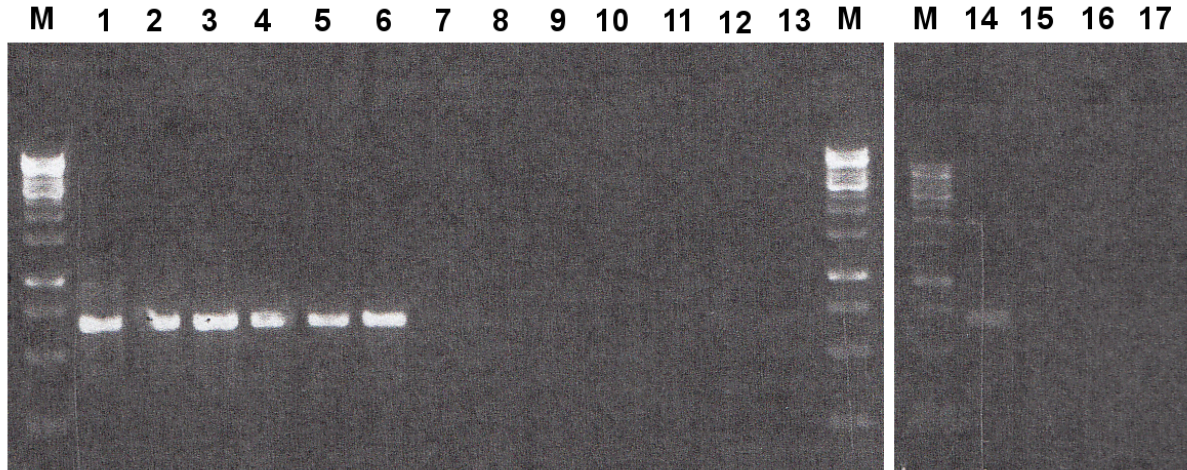


Abbildung 12.1.: Agarosegel der Einstellung der Positivkontrolle der Hepatocystis Cytochrom b-PCR

Positivkontrolle mit den zu untersuchenden Stechmückenproben vermengt ist, findet keine Inhibition des positiven Signals statt. In den Spuren eins, drei und fünf sind die Stechmücken Super-Pools ohne zusätzliche Positivkontrolle eingesetzt worden.

Man kann ebenfalls erkennen, dass die Amplifikatmenge nach der Outer-PCR zu gering war, weshalb auch keine Banden im linken Gel zu sehen sind.

12.1.1. Ergebnisse der Nested-PCRs

Die Nested-PCRs wurden lediglich im Jahr 2010 und nur für 94 Proben eingesetzt.

Bei den Proben handelte es sich um die Super-Pools 1c bis 94c, die aus jeweils fünf Pools (in einer 1:10-Verdünnung) zusammengesetzt waren.

In diesen Proben konnten keine Haemosporidien nachgewiesen werden. Allerdings muss angemerkt werden, dass die PCRs nach den Testläufen, in denen Positivkontrollen eingestellt und die Inhibitionskontrollen durchgeführt wurden, nicht mehr zuverlässig funktioniert haben. Der Grund hierfür war nicht zu ermitteln, weshalb, diese PCRs aufgegeben wurden.

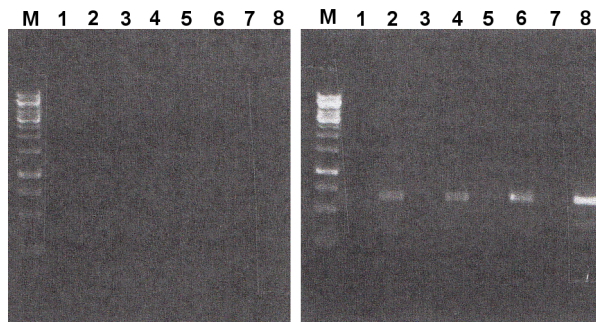


Abbildung 12.2.: Agarosegel der Inhibitionskontrolle der Hepatocystis-Gel Cytochrom b-PCR. Links: Outer-PCR, rechts: Inner-PCR. Gel-Belegung: 1: P1, 2: P1+pos, 3: P2, 4: P2+pos, 5: P3, 6: P3+pos, 7: Negativkontrolle, 8: Positivkontrolle

13. Multiplex Real-time PCR FilaHaem

Im Winter 2011 wurde eine Multiplex Real-time PCR entwickelt, mit der es möglich ist Nematoden und Haemosporidien nachzuweisen.

Als im Vorjahr die Haemosporidien-PCRs nicht mehr zuverlässig liefen, mussten diese Untersuchungen vor allem aus zeitlichen Gründen abgebrochen werden. Die Etablierung einer Multiplex Real-time PCR bedeutet für das Screening der Stechmücken eine enorme Zeitersparnis. Während eine vollständige Nested-PCR mit einem anschließend laufenden Agarosegel ca. sieben bis acht Stunden dauert, ist diese Real-time PCR (mit Vorbereitungszeit) bereits nach drei Stunden fertig. Auf diese Weise ermöglicht sie es, das Screening mit einem hohen Durchsatz an Proben in verhältnismäßig kurzer Zeit durchzuführen. Zudem liegen dieser PCR nicht nur ein sondern drei Zielgenen zugrunde, sodass gleichzeitig auf das Vorhandensein von Nematoden- und Haemosporidien-DNA gescreent werden kann.

13.1. Etablierung der Multiplex Real-time PCR FilaHaem

Ursprünglich sollte die PCR so ausgerichtet sein, dass je zwei Zielsequenzen nematodenspezifisch bzw. haemosporidienspezifisch sein sollten, weshalb vier Primer-Sonden-Triplets benötigt wurden.

Für die Nematoden wurde beschlossen, die Primer- und SONDENSEQUENZEN aus der 12s mitochondrialen Real-time PCR zum Nachweis von Filarien zu verwenden, da diese gut funktioniert hatten (vgl. Tabelle 11.1). Zudem sollte ein Fragment des Cytochromoxidase I-Gens als Zielsequenz dienen.

Als Zielgene für den Nachweis der Vogel malaria-Erreger wurden 18s SSU rDNA und das Cytochrom b-Gen gewählt.

Das Vorgehen sowohl für das Heraussuchen der Nematoden-Primer und -Sonden als auch für das der Haemosporidien-Oligonucleotide war gleich. Für jedes Zielgen wurde in der Gendatenbank des NCBI nach bereits vorhandenen Sequenzen der entsprechenden Tiergruppe gesucht, diese dann heruntergeladen und mit Hilfe des Programms CLC Sequence Viewer aligniert, sodass die Primer- und SONDENSEQUENZEN letztendlich aus drei Alignments (je eins für das Cytochromoxidase I-Gen der Nematoden, eins für die 18s SSU rDNA der Vogel malaria-Erreger und eins für das Cytochrom b-Gen der Haemosporidien) herausgesucht wurden. Anhand der Alignments wurden Sequenzen gewählt, die innerhalb gut konservierter Regionen der Zielgene liegen, wobei darauf geachtet wurde, dass diese Basenfolgen spezifisch für die nachzuweisende Parasitengruppe sind. Die Spezifität der möglichen Primer wurde mit Hilfe von BLAST überprüft [Gertz, 2005]. Generell beruhte die Wahl der Primer auf den in Kapitel 8.1 bereits aufgeführten Regeln.

Mehrere Komponenten können bei der Etablierung einer PCR, vor allem bei der einer Multiplex-PCR, verändert werden. Da die Konzentrationen der einzelnen Reagenzien empirisch ermittelt werden, ergibt es den meisten Sinn, wenn man zunächst mehrere Variablen konstant hält (und dafür Standardwerte heranzieht), während ein anderer Bestandteil schrittweise eingestellt wird bis die optimale Zusammensetzung des Versuchsansatzes erreicht ist.

13. Multiplex Real-time PCR FilaHaem

Oligonucleotid (Interne Nr.)	Sequenz (5'→3')	T_m	Amp.
18sHaemproF1425 (1679)	CGC AAG CGA GAA AGT TAA AAG	55,9°C	73 bp
18sHaemproP1446 (1701)	ROX - AAT TGA CGG AAG GGC ACC ACC A - BHQ2	62,1°C	
18sHaemproR1497 (1680)	TGA GTC AAA TTA AGC CGC AAG	55,9°C	
CybHaemproF200 (1683)	GAG AAT TAT GGA GTG GAT G	52,4°C	95 bp
CybHaemtq220 (1699)	JOE - TGT TTT AGA TAT ATG CAT GCW ACW G - BHQ1	56,4°C	
CybHaemproR294 (1685)	TAA TCC TCT TAA AAT ATG	42,3°C	
12sMitoF (1693)	TGG ATT AGT ACC CAG GTA ATC	55,9°C	94 bp
12sMitoTq (1695)	FAM - AAC AAA ACT TTA CTC CCG A - BHQ1	50,2°C	
12sMitoR (1694)	CCA AAG AAA AAT CTA AAG TCA GTC	55,9°C	
PhHV F	GGG CGA ATC ACA GAT TGA ATC	64°C	
PhHV Sonde	Cy5.5 - TTT TTA TGT GTC CGC CAC CAT CTG GAT C - BBQ	82°C	
PhHV R	GCG GTT CCA AAC GTA CCA A	58°C	

Tabelle 13.1.: Primer- und Sondensequenzen der Multiplex Real-time PCR FilaHaem, T_m nach Herstellerangabe (MWG), Amp.= Länge des Amplifikates

So wurden zunächst (bei einer gleichbleibenden Sondenkonzentration von 200 nM und einer $MgCl_2$ -Standardkonzentration von 4 mM) die zusammengehörigen Primern in unterschiedlichen Kombinationen eingesetzt.

Beim verwendeten Temperaturprofil wurden zunächst auch die Standardwerte des verwendeten Kits als Start-, Denaturierungs- und Elongationstemperaturen verwendet, während die Annealingtemperatur an die verwendeten Oligonucleotidsequenzen angepasst wurde. Da sich die Schmelztemperaturen der Primer- und Sonden zum Teil um 20°C unterscheiden wurde für das Annealing ein sogenannter Touchdown verwendet, d. h. ausgehend von einer bestimmten Ausgangstemperatur (hier zunächst 52°C) wurde diese pro Zyklus um 0,5°C gesenkt, bis die gewünschte End-Annealingtemperatur erreicht war (in diesem Fall 42°C).

Gewählte Konzentrationen an Primern, Sonden und Magnesiumchlorid wurden als optimal erachtet, wenn

1. ein PCR-Produkt spezifisch amplifiziert wurde,
2. die Amplifikationskurve der Kurve eines beschränkten Wachstums entsprach,
3. der C_t – Wert unter 30 lag,
4. die verwendeten Sondenkonzentration nicht dazu führte, dass das Sondersignal in einen falschen Kanal hineinstrahlte.

Anhand dieser Prämissen wurden schließlich zwei Haemosporidien-spezifische Primer- und Sondenkombinationen innerhalb der Zielsequenz der 18s SSU rDNA und innerhalb des Cytochrom b-Gens gefunden. Der ursprüngliche Gedanke an zwei Nematoden-Zielgene wurde verworfen, da die möglichen Primersequenzen des Cytochromoxidase I-Gens mit den anderen Oligonucleotidsequenzen im Multiplex-Ansatz nicht kompatibel waren. Somit wurde in der FilaHaem-PCR letztendlich nur ein Primer-Sonden-Triplett zum Nachweis von Nematoden verwendet. Die gewählten Nucleotidsequenzen sind in Tabelle 13.1 dargestellt, wobei 12s Mito nematodenspezifisch und die anderen beiden (18s Haempro und Cytb Haempro - im Folgenden 18s Haem und Cytb Haem) haemosporidienspezifisch sind.

13. Multiplex Real-time PCR FilaHaem

Zur Untersuchung der Primerspezifität wurden *Loa loa* als Positivkontrolle für die Nematoden-Primer und *Plasmodium falciparum* als Positivkontrolle der Haemosporidien Primersequenzen untersucht. Da im Mastermix alle Primer enthalten waren (vgl. Tabelle 13.5) hätten diese die Möglichkeit gehabt, unspezifisch zu amplifizieren, dies war allerdings nicht der Fall. Abbildung 13.1 zeigt das Ergebnis dieser Überprüfung, wobei jeweils ein Doppelansatz verwendet wurde. Dargestellt ist die bildliche Ausgabe aller vier Kanäle des RotorGene-PCR-Cyclers. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Wachstumskurven, welche die Produktion des entsprechenden Amplifikates anzeigen, nur in den spezifischen Kanälen auftreten. Auch liegen die C_t -Werte alle im Rahmen (vgl. Tabelle 13.2), d. h. sie haben einen Wert zwischen 20 und 26. C_t -Werte, die 30 und höher sind, die also eine sehr geringe Amplifikatmenge anzeigen, werden in der Regel als falschpositiv erachtet und fließen in die Auswertung positiver Daten nicht mit ein.

Zielgen	C_t -Wert
12s Mito Fil	24,8
18s Haem	20,8
Cytb Haem	22,6
Inhibitionskontrolle	25,7

Tabelle 13.2.: C_t -Werte der Positiv- und Inhibitionskontrollen

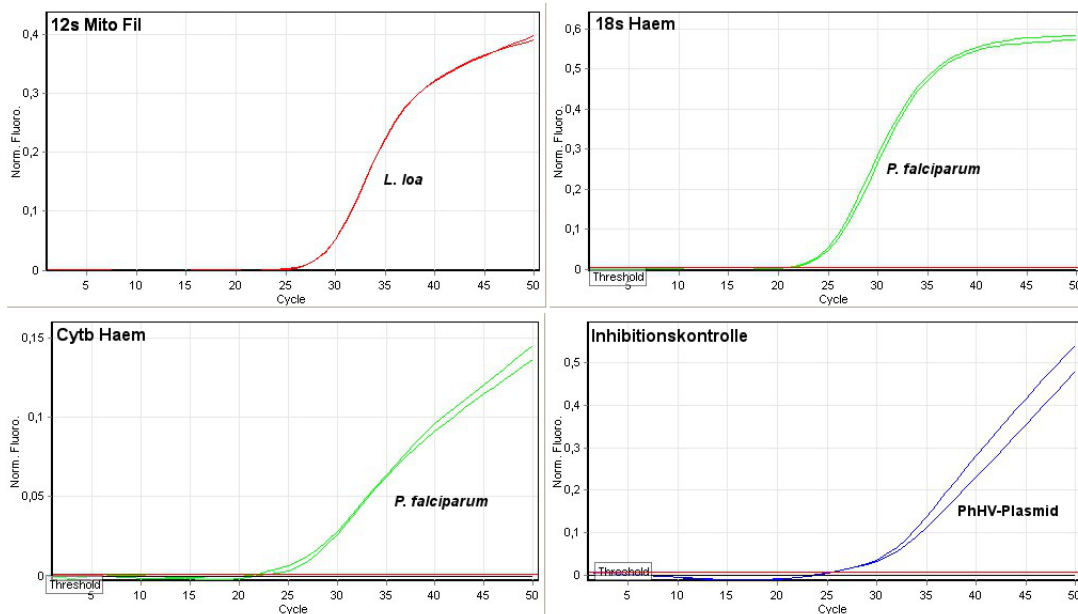


Abbildung 13.1.: Primerspezifität der FilaHaem Real-time PCR

Während die Sonden in niedrigen Konzentrationen verwendet wurden (50 nM, 12s Mitotq nur 10 nM), wurden die Primer in Konzentrationen zwischen 300 nM und 900 nM eingesetzt. F- und R-Primer des Cytochrom b-Gens wurden asynchron, also in unterschiedlichen Konzentrationen (300 nM und 900 nM) in der PCR verwendet, die Primer der anderen beiden Zielgene wurden in gleichen Verhältnissen eingesetzt (vgl. Tabelle 13.3).

Nach der Einstellung der Primer- und Sondenkonzentrationen wurde noch das Temperaturprofil der PCR optimiert. Hierbei wurde vor allem die Annealing-Temperatur an die gewählten Oligonucleotide angepasst (vgl. Tabelle 13.4).

Das Temperaturprofil der FilaHaem Multiplex Real-time PCR beginnt mit einem 15 minütigen Hot Start bei 95°C. Ihm schließen sich 50 Zyklen an, in denen Denaturierung (15 s bei 95°C), Annealing und Elongation (30 s bei 72°C) aufeinander folgen. Der Annealing-Schritt beinhaltet einen Touchdown,

13. Multiplex Real-time PCR FilaHaem

Konzentration	Oligonucleotide
10 nM	12s Mitotq
50 nM	18sHaemproP1446, CytbHaemtq220
300 nM	18sHaemproF1425, 18sHaemproR1497, CybHaemproF200
600 nM	12sMitoF, 12sMitoR
900 nM	CybHaemproR294

Tabelle 13.3.: In der FilaHaem-PCR eingesetzte Oligonucleotidkonzentrationen

d. h. beginnend mit einer Annealing-Temperatur von 57°C sinkt die Temperatur pro Zyklus um 0,5°C und endet nach 21 Zyklen bei 46,5°C (vgl. Tabelle 13.4). Das Einfügen eines Touchdowns war nötig, um auch den Primern mit sehr niedrigen Schmelztemperaturen (z. B. CybHaemproR294) ein Annealing zu ermöglichen.

Als Positivkontrollen wurde für die Nematoden *Loa loa*-DNA und für die Haemosporidien *Plasmodium falciparum*-DNA verwendet.

Zusätzlich wurde noch in jedem Lauf ein PhHV-Plasmid (ein Plasmid, das die Sequenz des Phocin Herpesvirus trägt) als Inhibitionskontrolle mitlaufen gelassen, welches gemeinsam mit den entsprechenden Primern dem Mastermix hinzugegeben wurde. Die Plasmidprimer wurden in einer Konzentration von 4 pmol/µl, die Plasmidsonde in einer Konzentration von 5 pmol/µl eingesetzt.

Als Vorbereitung für den Mastermix wurde von jedem Primer-Sonden-Triplett ein Primer-Mix hergestellt, in dem die dazugehörigen Primern (in der richtigen Konzentration) in gleichen Teilen zusammengegeben wurden, weshalb in Tabelle 13.5 nur noch die Mixe und nicht alle Oligonucleotide separat aufgeführt werden.

Pro Reaktion wurden 18 µl Mastermix und 2 µl Probe eingesetzt, insgesamt wurde also ein Reaktionsvolumen von 20 µl verwendet.

Temperatur	Dauer
95°C	15 min
95°C	15 s
57°C → -21 * 0,5°C/Zyklus (Touchdown)	30 s
72°C	30 s
40°C	30s

Tabelle 13.4.: Temperaturprofil der FilaHaem-PCR

13.2. Ergebnisse der Multiplex Real-time PCR FilaHaem

Alle in den Jahren 2011 und 2012 gesammelten Pools (4113) wurden mit der FilaHaem Real-time PCR auf das Vorhandensein von Nematoden und haemosporidialer DNA hin untersucht.

Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser PCR vorgestellt, wobei die Ergebnisse für die einzelnen Zielgene bzw. deren Sequenzen (12s Mito, 18s Haem und Cytb Haem) getrennt aufgeführt werden.

Tabelle 13.6 gibt einen Überblick über die Anzahl aller positiven Stechmückenpools, welche den unterschiedlichen Standorten aus den Jahren 2011 und 2012 entstammen. Die Fallenart, mit der am Standort gesammelt wurde, ist ebenfalls angegeben.

Da nicht alle Standorte in jedem Jahr aufgesucht wurden (nu) und die Bedingungen an den Fallenstandorten zur Zeit der Fänge nicht immer gleich war, ist ein direkter Vergleich zwischen den Standorten und der Anzahl der infizierten Pools nicht möglich.

13.2.1. Ergebnisse des Screenings auf die 12s Mito Sequenz

Im Gegensatz zum ersten Jahr der Studie, in dem diese nematodenspezifischen Primer (allerdings noch nicht in eine Multiplex-PCR eingebunden) verwendet wurden, wurden die hier untersuchten Pools einzeln (und nicht in einem Super-Pool-Verband mit vier weiteren Pools) untersucht.

Insgesamt zeigten 1050 der untersuchten Pools ein positives Signal in dieser PCR, wobei im Jahr 2011 687 von 2379 Pools positiv waren (29%), im Jahr darauf waren es lediglich 21% (363 von 1734).

Im Jahr 2011 konnten positive Pools an allen untersuchten Standorten nachgewiesen werden, während 2012 keine positive Pools an den Standorten Alsheim, Greifswald, Loissin, den Osterseen, Strüth und Waldsee gefunden werden konnten (vgl. Tabelle 13.6 am Ende des Kapitels).

Reagens	V/R	V_{ges}	V_{pip}
HotStarTaq plus Mastermix	10 μ l	100 μ l	110 μ l
$MgCl_2$	2 μ l	20 μ l	22 μ l
Cytb Primer Mix	0,75 μ l	7,5 μ l	8,25 μ l
18s Haem Primer Mix	0,75 μ l	7,5 μ l	8,25 μ l
12s Mito Primer Mix	0,75 μ l	7,5 μ l	8,25 μ l
PhHV Primer Mix	0,75 μ l	7,5 μ l	8,25 μ l
PhHV Plasmid 10^{-9}	1,6 μ l	16 μ l	17,6 μ l
H_2O	1,4 μ l	14 μ l	15,4 μ l

Tabelle 13.5.: Pipettierschema der FilaHaem-PCR, Beispiel für 10 Reaktionen

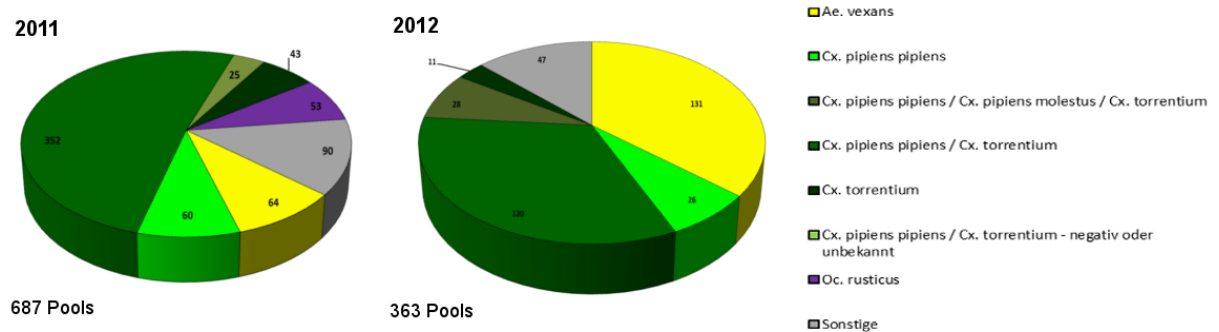


Abbildung 13.2.: Artverteilung der auf die 12s Mito Sequenz positiven Pools (2011+2012)

Die meisten positiven Pools waren in beiden Jahren in der Gattung *Culex* zu finden. So wurden im Jahr 2011 508 *Culex*-Pools als positiv identifiziert (74%), wobei 352 Pools eine Mischung aus den Arten *Cx. pipiens pipiens* und *Cx. torrentium* darstellten. Weiterhin wurden 60 reine *Cx. pipiens pipiens*-Pool positiv auf das 12s Mito-Gen getestet. Neben der Gattung *Culex* waren noch 64 *Ae. vexans*-Pools positiv, was einem Anteil von etwa 9% aller positiven Pools entspricht. Zudem wurden noch 53 Pools der Art *Oc. rusticus* positiv auf das 12s Mito Gen getestet (vgl. Abbildung 13.2 sowie Tabelle 13.7 am Ende des Kapitels).

Im Jahr 2012 waren 195 von 363 nematodenpositiven Pools der Gattung *Culex* zuzuordnen (54%). Auch hier war ein Großteil der 12s Mito positiv getesteten Pools in Gemischen der Arten *Cx. pipiens pipiens* und *Cx. torrentium* zu finden (120).

Allerdings gehörten im Jahr 2012 mit 131 von 363 getesteten Pools 36% der Art *Ae. vexans* an - mehr als doppelt so viele wie im Vorjahr.

Hervorzuheben sind noch die Arten *An. maculipennis* s. l. und *Cs. annulata*. So konnte aus dem Jahr 2011 eine der zehn auf 12s Mito positiven *Cs. annulata* Proben als *D. repens* identifiziert werden. Im Jahr 2012 handelte es sich bei zwei der sieben auf 12s Mito positiven *An. maculipennis* s. l. Pools

ebenfalls um den Hundehautwurm.

Die weiteren in der Real-time PCR auf die 12s Mito Sequenz positiv getesteten Proben verteilen sich auf unterschiedliche Arten, allerdings zu einem Anteil von unter zehn Prozent.

Betrachtet man Abbildung 13.3 so fällt auf, dass ein Großteil der auf die 12s Mito Sequenz positiven Pools aus dem Süden und Südwesten des Landes stammen. An den Standorten an der Ostsee (Greifswald und Loissin) konnten insgesamt lediglich 35 positive Stechmückenpools, an der Elbe und dem Drömling 22, in Hamburg 21 und an der Oder sogar nur 18 positive Pools gefunden werden. An den Standorten im Süden des Landes, insbesondere im Rheingraben (Rheinland-Pfalz und Baden-Württemberg) aber auch in Bayern konnte mit 211, 625 und 99 positiven Stechmückenpools der Großteil der mit der 12s Mito Sequenz infizierten Culiciden-Pools gefunden werden.

13.2.2. Ergebnisse des Screenings auf die 18s Haem Sequenz

Im Jahr 2011 konnte in 1429 von 2379 untersuchten Proben die haemosporidien spezifische 18s Haem Sequenz nachgewiesen werden (60%), 2012 waren es 581 von 1734 (34%).

Wie bereits bei den Ergebnissen des Screenings auf die 12s Mito Sequenz, konnte auch hier der Großteil der positiven Proben innerhalb der Gattung *Culex* festgestellt werden. So gehörten im Jahr 2011 mit insgesamt 883 von 1429 positiven Proben etwa 62% dieser Gattung an, im darauffolgenden Jahr waren es mit 470 von 581 positiven Proben sogar 81% (vgl. Tabelle 13.8 am Ende des Kapitels).

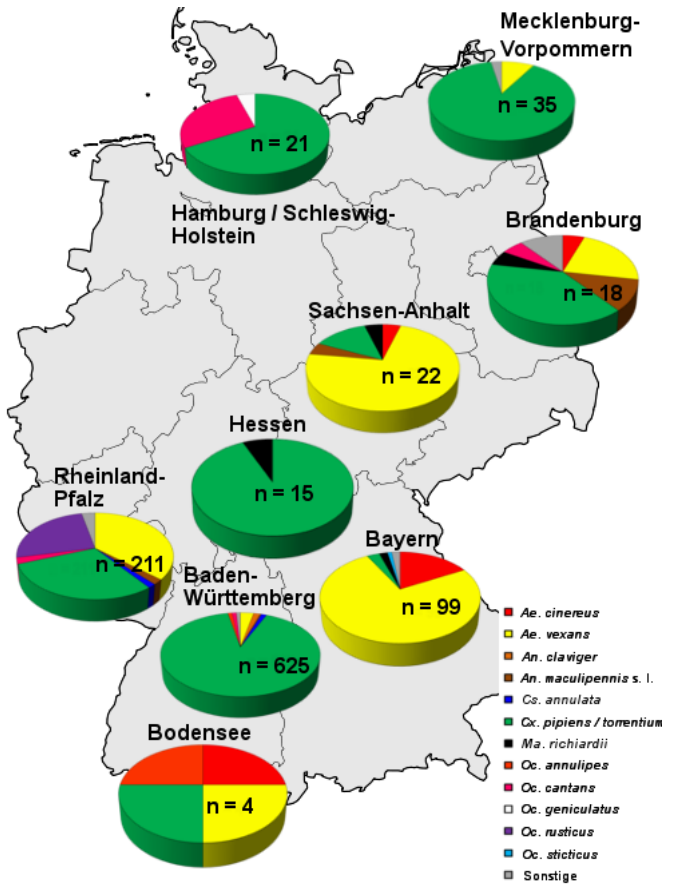


Abbildung 13.3.: Deutschlandweite Verteilung der auf die 12s Mito Sequenz positiven Pools (2011+2012)

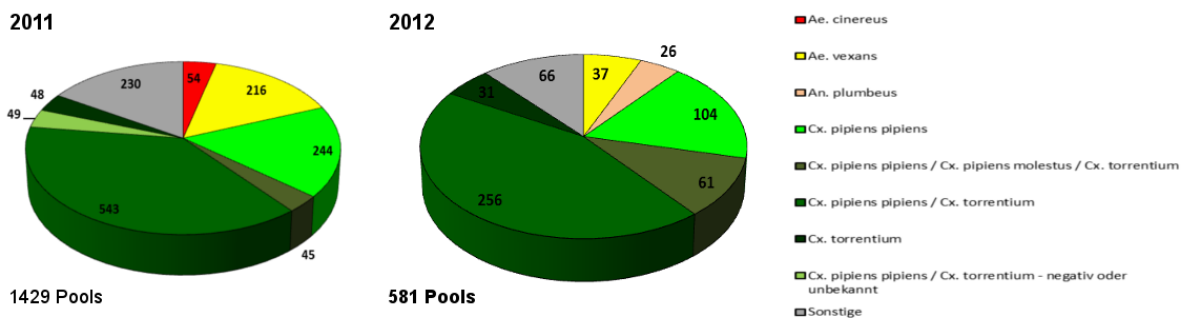


Abbildung 13.4.: Artverteilung der auf die 18s Haem-Sequenz positiven Pools (2011+2012)

13. Multiplex Real-time PCR FilaHaem

In beiden Jahren war der Hauptteil der positiven Proben in gemischten Pools zu finden, die sich aus den Arten *Cx. pipiens pipiens* und *Cx. torrentium* zusammensetzten (543 in 2011 und 256 in 2012). Weiterhin waren auch viele reine *Cx. pipiens pipiens* Pools infiziert, 244 im Jahr 2011 und 104 im Jahr 2012.

Auch der Anteil an positiven *Ae. vexans* Pools war mit 216 und 37 Pools in beiden Jahren recht hoch (15% und 6%), wobei der Großteil der infizierten Arten eindeutig den ornithophilen *Culex*-Arten zufiel.

Die einzigen Arten, die in beiden Jahren keine positiven Pools aufwiesen waren die mammalophilen Spezies *Cx. pipiens pipiens* biotyp *molestus* und *Oc. caspius* (vgl. Tabelle 13.8).

13.2.3. Ergebnisse des Screenings auf die Cytb Haem Sequenz

Von den 2379 im Jahr 2011 untersuchten Proben wiesen 675 ein positives Signal für die haematosporidien spezifische Cytb Haem Sequenz auf (28%), im darauffolgenden Jahr waren es 283 von 1734 (16%).

Auch bei der Untersuchung der Stechmücken auf die haemosporidien spezifische Cytb Haem Sequenz zeigte sich bei der Verteilung der positiven Proben, dass vor allem die Gattung *Culex* solche beinhaltetete (vgl. Abbildung 13.5).

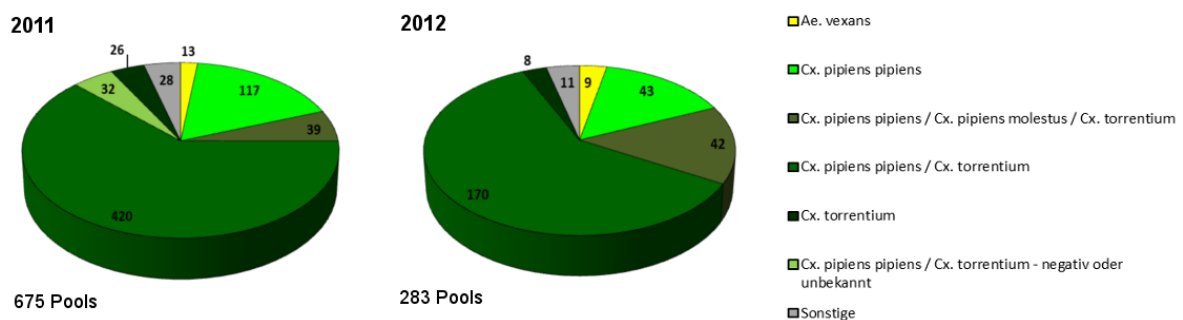


Abbildung 13.5.: Artverteilung der auf die Cytb Haem Sequenz positiven Pools (2011+2012)

Im Jahr 2011 gehörten mit 643 von 675 positiven Pools 95% der Gattung *Culex* an. Bei dem Großteil der positiven Proben handelte es sich um Pools, in denen die Schwesterarten *Cx. pipiens pipiens* und *Cx. torrentium* enthalten waren (62%), zusätzlich konnte in 117 reinen *Cx. pipiens pipiens* Pools die Cytb Haem Sequenz festgestellt werden (17%). Neben den in Abbildung 13.5 aufgeführten Proben konnten unter anderem noch drei positive *Ae. cinereus* Pools, zwei *An. claviger* Pools, zwei der Art *An. maculipennis* s. l. sowie je 3 *Oc. cantans* und *Oc. rusticus* gefunden werden. Die weiteren positiven Pools können Tabelle 13.9 (am Ende des Kapitels) entnommen werden.

Auch im Jahr 2012 war die Verteilung der positiven Proben ähnlich. Mit 269 von 283 positiven Pools gehörten wie im Vorjahr 95% der positiven Pools der Gattung *Culex* an. Mit 60% war der Anteil der aus den Arten *Cx. pipiens pipiens* und *Cx. torrentium* zusammengesetzten Pools etwas geringer als im Vorjahr. Ebenfalls etwas geringer (mit 15%) war der Anteil positiver reiner *Cx. pipiens pipiens* Pools. Mit 42 von 283 positiven Proben war der Anteil gemischter Pools bestehend aus *Cx. pipiens pipiens*, *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* und *Cx. torrentium* höher als 2011 (39 von 675). Tabelle 13.9 zeigt die weiteren Proben, die ein positives Signal bezüglich der Cytb Haem Sequenz zeigten.

13. Multiplex Real-time PCR FilaHaem

Standort	12s Mito		18s Haem		Cytb Haem		Pools Gesamt		Fallenart
	2011	2012	2011	2012	2011	2012	2011	2012	
Alsheim	2	0	6	0	0	0	8	1	EVS
Bad Dürkheim	nu	1	nu	11	nu	1	nu	29	GT
Beerfelden	nu	2	nu	5	nu	2	nu	5	GT
Bobenheim-Roxheim	nu	4	nu	16	nu	9	nu	26	GT
Bodensee	1	3	12	4	0	0	13	44	EVS
Chiemsee	2	2	22	5	1	0	32	45	EVS
Dirmstein	nu	11	nu	59	nu	24	nu	133	GT
Drömling	1	nu	3	nu	0	nu	5	nu	EVS
Eberstadt	nu	7	nu	9	nu	6	nu	11	GT
Elbe	17	4	38	3	12	3	48	18	EVS
Greifswald	23	0	198	0	32	0	520	6	EVS
Großsachsen	201	24	215	26	151	10	231	39	GT
Hamburg (Großraum, mit Schleswig-Holstein)	nu	21	nu	45	nu	5	nu	140	BG
Hemsbach	nu	2	nu	5	nu	2	nu	10	GT
Haßloch	62	nu	32	nu	4	nu	134	nu	EVS
Heidelberg	154	6	413	58	331	35	438	90	GT
Karlsruhe - Insel Rott	2	10	15	6	4	1	15	34	EVS
Karlsruhe - Russheimer Altrhein	7	3	12	13	1	3	20	55	EVS
Isar	6	74	21	14	2	3	29	220	EVS
Kühkopf	41	53	135	30	18	6	317	346	EVS
Loissin	12	0	47	1	5	0	216	4	EVS
Mettenheim	nu	3	nu	10	nu	9	nu	11	GT
Mümling-Grumbach	nu	6	nu	10	nu	3	nu	11	GT
Neckargerach	nu	5	nu	5	nu	3	nu	8	GT
Neustadt a. d. Weinstraße	nu	7	nu	23	nu	10	nu	74	GT
Oder	10	8	57	14	12	7	101	44	EVS
Osterseen	15	0	22	0	1	0	27	5	EVS
Römerberg	nu	27	nu	82	nu	68	nu	93	EVS
Sandhausen	nu	7	nu	13	nu	12	nu	13	GT
Strüth	nu	0	nu	7	nu	0	nu	18	EVS
Waghäusel	21	15	28	7	3	1	46	65	EVS
Waldsee	nu	0	nu	1	nu	0	nu	2	GT
Weinheim	110	58	153	99	98	60	179	134	GT
Gesamt	687	363	1429	581	675	283	2379	1734	
	1050		2010		958		4113		

Tabelle 13.6.: Übersicht über die Ergebnisse der FilaHaem nach Standort (2011+2012). Dargestellt sind alle in der entsprechenden Kategorie pro Jahr positiven Pools (nu = Standort nicht untersucht)

13. Multiplex Real-time PCR FilaHaem

Art	Positive Pools		
	2011	2012	Gesamt
<i>Ae. cinereus</i>	17	6	23
<i>Ae. rossicus</i>	1	0	1
<i>Ae. vexans</i>	64	131	195
<i>An. claviger</i>	7	3	10
<i>An. maculipennis</i> s. l.	3	7	10
<i>An. plumbeus</i>	0	0	0
<i>Cs. annulata</i>	10	2	12
<i>Cx. modestus</i>	0	0	0
<i>Cx. p. pipiens</i> biotyp <i>molestus</i>	0	0	0
<i>Cx. pipiens pipiens</i>	61	26	87
<i>Cx. pipiens pipiens</i> x <i>Cx. p. pipiens</i> biotyp <i>molestus</i>	0	0	0
<i>Cx. pipiens pipiens</i> / <i>Cx. p. pipiens</i> biotyp <i>molestus</i>	0	2	2
<i>Cx. pipiens pipiens</i> / <i>Cx. p. pipiens</i> biotyp <i>molestus</i> / <i>Cx. torrentium</i>	17	28	45
<i>Cx. pipiens pipiens</i> / <i>Cx. torrentium</i>	351	120	471
<i>Cx. pipiens pipiens</i> / unbekannt	9	0	9
<i>Cx. pipiens pipiens</i> / <i>Cx. torrentium</i> - negativ oder unbekannt	25	2	27
<i>Cx. territans</i>	2	0	2
<i>Cx. torrentium</i>	43	11	54
<i>Cx. torrentium</i> / <i>Cx. p. pipiens</i> biotyp <i>molestus</i>	0	6	6
<i>Ma. richiardii</i>	1	5	6
<i>Oc. annulipes</i>	7	3	10
<i>Oc. cantans</i>	12	8	20
<i>Oc. cantans</i> / <i>Oc. annulipes</i>	0	0	0
<i>Oc. caspius</i>	0	1	1
<i>Oc. communis</i>	0	0	0
<i>Oc. geniculatus</i>	0	1	0
<i>Oc. flavescens</i>	1	0	1
<i>Oc. punctor</i>	2	0	2
<i>Oc. rusticus</i>	53	0	53
<i>Oc. sticticus</i>	1	1	2
Gesamt	687	363	1050

Tabelle 13.7.: Anzahl der auf die 12s Mito Sequenz positiven Pools (2011+2012)

13. Multiplex Real-time PCR FilaHaem

Art	Positive Pools		
	2011	2012	Gesamt
<i>Ae. cinereus</i>	54	3	57
<i>Ae. rossicus</i>	3	0	3
<i>Ae. vexans</i>	216	37	253
<i>An. claviger</i>	24	8	32
<i>An. maculipennis</i> s. l.	38	4	42
<i>An. plumbeus</i>	2	26	28
<i>Cs. annulata</i>	36	9	45
<i>Cx. modestus</i>	1	0	1
<i>Cx. pipiens molestus</i>	0	0	0
<i>Cx. pipiens pipiens</i>	244	104	348
<i>Cx. pipiens pipiens</i> x <i>Cx. p. pipiens</i> biotyp <i>molestus</i>	0	3	3
<i>Cx. pipiens pipiens</i> / <i>Cx. p. pipiens</i> biotyp <i>molestus</i>	0	6	6
<i>Cx. pipiens pipiens</i> / <i>Cx. pipiens molestus</i> / <i>Cx. torrentium</i>	45	61	106
<i>Cx. pipiens pipiens</i> / <i>Cx. torrentium</i>	543	255	798
<i>Cx. pipiens pipiens</i> / unbekannt	39	0	39
<i>Cx. pipiens pipiens</i> / <i>Cx. torrentium</i> - negativ oder unbekannt	49	6	55
<i>Cx. territans</i>	4	0	4
<i>Cx. torrentium</i>	48	31	79
<i>Cx. torrentium</i> / <i>Cx. p. pipiens</i> biotyp <i>molestus</i>	0	3	3
<i>Ma. richiardii</i>	5	6	11
<i>Oc. annulipes</i>	14	3	17
<i>Oc. cantans</i>	24	5	29
<i>Oc. cantans</i> / <i>Oc. annulipes</i>	0	0	0
<i>Oc. caspius</i>	0	0	0
<i>Oc. communis</i>	1	0	1
<i>Oc. geniculatus</i>	0	5	5
<i>Oc. flavescens</i>	4	0	4
<i>Oc. punctor</i>	7	0	7
<i>Oc. rusticus</i>	9	1	10
<i>Oc. sticticus</i>	19	4	23
Gesamt	1429	581	2010

Tabelle 13.8.: Anzahl der auf die 18s Haem Sequenz positive Pools (2011+2012)

13. Multiplex Real-time PCR FilaHaem

Art	Positive Pools		
	2011	2012	Gesamt
<i>Ae. cinereus</i>	3	1	4
<i>Ae. rossicus</i>	0	0	0
<i>Ae. vexans</i>	13	9	22
<i>An. claviger</i>	2	0	2
<i>An. maculipennis</i> s. l.	3	0	3
<i>An. plumbeus</i>	0	3	3
<i>Cs. annulata</i>	5	1	6
<i>Cx. modestus</i>	0	0	0
<i>Cx. p. pipiens</i> biotyp <i>molestus</i>	0	0	0
<i>Cx. pipiens pipiens</i>	117	43	160
<i>Cx. pipiens pipiens</i> x <i>Cx. p. pipiens</i> biotyp <i>molestus</i>	0	1	1
<i>Cx. pipiens pipiens</i> / <i>Cx. p. pipiens</i> biotyp <i>molestus</i>	0	3	3
<i>Cx. pipiens pipiens</i> / <i>Cx. pipiens molestus</i> / <i>Cx. torrentium</i>	39	42	81
<i>Cx. pipiens pipiens</i> / <i>Cx. torrentium</i>	420	170	590
<i>Cx. pipiens pipiens</i> / unbekannt	7	0	7
<i>Cx. pipiens pipiens</i> / <i>Cx. torrentium</i> - negativ oder unbekannt	32	2	34
<i>Cx. territans</i>	2	0	2
<i>Cx. torrentium</i>	26	8	34
<i>Cx. torrentium</i> / <i>Cx. p. pipiens</i> biotyp <i>molestus</i>	0	0	0
<i>Ma. richiardii</i>	0	0	0
<i>Oc. annulipes</i>	0	0	0
<i>Oc. cantans</i>	3	0	3
<i>Oc. cantans</i> / <i>Oc. annulipes</i>	0	0	0
<i>Oc. caspius</i>	0	0	0
<i>Oc. communis</i>	0	0	0
<i>Oc. geniculatus</i>	0	0	0
<i>Oc. flavescens</i>	0	0	0
<i>Oc. punctor</i>	0	0	0
<i>Oc. rusticus</i>	3	0	3
<i>Oc. sticticus</i>	0	0	0
Gesamt	675	283	958

Tabelle 13.9.: Anzahl der auf die Cytb Haem Sequenz positiven Pools (2011+2012)

14. Multiplex Real-time PCR LupImmRep

Die Multiplex Real-time PCR LupImmRep wurde etabliert um die Möglichkeit zu besitzen, Proben gleichzeitig auf das Vorhandensein der Pathogene *Dirofilaria immitis* (LEIDY, 1856), *Dirofilaria repens* (RAILLIET & HENRY, 1911) und *Onchocerca lupi* zu untersuchen.

In Kombination mit der PCR FilaHaem ermöglicht die LupImmRep Real-time PCR ein Screening mit einem sehr hohen Probendurchsatz. So wurden zunächst alle Proben mit der FilaHaem untersucht und im Anschluss die in der FilaHaem positiven Proben mit der LupImmRep-PCR weiter in Augenschein genommen.

14.1. Etablierung der Multiplex Real-time PCR LupImmRep

Zunächst wurden - wie auch schon bei der Etablierung der Multiplex Real-time PCR FilaHaem - anhand verschiedener Alignments spezifische Primer- und Sondensequenzen ermittelt.

Bei der Wahl spezifischer *D. immitis*-Primer wurde als Zielgen ein Fragment der 16S rRNA gewählt, welches *D. immitis* durch verschiedene Basenaustausche eindeutig von anderen Spezies unterscheidet. Für die Arten *D. repens* und *O. lupi* wurde jeweils ein artspezifischer Abschnitt des Cytochromoxidase I-Gens gewählt.

Im Gegensatz zu den beiden anderen Nematoden, gab es für *O. lupi* nur eine mögliche Primer-Sonden-Kombination. Dies lässt sich dadurch begründen, dass es (zum Zeitpunkt des PCR-Designs) nur sehr wenige Sequenzen der Art *O. lupi* gab, die man mit vorhandenen Gen-Sequenzen von *D. immitis* und *D. repens* alignieren konnte.

Zielgen	Art	Name	Sequenz (5'→3')	T_m	Amplifikat
16S rRNA	<i>D. immitis</i>	Imm-F	CTA TAT GTT ACC TTA ATT GG	52°C	161 bp
16S rRNA	<i>D. immitis</i>	Imm-T	ROX - GTA GCT AGT AAG TTT ACC TTG - BHQ2	58°C	
16S rRNA	<i>D. immitis</i>	Imm-R	CTT AAC CAT TAT CTT AGA TCA G	58°C	
COI	<i>D. repens</i>	Rep-F	GAG ATG GCG TTT CCT CGT G	60°C	138 bp
COI	<i>D. repens</i>	Rep-T	JOE - GTT GCT TTG TTA ATG GTT TAT C - BHQ1	58°C	
COI	<i>D. repens</i>	Rep-R	GAC CAT CAA CAC TTA AAG	50°C	
COI	<i>O. lupi</i>	Lup-F	GTA TCT TTG TTG ATG GTT TAT C	58°C	108 bp
COI	<i>O. lupi</i>	Lup-T	FAM - CTC TTA GAG TAG AGG GTC - BHQ1	54°C	
COI	<i>O. lupi</i>	Lup-R	GCA AAC CCA AAA CTA TAG	50°C	

Tabelle 14.1.: Primersequenzen der Multiplex Real-time PCR LupImmRep

Die Vorgehensweise zur Ermittlung der optimalen Primer- und Sondenkonzentrationen war dieselbe, wie auch schon in Kapitel 13.1 beschrieben. Zunächst wurden die Sonden in einer Konzentration von 200 nM eingesetzt, während eine $MgCl_2$ -Konzentration von 4 mM verwendet wurde. Die richtige Primerkonzentration wurde empirisch festgestellt und im Anschluss daran die anderen Komponenten angepasst.

14. Multiplex Real-time PCR LupImmRep

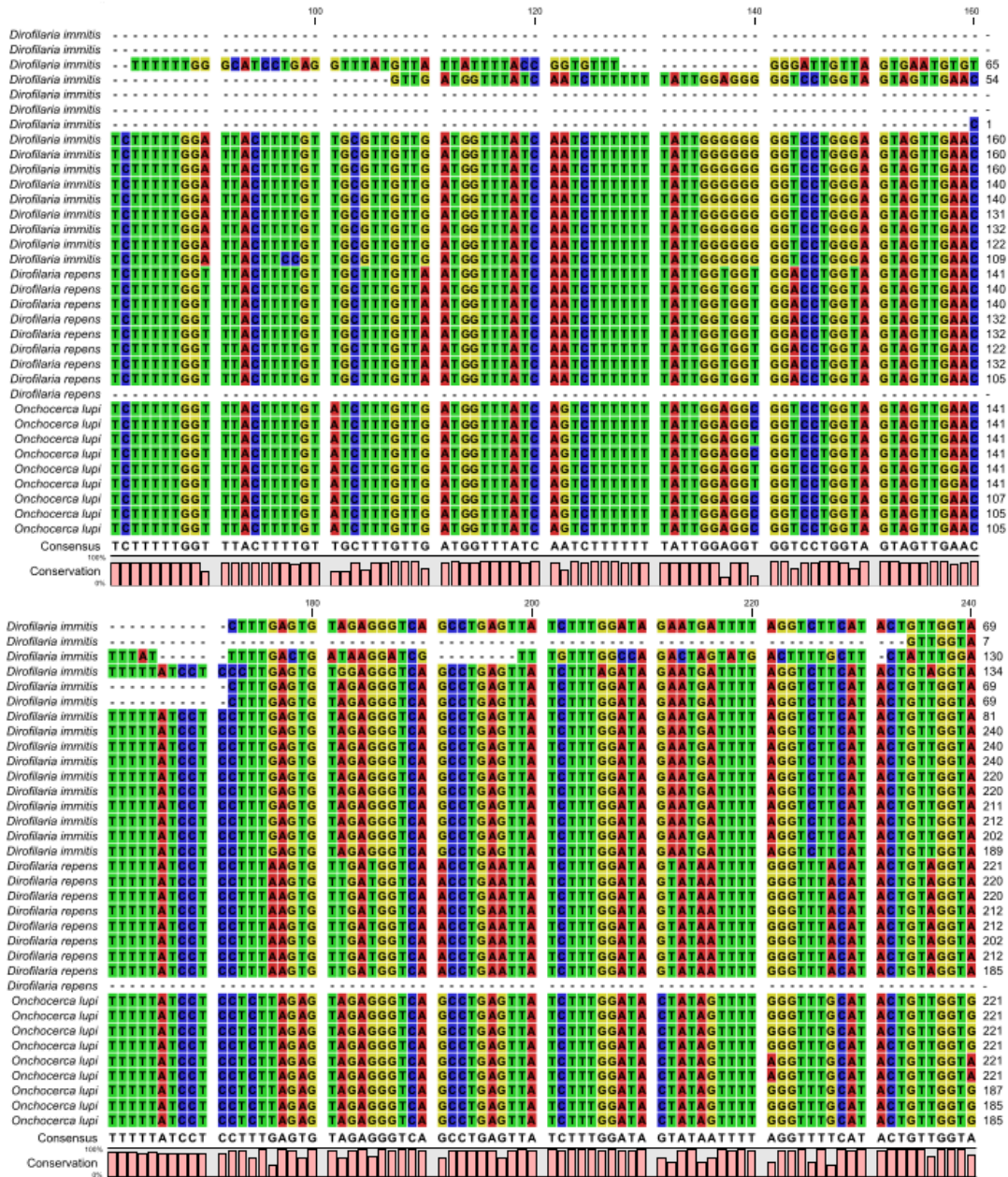


Abbildung 14.1.: Alignment eines Abschnittes des COI-Gens der Arten *D. immitis*, *D. repens* und *O. lupi*

Die Primer und Sonden wurden in insgesamt vier unterschiedlichen Konzentrationen für den Mastermix eingesetzt, welche in Tabelle 14.2 aufgeführt sind, wobei F, R und T für Forward-, Reverse-Primer und Taqman-Sonde stehen, während unter den Abkürzungen Imm., Rep. und Lup. die Zielgene der nachzuweisenden Arten *D. immitis*, *D. repens* und *O. lupi* zu verstehen sind.

Zur Vorbereitung des Mastermixes, (unter Verwendung des HotStar Taq Mastermix-Kits von Qiagen), wurden die Primer (nachdem sie zur gewünschten Konzentration verdünnt wurden) zu gleichen Teilen zu Primer-Mixen zusammengegeben.

Dem Mastermix wurde neben den üblichen Reagenzien noch BSA (Bovines Serumalbumin) hinzugegeben, um die Effektivität der Amplifikation der *Onchocerca lupi*-Primer zu erhöhen.

Das finale Volumen für eine Reaktion beträgt 20 µl, wobei 18 µl Mastermix und 2 µl der zu

14. Multiplex Real-time PCR LuplmmRep

untersuchenden DNA eingesetzt werden.

Als Positivkontrollen wurden extrahierte DNA von *D. immitis*, *D. repens* (beidesmal eine 1:100-Verdünnung) und *O. lupi* verwendet. Die *Onchocerca*-DNA wurde von Prof. Otranto (Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Bari, Italien) zur Verfügung gestellt.

Auch die Einstellung des Temperaturprofils, die primäre Annealing-Temperatur, bedurfte einer Anpassung. Diese erfolgte, von Standardwerten ausgehend, empirisch.

Die PCR wird mit einem initialen Denaturierungsschritt von 15 min bei 95°C eingeleitet. Ihm folgen 50 Zyklen, in denen sich Denaturierung (15 s bei 95°C), Annealing und Elongation (30 s bei 72°C) abwechseln. Auch bei der LuplmmRep-PCR war es nötig, einen „Touchdown“ einzubringen, bei dem die Temperatur in den ersten 21 Zyklen um 0,5°C pro Zyklus gesenkt wird, sodass eine endgültige Annealing-Temperatur von 51°C erreicht wird.

Nach der Einstellung der Reaktionsbedingungen wurden die Primer noch auf Spezifität und Sensitivität hin geprüft.

Die Überprüfung der Primerspezifität wurde durchgeführt, indem dem Mastermix (der alle Primer und Sonden beinhaltet) jeweils die DNA eines der nachzuweisenden Organismen (also *D. immitis*, *D. repens* und *O. lupi*) zugegeben wurde. Um mögliche Pipettierungenauigkeiten und -fehler auszuschließen wurden jeweils zwei Proben angesetzt. Wie man Abbildung 14.2 entnehmen kann, sind positive Signale nur in den entsprechenden Kanälen zu sehen gewesen, die Primer sind also spezifisch.

Konzentration	Oligonucleotid
10 nM	Imm-T
50 nM	Imm-F, Rep-F, Lup-F
200 nM	Rep-T, Lup-T
300 nM	Imm-R, Rep-R, Lup-R

Tabelle 14.2.: Konzentrationen von Primer und Sonden der LuplmmRep

Reagens	Konz. Ansatz	V/R
HotStarTaq plus Mastermix 2x	1x	10,00 µl
<i>MgCl₂</i>	4 mM	2,00 µl
Primer-Mix <i>D. immitis</i>		0,75 µl
Primer-Mix <i>D. repens</i>		0,75 µl
Primer-Mix <i>O. lupi</i>		0,75 µl
BSA	1 mg/ml	0,80 µl
<i>H₂O</i>		2,95 µl

Tabelle 14.3.: Pipettierschema der Multiplex Real-time PCR LuplmmRep

Temperatur	Dauer
15 min	95°C
15 s	95°C
30 s	61°C → -21*0,5°C/Zyklus (Touchdown)
30 s	72°C
30	40°C

Tabelle 14.4.: Temperaturprofil der LuplmmRep-PCR

14. Multiplex Real-time PCR LuplmmRep

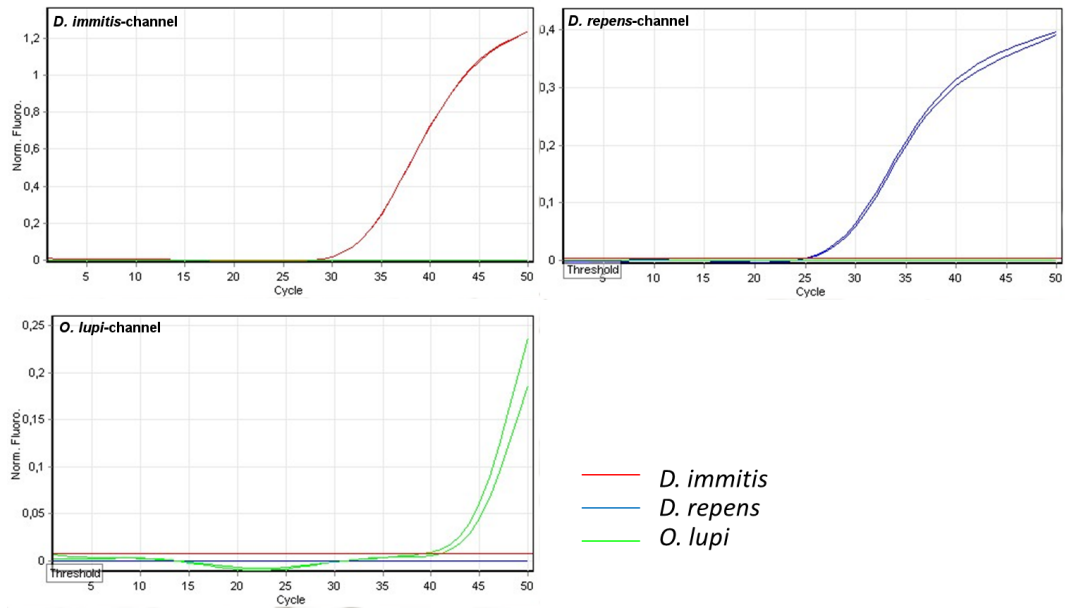


Abbildung 14.2.: Spezifität der LuplmmRep-Primer

Es wurden weiterhin acht weitere Nematoden-Arten in insgesamt 23 Proben untersucht, um auszuschließen, dass die LuplmmRep-Primer diese amplifizieren (vgl. Tabelle 14.5). Auch diese Arten wurden, bis auf die DNA, welche aus einer Larve extrahiert wurde, nicht amplifiziert. Bei der (auf *D. repens*) positiven DNA handelt es sich um aus einer Larve extrahierte DNA, welche im Vorfeld morphologisch als *Strongyloides spec.* bestimmt wurde. Da aber die morphologische Charakterisierung von Nematoden-Larven oftmals sehr schwierig ist, es also nicht auszuschließen ist, dass die Larve eigentlich der Art *D. repens* angehörte und zwei weitere als *Strongyloides* bestimmte Proben ebenso wie die restlichen Proben negativ waren, kann davon ausgegangen werden, dass die gewählten Oligonucleotide - und damit die PCR - spezifisch sind.

Art	Anzahl (Proben)	DNA-Quelle	LuplmmRep
<i>Ancylostoma spec.</i>	6	unbekannt (5), Eier (1)	neg
<i>Ascaris spec.</i>	2	unbekannt	neg
<i>Ascaris spec.</i> , <i>Trichuris spec.</i>	1	unbekannt	neg
<i>Enterobius spec.</i>	4	unbekannt	neg
<i>Hymenolepsis nana</i>	2	unbekannt	neg
<i>Loa loa</i>	1	adulter Wurm	neg
<i>Setaria tundra</i>	2	Extrakt aus infizierten Stechmücken	neg
<i>Strongyloides spec</i>	3	unbekannt (1), Larve (2)	neg (2), <i>D. repens</i> (1)
<i>Trichuris spec.</i>	2	unbekannt	neg

Tabelle 14.5.: Überprüfung der Primerspezifität

Neben der Spezifität der Primer und Sonden wurde auch deren Sensitivität überprüft. Hierzu wurden die drei von den Primern nachzuweisenden DNAs einzeln und in unterschiedlichen Kombinationen eingesetzt. In Abbildung 14.3 ist zu erkennen, dass die Primer die DNAs einzeln, aber auch mit den anderen DNAs vermischt, amplifizieren können. Dies bedeutet, dass die Primer sensitiv genug sind, um auch Doppel- oder Dreifachinfektionen zu registrieren.

14. Multiplex Real-time PCR LupImmRep

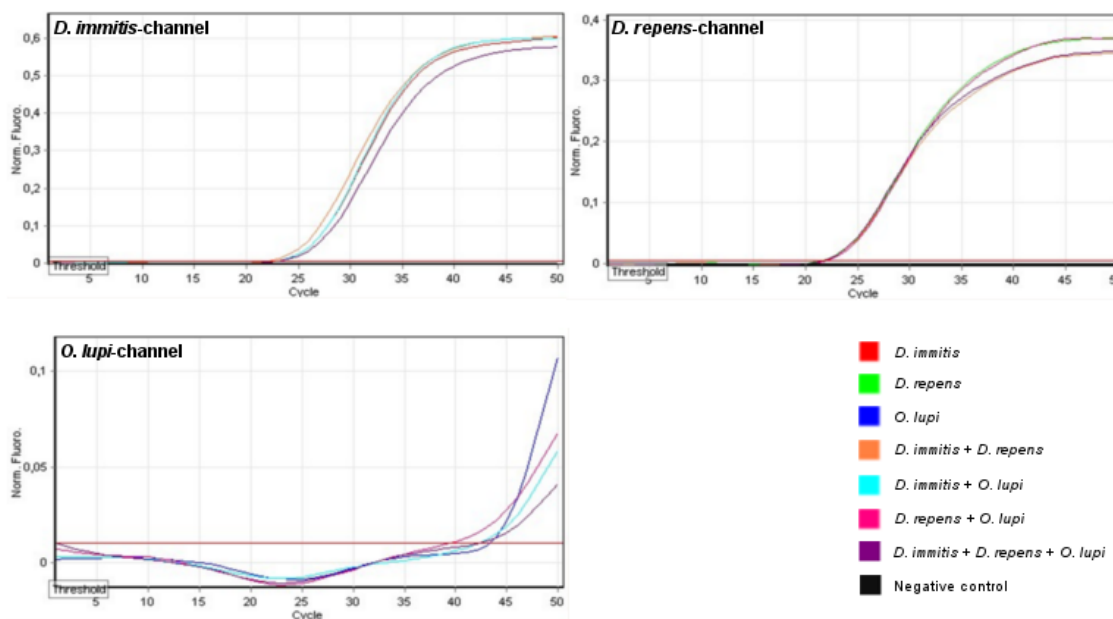


Abbildung 14.3.: Überprüfung der Primersensitivität

Es ist auch zu erkennen, dass (wie auch schon in Abbildung 14.5 zu sehen ist) das Signal für *Onchocerca lupi* nur sehr schwach ist. Der in der Positivkontrolle gemessene DNA-Gehalt betrug etwa 3,5 ng/ μ l (zum Vergleich: Die Positivkontrollen von *D. immitis* und *D. repens* wiesen beide in einer Verdünnung von 1:10 einen DNA-Gehalt von 0,3 ng/ μ l auf).

Auch hat eine Veränderung der Annealing-Temperatur keine Auswirkungen auf eine Verbesserung der *O. lupi*-Amplifikation gezeigt. Ebenso wenig hatte die zusätzliche Verwendung von Solution S (einer Lösung, die oft zur Unterstützung der Amplifikation verwendet wird) oder die Beigabe von weiteren dNTPs eine positive Veränderung der Amplifikation zur Folge.

Der Grund für die schlechte Amplifikation liegt also vermutlich in einer ungenügenden Effektivität der Primer. Da allerdings, wie bereits erwähnt, diese Primer-Sonde-Kombination der verschiedenen Alignments die einzige mögliche war, die aufgrund der vorhandenen Datenbasis für eine Real-time PCR genutzt werden konnte, beschloss man, mit den mangelhaften Primern zu arbeiten, weshalb mögliche *O. lupi*-positive Proben (etwa mit Hilfe von Klonierung und Sequenzierung) kritisch überprüft werden müssten.

14.2. Ergebnisse der LupImmRep

Mit der LupImmRep Multiplex Real-time PCR wurden alle 1050 in den Jahren 2011 und 2012 der FilaHaem-PCR positiven Pools untersucht.

Insgesamt fünf Pools zeigten ein positives Signal für *Dirofilaria repens*, keine der untersuchten Proben wurde positiv auf *Dirofilaria immitis* oder *Onchocerca lupi* getestet.

Alle Proben, welche ein positives Signal aufwiesen, entstammten den Standorten an der Oder (Hohenwutzen und Zollbrücke) und gehörten den Arten *Ae. vexans*, *An. maculipennis* s. l., *Cs. annulata* und *Cx. pipiens pipiens*.

Weiterführende Untersuchungen (vgl. 14.2.1) zeigten, dass es sich tatsächlich um den Hundehautwurm *D. repens* handelt.

14.2.1. Untersuchungen zum Nachweis von *Dirofilaria repens*

Die fünf positiven Pools (Poolnummern 3450, 3508, 5473, 5745, 5746) wurden erneut mit der LuplmmRep-PCR untersucht, in der alle Pools bis auf die Nummer 3508 erneut positiv erschienen (vgl. Abbildung 14.4).

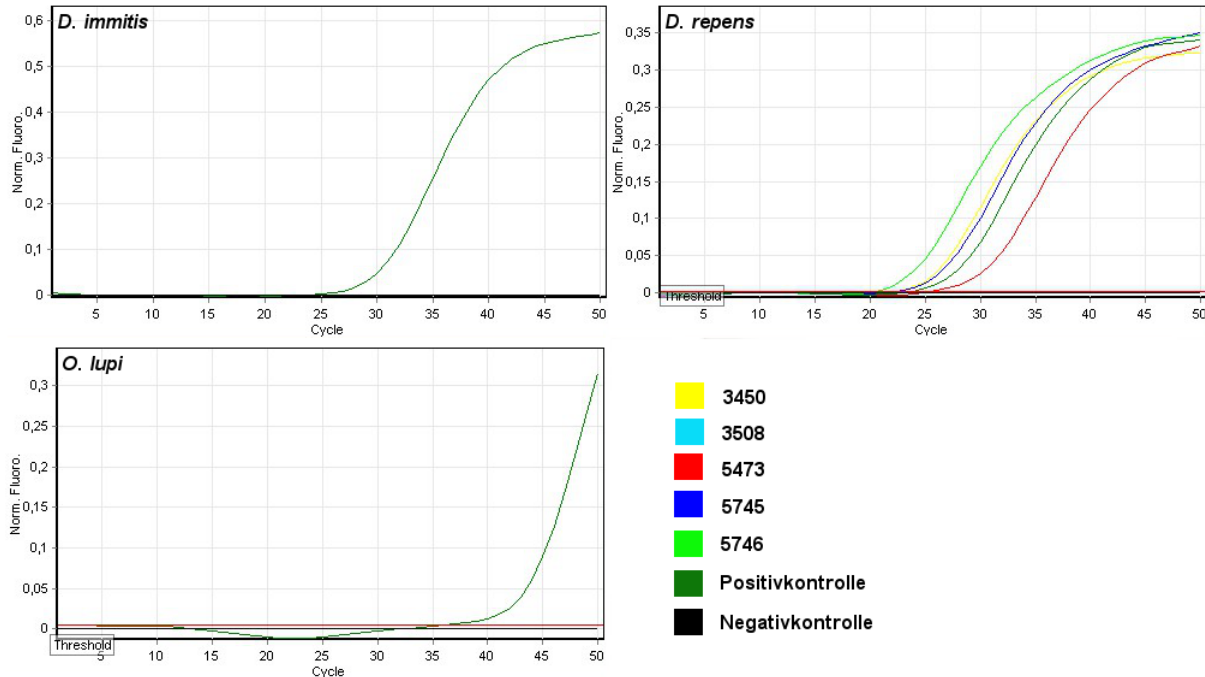


Abbildung 14.4.: *D. repens* positive Pools in der LuplmmRep-PCR

Durchführung und Ergebnisse der nematodenspezifischen Gel-PCR Da die Amplifikate mittels Sequenzierung überprüft werden sollten, wurde im Anschluss eine nematodenspezifische Gel-PCR durchgeführt, um längere Amplifikate zu bekommen. Die verwendeten Primer amplifizieren ein Fragment von 530 bp und sind in Tabelle 14.6 aufgeführt. Beide wurden in einer Konzentration von 10 pmol/µl eingesetzt.

Oligonucleotid	Name	Sequenz (5'→3')	T_m
F-Primer	RepF (#1732)	GAG ATG GCG TTT CCT CGT G	~60°C
R-Primer	COI R (#1483)	GAT AAG GAT CGT TTG TTT GG	~56°C

Tabelle 14.6.: Nematoden-Primer, die zur Vorbereitung der Sequenzierung verwendet wurden

Das Pipettierschema wurde auf ein Reaktionsvolumen von 50 µl eingestellt (vgl. Tabelle 14.7). Zu 45 µl Mastermix wurden jeweils 5 µl einer Probe hinzugegeben. Verwendet wurde hierbei ein Expand Long Template PCR System-Kit von Roche. Überschichtet wurde jeder Ansatz mit 50 µl Öl, um ein Verdampfen der Probe im PCR-Cycler zu verhindern.

Das Temperaturprofil war an das verwendete PCR-Kit angepasst. Da keine taq-Polymerase verwendet wurde, sondern das Expand Long Enzyme von Roche wurden Elongationstemperaturen von 68°C verwendet. Einem zweiminütigen Hot Start bei 94°C folgten 38 Zyklen, in denen Denaturierung, Annealing und Elongation aufeinander folgten, wobei die ersten 8 Zyklen einen Touchdown von -0,5°C pro Zyklus aufwiesen (vgl. Tabelle 14.8).

14. Multiplex Real-time PCR LuplmmRep

Neben den in der LuplmmRep positiven Proben wurden auch noch die Positivkontrollen *D. immitis*, *D. repens*, *O. lupi* und Wasser als Negativkontrolle untersucht.

Im Anschluss an die PCR wurden die Amplifikate auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen, wobei jeweils 4 µl loading buffer und 10 µl Probe verwendet wurden. Als Marker wurde der 100 kb DNA-Ladder eingesetzt.

Lediglich die Proben 5745 und 5746 zeigten eine deutliche Bande, wohingegen die Banden der Proben 3450 und 5473 nur ganz schwach zu erkennen waren (vgl. Abbildung 14.5). Probe 3508 war - wie auch im zweiten Durchlauf der LuplmmRep - negativ. Allerdings war auch bei *D. immitis* eine Bande zur erkennen, während das Ergebnis für *D. repens* negativ blieb. Warum *D. immitis* und nicht *D. repens* amplifiziert wurde, konnte nicht geklärt werden.

Reagens	Konz.	V/R
H ₂ O		27,25 µl
dNTP's	350 µM	1,75 µl
RepF (#1732)	10 pmol/µl	5,00 µl
COI R (#1483)	10 pmol/µl	5,00 µl
Puffer 1		5,00 µl
Expand Long Enzyme		1,00 µl

Tabelle 14.7.: Pipettierschema der nematodenspezifischen Gel-PCR

Temperatur	Dauer
2 min	94°C
10 s	94°C
30 s	56°C→8*-0,5°C/Zyklus Touchdown
2 min	68°C
10 min	68°C

Tabelle 14.8.: Temperaturprofil der nematodenspezifischen Gel-PCR

Vorbereitung und Durchführung der Sequenzierung der nematoden-positiven Proben Für die anschließende Sequenzierung wurden die Proben, welche in der vorausgegangenen nematodenspezifischen Gel-PCR eine Bande aufwies verwendet.

Pro Mastermix wurde 1 µl des PCR-Produktes eingesetzt, als Primer wurden F- und R-Primer der vorangegangenen PCR in einer Konzentration von 5 pmol/µl verwendet. In gleichen Teilen wurden die Primer zu einem Primermix zusammenpipettiert.

Lediglich bei Probe 5746 kam eine verwertbare Sequenz heraus, die eindeutig einer Art - nämlich *D. repens* - zugeordnet werden konnte. Bei einer erneuten Überprüfung der PCR-Templates mittels Agarose-Gel waren viele Primer-Dimer zu sehen, daher ist zu vermuten, dass diese eine ordentliche Sequenzierung verhindert haben.

Bei einer Wiederholung der Sequenzierung wurden die durch die Multiplex Real-time PCR LuplmmRep gewonnenen Amplifikate zunächst in kompetente Zellen hineinkloniert. Eine Klonierung mit anschließender MiniPräp hat den Vorteil, das die ersten Basen eines Amplifikates, welche in der Regel bei einer Sequenzierung verloren gehen, in diesem Fall Vektorreste sind und nicht das eigentliche, zur Sequenzierung vorgesehene Fragment (vgl. 7.4).

Für die Sequenzierung wurde im Temperaturprofil der LuplmmRep nach der letzten Elongation ein zusätzlicher 10 minütiger Schritt bei 72°C eingefügt, in dem die Taq-Polymerase die Möglichkeit hatte, an das 3'-Ende jedes Amplifikates eine zusätzliche Adenin-Base einzufügen. Dieses Adenin ist nötig, damit die PCR-Produkte im Vektor an der entsprechenden Stelle ligieren können.

14. Multiplex Real-time PCR LupImmRep

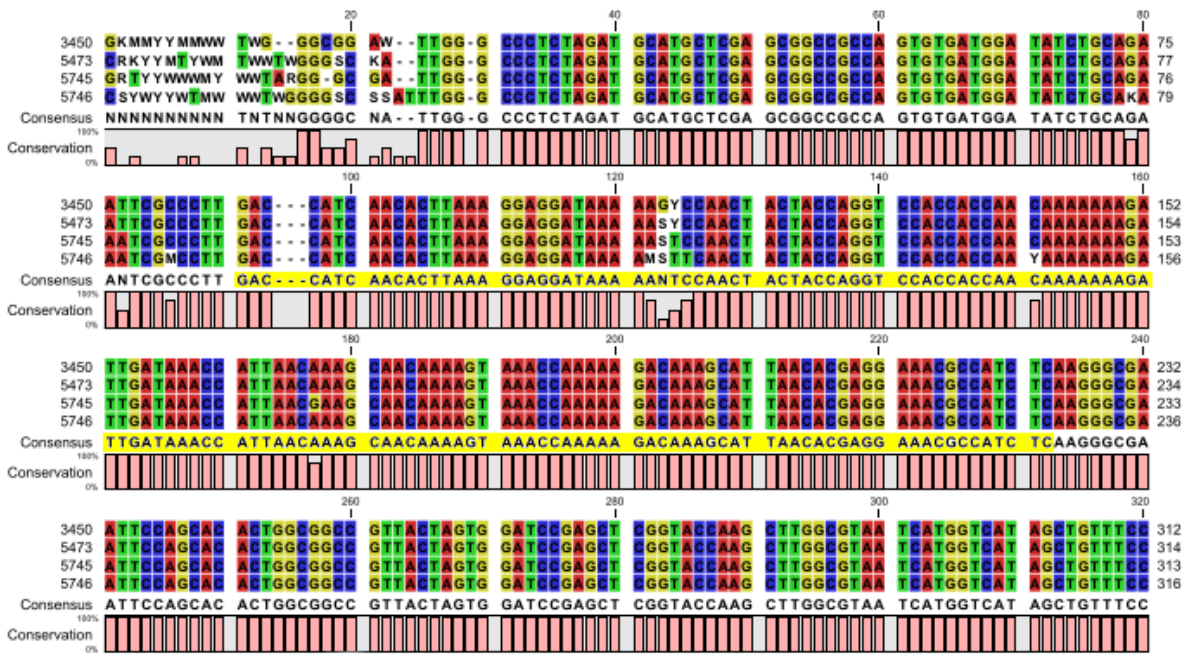


Abbildung 14.6.: Auszug aus dem Alignment der nachgewiesenen *D. repens*-Sequenzen

Ergebnis der Sequenzierung der nematodenpositiven Proben Das Alignment in Abbildung 14.6 zeigt vier der acht aus den Klonen gewonnenen *D. repens*-Sequenzen, die jeweils einem der vier positiven Stechmückenpools zuzuordnen sind. Das Amplifikat ist im Konsensus gelb unterlegt.

Es wurden je Probe (3450, 5473, 5745, 5746) vier Klone gepickt und mittels MiniPräp die Vektoren aus den kompetenten Zellen isoliert.

Die insgesamt 16 Proben wurden im Anschluss - wie oben beschrieben - für die Sequenzierung vorbereitet. Immerhin acht der Klone zeigten eindeutige Sequenzen, sodass in allen vier positiven Pools die Art *D. repens* nachgewiesen werden konnte.

Bis auf Wobbles an vier Stellen und einem Basenaustausch an Position 177 sind die Sequenzen völlig identisch. Allerdings implizieren die eingefügten Wobbles, dass die Sequenzen auch an diesen Stellen übereinstimmen. So steht etwa das M (aMino) der Probe 5746 in Position 122 für die Möglichkeit ein Adenin oder ein Cytosin einzubauen - bei den drei anderen Sequenzen wurde an dieser

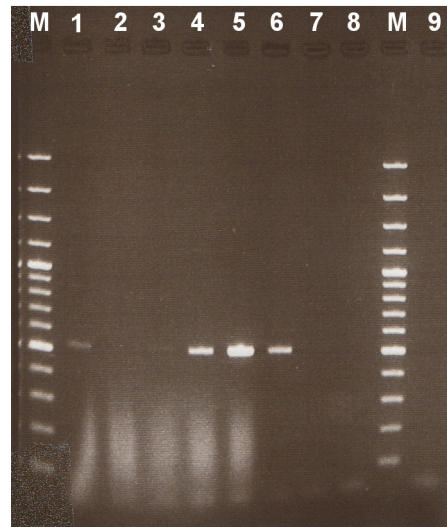


Abbildung 14.5.: Agarosegel der nematodenspezifischen PCR (M: 100 kb DNA-Ladder, 1: 3450, 2: 3508, 3: 5473, 4: 5745, 5: 5746, 6: *D. immitis*, 7: *D. repens*, 8: *O. lupi*, 9: H_2O)

14. Multiplex Real-time PCR LupImmRep

Stelle eine Adenin-Base eingefügt. Mit den anderen Wobbles verhält es sich ebenso, so kann das S an Position 123 für Guanin oder Cytosin und das Y an den Stellen 124 und 151 für den möglichen Einbau eines Cytosins oder Thymins stehen, wobei immer bereits eine der Alternativen an der entsprechenden Position eingefügt wurde. Bei der Sequenz links und rechts des Amplifikates handelt es sich um die Basenabfolge des TOPO-Vektors, in welchen die PCR-Produkte (die aus der LupImmRep-PCR stammen) hineinkloniert wurden.

Die Sequenzierung bestätigte also den Nachweis von *D. repens* in vier unterschiedlichen Stechmücken-Pools. Bei den positiven Pools handelt es sich um einen *Cs. annulata*-Pool (3450) aus dem Jahr 2011 und drei Pools aus dem Jahr 2012 (*An. maculipennis* s.l. (5745, 5746) und *Ae. vexans* (5473)).

Nachgewiesen wurden die positiven Sequenzen in den Ortschaften Hohenwutzen und Zollbrücke, die beide im Bereich Oderaue des Bundeslandes Brandenburg liegen (vgl. Abbildung 14.7). Die Sequenzen können in der NCBI-Datenbank unter der Nummer KF410864 eingesehen werden.

An beiden Standorten zusammengenommen wurden 3124 Individuen gefangen, die in 145 Pools sortiert wurden. Dabei wiesen 18 der 145 untersuchten Pools bereits ein positives Signal in der FilaHaem-PCR auf.

Die statistische Untersuchung der Ergebnisse führte zu keinem signifikanten Unterschied zwischen den Jahren 2011 und 2012 - weder in Bezug auf die Anzahl der positiven *D. repens*-Pools noch in Bezug auf die Anzahl der gesammelten Stechmücken.

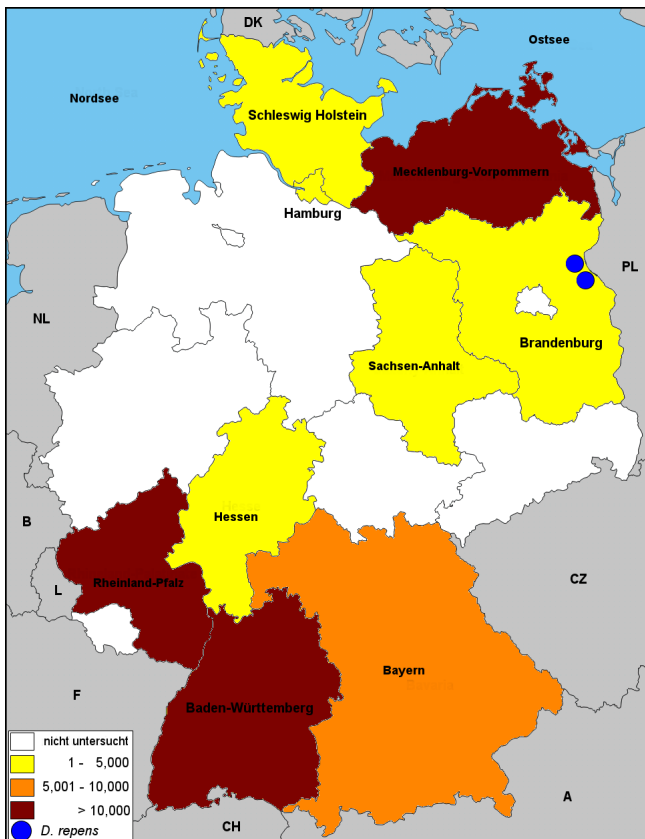


Abbildung 14.7.: Fundorte von *Dirofilaria repens*

Teil IV.

Diskussion

15. Ergebnisse der Fänge

Die Anzahl der in den Untersuchungsjahren 2010, 2011 und 2012 gefangenen Stechmückenweibchen unterscheidet sich zum Teil erheblich.

Neben Niederschlag und Temperatur ist einer der Hauptgründe für einen erfolgreichen Fang die Wahl des richtigen Zeitpunktes. Um Überschwemmungsmückenarten mit Hilfe von EVS-Fallen zu fangen, muss dieser für die Fänge gut gewählt werden, denn die Arten entwickeln sich nach Flutungen von Au- und Bruchwäldern in den dadurch entstandenen Tümpeln. Aus diesem Grund sollten die Fänge etwa eineinhalb bis zwei Wochen nach entsprechenden Hochwasserereignissen, welche durch starken oder anhaltenden Regen aber auch durch Schneeschmelze hervorgerufen werden, stattfinden. Bei einer zu frühen Beprobung der Stechmückenpopulation eines Standortes sind die Weibchen zu jung und noch nicht stechlustig. Wählt man hingegen einen zu späten Zeitpunkt, so ist es - je nach Stechmückenaufkommen - gut möglich, dass die Weibchen auf der Suche nach einer Blutmahlzeit bereits abgewandert sind, um dem vorherrschenden Konkurrenzdruck zu entkommen. Es wurde versucht, diese Zeitfenster so gut es geht einzuhalten. Dies war allerdings nicht immer möglich, weil Standorte in der ganzen Bundesrepublik untersucht wurden. Denn um den Kosten- und Zeitaufwand so gering wie möglich zu halten, wurden die Standorte, welche nicht in der Rheinebene lagen, in einer bzw. zwei Etappen aufgesucht. Deshalb konnte nicht immer der optimale Zeitpunkt für die Fallenfänge abgepasst werden, was sich in unterschiedlichen Fangzahlen innerhalb eines Standortes in den einzelnen Jahren niederschlägt.

Bei Gravid-Traps wird eine Brutstätte für trächtige Mückenweibchen imitiert, daher spielen Hochwasserereignisse oder Niederschlag kaum eine Rolle, wohl aber die Temperatur. So war zu beobachten, dass in der Saison 2011 deutlich mehr Stechmückenweibchen mit Hilfe der Gravid-Traps gefangen werden konnten, als im Jahr darauf. Dies lässt sich dadurch begründen, dass die Temperaturen im Sommer 2011 höher waren als 2012. Neben den Außentemperaturen (die natürlich auch die Temperatur des Heuaufgusses und damit die Larvenentwicklung beeinflussen), könnte theoretisch auch die Qualität des Aufgusses Einfluss auf die Quantität der Fänge haben. Dies sollte aber nicht der Fall gewesen sein, da der Heuaufguss immer auf die selbe Weise, mit den gleichen Zutaten angesetzt wurde.

Insgesamt unterscheidet sich die Anzahl der in den einzelnen Untersuchungsjahren - 2010, 2011, 2012 - gefangenen Stechmückenweibchen zum Teil erheblich.

Im Jahr 2010 wurden insgesamt 68 605 Individuen gefangen, die in 2971 Stechmückenpools sortiert wurden. Mit 63 689 Weibchen konnten signifikant mehr Individuen mit Hilfe der EVS-Fallen gefangen werden, als mit den Gravid-Traps (4916). Der Grund dafür liegt zum einen darin, dass das Stechmückenaufkommen in den Au- und Bruchwäldern in diesem Jahr besonders hoch war. Zum anderen kommt hinzu, dass die Arten *Cx. pipiens / torrentium*, welche etwa 99% des Anteiles in Gravid-Traps stellen, selten in solchen Massen vorkommen, wie es bei Überschwemmungsmückenarten der Fall ist.

2011 konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl der Individuen, welche mit Gravid-Traps und EVS-Fallen gesammelt wurden, festgestellt werden. Der Grund dafür liegt zum einen darin,

15. Ergebnisse der Fänge

dass vermehrt Gravid-Traps aufgestellt wurden, welche vor allem am Standort Heidelberg sehr produktiv waren. Des Weiteren waren Frühjahr und Sommer des Jahres 2011 in Süd- und Südwestdeutschland, wo der Großteil der Fänge stattfand verhältnismäßig trocken.

Vergleicht man aber die Jahre 2010 und 2011 so ist der die Anzahl der gefangenen Individuen und Pools betreffende Unterschied durchaus signifikant. Im Jahr 2010 wurden deutlich mehr Stechmücken als im Folgejahr gefangen. Zudem war der Anteil der gefangenen *Cx. pipiens / torrentium*-Weibchen in 2011 mit fast 62% deutlich höher als im Vorjahr (etwa 8%). Der höhere Anteil der Gattung *Culex* liegt in dem bereits erwähnten vermehrten Einsatz von Gravid-Traps begründet, während der Grund für die höhere Individuenanzahl des Jahres 2010 (welche sich in erster Linie in den Überschwemmungs- und Frühjahrsarten abzeichnet) an höheren Niederschlägen im Jahr 2010 zu finden ist.

Wenn man bedenkt, dass im Jahr 2011 mehr Flussauen und Bruchwälder beprobt wurden, so könnte man davon ausgehen, dass der Anteil der Überschwemmungsmücken überwiegen sollte, dem ist allerdings nicht so, denn der Hauptteil der im Jahr 2011 gesammelten Stechmücken gehört mit mehr als 30 000 Weibchen der Gattung *Culex* an. Denn alleine an den Standorten an der Ostsee (Greifswald und Loissin) wurden zusammen über 11 000 Individuen der Schwesterarten *Cx. pipiens / torrentium* in mehr als 450 Pools gefangen. Hinzu kommt die Tatsache, dass der Sommer 2011 im Süden und Westen relativ niederschlagsarm war und dort somit keine größeren Hochwasserereignisse aufgetreten sind, die ein hohes Aufkommen an Überschwemmungsmücken hätten mit sich führen können.

Wie bereits im Jahr 2010 gab es auch 2012 einen signifikanten Unterschied zwischen der Anzahl der Individuen, welche mit EVS- und Gravid-Traps gefangen wurden. So wurden etwa ein Drittel der Weibchen mit Gravid-Traps gefangen (die wiederum zu 99% der Gattung *Culex* angehören). Der Grund für den hohen Anteil an Individuen, welche mit Gravid-Traps gesammelt wurden, liegt zum einen an dem erhöhten Einsatz dieser Fallenart, zum anderen in dem verhältnismäßig niederschlagsarmen Sommer. Hinzu kommt, dass an manchen Standorten der optimale Zeitpunkt für einen Fallenfang nicht getroffen wurde. Etwa am Bodensee wurde die Falle (Typ: EVS) etwa zwei bis drei Tage zu früh aufgehängt: Es flogen zwar sehr viele Stechmückenweibchen auf, wenn an der Vegetation am Fallensandort geschüttelt wurde, allerdings schienen diese an einer Blutmahlzeit noch nicht interessiert zu sein. Hätte man den Fang einige Tage später durchgeführt, wären mit Sicherheit mehr Stechmücken gefangen worden.

Nimmt man nun die Zahlen für alle drei Fangjahre zusammen so ergibt sich auch hier ein signifikanter Unterschied zwischen EVS- und Gravid-Traps. Mit 30000 Individuen in 1806 Pools wurden mit den Gravid-Traps signifikant weniger Stechmückenweibchen gefangen, als mit Hilfe der EVS-Traps, mit denen 111846 Individuen in 5138 Pools gesammelt wurden. Die Fänge aus Hamburg und Schleswig-Holstein wurden hierbei nicht berücksichtigt, da sie vorwiegend mit BG-Traps durchgeführt wurden.

Der signifikante Unterschied zwischen Gravid-Traps und EVS-Fallen ist allerdings nicht sonderlich verwunderlich, wenn man bedenkt, dass Gravid-Traps vorwiegend zum Fangen trächtiger *Culex*-, *Anopheles* oder *Culiseta*-Weibchen verwendet werden [Reiter, 1983], die in der Regel in einer wesentlich geringeren Individuenzahl als Überschwemmungsmücken auftreten. Zudem wurden die Fallen an Standorten eingesetzt, bei denen von vorn herein von einem geringeren Stechmückenaufkommen ausgegangen werden konnte als an den Standorten, an denen Fänge mit EVS-Traps durchgeführt wurden. Diese Standorte waren bereits im Vorfeld für eine hohe Individuendichte von Überschwemmungs-

15. Ergebnisse der Fänge

und Frühjahrsmückenarten bekannt, die auf der Suche nach einer Blutmahlzeit letztlich von dem ausströmenden CO_2 aktiv angelockt wurden [Chen et al., 2011].

Die geographische Verteilung der gefangenen Stechmücken, wie sie in Abbildung 9.1 dargestellt ist, lässt sich unter anderem auf die Verwendung der unterschiedlichen Fallentypen zurückführen. Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei den am häufigsten gefangenen Culicidenarten um *Cx. pipiens* / *torrentium* und *Ae. vexans*. Der hohe Anteil der Gattung *Culex* lässt sich zumindest an den Standorten in Baden-Württemberg, Rheinland-Pfalz und Hessen auf einen vermehrten Einsatz von Gravid-Traps zurückführen. Auch an den Standorten Greifswald und Loissin konnten ungewöhnlich viele Weibchen dieser Stechmückengattung (hauptsächlich der Art *Cx. pipiens pipiens* biotyp *pipiens*) gefangen werden, allerdings nur im Jahr 2011. Dieses Ergebnis erscheint vor allem in Anbetracht der Tatsache interessant, dass ausschließlich EVS-Traps eingesetzt wurden. Möglicherweise ist die Ursache für das erhöhte *Culex*-Aufkommen in größeren Tümpeln zu suchen, die sich in Gebieten gebildet haben, in denen über einen längeren Zeitraum hinweg Wasser stand.

Die Artzusammenstellung, welche an den weiteren Standorten anzutreffen war, ist nicht weiter überraschend. So konnten an den EVS-Standorten in Auwäldern vermehrt Überschwemmungsmückenarten wie *Ae. vexans* und *Oc. sticticus* gefunden werden, während in Bruchwäldern (wie zum Beispiel am Standort Haßloch oder in Hamburg, wo unter anderem im Eppendorfer Moor Fallen aufgestellt wurden) auch vermehrt Arten wie *Oc. cantans* oder *Oc. rusticus* gefunden worden sind. Der hohe Anteil an *An. plumbeus* in Hessen liegt in einem Fallenfang begründet, der im Sommer 2012 am Standort Strüth mit EVS-Traps durchgeführt wurde. Dieser Standort wurde untersucht, weil von einem erhöhten Stechmückenaufkommen im Bereich eines Bauernhofes berichtet wurde. Hier hatte sich eine Population der Art *An. plumbeus* in einer Sickergrube etabliert.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass (bis auf das erhöhte Vorkommen von *Cx. pipiens pipiens* an der Ostsee) die Artverteilung der gefangenen Culiciden an den einzelnen Standorten der dort vorhandenen Biotope entspricht und sie somit eine charakteristische Zusammenstellung der Stechmückenfauna der Brut- und Fanggebiete widerspiegelt.

16. Taxonomische Multiplex Real-time PCR zur Unterscheidung der Arten des *Cx. pipiens*-Komplexes

Bislang war es sehr umständlich, die Weibchen Arten des *Cx. pipiens*-Komplexes und *Cx. torrentium* zu unterscheiden. Eine Differenzierung der Männchen ist zwar mittels Genitalpräparation möglich, doch ist dies bei einer Untersuchung vieler Individuen sehr zeitraubend. Die Möglichkeit, die maskulinen Individuen dieser Arten unterscheiden zu können, mag zwar aus zoologischer oder ökologischer Sicht interessant sein, ist aber bei einem Screening von Stechmücken, welches auf die Suche nach Humanpathogenen ausgelegt ist, hinfällig, da nur weibliche Stechmücken untersucht werden, denn nur diese sind in der Lage, mögliche Krankheitserreger auf den Menschen zu übertragen, da sie - im Gegensatz zu den Männchen - Blutmahlzeiten zu sich nehmen.

In den letzten Jahren wurden immer häufiger Versuche unternommen, die Arten mit Hilfe diverser Labormethoden voneinander zu unterscheiden.

Die Etablierung eines enzymelektrophoretischen Ansatzes, in dem spezifische Allozymmarker zur Unterscheidung der Arten *Cx. p. pipiens*, *Cx. torrentium*, *Cx. modestus*, *Cx. stigmatosoma* und *Cx. territans* eingesetzt werden, war eine Möglichkeit, die zur Differenzierung eingesetzt wurde. So kann mit Hilfe der Enzym-Marker Adenylatkinase (AK) und 2-hydroxybutyrat dehydrogenase (HBDH) zwischen *Cx. p. pipiens* und *Cx. torrentium* [Weitzel et al., 2011], mit den Enzymen MDH (Maltatdehydrogenase) und NADP (Maltatdehydrogenase) sogar zwischen *Cx. pipiens pipiens* und *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* unterschieden werden [Weitzel et al., 2009]. Der Nachteil liegt allerdings darin, dass die zu untersuchende Probe auf mindestens drei Gele, welche in einer entsprechenden Pufferlösung (für AK, MDH oder NADP) in die Elektrophorese geführt werden, aufgetragen werden muss, um charakteristische Bandenkombinationen erkennen zu können. Dieser Ansatz funktioniert zwar sehr gut, ist aber für ein Screening mit einem hohen Probendurchsatz (bei dem auch keine Einzelindividuen untersucht werden können) ungeeignet.

Eine weitere Möglichkeit zur Unterscheidung der Arten des *Cx. pipiens*-Komplexes und *Cx. torrentium* ist ein PCR-RFLP-System (RFLP = Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus), das 2007 entwickelt wurde [Shaikevich, 2007]. Hier folgt einer PCR mit spezifischen COI-Primern ein Verdau mit den Restriktions-Endonucleasen *HaeIII* und *BclI*. Dem Vorgehen liegt zu Grunde, dass innerhalb der Amplifikate von *Cx. pipiens pipiens*, *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* und *Cx. torrentium* artspezifisch Schnittstellen der entsprechenden Endonucleasen vorhanden sind oder nicht. So besitzt das PCR-Produkt von *Cx. pipiens pipiens* im Gegensatz zum biotyp *molestus* und *Cx. torrentium* eine Schnittstelle für *HaeIII*, sodass im Gel eine Doppelbande für *Cx. pipiens pipiens* zu sehen ist, während die beiden anderen Arten jeweils nur eine Bande aufweisen. Um nun zwischen den beiden Biotypen und *Cx. torrentium* zu unterscheiden, ist ein zusätzlicher Restriktionsverdau des PCR-Amplifikates mit *BclI* nötig, nach dem im Gel bei *Cx. torrentium* zwei, bei den beiden Biotypen drei Banden

16. Taxonomische Multiplex Real-time PCR zur Unterscheidung der Arten des *Cx. pipiens*-Komplexes

sichtbar werden. Aber auch dieses Vorgehen ist durch den sich an die PCR anschließenden doppelten Enzymverdau umständlich und zeitaufwändig.

Zur Unterscheidung der Biotypen und *Cx. quinquefasciatus* können auch SNP-Marker, die auf dem Austausch eines einzigen Nucleotides zwischen den Arten beruhen, verwendet werden [Huang et al., 2011], jedoch ist dieser Ansatz für die in Deutschland autochthonen Mückenarten leider nicht anwendbar, weil man hier eine Differenzierung der Biotypen und *Cx. torrentium* bräuchte und nicht *Cx. quinquefasciatus*, da diese Art im Untersuchungsgebiet nicht vorkommt.

Obwohl man mit den bisher vorgestellten Ansätzen durchaus in der Lage ist, die Weibchen der Arten des *Culex*-Komplexes zumindest teilweise voneinander zu unterscheiden, so waren sie für die vorliegende Arbeit nicht geeignet. Denn aufgrund der hohen Probenanzahl sollte man mit der zu verwendenden Untersuchungsmethode in der Lage sein möglichst zeiteffektiv eine taxonomische Einordnung der gefangenen Stechmücken vorzunehmen und zwar auf eine Art, die es ermöglicht, alle in Deutschland vorkommenden Arten des *Culex*-Komplexes zu erfassen. Zudem sollte die Konatminationsgefahr, welche sich oftmals durch Systeme ergibt, bei denen Gelelektrophoresen der PCR-Amplifikate zur Anwendung kommen, so gering wie möglich gehalten werden. Die bisher vorhandenen Assays entsprachen diesen Anforderungen nicht. Zum einen wären bei Ansätzen, wie etwa der Enzymelektrophorese (mit deren Hilfe immerhin noch Hybride hätten nachgewiesen werden können) die einzelnen Arbeitsschritte zu zeitintensiv gewesen und damit für die Untersuchung einer hohen Individuenanzahl nicht geeignet gewesen, zumal die taxonomische Bestimmung der Culiciden zwar einen wichtigen Teil dieser Arbeit darstellte, der Hauptfokus der vorliegenden Studie aber auf der weiterführenden Untersuchung der Stechmücken in Bezug auf das Vorhandensein diverser humanpathogener Erreger lag. Hierzu war und ist es auch wichtig, die Culiciden-Art so genau wie möglich zu bestimmen, da sich aus der systematischen Einordnung auch wichtige Rückschlüsse in Hinblick auf potentiell vorhandene Vektorkompetenzen schließen lassen. Außerdem birgt die Arbeit mit vielen Proben, welche nicht in geschlossenen Systemen, wie etwa einer Real-time PCR, untersucht werden, immer die Gefahr der Verunreinigung. So werden bei konventionellen PCRs die Amplifikate im Anschluss an diese auf ein Agarose-Gel aufgetragen, wobei es vorkommen kann, dass mit dem Amplifikat eigentlich negative Proben kontaminiert werden und so zu einem falsch-positiven Ergebnis führen können.

Die in dieser Arbeit vorgestellte taxonomische Multiplex Real-time PCR bietet erstmals die Möglichkeit der zeitgleichen Differenzierung der Arten des *Cx. pipiens*-Komplexes und *Cx. torrentium*. Zusätzlich erlaubt sie es, Hybride der Biotypen *Cx. p. pipiens pipiens* und *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* zu detektieren, wobei der Nachweis von Hybriden nur dann möglich ist, wenn DNA einzelner Individuen untersucht wird, die Stechmücken im Vorfeld also nicht zu Pools zusammengefasst wurden. Normalerweise findet Bestimmung der Art dadurch statt, dass beim Herstellen des spezifischen Amplifikates ein fluoreszierendes Signal abgegeben wird, dass im entsprechenden Kanal erscheint. Während bei *Cx. torrentium* nur ein Signal im *Cx. torrentium*-Kanal zu sehen sein wird, werden *Cx. pipiens*-positive Signale von vornherein in zwei Kanälen abgebildet: dem „All-Kanal“ und dem Kanal, welcher dem Biotypen entspricht (also entweder dem *Cx. pipiens*- oder dem *Cx. molestus*-Kanal). Bei dem Nachweis eines Hybriden muss also sichergestellt sein, dass nur ein Individuum untersucht wurde, denn der Hybrid muss, neben einem Signal im all-Kanal, zusätzlich je ein Signal im *Cx. pipiens*- und im *Cx. molestus*-Kanal auslösen (bei Pools, die aus mehreren Individuen bestehen kann nicht ausgeschlossen werden, dass mehrere Arten und Biotypen zusammengefasst wurden).

Mit über 1100 untersuchten *Culex*-Pools wurde ebenfalls gezeigt, dass die vorliegende taxonomische

16. Taxonomische Multiplex Real-time PCR zur Unterscheidung der Arten des *Cx. pipiens*-Komplexes

Multiplex Real-time PCR eine hervorragende Möglichkeit zur zeiteffektiven Untersuchung vieler Proben hinsichtlich der Artzugehörigkeit der Spezies *Cx. p. pipiens*, *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* und *Cx. torrentium* bietet. Weiterhin konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass es mit dieser PCR nicht nur möglich ist, Hybride der Biotypen *pipiens* und *molestus* zu detektieren, es konnten sogar erstmalig Hybride dieser Biotypen innerhalb Deutschlands (sogar innerhalb Europas) nachgewiesen werden. So wurde *Cx. pipiens pipiens* x *Cx. pipiens* biotyp *molestus* an zwei Standorten in Rheinland-Pfalz und an einem Standort in Baden-Württemberg gefunden. An den rheinland-pfälzischen Standorten Bobenheim-Roxheim und Dirmstein wurden je zwei und ein Hybrid gefunden, im Heidelberger Zoo (Baden-Württemberg) konnte ebenfalls ein Hybrid nachgewiesen werden. Alle *Cx. p. pipiens* x *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* wurden mittels Gravid-Traps gefangen, die an eher ländlichen Standorten aufgestellt wurden. Eine Ausnahme bildet hierbei der Heidelberger Zoo, der zwar im Randbereich der Stadt (Neuenheimer Feld) liegt, aber dennoch nur knapp fünf bis sechs Kilometer vom Stadtzentrum (Universitätsplatz) entfernt ist.

Im Gegensatz zu den USA, in denen die Hybridisierung der Biotypen wohl recht häufig auftritt ([Fonesca et al., 2004], [Bahnck and Fonseca, 2006]) oder Marokko, wo 2012 zum ersten Mal Hybride zwischen *Cx. pipiens pipiens* und *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* nachgewiesen wurden [Amraoui et al., 2012], konnten in Europa bislang keine Hybride gefunden werden.

Man vermutet, dass *Cx. pipiens pipiens* x *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* in der Lage ist, das WNV (West-Nil-Virus) zu übertragen, da die Weibchen (im Gegensatz zu den nicht hybriden Formen) als Wirte Vögel und Menschen annehmen und so das Virus, welches normalerweise nur von Vogel zu Vogel weitergegeben wird, auch auf Menschen übertragen können ([Fonesca et al., 2004], [Bahnck and Fonseca, 2006]).

In Anbetracht der globalen Klimaerwärmung und der Tatsache, dass mittlerweile auch in Südeuropa (etwa Spanien und Italien) erste Fälle von WNV-Infektionen gemeldet wurden ([García-Bocanegra et al., 2011], [Bagnarelli et al., 2011]) und in Deutschland nun nachweislich ebenfalls potentielle Vektoren vorhanden sind, ist es möglich, dass das Virus letztlich auch in Deutschland Fuß fassen kann.

Gerade Standorte, wie etwa der Zoo in Heidelberg, an dem sich sowohl eine hohe Anzahl an Vögeln als auch an Menschen befinden, würden dem Virus optimale Verbreitungsmöglichkeiten bieten, da hier das Virus durch die Präsenz des Vektors problemlos von Vögeln auf die Besucher oder Mitarbeiter des Zoos überspringen könnte. Aus diesem Grund wäre eine Fortführung des Monitorings der Stechmücken und deren regelmäßige Untersuchung auf das Vorhandensein viraler Nucleinsäuren wichtig, um einem möglichen WNV-Ausbruch entgegenwirken zu können. Zusätzlich wäre auch eine Stechmückenbekämpfung im Zoo wünschenswert, um die bestehende Vektorpopulation möglichst klein zu halten.

Bezogen auf die Verbreitung der einzelnen Arten des *Cx. pipiens*-Komplexes und *Cx. torrentium* ist auffällig, dass *Cx. pipiens pipiens* im Norden und Osten Deutschlands dominiert, während im Süden des Landes vermehrt auch reine *Cx. torrentium*- und gemischte Pools zu finden sind.

Ebenso konnten im Süden auch deutlich mehr *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* gefunden werden als im Rest der Bundesrepublik.

Die genauen Ursachen für die Unterschiede in der Verteilung der genannten Arten sind noch nicht eindeutig zu benennen.

Von europäischen *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus*-Populationen waren bisher lediglich unterirdi-

16. Taxonomische Multiplex Real-time PCR zur Unterscheidung der Arten des *Cx. pipiens*-Komplexes

sche Vorkommen, wie etwa in U-Bahn-Systemen Londons [Fonesca et al., 2004] oder Sickergruben in Deutschland [Weitzel et al., 2011] bekannt. Es wurde bislang festgestellt, dass der Biotyp *molestus* sich in kälteren Gegenden in unterirdische Habitaten aufhält [Fonesca et al., 2004, Weitzel et al., 2011], vielleicht, weil die Temperaturtoleranz geringer ist, als beim Biotyp *pipiens*, hierzu ist allerdings nichts bekannt. Aber würde es sich tatsächlich so verhalten, könnte man dadurch, dass *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* vorwiegend im Süden und Südwesten Deutschlands nachgewiesen werden konnte, vermuten, dass in diesem Teil der Bundesrepublik, aufgrund der höheren Außentemperaturen als im Norden und Osten des Landes, Bedingungen gegeben sind die es dem Biotypen *molestus* erlauben, auch in oberirdischen Habitaten zu brüten. Denkbar wären aber auch vermehrte unterirdische Habitate im Süden, die entsprechenden Brutraum bieten. Um die tatsächlichen Gründe für die unterschiedliche Verteilung der Arten des *Culex pipiens*-Komplexes benennen zu können, müssten die Umgebungen der Standorte, etwa auf das Vorhandensein entsprechend unterirdischer Bruthabitate hin, genauer untersucht werden. Auch wären weiterführende Studien bezüglich Temperatur- und Bruthabitatpräferenz der Biotypen *pipiens* und *molestus* sicherlich hilfreich.

Angesichts der Tatsache, dass deutschlandweit über 130 Pools gefunden wurden, welche beide Biotypen der Art *Cx. pipiens pipiens* beinhalten und bereits vier Hybride alleine in Süddeutschland gefunden werden konnten, wird deutlich, dass die Hybridisierung zwischen den Biotypen kein seltenes Ereignis. Entsprechend hoch ist das Risiko einer Verbreitung des West-Nil-Virus durch *Cx. pipiens pipiens* biotyp *pipiens* x *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* einzuschätzen, sollte dieses nach Deutschland gelangen.

17. Multiplex Real-time PCR FilaHaem

17.1. Nematoden-Screening

Mit der Multiplex Real-time PCR FilaHaem konnte eine Nachweismethode für Filarien und Haemosporidien entwickelt werden, die die Möglichkeit bietet, ein Screening von Stechmücken auf das Vorhandensein dieser Parasiten mit einem hohen Probendurchsatz in verhältnismäßig kurzer Zeit durchzuführen.

Es wurden bewusst Pan-Primer verwendet, die nicht nur eine Art spezifisch detektieren, sondern innerhalb einer ganzen Gruppe von Organismen, wie hier den Nematoden und Haemosporidien, angewandt werden können. Der Grund hierfür lag zum einen darin, dass - bezüglich humanpathogener Pathogene - mit einer sehr geringen Infektionsrate gerechnet wurde, zumal das Nematoden-Screening aus dem Jahr 2010 zu lediglich 27 (von über 2000) positiven Proben führte. Zum anderen war das Ziel mit einem Screening innerhalb einer Organismengruppe eine möglichst breitgefächerte Untersuchung durchzuführen. Mögliche positive Proben sollten im Anschluss mittels weiterführenden, spezifischeren PCRs, wie der in dieser Studie ebenfalls entwickelten Multiplex Real-time PCR LuplmmRep zu untersuchen.

Gleichzeitig bestand der Anspruch an die zu entwickelnde PCR, dass die Kontaminationsgefahr so gering wie möglich gehalten werden sollte, weshalb anstatt einer konventionellen Gel-PCR eine Real-time PCR gewählt wurde. Die PCR und der Nachweis der Amplifikate finden beide im gleichen geschlossenen System (Reaktionsgefäß) statt. Da die Ergebnisse direkt am Monitor mitverfolgt werden können, anstatt die Amplifikate im Anschluss an die PCR auf ein Agarose-Gel auftragen zu müssen, besteht kaum Gefahr, andere Proben mit Amplifikaten zu kontaminieren. Mit der Etablierung der FilaHaem-PCR ist es gelungen, eine Real-time PCR zu entwickeln mit der man in der Lage ist, eine hohe Probenanzahl effektiv auf das Vorhandensein der DNA von Nematoden und Haemosporidien hin untersuchen. Allerdings bietet sie nur die Möglichkeit eines groben Screenings - für den Nachweis einzelner Arten müssen noch andere Nachweismethoden angeschlossen werden. Geht man allerdings von einer geringen Parasitämie aus, kann man mit dieser PCR ein breites Spektrum an Erregern nachweisen.

Es konnte festgestellt werden, dass der Großteil der Nematoden-positiven Stechmücken in Pools der Gattung *Culex* zu finden waren (vgl. Abbildung 13.3). Die meisten der positiven *Culex*-Mücken stammen aus Fängen, welche mit Gravid-Traps durchgeführt wurden. Dies ist sicherlich der Grund für den hohen Anteil der Nematoden-positiven Stechmücken innerhalb dieser Gattung sein, denn während Culiciden, welche mit EVS-Traps gefangen werden auf der Suche nach einer Blutmahlzeit sind, sind Weibchen, die in Gravid-Traps geraten bereits auf der Suche nach einer Möglichkeit zur Oviposition, d. h. sie haben bereits eine Blutmahlzeit zu sich genommen. Man kann davon ausgehen, dass die Stechmückenweibchen bei dieser Gelegenheit Blut Nematoden infizierter Wirte zu sich und dabei Microfilarien aufgenommen haben. Dies würde auch erklären, warum von den *Cx. pipiens pipiens*, die an den Standorten Greifswald und Loissin in Mecklenburg-Vorpommern gesammelt wurden, lediglich

5% (36 der 746 Pools) infiziert waren, während die Infektionsrate der *Culex*-Weibchen etwa in Baden-Württemberg beinahe 30% betrug: 625 von 2206 *Culex*-Pools waren Nematoden-positiv.

Weiterhin ist zu bemerken, dass der Großteil der Nematoden-positiven Pools im Süden und Südwesten gefunden werden konnte, 80% aller positiven Pools wurden an den Standorten in Baden-Württemberg und Rheinland-Pfalz gesammelt. Dieses Ergebnis hängt wiederum mit der Tatsache zusammen, dass die Infektionsrate innerhalb der Gattung *Culex*, welche wiederum vorwiegend mit Gravid-Traps gesammelt wurden, so hoch war. Vergleicht man etwa den Anteil an positiven *Ae. vexans*-Pools so ist dieser im Osten bzw. Nordosten des Landes (Mecklenburg-Vorpommern, Schleswig-Holstein und Brandenburg) mit etwa 30% höher als im Süden - hier gehörten lediglich 18% der infizierten Pools der Art *Ae. vexans* an. Auch dieser scheinbar hohe Anteil der Überschwemmungsmückenart ist zumindest zum Teil auf den sehr hohen *Culex*-Anteil zurückzuführen.

Zudem kann vermutet werden, dass sich eine stabile *Dirofilaria repens*-Population (zumindest in Brandenburg) etabliert hat, die unter anderem in *Ae. vexans*, aber bislang in keiner Art des *Culex pipiens*-Komplexes nachgewiesen werden konnte (vgl. Kapitel 18.1). Auch dies könnte zu der ungleichen Verteilung der positiven *Ae. vexans* beigetragen haben.

Denkbar wäre außerdem die Präsenz von etwa *Setaria tundra* oder eines anderen Nematoden. Diese Hypothese ließe sich überprüfen, indem die Nematoden-positiven Pools der Art *Ae. vexans* erneut mit einer weiterführenden PCR untersucht werden würden. Da der Fokus allerdings auf der Untersuchung der Culiciden auf die Präsenz humanpathogener nematodischer DNA lag, wurden mögliche Anschlussversuche (weitere PCRs, Sequenzierungen) nicht mehr durchgeführt.

17.1.1. Nachweis von *Setaria tundra*

Bei der Auswertung der Sequenzierung aus dem Jahr 2010 konnten neben 25 Sequenzen unbekanntem filarialen Ursprungs noch zwei Sequenzen der Filarie *Setaria tundra* gefunden werden.

Neben Rentieren und Elchen (*Alces alces*) werden als Wirte von *S. tundra* in Skandinavien, wo es weitläufige Studien zu dieser Filarienart gibt, auch Rehe (*Capreolus capreolus*) aufgezählt [Laaksonen et al., 2009b]. In Berichten aus Deutschland ([Büttner, 1978, Rehbein et al., 2000]) und Österreich [Kutzer and Hinaidy, 1969] werden ebenfalls Rehe als Wirtstiere genannt. Dabei wird berichtet, dass der Befall der Rehe mit *S. tundra* zwischen 1,6 % in Nordrhein-Westfalen [Rehbein et al., 2000] und 12,3 % in Bayern [Büttner, 1978] liegt.

In dieser Studie wurde *S. tundra*-DNA in *Ae. vexans* und *Oc. sticticus* nachgewiesen, zusätzlich konnte die Filarie auch in *An. claviger* nachgewiesen werden [Czajka et al., 2012]. Aus Finnland sind die Arten *Oc. communis*, *Oc. punctator*, *Ae. hexodontus* und *Ae. excrucians* als natürliche Überträger bekannt [?], Stechmückenarten, die in Hinblick auf den Lebensraum, den in Deutschland infizierten Arten ähnlich sind.

In Finnland und Lapland führten gehäuftes Auftreten der Art *S. tundra* zu massiven wirtschaftlichen Schäden (vgl. [?], [Laaksonen et al., 2010]). So konnten in Finnland drei Ausbrüche innerhalb der Familie der Hirsche (Cervidae) 1973, 2003-2005 und 2007 verzeichnet werden, wobei im ersten die Zahl der Rentiere (*Rangifer tarandus*) im Norden Finnlands um ein Drittel reduziert wurde. Ein Vermehrung der Filarien in Deutschland könnte aber durchaus eine Gefahr für Cerviden-Bestände darstellen.

Im Zuge der Globalen Erwärmung wird vermutet, dass sich die Zahl der *S. tundra*-Epidemien (zumindest in Skandinavien) erhöhen wird [Laaksonen et al., 2010]. Gleichzeitig wird von der Möglichkeit

berichtet, dass es auch nicht pathogene Stämme innerhalb der Art *S. tundra* geben könnte ([Laaksonen et al., 2009b], [Laaksonen et al., 2008]). Dies würde erklären, warum es in Deutschland, wo *S. tundra* zumindest in Stechmücken verhältnismäßig häufig vorkommt, bislang zu keiner Dezimierung des Rotwildbestandes kam.

17.1.2. Nachweis einer Filarien-Art mit einer bislang unbekannt Sequenz

Das Alignment (vgl. Abbildung 17.2) einiger der filarialen Sequenzen unbekannter Herkunft (Pools 43, 129, 135, 141 und 143) zeigt, dass alle derselben Art angehören zu scheinen, vereinzelte Substitutionen oder Basenaustausche (z. B. Stelle 76: Austausch von A gegen G) spielen hierbei nur eine untergeordnete Rolle.

Die in 2010 in Stechmückenpools der Arten *Cx. pipiens* / *torrentium* gefundenen Filarien wurden sequenziert, um Auskunft über die gefundene Spezies zu bekommen (vgl. Kapitel 11.2).

Ein Abgleich mit der NCBI-Datenbank GenBank zeigte, dass es sich um eine bislang unbekannte Sequenz handelt, die allerdings eindeutig filarialer Herkunft ist. Daher ist auch der Unterschied zwischen der unbekannt Sequenz und dem Nematoden *Onchocerca suzukii* zu erkennen (vgl. Abbildung 17.2). Dieser zeigt mit einer Übereinstimmung von 86 % die höchste Identität mit der nachgewiesenen Sequenz.

Da sie ausschließlich in *Cx. pipiens* / *torrentium* Pools gefunden wurden, also in vorwiegend ornithophilen Arten, kann vermutet werden, dass es sich um eine Filarienart handelt, die in erster Linie Vögel befällt.

Abbildung 17.1 zeigt die phylogenetische Einordnung der in 2010 gefundenen Sequenzen. Der Consensus *Setaria tundra*-like steht für die beiden in den Überschwemmungsmückenarten *Ae. vexans* und *Oc. sticticus* nachgewiesenen Sequenzen, die im Dendrogramm mit *Setaria tundra* clustern und somit eindeutig dieser Art zugewiesen werden können.

Die 25 weiteren, nur in den *Culex pipiens* / *torrentium*-Pools gefundenen Sequenzen sind in Abbildung 17.1 im Consensus *Culex-filaria* zu finden. Wie dem Stammbaum zu entnehmen ist, clustert der Consensus mit keiner der im Stammbaum verwendeten Sequenzen. Die filariale DNA wurde ausschließlich in Stechmücken der Gattung *Culex* gefunden. Da es sich um Pools der Arten *Cx. pipiens* / *torrentium* handelt und lediglich der Biotyp *Cx. p. molestus* anthropophil ist, kann man davon ausgehen, dass es sich bei dem Großteil dieser Individuen um ornithophile Stechmückenarten handelt. Dies wiederum lässt den Schluss zu, dass es sich bei der gefundenen Sequenz um eine Filarien-Art handelt, die ebenfalls ornithophil ist (vgl. auch [Czajka et al., 2012]).

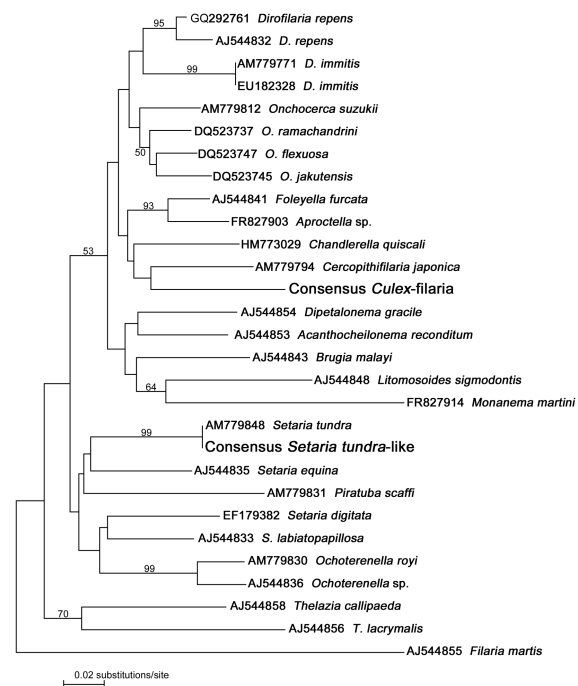


Abbildung 17.1.: Phylogenetische Einordnung der gefundenen Sequenzen, basierend auf Teilen der 12s rDNA Sequenzen

Bei europäischen Vögeln, sind unter anderem parasitäre Nematoden der Gattungen *Cardiofilaria*, *Eufilaria*, *Pelecitus* bekannt ([Haas et al., 2011], [Krone, 1999]). Über Nematoden in europäischen Vögeln wird in der Literatur vorwiegend von Arten berichtet, die bei Geflügel zu wirtschaftlichen Schäden führen können, zum Beispiel *Ascaridia galli*, ein Parasit, welcher bei Hühnern vorkommt [Dänicke et al., 2009]. Des Weiteren sind auch die Nematoden *Capillaria obsignata* oder *Heteraki gallinarum* in europäischen Vögeln nachzuweisen ([Al-Balwari and Saeed, 2012], [Katoch et al., 2011]). Speziell aus Deutschland gibt es nur einen Nachweis und zwar von *Cardiofilaria pavlovski* [Krone, 1999], weshalb es möglich wäre, dass es sich dabei um die in dieser Studie gefundene, unbekannt Sequenz handelt. Allerdings gibt es keinen Eintrag einer Sequenz dieser Art in GenBank. Um genauer bestimmen zu können, um welche Spezies es sich bei dieser unbekannt Sequenz handelt, müsste eine umfangreiche Studie unternommen werden, bei der Stechmücken mittels Sektion auf das Vorhandensein von Microfilarien untersucht werden. Weiterhin wäre es auch möglich, Vogelkadaver auf Nematoden-Befall zu untersuchen und diese dann genauer zu charakterisieren. Ein Vergleich der Ergebnisse aus Stechmücken und Vögeln könnte entschlüsseln, um welche Filarienart es sich bei der Sequenz handelt.

17.1.3. Vogel malaria-Screening

Der Nachweis von Haemosporidien fand bislang entweder durch Mikroskopie von Blutaussstrichen [Gediminas Valkiunas and Bensch, 2008] oder durch Nested PCRs statt ([Hellgren et al., 2004], [J. Waldenström and Östman, 2004]).

Die in dieser Studie eingesetzten Primer-Probe-Kombinationen sind in der Lage Haemosporidien nachzuweisen, wobei die Cytochrom b-Primer spezifischer schienen, als diejenigen welche zum Nachweis der 18s-Sequenz verwendet wurden. So erschienen im Schnitt lediglich 48 % der auf die 18s Haem-Sequenz positiven Pools auch mit den Cytochrom b-Primern positiv. Um die tatsächliche Anzahl an Haemosporidien-positiven Stechmücken zu ermitteln, hätte man im Anschluss jeden Pool mit einer der bereits bestehenden Nested-PCRs untersuchen und die Amplifikate im Anschluss sequenzieren müssen, dies war aber bei der Menge der in der FilaHaem positiven Pools aus ökonomischen und zeitlichen Gründen nicht möglich. Insgesamt zeigten 2009 Pools ein positives Signal für die 18s Haem-Sequenz und für Cytochrom b waren es zusätzlich 958 Pools.

Dennoch gibt es Hinweise, dass es sich (zumindest bei einem Großteil der Pools) tatsächlich um Erreger der Vogel malaria handelt. Zum einen, wurden im Jahr 2010 946 von 1429 auf 18s Haem positive Pools in ornithophilen Stechmückenarten gefunden (66%). Im darauffolgenden Jahr waren es mit 469 von 580 sogar 80 %. Von den für Cytochrom b positiven Pools wurden 643 von 675 in der Gattung *Culex* gefunden (95%, 2011), bzw 269 von 283 *Culex*-Pools (ebenfalls 95%, 2012). Auch der Rückgang der 18s Haem positiven *Culex*-Pools von 946 auf 469 und der Rückgang innerhalb der Cytochrom b positiven Pools von 643 auf 269 spricht für eine relativ hohe Spezifität der PCR.

Zusätzlich wurden im Jahr 2011 acht Proben, welche in der FilaHaem-PCR positiv erschienen von Janus Börner (Universität Hamburg) mit einer haemosporidien-spezifischen nested-PCR untersucht. Drei der Proben waren negativ für Cytochrom b, sieben ergaben für die 18s Haem-Sequenz ein positives Signal. Insgesamt konnten drei haemosporidiale Sequenzen nachgewiesen werden. Ein *Cx. pipiens / torrentium*-Pool, welcher positiv für die 18s Haem- aber negativ für die Cytochrom b-Sequenz erschien, beinhaltete Leukocytozoon-DNA, bei den beiden anderen positiven Pools konnte *Plasmodium*-DNA nachgewiesen werden. Es handelte es sich ebenfalls um *Cx. pipiens / torrentium*-Pools, die für die 18s Haem-PCR einen sehr niedrigen Ct-Wert hatten und auch für Cytochrom b positiv waren. Um diese

17. Multiplex Real-time PCR FilaHaem

Ergebnisse weiter zu untermauern, hätte man noch mehr Proben mittels Sequenzierung untersuchen sollen, dies war aber leider aus Zeitgründen nicht möglich. Dennoch kann davon ausgegangen werden, dass die PCR zumindest genau genug ist, um eine Tendenz angeben zu können.

Diese Verringerung der (vermutlich) Vogel malaria positiven Stechmücken kann folgende Gründe haben.

Kurz nach Beginn des Monitorings im Zoo wurde mit einer Stechmückenbekämpfung begonnen, um die Anzahl der möglichen Vogel malaria-Vektoren zu dezimieren. Hierbei wurden die stehenden Gewässer, welche auf dem Zoogelände gefunden werden konnten, in regelmäßigen Abständen mit *Bti* (*Bacillus thuringiensis israelensis*) behandelt und dort, wo es möglich war, das Wasser regelmäßig gewechselt, sodass die im Wasser abgelegten Eier nicht zum Ausschlüpf kommen konnten. Weiterhin wurden die Inka-Seeschwalben mit einer Vogel malaria-Prophylaxe behandelt, um auch innerhalb der Schwalben-Population die Erreger-Anzahl so gering wie möglich zu halten [Stockklausner et al., 2013]. Die geringere Anzahl der mit dem Haemosporidien-Anteil der FilaHaem-PCR als positiv getesteten Pools im Jahr 2012 scheint den Erfolg der Stechmückenbekämpfung und den der Vogel malaria-Prophylaxe zu bestätigen. Hierzu ist in Abbildung 17.3 zu sehen, dass im Jahr 2012 der Anteil an Cytochrom b-positiven Pools mit 64 % geringer war als im Vorjahr (75%). Besonders in den Monaten Juli und August ist ein Unterschied zu erkennen, denn während 2011 beinahe alle untersuchten Pools positiv waren, war es im Jahr 2012 nur noch etwa die Hälfte der gesammelten Proben.

Diese Arbeit ist nicht die erste, in der haemosporidiale DNA in Stechmücken, welche in einem Tierpark gesammelt wurden, nachgewiesen werden konnten. Bereits 2003 fand eine Untersuchung des Rotterdamer Zoos (Niederlande) statt, in der Stechmücken gefangen und auf das Vorhandensein von Vogel malaria-Erreger hin getestet wurden. Dabei wurde Plasmodium-DNA in etwa 2 % aller gefangenen Stechmücken gefunden, die alle der Art *Cx. pipiens* s. l. angehörten [Huijben et al., 2007]. Weiterhin konnte in europäischen Stechmücken bislang nur in Portugal, und in der Schweiz DNA von Haemosporidien nachgewiesen werden. Bei den in Portugal infizierten Stechmücken handelte es sich um die Arten *Cx. pipiens*, *Cx. perexiguus* und *Cx. theileri*, welche alle im Jahr 2008 gesammelt wurden [Ventim et al., 2012]. In der Schweiz konnte ebenfalls Vogel malaria in der Art *Cx. pipiens*

Diese Arbeit ist nicht die erste, in der haemosporidiale DNA in Stechmücken, welche in einem Tierpark gesammelt wurden, nachgewiesen werden konnten. Bereits 2003 fand eine Untersuchung des Rotterdamer Zoos (Niederlande) statt, in der Stechmücken gefangen und auf das Vorhandensein von Vogel malaria-Erreger hin getestet wurden. Dabei wurde Plasmodium-DNA in etwa 2 % aller gefangenen Stechmücken gefunden, die alle der Art *Cx. pipiens* s. l. angehörten [Huijben et al., 2007]. Weiterhin konnte in europäischen Stechmücken bislang nur in Portugal, und in der Schweiz DNA von Haemosporidien nachgewiesen werden. Bei den in Portugal infizierten Stechmücken handelte es sich um die Arten *Cx. pipiens*, *Cx. perexiguus* und *Cx. theileri*, welche alle im Jahr 2008 gesammelt wurden [Ventim et al., 2012]. In der Schweiz konnte ebenfalls Vogel malaria in der Art *Cx. pipiens*

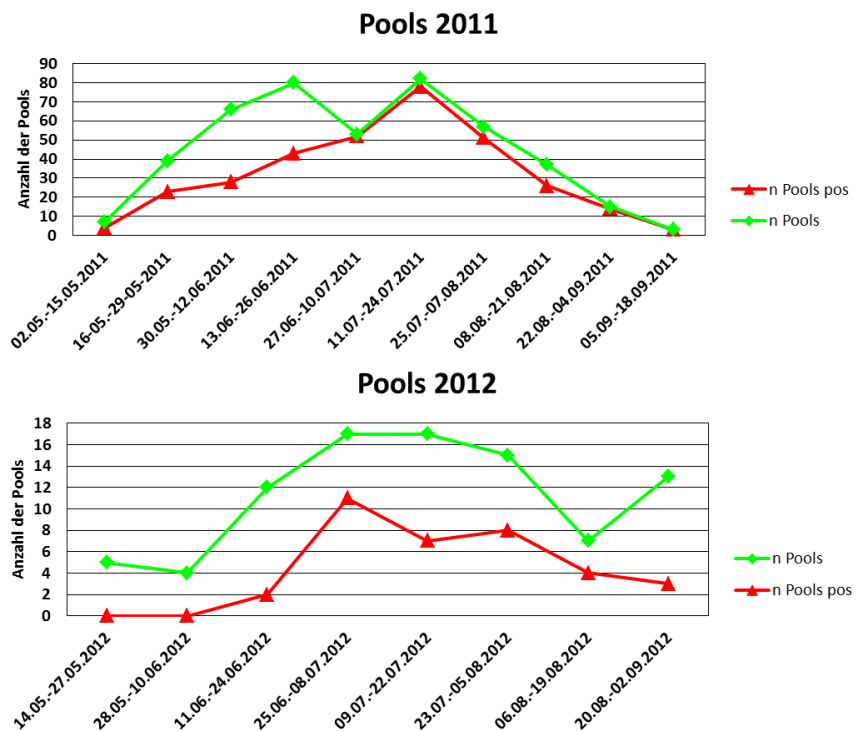


Abbildung 17.3.: Vergleich der Cytochrom b-positiven Pools im Zoo Heidelberg 2011+2012

17. *Multiplex Real-time PCR FilaHaem*

nachgewiesen werden [Glaizot et al., 2012]. Vergleicht man die Prozentsätze der innerhalb einer Studie positiven Stechmücken, so waren in der Schweiz mit etwa 6 % die meisten Individuen infiziert und in Portugal mit < 1 % die wenigsten. Der Grund dafür liegt vermutlich darin, dass lediglich in der schweizer Studie mit Gravid-Traps gefangen wurde, während in den anderen beiden Untersuchungen unter anderem CDC-Traps oder der Mosquito Magnet verwendet wurden. Dennoch ist die Anzahl der positiven Stechmücken in der Schweiz sehr gering, wenn man sie mit der in dieser Arbeit gefundenen, positiven Stechmückenpools vergleicht. Der Unterschied könnte darin begründet sein, dass sich die Standorte in der Schweiz in einem Wald befanden, dem die künstlichen Brutmöglichkeiten fehlen, wie sie etwa im Zoo in Heidelberg vorhanden waren.

17. Multiplex Real-time PCR *FilaHaem*

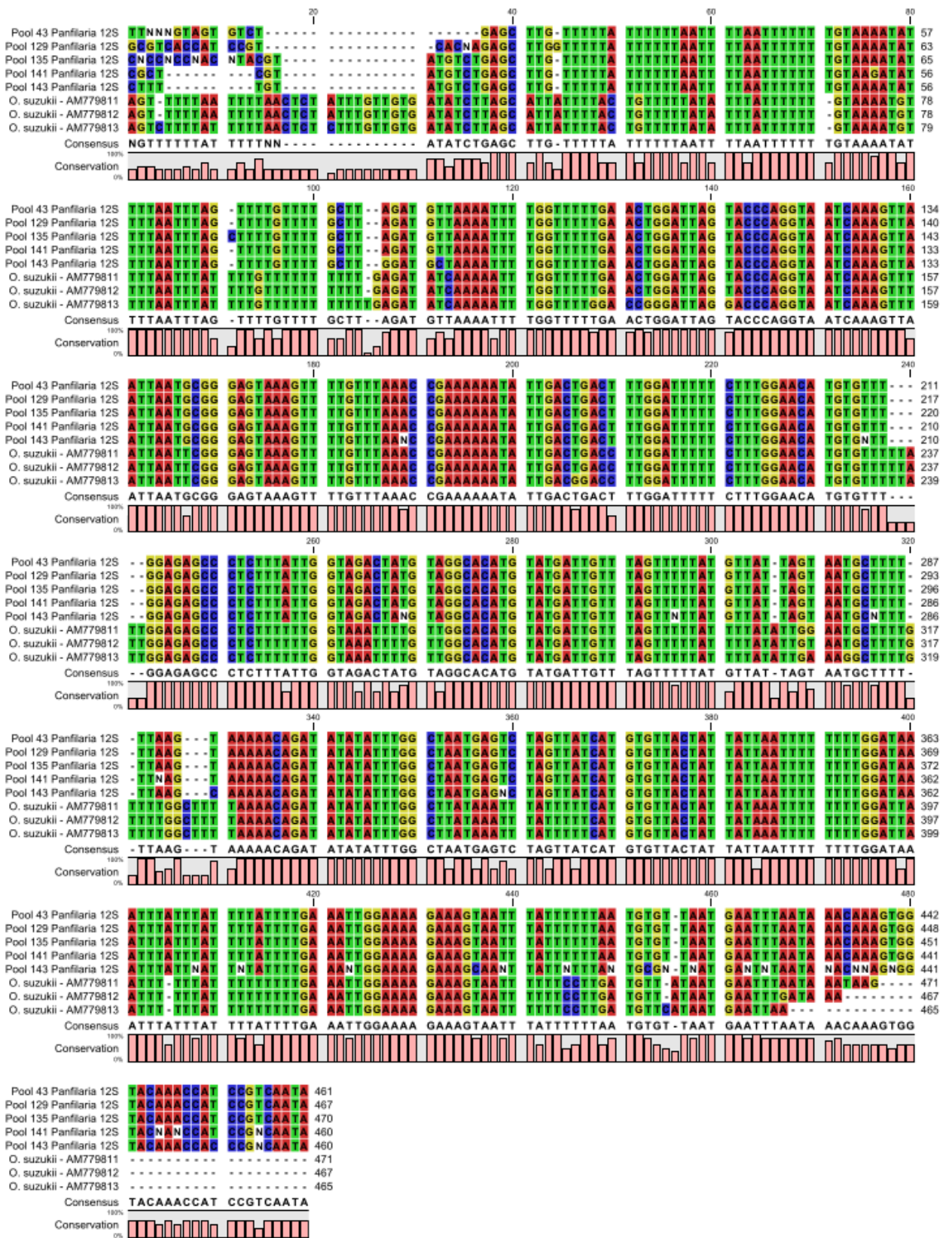


Abbildung 17.2.: Alignment einiger exemplarisch gewählter Sequenzen unbekanntem filarialem Ursprungs mit *O. sukuzii*

18. Multiplex Real-time PCR LupImmRep

Die Multiplex Real-time PCR LupImmRep wurde entwickelt, um in der Lage zu sein, bei einem Screening mit einer hohen Durchsatz an Proben, diese gleichzeitig auf die Nematoden *D. immitis*, *D. repens* und *O. lupi* untersuchen zu können. Es sollte eine Real-time PCR entwickelt werden, weil diese zum einen schneller Ergebnisse liefert, als eine Gel-PCR und zum anderen die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination, welche etwa während des Auftragens der Amplifikate auf das Agarose-Gel stattfinden kann, verhältnismäßig gering hält.

In der Literatur sind durchaus PCRs zu finden, mit denen Filarien nachgewiesen werden können, allerdings handelt es sich oft um Gel-PCRs (z. B. [Rishniw et al., 2006]). In [Latrofa et al., 2012b] etwa wird eine Multiplex PCR beschrieben, mit deren Hilfe neben *D. immitis* und *D. repens* auch noch die caninen Filarienarten *Acanthocheilonema reconditum* und *Cercopithifilaria* sp. detektiert werden können, allerdings handelt es sich um eine Gel-PCR, die auf einer Restriktionsverdau beruht. Da sie zudem den Nachweis von *O. lupi* nicht ermöglicht, bietet sie keine Alternative zu der hier entwickelten Real-time PCR. Eine auf Restriktionsverdau beruhende Gel-PCR wird auch bei [Casiraghi et al., 2006] beschrieben. Es wird auch von Real-time PCRs berichtet, diese sind aber in der Regel nur in der Lage eine (z. B. *D. immitis* bei [Thanchomnang et al., 2010]) oder zwei Arten (*D. immitis* und *D. repens* bei [Gioia et al., 2010, Latrofa et al., 2012a]) nachzuweisen.

Die Multiplex Real-time PCR LupImmRep bietet die Möglichkeit, alle drei genannten humanpathogenen Erreger gleichzeitig in einem Real-time Assay nachweisen zu können.

Die Entwicklung dieser PCR ist aus verschiedenen Gründen von Bedeutung. Einen ersten wichtigen Punkt stellt die effektive Verarbeitung von großen Probenmengen dar. Dies ist für die Etablierung von Monitoring-Programmen relevant. Bei diesen Programmen ist es entscheidend, gezielt einzelne Erreger in großen Probenmengen auffindig zu machen und sicher zu identifizieren, um deren Verbreitung möglichst präzise nachvollziehen zu können. Während das autochthone Verbreitungsgebiet von *D. immitis*, *D. repens* und *O. lupi* für die südeuropäischen Länder weitgehend bekannt ist, gibt es bislang noch keine Nachweise für die nordeuropäischen Staaten. Im Zuge der Klimaerwärmung ist allerdings davon auszugehen, dass sich dies in den kommenden Jahren ändern wird. Um Infektionen vorbeugen zu können wäre daher ein entsprechendes Routine-Monitoring wünschenswert. Hierzu kann das vorliegende PCR-Modell als Grundlage für nachfolgende Untersuchungen herangezogen werden. Zum einen wäre es denkbar, einzelne Amplifikatsequenzen gegen die anderer Zielorganismen auszutauschen oder weitere PCRs auf Basis der vorhandenen Sonden-Primer-Triplets auszubauen.

Auch wenn die Verbreitung der drei Nematoden für südeuropäische Länder, wie Italien, Griechenland oder Spanien bekannt ist, so wäre die vorliegende PCR für eine Untersuchung in diesen Ländern dennoch interessant, um mögliche Hotspots der Parasiten in diversen Stechmückenpopulationen aufzudecken, sodass in diesen Gegenden eine bessere Aufklärung stattfinden kann.

Es muss eingeräumt werden, dass die Primereffektivität für den Nachweis von *O. lupi* verbesserungswürdig ist. Beim Entwurf der PCR war bereits zu Beginn des Designs zu erkennen, dass es zu Schwierigkeiten bei der Wahl der *O. lupi*-spezifischen Primern kommen könnte. Die Ursache lag darin,

dass in der Datenbank für *O. lupi* (im Gegensatz zu *D. immitis* und *D. repens*) verhältnismäßig wenige Sequenzen zur Verfügung standen, die mit den anderen beiden Arten aligniert werden konnten. Dadurch gestaltete sich die Suche nach Regionen schwierig, die zwar innerhalb einer Art konserviert sind, sich aber über die Artgrenze hinaus unterscheiden. Für eine Gel-PCR hätte man (da längere Amplifikate als in der Real-time PCR möglich sind) aber durchaus andere Oligonucleotidsequenzen finden können, in diesem Fall gab es aber nur eine mögliche Primer-Sonden-Kombination innerhalb des COI-Genes (vgl. auch Kapitel 14.1).

Doch auch wenn die Effektivität der *O. lupi*-Primer nicht optimal ist, sind sie dennoch ausreichend spezifisch, sodass man bei einer hohen Konzentration an *O. lupi*-DNA die Möglichkeit hat, diese nachzuweisen. Dennoch sollte das Ziel verfolgt werden, die Anzahl der *O. lupi*-Sequenzen in der NCBI-Datenbank zu erhöhen, am besten mehrere Teil-Sequenzierungen dieses Organismuses vorzunehmen, um die Chance auf effektivere Primer, vor allem im Bereich der real-time PCRs, erhöhen zu können.

18.1. Nachweis von *D. repens*

Mit Hilfe der Multiplex Real-time PCR ist es in dieser Arbeit gelungen, an zwei Standorten (Hohenwutzen und Zollbrücke, beide im Bereich Oderaue) zum ersten Mal in zwei aufeinanderfolgenden Jahren DNA des Hundehautwurmes *D. repens* in autochthonen Stechmücken Deutschlands nachzuweisen.

Außerhalb Deutschlands konnten Mikrofilarien oder DNA von *D. repens* in europäischen Stechmücken bereits mehrfach nachgewiesen werden. Hierbei stammen die meisten Berichte aus Italien, wo es in den Jahren 2003 und 2012 gelang, *D. repens*-DNA aus natürlichen Stechmückenpopulationen der Arten *Ae. albopictus* ([Cancrini et al., 2003a, Cancrini et al., 2003b]) und *Cx. pipiens* s. l. [Latrofa et al., 2012a] zu isolieren. Diese Funde aus Mittel-Italien spiegeln auch einen Teil des Verbreitungsgebietes des Hundehautwurmes wider. Ebenso konnte im Osten der Slowakei *D. repens* in Stechmücken der Art *Ae. vexans* nachgewiesen werden [Bocková et al., 2013].

Bereits in den Jahren 2006 und 2009 [Sassnau et al., 2009], [Pantchev et al., 2009] wurden von diversen Autoren Berichte über autochthone *D. repens*-Erkrankungen bei Hunden in Deutschland veröffentlicht. So konnte bei einem Pointer, welcher laut Angaben seines Besitzers nie im Ausland war und im Süden Baden-Württembergs (in der Nähe von Karlsruhe) lebt, ein trächtiges *D. repens* Weibchen aus dem Auge entfernt werden [Hermosilla et al., 2006]. Ebenfalls aus Süddeutschland stammt der Bericht von N. Pantchev, der 44 Jagdhunde im Bereich Karlsruhe untersuchte und mittels Knott-Test und PCR in drei Hunden *D. repens* feststellen konnte [Pantchev et al., 2009]. Ein Teil der in dieser Arbeit untersuchten Standorte befindet sich ebenfalls im Bereich Karlsruhe (Insel Rott, Russheimer Altrhein, Knielinger See und Stutensee), jedoch konnte in dieser Gegend keine *D. repens*-DNA in den untersuchten Stechmücken festgestellt werden.

Mögliche Ursachen hierfür könnten sein, dass die Infektionsrate der Stechmücken in Süddeutschland zu gering ist, sodass aus diesem Grund keine positiven Weibchen in den Fallen nachzuweisen waren. Weiterhin wäre es auch denkbar, dass die Hunde (auch wenn sie nie im Ausland waren) sich in Brandenburg infiziert haben - dies müsste allerdings genauer untersucht werden.

Der dritte Bericht autochthoner *D. repens* Fälle stammt aus Brandenburg, wo der Befall eines Rudels Schlittenhunde durch den Hundehautwurm gemeldet wurde, fünf von 29 Tieren waren *D. repens* positiv. Laut Autor ist aufgrund des Reiseverhaltens der Tiere auszuschließen, dass sie sich im Ausland infiziert haben [Sassnau et al., 2009]. Das befallene Schlittenhund Rudel stammte aus dem

Havelland, etwa 50 km westlich von Berlin und befindet sich damit in einer Entfernung von etwa 150 km vom Fundort der *D. repens* positiven Stechmücken.

Die Meldungen über autochthone *D. repens*-Fälle bei Hunden unterstreichen die Relevanz dieser Arbeit, da der Erreger damit nicht nur in Vektoren sondern auch schon im Wirt nachgewiesen werden konnte. Angesichts der Tatsache, dass die in dieser Arbeit nachgewiesene *D. repens*-DNA aus den mammalophilen Stechmückenarten *An. maculipennis* s. l., *Ae. vexans* und *Cs. annulata* isoliert wurde ist davon auszugehen, dass die in Deutschland autochthon vorkommenden Mückenarten nicht nur potentielle sondern tatsächliche Vektoren des Hundehautwurmes sind.

Auch außerhalb dieser Studie mehren sich die Hinweise, dass sich der Hundehautwurm, der bislang eher aus Südeuropa bekannt war, vermutlich in Folge der Klimaerwärmung, immer weiter nach Norden hin ausbreitet. So gibt es Berichte über eine Dirofilariose bei einem älteren Mann aus Polen [Wesolowska et al., 2010] und über autochthone Erkrankungen bei Hunden aus der Tschechischen Republik [Svobodová et al., 2006]. Weiterhin konnte der Erreger bei einem Mann aus dem Elsaß nachgewiesen werden [Argy et al., 2011]. Ebenso wurde 2008 in Österreich bei einer Frau *D. repens* gefunden [Auer and Susani, 2008].

Dass in Deutschland noch keine humanen Fälle von subkutaner Dirofilariose gemeldet wurden, liegt vermutlich auch daran, dass noch nicht intensiv danach gesucht wurde. Denn siedelt sich die Filarie nicht im Auge an, sondern bildet ein Knötchen irgendwo unter der Haut, kann es sein, dass bei einer Entfernung des Knotens dieser nicht genau untersucht, sondern mitsamt des darin enthaltenen Wurms entsorgt wird. Gleichzeitig ist es möglich, dass selbst die Bildung eines Knötchens vom Patienten selber nicht bemerkt wird, da die Infektion ansonsten symptomlos verläuft.

Bezüglich der Verbreitung der gefundenen *D. repens* Sequenzen ist auffällig, dass sie alle in einem Bereich gefunden wurden, in dem die Infektionsrate der Stechmücken für Nematoden im Allgemeinen verhältnismäßig gering war. Lediglich 18 von 145 am Standort Oder gefangene Stechmückenpools wiesen in der PCR ein positives Signal für Nematoden auf, wobei allerdings vier dieser Pools *D. repens*-DNA enthielten. Im Süden des Landes, in dem die Infektionsrate für Nematoden im Allgemeinen höher war als im Osten und Nordosten, konnte hingegen keine DNA des Hundehautwurmes nachgewiesen werden. Dies war insofern verwunderlich, als es Meldungen über mehrere autochthone *D. repens*-Infektionen bei Hunden aus dem Süden und Südwesten Deutschlands gibt (vgl. [Hermsilla et al., 2006, Pantchev et al., 2009]). Möglicherweise hat sich der Hundehautwurm über Osteuropa ausgebreitet und damit den Alpenbogen umgangen. Weiterhin ist nicht auszuschließen, dass sich die aus Süddeutschland stammenden infizierten Hunde im Bereich Brandenburg aufgehalten haben, wo sie sich hätten mit *D. repens* infizieren können. Eine Studie von [Sassnau and Genchi, 2013] konnte in beinahe 8% von über 370 untersuchten Hundebloodproben Microfilarien nachweisen. Obwohl der Großteil dieser Hunde sich vermutlich im Ausland infiziert hat, stellen diese doch die Grundlage für das Etablieren einer *D. repens* Population in Deutschland dar. Wie von [Sassnau and Genchi, 2013] ebenfalls beschrieben wird, wurde die Minimumtemperatur für die larvale *D. repens*-Entwicklung zwischen den Jahren 2001 und 2012 in den relevanten Monaten kein einziges Mal unterschritten.

Die globale Erwärmung und damit auch ein Anstieg der Durchschnittstemperatur in Deutschland begünstigt eine Ansiedlung dieses Parasiten [Sassnau and Genchi, 2013], sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Erreger dieser subkutanen Dirofilariose sich langsam von Süden über Osten nach Norden hin ausgebreitet haben. Die damit verbundene Umgehung des Alpenbogens als natürliche Temperaturbarriere könnte auch erklären, warum in Süddeutschland bislang keine infizierten Stechmücken

nachgewiesen werden konnten. Der erste Bericht einer vermutlich autochthon erworbenen subkutanen Dirofilariose einer Frau aus Österreich, welche an der Grenze zu Ungarn wohnt, scheint diese Theorie zu stützen [Auer and Susani, 2008]. Bereits 2009 wurden Klimamodelle und Hochrechnungen erstellt, denen zu Folge sich die Anzahl der *Dirofilaria repens*-Infektionen innerhalb der nächsten Jahrzehnte in Europa erhöhen und auch in bislang *Dirofilaria*-freie Regionen ausbreiten werden [Genchi et al., 2009].

Betrachtet man die Häufigkeit, mit der *D. repens* Mikrofilarien in Hunden nachgewiesen werden konnten im Zusammenhang mit der Tatsache, dass *D. repens* am selben Standort in zwei aufeinanderfolgenden Jahren in insgesamt drei Stechmückenarten nachgewiesen werden konnte, so spricht dies dafür, dass sich der Hundehautwurm in Brandenburg bereits etabliert und eine stabile Population gebildet hat. Mit dem Vorhandensein der Vektoren besteht eine realistische Gefahr, dass sich *D. repens* von Brandenburg aus auch in die anderen Bundesländer verbreitet - sei es schrittweise über die Stechmücken, die den Erreger nach und nach weitertragen oder durch infizierte Hunde, die den Erreger in bislang *D. repens*-freie Gebiete bringen und so für dessen Ausbreitung sorgen.

Die Ergebnisse werfen einen dringenden Handlungsbedarf sowohl in Hinblick auf weiterführende Monitoring-Arbeiten als auch auf vermehrte Aufklärungsarbeit auf. So sollten weiter Stechmücken, aber auch Hunde und Menschen der betroffenen Gegenden Brandenburgs auf Infektionen mit *D. repens* untersucht werden. Im Optimalfall auch über die bekannten Standpunkte hinaus, um einen genaueren Überblick über die bisher vorhandene Ausbreitung der Art zu bekommen. Zudem sollten Aufklärungsarbeit betrieben werden, um die Anwohner und Besucher dieser Gegenden über die Risiken von Mückenstichen und wie man sich am besten davor schützen kann zu informieren.

19. Zusammenfassung und Ausblick

Die in dieser Studie entwickelten Multiplex Real-time PCRs bieten eine gute Grundlage, um ein umfangreiches Stechmückenmonitoring mit einem hohen Durchsatz an Proben durchführen zu können.

So wurde zunächst die Real-time PCR FilaHaem entwickelt, mit deren Hilfe Stechmücken auf das Vorhandensein filarialer und haemosporidialer DNA hin untersucht werden können. Die Multiplex Real-time PCR LupImmRep erlaubt das Detektieren der Nematoden *D. immitis*, *D. repens* und (bei ausreichender Menge vorhandener filarialer DNA) *O. lupi*. Mit beiden Nachweismethoden konnten erstmals potentiell humanpathogene parasitäre Erreger innerhalb der deutschen Stechmückenfauna gefunden werden.

Die Vogel malaria stellt in der Bundesrepublik lediglich in Zoos immer wieder ein Problem dar, hat aber durchaus das Potential, bei Neueinschleppung einen vorhandenen Vogelbestand zu dezimieren und sogar zum Aussterben einiger Arten beizutragen [Huijben et al., 2007]. Es ist allerdings durchaus denkbar, dass die Einführung eines invasiven Erregers der aviären Malaria, an den die heimischen Vögel nicht adaptiert sind, zu einem Vogelsterben führen könnte.

Während der Nematode *S. tundra* in Deutschland vermutlich keine großen wirtschaftlichen Schäden, wie sie aus Finnland bekannt sind, anrichten wird [Laaksonen et al., 2009b], ist der Nachweis von *D. repens* durchaus auch für den Menschen von medizinischer Bedeutung. Wie bereits von [Genchi et al., 2009] und [Sassnau and Genchi, 2013] prognostiziert, wird die Bedeutung an Filariosen auch in Mittel- und Nordeuropa innerhalb der nächsten Jahrzehnten, verursacht durch die globale Erwärmung, vermutlich stark zunehmen, sodass die Einschleppung bzw. die Etablierung weiterer Filarien-Arten, wie etwa *D. immitis* nicht mehr ausgeschlossen werden kann. Dass sich der Hundehautwurm offensichtlich in einigen Gegenden Deutschlands bereits etabliert hat, zeigte sich zum einen in der Tatsache, dass er innerhalb der gleichen Region in zwei aufeinanderfolgenden Jahren in Stechmücken nachgewiesen werden konnte. Und zum anderen zeigte es sich daran, dass in einer Region, die nur knapp 150 km von der Gegend entfernt ist, der Erreger in einem Hundebestand nachgewiesen wurde [Sassnau et al., 2009].

Der Einfluss der globalen Erwärmung und die damit verbundene Zunahme bisher in Europa nicht vorhandener Krankheiten zeigt sich schon jetzt an vielen Stellen. So gab es bereits die ersten Fälle autochthon erworbener West-Nil-Virus-Infektionen in Spanien und Italien ([Bagnarelli et al., 2011], [García-Bocanegra et al., 2011]) oder einen kleineren Dengue-Virus-Ausbruch in Kroatien [Gjenero-Margan et al., 2011] im Jahr 2010. Aber auch in Deutschland konnten im Jahr 2009 das Sindbis- und in 2011 das Usutu-Virus nachgewiesen werden [Jöst et al., 2010, Jöst et al., 2011]. Während das Sindbis-Virus nur in Stechmücken gefunden wurde, starben 2011 zahlreiche Singvögel an dem Usutu-Virus. Beide Viren sind auch in der Lage, bei Menschen Krankheitsbilder hervorzurufen, die in der Regel zwar harmlos sind, wobei das Usutu-Virus jedoch bei immungeschwächten Patienten zu einer Enzephalitis führen kann.

Im Zusammenhang mit der globalen Erwärmung und der Globalisierung steht auch die beginnende Etablierung invasiver Stechmückenarten in Deutschland, wie etwa dem Japanischen Buschmoskito

19. Zusammenfassung und Ausblick

Oc. japonicus [Becker et al., 2011] und der Asiatischen Tigermücke *Aedes albopictus* [Pluskota et al., 2008], die beide in der Lage sind Viren wie WNV (*Oc. japonicus*) oder Chikungunya- und Dengue-Fieber (*Ae. albopictus*) auf den Menschen zu übertragen. Zwar wurden innerhalb dieses Monitorings keine invasiven Stechmückenarten nachgewiesen, dennoch häufen sich die Meldungen über die Asiatische Tigermücke ([Becker et al., 2013], [Pluskota et al., 2008], [Werner et al., 2012, Kampen et al., 2012]) und *Oc. japonicus* hat sich bereits etabliert und kann vor allem auf Friedhöfen gefunden werden [Becker et al., 2011]. Aufgrund der Auswahl der Fallenstandorte in dieser Studie galt es bereits im Vorfeld als unwahrscheinlich diese Arten nachzuweisen.

Auch der an drei Standorten nachgewiesene Hybrid *Cx. pipiens pipiens* x *Cx. p. pipiens* biotyp *molestus* spielt als Virus-Vektor eine Rolle, so ist er in den USA vermutlich an der Ausbreitung des WNV beteiligt [Fonesca et al., 2004].

Alleine die Funde von *D. repens* und dem Stechmückenhybriden aus der Gattung *Culex* in dieser Studie sind alarmierend und unterstreichen die Notwendigkeit eines bundesweiten Stechmückenmonitorings. Denn obwohl die Funde bislang noch relativ harmlos scheinen, könnte sich dies in einigen Jahren durchaus ändern.

Die in dieser Studie durchgeführten Untersuchungen standen in Zusammenhang mit einer deutschlandweiten Arbovirus-Überwachung [Jöst, 2013] und hätten kaum ergebnisreicher verlaufen können. Dabei profitierten beide Arbeiten von der Zusammenarbeit verschiedener Disziplinen (Virologie, Parasitologie, Entomologie, Ökologie und Veterinärmedizin). Dieses Monitoring von Stechmücken auf das Vorhandensein von Arboviren und Parasiten, aber auch invasiver Stechmückenarten sollte unbedingt fortgeführt und auf andere Erreger ausgeweitet werden, um die mögliche Einschleppung verschiedener Krankheitserreger im Frühstadium zu erkennen und rechtzeitig entsprechende Gegenmaßnahmen zu ergreifen.

Literaturverzeichnis

- [QIA, 2005] (2005). *QIAamp Viral RNA Mini Handbook*. QIAGEN, 2 edition.
- [5PR, 2007] (2007). *Manual FastPlasmid Mini Kit. For rapid plasmid purification in just 9 minutes.* 5 PRIME.
- [Inv, 2012] (2012). *TOPO TA Cloning Kit for Sequencing. Five-minute cloning of Taq polymerase-amplified PCR products for sequencing.* Invitrogen (by life technologies).
- [CLC, 2013] (2013). CLC Sequence Viewer 6.8.1.
- [Al-Balwari and Saeed, 2012] Al-Balwari, S. and Saeed, I. (2012). The parasitic communities of the rock pigeon *Columba livia* from Iraq: component and importance. *Tyrkie Parazitoloji Dergisi*, 36 (4):232–239.
- [Amraoui et al., 2012] Amraoui, F., Tijane, M., Sarih, M., and Failloux, A. B. (2012). Molecular evidence of *Culex pipiens* form *molestus* and hybrids *pipiens/molestus* in Morocco, North Africa. *Parasit Vectors*, 5(83).
- [Argy et al., 2011] Argy, N., Sabou, M., Billing, A., Hermsdorff, C., Candolfi, E., and Abou-Bacar, A. (2011). A First Human Case of Ocular Dirofilariosis due to *Dirofilaria repens* in Northeastern France. *J Trop Med*, 2011.
- [Auer and Susani, 2008] Auer, H. and Susani, M. (2008). The first autochthonous case of subcutaneous dirofilariosis in Austria. *Wien Klin Wochenschr*, 120(19-20 Suppl 4):104–106.
- [Bagnarelli et al., 2011] Bagnarelli, P., Marinelli, K., Trotta, D., Monachetti, A., Tavio, M., Del Gobbo, R., Capobianchi, M. R., Menzo, S., Nicoletti, L., Magurano, F., and Varaldo, P. E. (2011). Human case of autochthonous West Nile Virus lineage 2 infection in Italy, September 2011. *Euro Surveill*, 16 (43).
- [Bahnck and Fonseca, 2006] Bahnck, C. and Fonseca, D. M. (2006). Rapid assay to identify the two genetic form of *Culex (Culex) pipiens* L. (Diptera: Culicidae) and hybrid populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 75(2):251–255.
- [Becker et al., 2013] Becker, N., Geier, M., Balczun, C., Bradersen, U., Huber, K., Kiel, E., Krüger, A., Lühken, R., Orendt, C., Plenge-Bönig, A., Rose, A., Schaub, G. A., and Tannich, E. (2013). Repeated introduction of *Aedes albopictus* into Germany, July to October 2012. *Parasitology Research*, 112.
- [Becker et al., 1996] Becker, N., Glaser, P., and Magin, H. (1996). *Biologische Stechmückenbekämpfung am Oberrhein*. KABS.

Literaturverzeichnis

- [Becker et al., 2011] Becker, N., Huber, K., Pluskota, B., and Kaiser, A. (2011). *Ochlerotatus japonicus japonicus* - a newly established neozoon in Germany and a revised list of the German mosquito fauna. *European Mosquito Bulletin*, 29:88–102.
- [Becker et al., 2010] Becker, N., Petric, D., Zgomba, M., Boase, C., Madon, M., Dahl, C., and Kaiser, A. (2010). *Mosquitoes and their control*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2 edition.
- [Bensch et al., 2000] Bensch, S., Stjernman, M., Hasselquist, D., Östman, J., Hansson, B., Westerdahl, H., and Torres, P. (2000). Host specificity in avian blood parasites: a study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. *Proceedings of the Royal Society B*, 267:1583–1589.
- [Bocková et al., 2013] Bocková, E., Rudolf, I., Kocisová, A., Betášová, L., Vencliková, K., Mendel, J., and Hubálek, Z. (2013). *Dirofilaria repens* microfilariae in *Aedes vexans* mosquitoes in Slovakia. *Parasitology Research*.
- [Büttner, 1978] Büttner, K. (1978). Untersuchungen zur Parasitierung des Rehwildes bei steigendem Jagddruck. *Zeitschrift für Jagdwissenschaft*, 24:139–155.
- [Cancrini et al., 2003a] Cancrini, G., Frangipane di Regalbono, A., Ricci, I., Tessarin, C., Gabrielli, S., and Pietrobelli, M. (2003a). *Aedes albopictus* is a natural vector of *Dirofilaria immitis* in Italy. *Vet Parasitol*, 118(3-4):195–202.
- [Cancrini et al., 2003b] Cancrini, G., Romi, R., Gabrielli, S., Toma, L., M. D. I. P., and Scaramozzino, P. (2003b). First finding of *Dirofilaria repens* in a natural population of *Aedes albopictus*. *Med Vet Entomol*, 17(4):448–51.
- [Casiraghi et al., 2006] Casiraghi, M., Bazzocchi, C., Mortarino, M., Ottina, E., and Genchi, C. (2006). A simple molecular method for discriminating common filarial nematodes of dogs (*Canis familiaris*). *Veterinary Parasitology*, 141:368–372.
- [Chen et al., 2011] Chen, Y. C., Wang, C. Y., Teng, H. J., Chen, C. F., Chang, M. C., Lu, L. C., Lin, C., Jian, S. W., and Wu, H. S. (2011). Comparison of the efficacy of CO₂-baited and unbaited light traps, gravid traps, backpack aspirators, and sweep net collections for sampling mosquitoes infected with Japanese encephalitis virus. *J Vector Ecol*, 36(1):68–74.
- [Ciocan et al., 2009] Ciocan, R., Dărăbus, G., Ionela, I., Illie, M., Hotea, I., K., I., Morariu, S., Morar, D., Balint, A., and Indre, D. (2009). Preliminary observations of an epidemiological survey in dirofilariosis of dogs from Timis county. *Lucrări științifice medicină veterinară*, 42(1).
- [Clements, 1992] Clements, A. N. (1992). *The Biology of Mosquitoes. Volume 1: Development, Nutrition and Repro.* Chapman & Hall, London.
- [Cordero et al., 1992] Cordero, M., Muro, A., Simon, F., Tapia, J. I., and Espinoza, E. (1992). Are transient pulmonary solitary nodules a common event in human dirofilariosis? *Clin Investig*, 70(5):437–40.

- [Cranfield et al., 1994] Cranfield, M. R., Graczyk, T. K., Beall, F. B., Ialeggio, D. M., L., S. M., and Skjoldager, M. L. (1994). Subclinical avian malaria infections in african black-footed penguins (*Spheniscus demersus*) and induction of parasite recrudescence. *Journal of Wildlife Diseases*, 30:372–376.
- [Czajka et al., 2012] Czajka, C., Becker, N., Poppert, S., Jost, H., Schmidt-Chanasit, J., and Kruger, A. (2012). Molecular detection of *Setaria tundra* (Nematoda: Filarioidea) and an unidentified filarial species in mosquitoes in Germany. *Parasit Vectors*, 5(14).
- [Dänicke et al., 2009] Dänicke, S., Moors, E., Beineke, A., and Gauly, M. (2009). *Ascaridia galli* infection of pullets and intestinal viscosity - consequences for nutrient retention and gut morphology. *British Poultry Science*, 50 (4):512–520.
- [Egyed et al., 2001] Egyed, Z., Sreter, T., Szell, Z., Beszteri, B., Oravec, O., Marialigeti, K., and Varga, I. (2001). Morphologic and genetic characterization of *Onchocerca lupi* infecting dogs. *Vet Parasitol*, 102(4):309–19.
- [Faisca et al., 2010] Faisca, P., Morales-Hojas, R., Alves, M., Gomes, J., Botelho, M., Melo, M., and Xufre, A. (2010). A case of canine ocular onchocercosis in Portugal. *Vet Ophthalmol*, 13(2):117–21.
- [Farajollahi et al., 2011] Farajollahi, A., Fonseca, D. M., Kramer, L. D., and Marm Kilpatrick, A. (2011). "Bird biting" mosquitoes and human disease: a review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology. *Infect Genet Evol*, 11(7):1577–85.
- [Fonesca et al., 2004] Fonesca, D. M., Keyghobadi, N., Malcolm, C. A., Mehmet, C., Schaffner, F., Mogi, M., Fleischer, R. C., and Wilkerson, R. C. (2004). Emerging Vectors in the *Culex pipiens* Complex. *Science*, 303:1535–1538.
- [García-Bocanegra et al., 2011] García-Bocanegra, I., Jaén-Téllez, J. A., Napp, S., Arenas-Montes, A., Fernández-Morente, M., Fernández-Molera, V., and Arenas, A. (2011). West Nile Fever Outbreak in Horses and Humans, Spain, 2010. *Emerg Infect Dis*, 17:2397–2399.
- [Gediminas Valkiunas and Bensch, 2008] Gediminas Valkiunas, Tatjana A. Iezhova, A. K. V. P. R. N. M. S. and Bensch, S. (2008). A comparative analysis of microscopy and PCR-based detection methods for blood parasites. *Journal of Parasitology*, 94(6):1395–1401.
- [Genchi et al., 2009] Genchi, C., Rinaldi, L., Mortarino, M., Genchi, M., and Cringoli, G. (2009). Climate and *Dirofilaria* infection in Europe. *Vet Parasitol*, 163(4):286–92.
- [Gertz, 2005] Gertz, M. E. (2005). BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).
- [Gioia et al., 2010] Gioia, G., Lecova, L., Genchi, M., Ferri, E., Genchi, C., and Mortarino, M. (2010). Highly sensitive multiplex PCR for simultaneous detection and discrimination of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in canine peripheral blood. *Vet Parasitol*, 172(1-2):160–3.
- [Gjenero-Margan et al., 2011] Gjenero-Margan, I., Aleraj, B., Krajar, D., Lesnikar, V., Klobucar, A., Pem-Novosel, I., Kurecic-Fillipovic, S., Komparak, S. ANA Martic, R., Duricic, S., Betica-Radic, L., Okmadzic, J., Cilibic-Cavlek, T., Babic-Erceg, A., Turcovic, B., Avsic-Zupanac, T., Radic, I., Ljubic, M., Sarac, K., Benic, N., and Mlinaric-Galinovic, G. (2011). Autochthonous dengue fever in Croatia, August-September 2010. *Eurosurveillance*, 16.

Literaturverzeichnis

- [Glaizot et al., 2012] Glaizot, O., Fumagalli, L., Iritano, K., Lalubin, F., Van Rooyen, J., and Christe, P. (2012). High prevalence and lineage diversity of avian malaria in wild populations of great tits (*Parus major*) and mosquitoes (*Culex pipiens*). *PLoS One*, 7(4).
- [Google Inc., 2003] Google Inc. (2003). Google earth version 7.1.1.1888.
- [Gürtler et al., 2012] Gürtler, L., Bauerfein, U., Blümerl, J., Burger, R., Drosten, C., Heiden, M., Hildebrandt, M., Jansen, B., Montag-Lessing, T., Offergeld, R., Pauli, G., Seitz, R., Schlenkrich, U., Schottstedt, V., Strobel, J., and Willkommen, H. (2012). Arbonematoden - durch Arthropoden übertragene Nematoden-Infektionen. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 55(8):1044–1056.
- [Haas et al., 2011] Haas, M., Barus, V., Benedikt, V., and Literák, I. (2011). Microfilariae in birds in the Czech Republic, including a note on adult nematodes *Eufilaria delicata* in a song thrush *Turdus philomelos*. *Parasitology Research*, 109:645–655.
- [Haase, 2007] Haase, A. (2007). Inkaseeschwalbe-Kopf. <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Inkaseeschwalbe-kopf.jpg>.
- [Haberkorn, 1984] Haberkorn, A. (1984). Observations on Malaria in European Perching Birds (Passeriformes). *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. Series A Medical microbiology, infectious diseases, virology, parasitology.*, 256(3):288–295.
- [Hall, 1999] Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp.*, 41:95–98.
- [Hellgren et al., 2004] Hellgren, O., Waldenström, J., and Bensch, S. (2004). A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. *Journal of Parasitology*, 90(4):797–802.
- [Hermosilla et al., 2005] Hermosilla, C., Hetzel, U., Bausch, M., Grubl, J., and Bauer, C. (2005). First autochthonous case of canine ocular onchocercosis in Germany. *Vet Rec*, 156(14):450–2.
- [Hermosilla et al., 2006] Hermosilla, C., Pantchev, N., Dyachenko, V., Gutmann, M., and Bauer, C. (2006). First autochthonous case of canine ocular *Dirofilaria repens* infection in Germany. *Vet Rec*, 158(4):134–5.
- [Holland et al., 1991] Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., and Gelfand, D. H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:7276–7280.
- [Huang et al., 2011] Huang, S., Molaei, G., and Andreadis, T. G. (2011). Reexamination of *Culex pipiens* hybridization zone in the Eastern United States by ribosomal DNA-based single nucleotide polymorphism markers. *Am J Trop Med Hyg*, 85(3):434–41.
- [Huijben et al., 2007] Huijben, S., Schaftenaar, W., Wijsman, A., Paaijmans, K., and Takken, W. (2007). Avian malaria in Europe: an emerging infectious disease? In Takken, W. and Knols, B. G. J., editors, *Emerging pests and vector-borne diseases in Europe*, volume 1, pages 59–74–. Wageningen Academic Publishers.

Literaturverzeichnis

- [J. Waldenström and Östman, 2004] J. Waldenström, S. Bensch, D. H. and Östman, . (2004). A New Nested Polymerase Chain Reaction Method Very Efficient in Detecting *Plasmodium* and *Haemoproteus* Infections From Avian Blood. *Journal of Parasitology*, 90(1):191–194.
- [Jacsó et al., 2009] Jacsó, O., Mándoki, M., Majoros, G., Pétsch, M., Mortarino, M., Genchi, C., and Fok, . (2009). First autochthonous *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) infection in a dog in Hungary. *Helminthologia*, 46(3):159–161.
- [Jöst, 2010] Jöst, H. (2010). Untersuchung von Stechmücken in Südwestdeutschland auf das Vorkommen von Arboviren. Diplomarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- [Jöst, 2013] Jöst, H. (2013). *Surveillance of arbovirus in mosquitoes of Germany*. PhD thesis, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- [Jöst et al., 2011] Jöst, H., Bialonski, A., Maus, D., Sambri, V., Eiden, M., Groschup, M. H., Gunther, S., Becker, N., and Schmidt-Chanasit, J. (2011). Isolation of usutu virus in Germany. *Am J Trop Med Hyg*, 85(3):551–3.
- [Jöst et al., 2010] Jöst, H., Bialonski, A., Storch, V., Gunther, S., Becker, N., and Schmidt-Chanasit, J. (2010). Isolation and phylogenetic analysis of Sindbis viruses from mosquitoes in Germany. *J Clin Microbiol*, 48(5):1900–3.
- [Kampen et al., 2012] Kampen, H., Kronefeld, M., Zielke, D., and Werner, D. (2012). Further specimens of the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) trapped in southwest Germany. *Parasitol Res*, 112 (2).
- [Katoch et al., 2011] Katoch, R., Yadav, A., Godara, R., Khajuria, J. K., Borkataki, S., and Sodhi, S. S. (2011). Prevalence and impact of gastrointestinal helminths on body weight gain in backyard chickens in subtropical and humid zone of Jammu, India. *Journal of Parasitic Diseases: official organ of the Indian Society for Parasitology*, 36 (1):49–52.
- [Kilpatrick et al., 2005] Kilpatrick, A. M., Kramer, L. D., Campbell, S. R., Alleyne, E. O., Dobson, A. P., and Daszak, P. (2005). West Nile virus risk assessment and the bridge vector paradigm. *Emerg Infect Dis*, 11:425–429.
- [Knight and Stone, 1977] Knight, K. L. and Stone, A. (1977). *A catalog of the mosquitoes of the world (Diptera: Culicidae)*. Entomological Society of America, 2 edition.
- [Kramer et al., 2007] Kramer, L. H., Kartashev, V. V., Grandi, G., Morchon, R., Nagornii, S. A., Karanis, P., and Simon, F. (2007). Human subcutaneous dirofilariasis, Russia. *Emerg Infect Dis*, 13(1):150–2.
- [Krone, 1999] Krone, O. (1999). Endoparasiten (Faunistik, Epizootiologie, Pathogenität) bei wildlebenden Greifvögeln aus drei verschiedenen Gebieten Deutschlands. *Journal of Ornithology*, 140:213–214.
- [Kutzer and Hinaidy, 1969] Kutzer, E. and Hinaidy, H. K. (1969). Die Parasiten der wildlebenden Wiederkäuer Österreichs. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 32:354–368.

- [Laaksonen et al., 2008] Laaksonen, S., Oksanen, A., Orro, T., Norberg, H., Nieminen, M., and Sukura, A. (2008). Efficacy of different treatment regimes against setariosis (*Setaria tundra*, Nematoda: Filarioidea) and associated peritonitis in reindeer. *Acta Veterinaria S*, 50.
- [Laaksonen et al., 2010] Laaksonen, S., Pusenius, J., Kumpula, J. AND Venäläinen, A., Kortet, R., Oksanen, A., and Hoberg, E. (2010). Climate Change Promotes the Emergence of Serious Disease Outbreaks of Filarioid Nematodes. *EcoHealth*, 7:7–13.
- [Laaksonen et al., 2009a] Laaksonen, S., Solismaa, M., Kortet, R., Kuusela, J., and Oksanen, A. (2009a). Vectors and transmission dynamics for *Setaria tundra* (Filarioidea; Onchocercidae), a parasite of reindeer in Finland. *Parasites and Vectors*, 2(3).
- [Laaksonen et al., 2009b] Laaksonen, S., Solismaa, M., Orro, T., Kuusela, J., Saari, S., Kortet, R., Nikander, S., Oksanen, A., and Sukura, A. (2009b). *Setaria tundra* microfilariae in reindeer and other cervids in Finland. *Parasitology Research*, 104:257–265.
- [Latrofa et al., 2012a] Latrofa, M. S., Montarsi, F., Ciocchetta, S., Annoscia, G., Dantas-Torres, F., Ravagnan, S., Capelli, G., and Otranto, D. (2012a). Molecular xenomonitoring of *dirofilaria immitis* and *dirofilaria repens* in mosquitoes from north-eastern Italy by real-time pcr coupled with melting curve analysis. *Parasit Vectors*, 5:76–.
- [Latrofa et al., 2012b] Latrofa, M. S., Weigl, S., Dantas-Torres, F., Annoscia, G., Traversa, D., Brianti, E., and Otranto, D. (2012b). A multiplex PCR for the simultaneous detection of species of filarioids infesting dogs. *Acta Trop*, 122(1):150–4.
- [Lundström, 1994] Lundström, J. (1994). Vector competence of western European mosquitoes for arboviruses: A review of field and experimental studies. *Bull Soc Vect Ecol*, 19:23–36.
- [Mazzariol et al., 2010] Mazzariol, S., Cassini, R., Voltan, L., Aresu, L., and Frangipane di Regalbono, A. (2010). Heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in a leopard (*Panthera pardus pardus*) housed in a zoological park in north-eastern Italy. *Parasit Vectors*, 3(1).
- [Mülhardt, 2009] Mülhardt, C. (2009). *Der Experimentator. Molekularbiologie / Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag.
- [Mohrig, 1969] Mohrig, W. (1969). *Die Culiciden Deutschlands. Untersuchungen zu Taxonomie, Biologie und Ökologie der einheimischen Stechmücken*. Parasitologische Schriftenreihe (18). Gustav Fischer Verlag, Jena.
- [Montoya et al., 2006] Montoya, J. A., Morales, M., Juste, M. C., Banares, A., Simon, F., and Genchi, C. (2006). Seroprevalence of canine heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) on Tenerife Island: an epidemiological update. *Parasitol Res*, 100(1):103–5.
- [Montoya-Alonso et al., 2010] Montoya-Alonso, J. A., Mellado, I., Carreton, E., Cabrera-Pedrero, E. D., Morchon, R., and Simon, F. (2010). Canine dirofilariosis caused by *Dirofilaria immitis* is a risk factor for the human population on the island of Gran Canaria, Canary Islands, Spain. *Parasitol Res*, 107(5):1265–9.
- [Moorhouse, 1978] Moorhouse, D. E. (1978). *Dirofilaria immitis*: a cause of human intra-ocular infection. *Infection*, 6(4):192–3.

- [Nicholl, 2002] Nicholl, D. S. T. (2002). *Gentechnische Methoden*. Spektrum Akademischer Verlag.
- [Nicolescu, 1998] Nicolescu, G. (1998). A general characterisation of the mosquito fauna (Diptera: Culicidae) in the endemic area for West Nile virus in the south of Romania. *European Mosquito Bulletin*, 2:13–19.
- [Otranto et al., 2009] Otranto, D., Capelli, G., and Genchi, C. (2009). Changing distribution patterns of canine vector borne diseases in Italy: leishmaniosis vs. dirofilariosis. *Parasit Vectors*, 2 Suppl 1.
- [Otranto et al., 2013] Otranto, D., Dantas-Torres, F., Brianti, E., Traversa, D., ANA Petric, D., Genchi, C., and Capelli, G. (2013). Vector-borne helminths of dogs and humans in Europe. *Parasites & Vectors*, 6.
- [Otranto et al., 2012] Otranto, D., Dantas-Torres, F., Cebeci, Z., Yeniad, B., Buyukbabani, N., Boral, O. B., Gustinelli, A., Mounir, T., Mutafchiev, Y., and Bain, O. (2012). Human ocular filariasis: further evidence on the zoonotic role of *Onchocerca lupi*. *Parasit Vectors*, 5.
- [Otranto and Eberhard, 2011] Otranto, D. and Eberhard, M. L. (2011). Zoonotic helminths affecting the human eye. *Parasit Vectors*, 4.
- [Pantchev et al., 2009] Pantchev, N., Norden, N., Lorentzen, L., Rossi, M., Rossi, U., Brand, B., and Dyachenko, V. (2009). Current surveys on the prevalence and distribution of *Dirofilaria* spp. in dogs in Germany. *Parasitol Res*, 105 Suppl 1:63–74.
- [Pluskota et al., 2008] Pluskota, B., Storch, V., Braunbeck, T., Beck, M., and Becker, N. (2008). First record of *Stegomyia albopicta* (Skuse) (Diptera: Culicidae) in Germany. *European Mosquito Bulletin*, 26:1–5.
- [Poppert et al., 2009] Poppert, S., Hodapp, M., Krueger, A., Hegasy, G., Niesen, W. D., Kern, W. V., and Tannich, E. (2009). *Dirofilaria repens* infection and concomitant meningoencephalitis. *Emerg Infect Dis*, 15(11):1844–6.
- [Rapti and Rehbein, 2010] Rapti, D. and Rehbein, S. (2010). Seroprevalence of canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in Albania. *Parasitol Res*, 107(2):481–5.
- [Raymaekers et al., 2009] Raymaekers, M., Smets, R., Maes, B., and Cartuyvels, R. (2009). Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays. *J Clin Lab Anal*, 23(3):145–51.
- [Rehbein et al., 2000] Rehbein, S., Lutz, W., Visser, M., and Winter, R. (2000). Beiträge zur Kenntnis der Parasitenfauna des Wildes in Nordrhein-Westfalen. 1. Der Endoparasitenbefall des Rehwildes. *Zeitschrift für Jagdwissenschaft*, 46:248–269.
- [Reineke, 2004] Reineke, A. (2004). *Gentechnische Grundlagen, Methoden und Anwendungen*. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart.
- [Reinert, 1973] Reinert (1973). Contributions to the mosquito fauna of Southeast Asia-XVI. Genus *Aedes* Meigen, subgenus *Aedimorphus* Theobald in SoutSouth Asia. *Contr Am Ent Inst*, 9(5):1–218.
- [Reiter, 1983] Reiter, P. (1983). A portable, battery-powered trap for collecting gravid *Culex*-mosquitoes. *Mosquito News*, 43:496–498.

Literaturverzeichnis

- [Rishniw et al., 2006] Rishniw, M., Barr, S. C., Simpson, K. W., Frongillo, M. F., Franz, M., and Dominguez Alpizar, J. L. (2006). Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction. *Veterinary Parasitology*, 135:303–313.
- [Rohe and Fall, 1979] Rohe, D. L. and Fall, R. P. (1979). A miniature battery powered CO₂ baited light trap for mosquito borne encephalitis. *Bull Soc Vector Ecol*, 4:24–27.
- [Rose et al., 2006] Rose, A., Kröckel, U., Bergbauer, R., Geier, M., and Eiras, A. E. (2006). Der BG-Sentinel, eine neuartige Stechmückenfalle für Forschung und Überwachung. *Mitt. Dtsch. Ges. Allg. Angew. Ent.*, 15:345–348.
- [Rudolf et al., 2013] Rudolf, M., Czajka, C., Börstler, J., Melaun, C., Jöst, H., von Thien, H., Badusche, M., Schmidt-Chanasit, J., Krüger, A., Tannich, E., and Müller, S. (2013). First nationwide surveillance of *Culex pipiens* complex and *Culex torrentium* mosquitoes demonstrated the presence of *Culex pipiens* biotype *pipiens* / *molestus* hybrids in Germany. *Plos One*, 8.
- [Santiago-Alarcon et al., 2012] Santiago-Alarcon, D., Palinauskas, V., and Schaefer, H. M. (2012). Diptera vectors of avian Haemosporidian parasites: untangling parasite life cycles and their taxonomy. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 87(4):928–64.
- [Sassnau et al., 2009] Sassnau, R., Dyachenko, V., Pantchev, N., Stöckel, F., Dittmar, K., and Daugschies, A. (2009). *Dirofilaria repens*-Befall in einem Schlittenhunde-Rudel im Land Brandenburg - Diagnose und Therapie der kaninen kutanen Dirofilariose. *Tierärztliche Praxis Kleintiere*, 2(2).
- [Sassnau and Genchi, 2013] Sassnau, R. and Genchi, C. (2013). Qualitative risk assessment for the endemisation of *Dirofilaria repens* in the state of Brandenburg (Germany) based on temperature-dependent vector competence. *Parasitology Research*, 112:2647–2652.
- [Schaffner et al., 2001] Schaffner, F., Angel, G., Geoffroy, B., Hervy, J. P., Rhaïem, A., and J., B. (2001). Les moustiques d'Europe: The mosquitoes of Europe. CD-ROM.
- [Schild,] Schild, T. Einführung in die Real-Time TaqMan[®] PCR-Technologie.
- [Schmidt-Chanasit, 2010] Schmidt-Chanasit, J. (2010). Filarien 12s Mitochondrial LC-PCR. unpublished.
- [Schubert et al., 2001] Schubert, R., Hilbig, W., and Klotz, S. (2001). *Bestimmungsbuch der Pflanzengesellschaften Deutschlands*. Spektrum Akademischer Verlag.
- [Shaikevich, 2007] Shaikevich, E. V. (2007). PCR-RFLP of the COI gene reliably differentiates *Cx. pipiens*, *Cx. pipiens* f. *molestus* and *Cx. torrentium* of the *pipiens*-Complex. *European Mosquito Bulletin*, 23:25–30.
- [Simon et al., 1996] Simon, F., Cordero, M., Muro, A., Villar, E., Perera, L., Espinoza, E., and Santamaria, B. (1996). Public health problems due to *Dirofilaria*: the Spanish situation. *Vet Res Commun*, 20(4):340–4.
- [Simon et al., 2012] Simon, F., Siles-Lucas, M., Morchon, R., Gonzalez-Miguel, J., Mellado, I., Carretón, E., and Montoya-Alonso, J. A. (2012). Human and animal dirofilariasis: the emergence of a zoonotic mosaic. *Clin Microbiol Rev*, 25(3):507–44.

Literaturverzeichnis

- [Sreter et al., 2002] Sreter, T., Szell, Z., Egyed, Z., and Varga, I. (2002). Subconjunctival zoonotic onchocerciasis in man: aberrant infection with *Onchocerca lupi*? *Ann Trop Med Parasitol*, 96(5):497–502.
- [Stockklausner et al., 2013] Stockklausner, J., Czajka, C., Jöst, H., Borner, J., Saenger, K., Schmidt, V., Becker, N., and Tannich, E. (2013). Avian Malaria in Inca terns at the zoo of Heidelberg and the mosquito control program. In Chitty, J., Marschang, R., Mayer, J., Speer, B., Lierz, M., Heffels-Redmann, U., and Ziegler, L., editors, *1st International Conference on Avian, Herpetological and Exotic mammal medicine*. VVB Laufersweiler Verlag édition scientifique.
- [Storch and Welsch, 2004] Storch, V. and Welsch, U. (2004). *Systematische Zoologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin, 6 edition.
- [Svobodová et al., 2006] Svobodová, Z., Svobodová, V., Genchi, C., and Forejtek, P. (2006). The first report of autochthonous dirofilariosis in dogs in the Czech Republic. *Helminthologia*, 43(4):242–245.
- [Szell et al., 2001] Szell, Z., Sreter, T., Erdelyi, I., and Varga, I. (2001). Ocular onchocercosis in dogs: aberrant infection in an accidental host or lupi onchocercosis? *Vet Parasitol*, 101(2):115–25.
- [Szenasi et al., 2008] Szenasi, Z., Kovacs, A. H., Pampiglione, S., Fioravanti, M. L., Kucsera, I., Tanczos, B., and Tiszlavicz, L. (2008). Human dirofilariosis in Hungary: an emerging zoonosis in central Europe. *Wien Klin Wochenschr*, 120(3-4):96–102.
- [Takken et al., 2007] Takken, W., Kager, P. A., and Verhave, J. P. (2007). Will malaria return to North-West Europe? In Takken, W. and Knols, B. G. J., editors, *Emerging pests and vector-borne diseases in Europe*, volume 1. Wageningen Academic Publishers.
- [Tasic et al., 2008] Tasic, A., Rossi, L., Tasic, S., Miladinovic-Tasic, N., Ilic, T., and Dimitrijevic, S. (2008). Survey of canine dirofilariosis in Vojvodina, Serbia. *Parasitol Res*, 103(6):1297–302.
- [Thanchomnang et al., 2010] Thanchomnang, T., Intapan, P. M., Lulitanond, V., Sangmaneedet, S., Chungpivat, S., Taweethavonsawat, P., Choochote, W., and Maleewong, W. (2010). Rapid detection of *Dirofilaria immitis* in mosquito vectors and dogs using a real-time fluorescence resonance energy transfer PCR and melting curve analysis. *Vet Parasitol*, 168(3-4):255–60.
- [Therizol-Ferly et al., 1996] Therizol-Ferly, M., Bain, O., Reynouard, F., Aimard, I., Raymond, J. M., Rossazza, C., and Richard-Lenoble, D. (1996). Ocular Dirofilariosis in a frenchwoman living in Sologne (France). *Veterinary Research Communications*, 20:345–349.
- [tin tin, 2007] tin tin, C. (2007). African penguin (*Spheniscus demersus*), near Boulders Beach, South Africa. wikipedia.
- [Tischler, 1993] Tischler, W. (1993). *Einführung in die Ökologie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- [Ventim et al., 2012] Ventim, R., Ramos, J. A., Osorio, H., Lopes, R. J., Perez-Tris, J., and Mendes, L. (2012). Avian malaria infections in western European mosquitoes. *Parasitol Res*, 111(2):637–45.

Literaturverzeichnis

- [Walter et al., 1994] Walter, H., Breckle, S.-W., Agachanjan, O., and Rahmann, M. (1994). *Ökologie der Erde Band 3. Spezielle Ökologie der Gemäßigten und Arktischen Zonen Euro-Nordasiens*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- [Weitzel et al., 2011] Weitzel, T., Braun, K., Collado, A., Jöst, A., and Becker, N. (2011). Distribution and frequency of *Culex pipiens* and *Culex torrentium* (Culicidae) in Europe and diagnostic allozyme markers. *Journal of the European Mosquito Control Association*, 29:22–37.
- [Weitzel et al., 2009] Weitzel, T., Collado, A., Jost, A., Pietsch, K., Storch, V., and Becker, N. (2009). Genetic differentiation of populations within the *Culex pipiens* complex and phylogeny of related species. *J Am Mosq Control Assoc*, 25(1):6–17.
- [Werner et al., 2012] Werner, D., Kronefeld, M., Schaffner, F., and Kampen, H. (2012). Two invasive mosquito species, *Aedes albopictus* and *Aedes japonicus japonicus*, trapped in south-west Germany, July to August 2011. *Euro Surveill*, 17(4).
- [Wesolowska et al., 2010] Wesolowska, M., Kiswa, K., Szalinski, M., Zielinski, M., Okulewicz, A., Misiuk-Hojlo, M., and Szostakowska, B. (2010). First case of heterochthonous subconjunctival dirofilariasis described in Poland. *Am J Trop Med Hyg*, 83(2).

Teil V.
Anhang

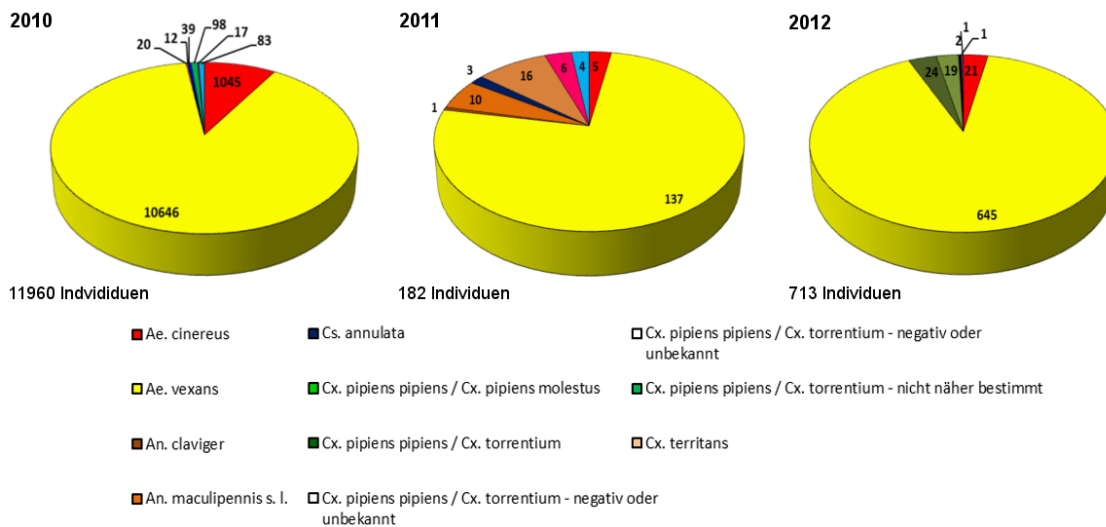


Abbildung 19.1.: Anzahl der auf der Insel Rott gefangenen Individuen (2010-2012)

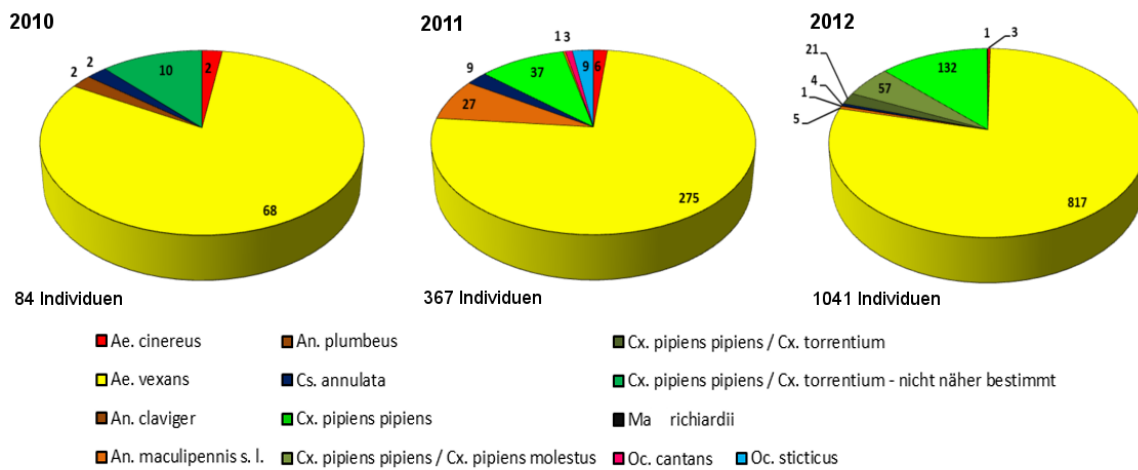


Abbildung 19.2.: Anzahl der am Rusheimer Altrhein gefangenen Individuen (2010-2012)

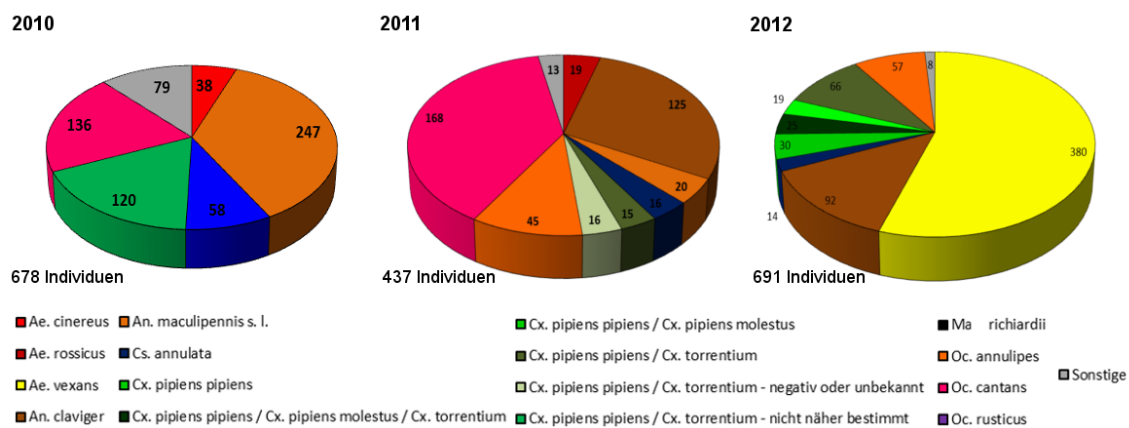


Abbildung 19.3.: Anzahl der in Waghäusel gefangenen Individuen (2010-2012)

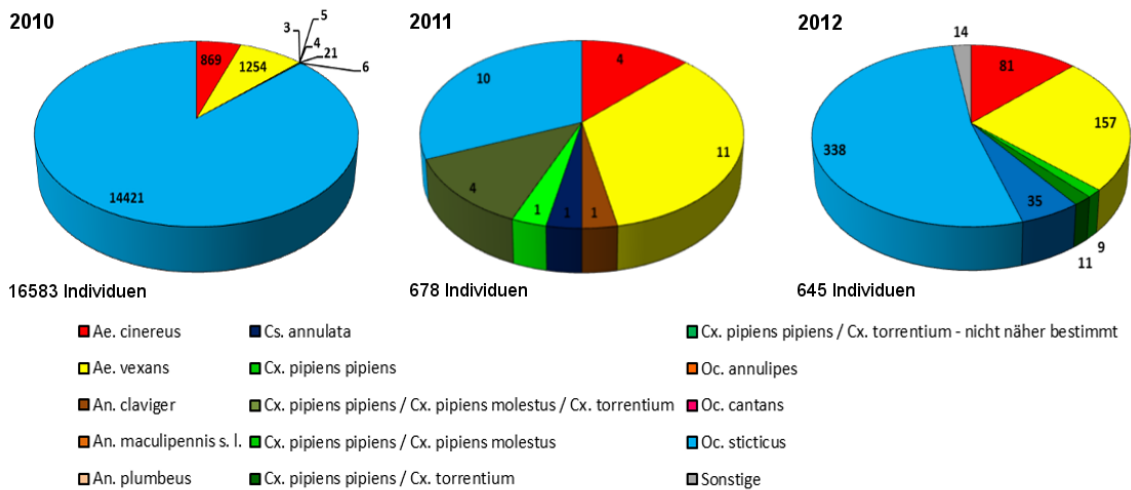


Abbildung 19.4.: Anzahl der am Chiemsee gefangenen Individuen (2010-2012)

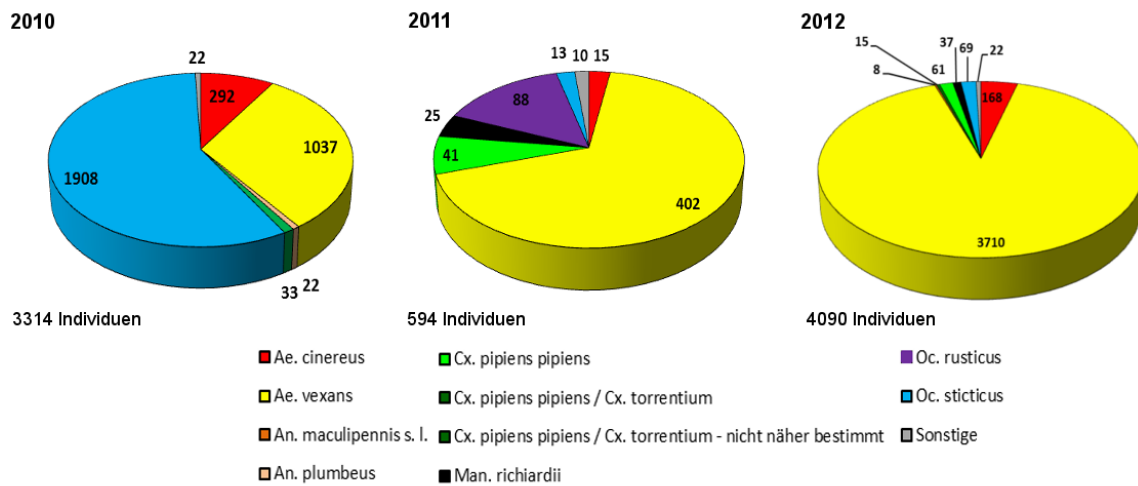


Abbildung 19.5.: Anzahl der an der Isar gefangenen Individuen (2010-2012)

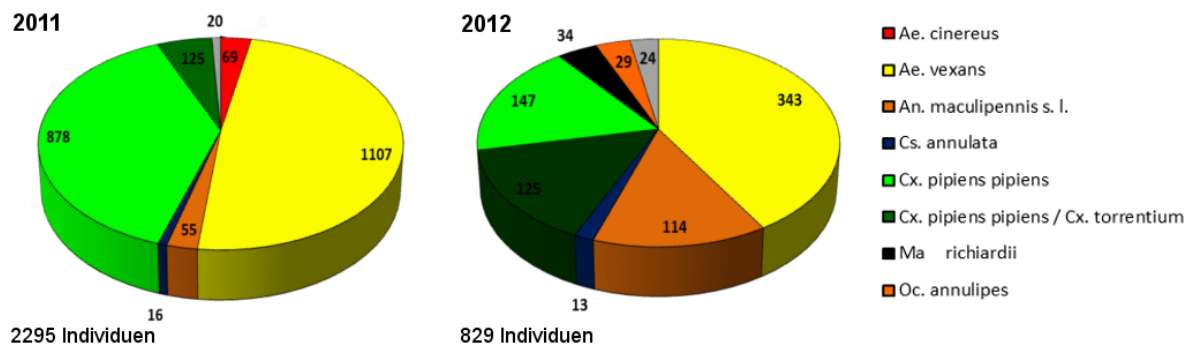


Abbildung 19.6.: Anzahl der an der Oder gefangenen Individuen (2011+2012)

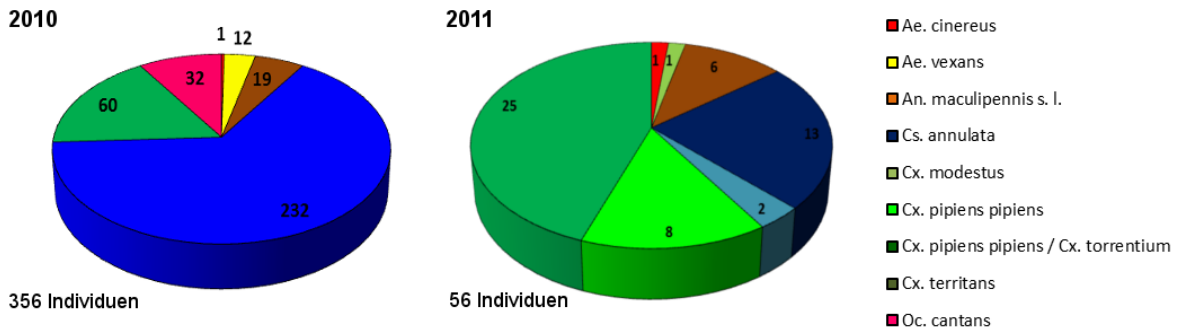


Abbildung 19.7.: Anzahl der in Alsheim gefangenen Individuen (2010-2012)

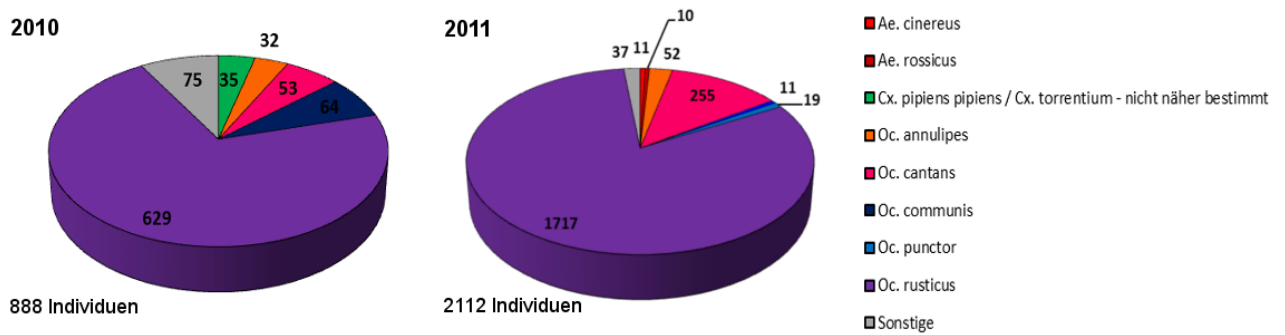


Abbildung 19.8.: Anzahl der in Haßloch gefangenen Individuen (2010+2011)

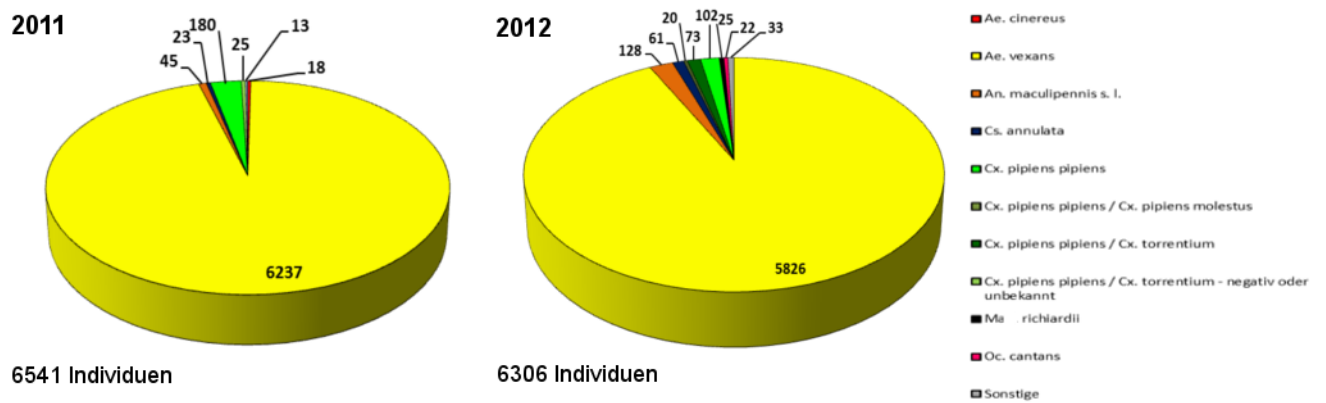


Abbildung 19.9.: Anzahl der am Kühkopf gefangenen Individuen (2011+2012)

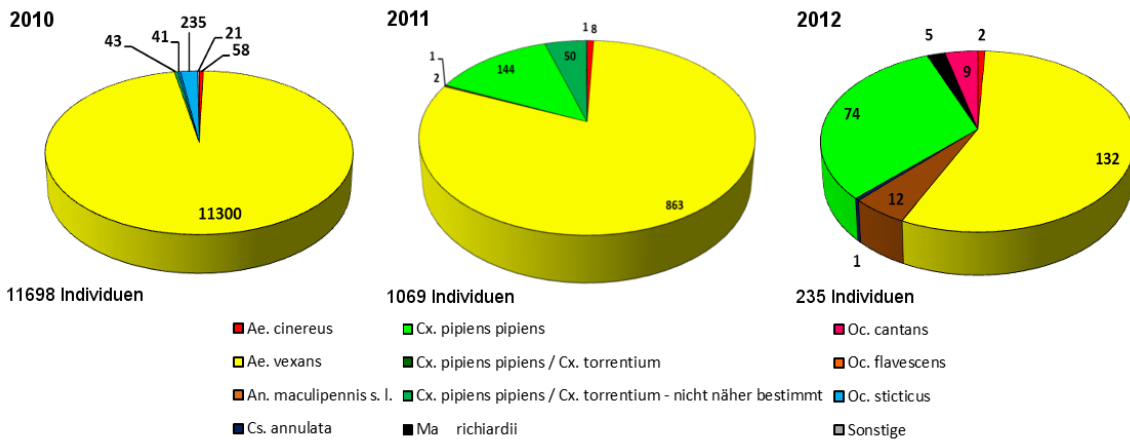


Abbildung 19.10.: Anzahl der an der Elbe gefangenen Individuen (2010-2012)

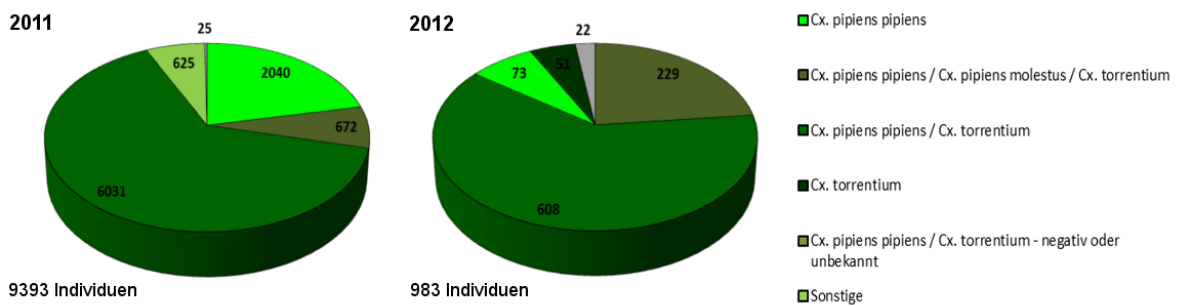


Abbildung 19.11.: Anzahl der in Heidelberg gefangenen Individuen (2011+2012)

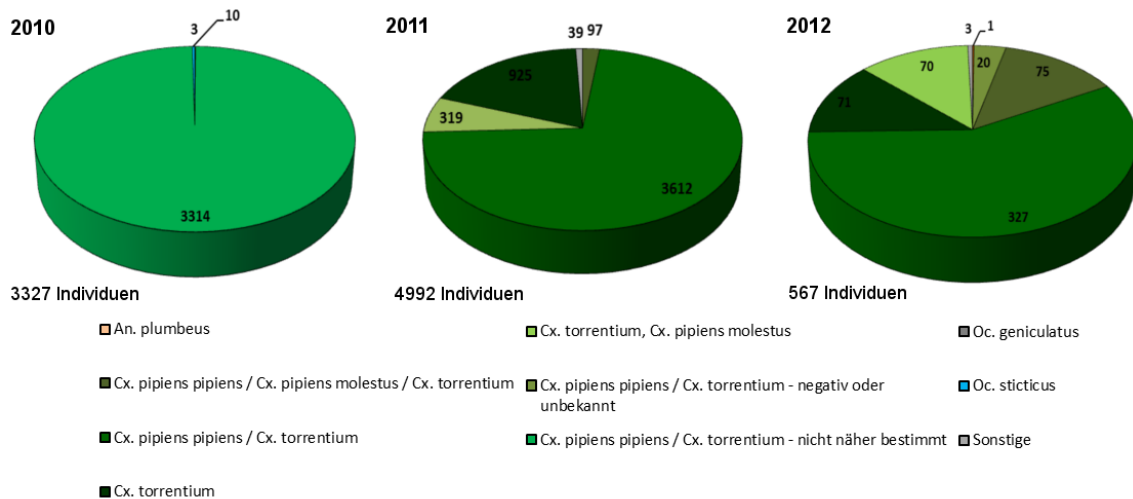


Abbildung 19.12.: Anzahl der in Großsachsen gefangenen Individuen (2010-2012)

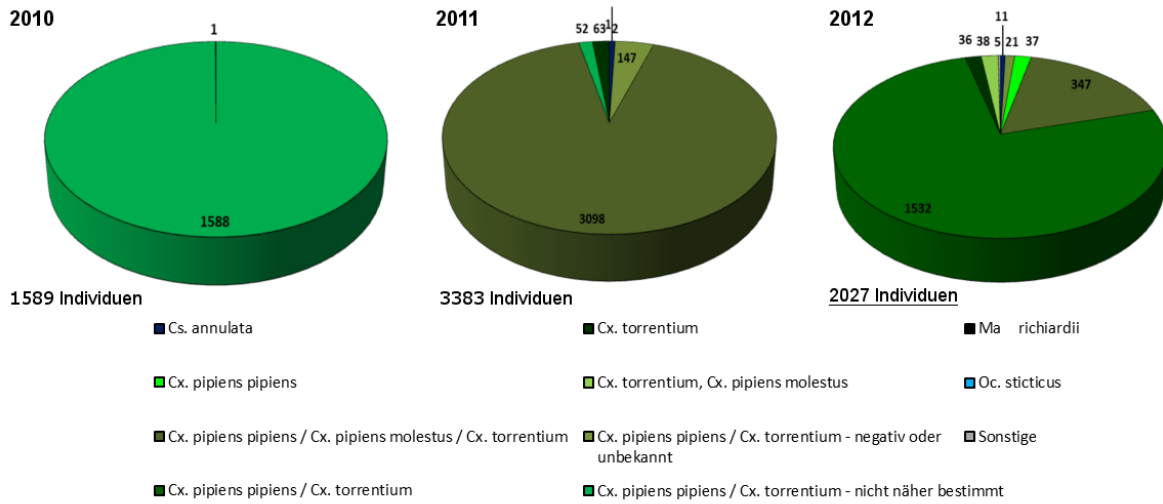


Abbildung 19.13.: Anzahl der in Weinheim gefangenen Individuen (2010-2012)

Art	n Individuen			n Pools			Individuen [%]			Pools [%]			pos Pools 12s Mito			pos Pools 18s Haem			pos Pools Cytb Haem		
	2010	2011	2012	2010	2011	2012	2010	2011	2012	2010	2011	2012	2010	2011	2012	2010	2011	2012	2010	2011	2012
<i>Ae. cinereus</i>	3097	2232	295	149	110	34	4,51	4,47	1,20	5,02	4,62	1,96	0	17	6	N/A	54	3	N/A	3	1
<i>Ae. rossicus</i>	0	39	1	0	5	1	0,00	0,08	0,00	0,00	0,21	0,06	0	1	0	N/A	3	0	N/A	0	0
<i>Ae. vexans</i>	34098	12244	12781	1373	510	578	49,70	24,55	51,82	46,21	21,44	33,33	5	64	131	N/A	216	37	N/A	13	9
<i>An. claviger</i>	281	184	96	25	27	13	0,41	0,37	0,39	0,84	1,13	0,75	0	7	3	N/A	24	8	N/A	2	0
<i>An. maculipennis</i>	207	256	285	27	44	49	0,30	0,51	1,16	0,91	1,85	2,83	0	3	7	N/A	38	4	N/A	3	0
<i>An. plumbeus</i>	33	3	465	9	2	36	0,05	0,01	1,89	0,30	0,08	2,08	0	0	0	N/A	2	26	N/A	0	3
<i>Cul. annulata</i>	405	165	174	38	59	48	0,59	0,33	0,71	1,28	2,48	2,77	2	10	2	N/A	36	9	N/A	5	1
<i>Cx. modestus</i>	0	2	0	0	1	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0	0	0	N/A	1	0	N/A	0	0
<i>Cx. pipiens molestus</i>	0	0	1	0	0	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0	0	0	N/A	0	0	N/A	0	0
<i>Cx. pipiens pipiens</i>	0	10937	1250	0	480	271	0,00	21,93	5,07	0,00	20,18	15,63	0	61	26	N/A	244	104	N/A	117	43
<i>Cx. pipiens pipiens</i> x <i>Cx. pipiens molestus</i>	0	0	4	0	0	4	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,23	0	0	0	N/A	0	3	N/A	0	1
<i>Cx. pipiens pipiens</i> / <i>Cx. pipiens molestus</i>	0	0	161	0	0	22	0,00	0,00	0,65	0,00	0,00	1,27	0	0	2	N/A	0	6	N/A	0	3
<i>Cx. pipiens pipiens</i> / <i>Cx. pipiens molestus</i> / <i>Cx. torrentium</i>	0	1022	1292	0	47	71	0,00	2,05	5,24	0,00	1,98	4,09	0	17	28	N/A	45	61	N/A	39	42
<i>Cx. pipiens pipiens</i> / <i>Cx. torrentium</i>	5399	13084	5810	306	581	320	7,87	26,23	23,55	10,30	24,42	18,45	139	351	120	N/A	543	255	N/A	420	170
<i>Cx. pipiens pipiens</i> / unbekannt	0	2872	0	0	118	0	0,00	5,76	0,00	0,00	4,96	0,00	0	9	0	N/A	39	0	N/A	7	0
<i>Cx. pipiens pipiens</i> / <i>Cx. torrentium</i> - neg. od. unb.	0	1904	96	0	90	21	0,00	3,82	0,39	0,00	3,78	1,21	0	25	2	N/A	49	6	N/A	32	2
<i>Cx. territans</i>	0	47	0	0	6	0	0,00	0,09	0,00	0,00	0,25	0,00	0	2	0	N/A	4	0	N/A	2	0
<i>Cx. torrentium</i>	0	992	231	0	51	86	0,00	1,99	0,94	0,00	2,14	4,96	0	43	11	N/A	48	31	N/A	26	8
<i>Cx. torrentium</i> / <i>Cx. pipiens molestus</i>	0	0	113	0	0	7	0,00	0,00	0,46	0,00	0,00	0,40	0	0	6	N/A	0	3	N/A	0	0
<i>Ma. richiardii</i>	0	33	194	0	6	28	0,00	0,07	0,79	0,00	0,25	1,61	0	1	5	N/A	5	6	N/A	0	0
<i>Oc. annulipes</i>	32	115	157	2	24	32	0,05	0,23	0,64	0,07	1,01	1,85	0	7	3	N/A	14	3	N/A	0	0
<i>Oc. cantans</i>	352	889	714	29	59	58	0,51	1,78	2,89	0,98	2,48	3,34	0	12	8	N/A	24	5	N/A	3	0
<i>Oc. cantans</i> / <i>Oc. annulipes</i>	0	0	4	0	0	4	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,23	0	0	0	N/A	0	0	N/A	0	0
<i>Oc. caspius</i>	0	80	5	0	8	2	0,00	0,16	0,02	0,00	0,34	0,12	0	0	1	N/A	0	0	N/A	0	0
<i>Oc. communis</i>	82	27	9	7	2	2	0,12	0,05	0,04	0,24	0,08	0,12	0	0	0	N/A	1	0	N/A	0	0
<i>Oc. geniculatus</i>	0	0	63	0	0	12	0,00	0,00	0,26	0,00	0,00	0,69	0	0	1	N/A	0	5	N/A	0	0
<i>Oc. flavescens</i>	0	48	0	0	8	0	0,00	0,10	0,00	0,00	0,34	0,00	0	1	0	N/A	4	0	N/A	0	0
<i>Oc. punctor</i>	41	257	40	2	22	5	0,06	0,52	0,16	0,07	0,92	0,29	0	2	0	N/A	7	0	N/A	0	0
<i>Oc. rusticus</i>	654	1832	2	28	85	1	0,95	3,67	0,01	0,94	3,57	0,06	0	53	0	N/A	9	1	N/A	3	0
<i>Oc. sticticus</i>	23924	617	423	976	34	28	34,87	1,24	1,71	32,85	1,43	1,61	1	1	1	N/A	19	4	N/A	0	0
Gesamt	68605	49881	24666	2971	2379	1734	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	147	687	363	N/A	1429	580	N/A	675	283
Gesamt 2010+2011+2012	143152			7084			1197			2009			958								

Tabelle 19.1.: Gesamtüberblick über die Arten, deren Häufigkeit und Infektion der zwischen 2010 und 2012 gefangenen Stechmücken - Teil 1

Art	pos Pools <i>S. tundra</i>			pos Pools <i>D. repens</i>			Individuen gesamt	Pools gesamt	12s gesamt	18s gesamt	Cyrb gesamt	<i>S. tundra</i>	<i>D. repens</i>
	2010	2011	2012	2010	2011	2012							
<i>Ae. cinereus</i>	0	N/A	N/A	0	0	0	5624	293	23	57	4	0	0
<i>Ae. rossicus</i>	0	N/A	N/A	0	0	0	40	6	1	3	0	0	0
<i>Ae. vexans</i>	1	N/A	N/A	0	0	1	59123	2461	200	253	22	1	1
<i>An. claviger</i>	0	N/A	N/A	0	0	0	561	65	10	32	2	0	0
<i>An. maculipennis</i>	0	N/A	N/A	0	0	2	748	120	10	42	3	0	2
<i>An. plumbeus</i>	0	N/A	N/A	0	0	0	501	47	0	28	3	0	0
<i>Cul. annulata</i>	0	N/A	N/A	0	1	0	744	145	14	45	6	0	1
<i>Cx. modestus</i>	0	N/A	N/A	0	0	0	2	1	0	1	0	0	0
<i>Cx. pipiens molestus</i>	0	N/A	N/A	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
<i>Cx. pipiens pipiens</i>	0	N/A	N/A	0	0	0	12187	751	87	348	160	0	0
<i>Cx. pipiens pipiens</i> x <i>Cx. pipiens molestus</i>	0	N/A	N/A	0	0	0	4	4	0	3	1	0	0
<i>Cx. pipiens pipiens</i> / <i>Cx. pipiens molestus</i>	0	N/A	N/A	0	0	0	161	22	2	6	3	0	0
<i>Cx. pipiens pipiens</i> / <i>Cx. pipiens molestus</i> / <i>Cx. torrentium</i>	0	N/A	N/A	0	0	0	2314	118	45	106	81	0	0
<i>Cx. pipiens pipiens</i> / <i>Cx. torrentium</i>	0	N/A	N/A	0	0	0	24293	1207	610	798	590	0	0
<i>Cx. pipiens pipiens</i> / unbekannt	0	N/A	N/A	0	0	0	2872	118	9	39	7	0	0
<i>Cx. pipiens pipiens</i> / <i>Cx. torrentium</i> - neg. od. unb.	0	N/A	N/A	0	0	0	2000	111	27	55	34	0	0
<i>Cx. territans</i>	0	N/A	N/A	0	0	0	47	6	2	4	2	0	0
<i>Cx. torrentium</i>	0	N/A	N/A	0	0	0	1223	137	54	79	34	0	0
<i>Cx. torrentium</i> / <i>Cx. pipiens molestus</i>	0	N/A	N/A	0	0	0	113	7	6	3	0	0	0
<i>Ma. richiardii</i>	0	N/A	N/A	0	0	0	227	34	6	11	0	0	0
<i>Oc. annulipes</i>	0	N/A	N/A	0	0	0	304	58	10	17	0	0	0
<i>Oc. cantans</i>	0	N/A	N/A	0	0	0	1955	146	20	29	3	0	0
<i>Oc. cantans</i> / <i>Oc. annulipes</i>	0	N/A	N/A	0	0	0	4	4	0	0	0	0	0
<i>Oc. caspius</i>	0	N/A	N/A	0	0	0	85	10	1	0	0	0	0
<i>Oc. communis</i>	0	N/A	N/A	0	0	0	118	11	0	1	0	0	0
<i>Oc. geniculatus</i>	0	N/A	N/A	0	0	0	63	12	1	5	0	0	0
<i>Oc. flavescens</i>	0	N/A	N/A	0	0	0	48	8	1	4	0	0	0
<i>Oc. punctator</i>	0	N/A	N/A	0	0	0	338	29	2	7	0	0	0
<i>Oc. rusticus</i>	0	N/A	N/A	0	0	0	2488	114	53	10	3	0	0
<i>Oc. sticticus</i>	1	N/A	N/A	0	0	0	24964	1038	3	23	0	1	0
Gesamt	2	0	0	0	1	3	143152	7084	1197	2009	958	2	4
Gesamt 2010+2011+2012	2			4									

Tabelle 19.2.: Gesamtüberblick über die Arten, deren Häufigkeit und Infektion der zwischen 2010 und 2012 gefangenen Stechmücken - Teil 2

Standort	Kategorie	<i>Ae. cinereus</i>	<i>Ae. vexans</i>	<i>An. claviger</i>	<i>An. maculipennis</i>	<i>An. plumbeus</i>	<i>Cs. annulata</i>	<i>Cx. pipiens / torrentium</i>	<i>Oc. annulipes</i>	<i>Oc. cantans</i>	<i>Oc. communis</i>	<i>Oc. punctator</i>	<i>Oc. rusticus</i>	<i>Oc. sticticus</i>	Gesamt Individuen	Gesamt Pools	Gesamt Pools 12s Mito	Gesamt Pools S. tundra	Standort
	n Individuen	3097	34098	281	207	33	405	5399	32	352	82	41	654	23924	68605	2971	149	2	n Individuen
	n Pools	149	1373	25	27	9	38	306	2	29	7	2	28	976					n Pools
	n Pools 12s Mito	0	5	2	0	0	2	139	0	0	0	0	0	1					n Pools 12s Mito
	n Pools S. tundra	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1					n Pools D. repens
Alshelm	n Individuen	1	12	0	19	232	60	32	2	32				356					A Inc
Alshelm	n Pools	1	1	2	2	12	3	2							21				A Pools
Alshelm	n Pools pos 12s Mito															0			A Pools 12s Mito
Alshelm	n Individuen	175	9528	4	132	2	43	72	87	18	18			21	10082				B Inc
Bodensee	n Pools	14	383	3	12	1	5	9	8	3	3			3	441				B Pools
Bodensee	n Pools pos 12s Mito															1			B Pools 12s Mito
Chiemsee	n Individuen	869	1254	3	5	4	21	21	6	6				14421	16583				C Pools
Chiemsee	n Pools	39	52	1	1	2	6	6	1	1				578	680				C Inc
Chiemsee	n Pools pos 12s Mito													1					C Pools in 12s Mito
Chiemsee	n Pools S. tundra													1					C Pools S. tundra
Elbe	n Individuen	58	11300	3	3		7	43	7			41	1	235	11698			1	E Inc
Elbe	n Pools	3	452	2	1		2	6	2			2	1	13					E Pools
Elbe	n Pools pos 12s Mito															1			E Pools in 12s Mito
Großsachsen	n Individuen					3	3314	3314						10	3327				G Inc
Großsachsen	n Pools					3	164	164						7	174				G Pools
Großsachsen	n Pools pos 12s Mito							99								99			G Pools in 12s Mito
Haßloch	n Individuen	19	13	1	13	1	12	35	32	53	64			16	888				H Inc
Haßloch	n Pools	2	1	1	2	1	2	3	2	3	4			1	48				H Pools
Haßloch	n Pools pos 12s Mito															0			H Pools in 12s Mito
Insel Rott	n Individuen	1045	10646	20	12		39	98	17					83	11960				IR Inc
Insel Rott	n Pools	46	425	4	6		7	9	4					5	506				IR Pools
Insel Rott	n Pools 12s Mito															3			IR Pools in 12s Mito
Insel Rott	n Pools S. tundra																1		IR Pools S. tundra
Isar	n Individuen	292	1037	7	7	22	10	33	5					1908	3314				I Inc
Isar	n Pools	12	42	1	1	1	1	2	1					77	137				I Pools
Isar	n Pools pos 12s Mito															0			I Pools in 12s Mito
Knielinger See	n Individuen	2	8					2						1	13				KK Inc
Knielinger See	n Pools	1	1					1						1	4				KK Pools
Knielinger See	n Pools pos 12s Mito															0			KK Pools in 12s Mito
Osterseen	n Individuen	596	217			1	2	1	9					7204	8030				O Inc
Osterseen	n Pools	27	10			1	2	1	1					289	331				O Pools
Osterseen	n Pools pos 12s Mito															0			O Pools in 12s Mito
Rusheimer Altrhein	n Individuen	2	68	2	2	2	10	10							84				RA Inc
Rusheimer Altrhein	n Pools	1	3	1	1	1	1	1							7				RA Pools
Rusheimer Altrhein	n Pools pos 12s Mito															0			RA Pools in 12s Mito
Stutensee	n Individuen			1				2							3				KS Inc
Stutensee	n Pools			1				1							2				KS Pools
Stutensee	n Pools pos 12s Mito															0			KS Pools in 12s Mito
Waghäusel	n Individuen	38	15	247	16		58	120	136				24	24	678				WH Inc
Waghäusel	n Pools	3	3	12	2		6	6	7				1	1	41				WH Pools
Waghäusel	n Pools pos 12s Mito			2			2									4			WH Pools in 12s Mito
Wenheim	n Individuen							1588						1	1589				W Inc
Wenheim	n Pools							94						1	95				W Pools
Wenheim	n Pools pos 12s Mito							40								40			W Pools in 12s Mito

Tabelle 19.3.: Übersicht über die in 2010 gefangenen Stechmücken - Auflistung nach Standort

Standort	Kategorie	Taxonomische Gruppen																Gesamt Individuen	Gesamt Pools	Gesamt Pools 12s Mito	Gesamt Pools D. repens	Standort										
		Ae. cinereus	Ae. rosafuscus	Ae. vexans	An. duxiger	An. maculipennis	An. plumbeus	Ck. annulata	Ck. modestus	Cx. pipiens pipiens	Cx. pip. pip., Cx. pip. mel., Cx. torr.	Cx. pip. pip., Cx. torr.	Cx. pip. pip., unb.	Cx. pip / torr. = neg. / unb.	Cx. pip. / torr. = nicht näher bestimmt	Cx. terrisians	Cx. torrentium						Ma. richardii	Oc. annulipes	Oc. cantans	Oc. caspius	Oc. communis	Oc. flavescens	Oc. punctator	Oc. rufifuscus	Oc. sticticus	
	n Individuen	2232	39	12244	184	256	3	165	2	10937	1019	13084	2872	1904	3	47	992	33	115	889	80	27	48	257	1832	617	49881	2379	667	1	n Individuen	
	n Pools	110	5	510	27	44	2	59	1	480	46	581	118	90	1	6	51	6	24	59	8	2	8	22	85	34					n Pools	
	n Pools 12s Mito	17	1	64	7	3	0	10	0	60	17	352	9	25	0	2	43	1	7	12	0	0	1	2	53	1					n Pools 12s Mito	
	n Pools D. repens	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					n Pools D. repens	
Altsheim	n Individuen	1			6			13	2	8							25										56				A Ind	
Altsheim	n Pools	1			2			1	1	1							1											8			A Pook	
Altsheim	n Pools pos 12s Mito	1															1												2		A Pook 12s Mito	
Bodensee	n Individuen	22		33	1			4		60	11							1								11	143				B Ind	
Bodensee	n Pools	2		2	1			1		3	1							1								2		13			B Pook	
Bodensee	n Pools pos 12s Mito	1																											1		B Pook 12s Mito	
Chiemsee	n Individuen	85		265	1			1		8	92															226	678				C Ind	
Chiemsee	n Pools	4		11	1			1		1	4															10		32			C Pook	
Chiemsee	n Pools pos 12s Mito			1							1																		2		C Pook in 12s Mito	
Drömling	n Individuen	3		9				1		14														2				29			D Ind	
Drömling	n Pools	1		1				1		1														1				5			D Pools	
Drömling	n Pools pos 12s Mito			1																									1		D Pools in 12s Mito	
Elbe / Coswig	n Individuen	8		863	2			1		144		50												1				1069				E/C Ind
Elbe / Coswig	n Pools	2		35	1			1		6		2													1				48			E/C Pook
Elbe / Coswig	n Pools pos 12s Mito	1		14						2																			17		E/C Pook in 12s Mito	
Greßwald / Elbena	n Individuen	1148	4	1834	29	73		25		5479		50	2152	534				10	205	53	16	42	181	16	273	12124						GR Ind
Greßwald / Elbena	n Pools	47	1	76	5	5		6		220		2	88	22				2	12	5	1	5	9	2	12		520				GR Pools	
Greßwald / Elbena	n Pools pos 12s Mito									13		1	6	1								1							22		GR Pools in 12s Mito	
Großbarchen	n Individuen				1		1	11		25	97	3612	319				925						1				4992				G Ind	
Großbarchen	n Pools				1		1	9		1	4	156	15				43						1					231			G Pook	
Großbarchen	n Pools pos 12s Mito							3		3	143	11					40						1					201			G Pools in 12s Mito	
Haßloch	n Individuen	11	10	8	9		6	4						3				52	255	11		19	1717	7	2112						H Ind	
Haßloch	n Pools	5	1	2	6		3	2						1				10	19	1		7	75	2			134				H Pools	
Haßloch	n Pools pos 12s Mito							1										3	4			1	53					62			H Pools in 12s Mito	
Insel Rott	n Individuen	5		137	1	10		3							16					6						4	182				IR Ind	
Insel Rott	n Pools	1		6	1	2		1							2					1						1		15			IR Pools	
Insel Rott	n Pools pos 12s Mito														1														2		IR Pools in 12s Mito	
Isar	n Individuen	15		402	5	1		4		41							25						88	13	594						I Ind	
Isar	n Pools	1		17	1	1		1		2								1					4	1				29			I Pook	
Isar	n Pools pos 12s Mito			3				1										1										6			I Pools in 12s Mito	
Kühkopf	n Individuen	18		6237	5	45	2	23		180		3		25				1	2								6541				K Ind	
Kühkopf	n Pools	6		259	4	13	1	9		19		1		2				1	2									317			K Pools	
Kühkopf	n Pools pos 12s Mito	1		33				2		4				1															41		K Pools in 12s Mito	
Loisín	n Individuen	461		976	14	5		6		1975		100	707	333				3	228	26		1	44	1	73	4953					L Ind	
Loisín	n Pools	20		40	2	2		2		79		4	29	14				2	11	2		1	3	1	4		216				L Pools	
Loisín	n Pools pos 12s Mito			3						6				3															12		L Pools in 12s Mito	
Oder Hohe nnutzen	n Individuen	69	6	1107		55		16		878		125						3	20	1		4	4	6	1	2295					OH Ind	
Oder Hohe nnutzen	n Pools	3	1	45		3		1		36		5						1	1	1		1	1	1	1		101				OH Pools	
Oder Hohe nnutzen	n Pools pos 12s Mito	1		3				1		3		2																	10		OH Pook in 12s Mito	
Oder Hohe nnutzen	n Pools LuplmmRep									1																			1		OH Pook in LuplmmRep	
Oste reeen	n Individuen	380		97	1			3		41								2	1				8			533					O Ind	
Oste reeen	n Pools	16		4	1			1		2								1	1				1					27			O Pools	
Oste reeen	n Pools pos 12s Mito	11		3																									15		O Pook in 12s Mito	
Russeimer Altrhein	n Individuen	6		275		27		9		37										1	3					9	367				RA Ind	
Russeimer Altrhein	n Pools	1		11		2		1		2										1	1					1		20			RA Pools	
Russeimer Altrhein	n Pools pos 12s Mito	1		2		1				1										1						1		7			RA Pools in 12s Mito	
Waghäuse I	n Individuen	19		125	20		16			1		15	16	6				4	45	168				2		437					WH Ind	
Waghäuse I	n Pools	2		9	4		3			1		2	2	3				2	7	10				1			46				WH Pools	
Waghäuse I	n Pools pos 12s Mito	1		7	1		1			1				1						3	6								21		WH Pook in 12s Mito	
Weinheim	n Individuen						20		2	147		3098	52					63	1							3383					W Ind	
Weinheim	n Pools						15		1	7		146	3					6	1								179				W Pools	
Weinheim	n Pools pos 12s Mito						2			6		98	2					3										111			W Pools in 12s Mito	
Zoo	n Individuen			2	2		3		2040	672	6031	13	625					4		1						9393					Zoo Ind	
Zoo	n Pools		</																													

Standort	Kategorie	<i>Ae. cinereus</i>	<i>Ae. rossicus</i>	<i>Ae. vexans</i>	<i>An. claviger</i>	<i>An. maculipennis</i>	<i>An. plumbeus</i>	<i>Cx. annulata</i>	<i>Cx. modestus</i>	<i>Cx. pipiens molestus</i>	<i>Cx. pipiens pipiens</i>	<i>Cx. pipiens pipiens, Cx. pipiens molestus, Cx. torrentium</i>	<i>Cx. pipiens pipiens x Cx. pipiens molestus</i>	<i>Cx. pipiens pipiens, Cx. pipiens molestus</i>	<i>Cx. pipiens pipiens, Cx. torrentium</i>	<i>Cx. pipiens pipiens, unbenannt</i>	<i>Cx. pipiens pipiens / torrentium - negativ oder unbenannt</i>	<i>Cx. pipiens pipiens / torrentium - nicht näher bestimmt</i>	<i>Cx. territans</i>	<i>Cx. torrentium, Cx. pipiens molestus</i>	<i>Cx. torrentium</i>	<i>Mb. richiardii</i>	<i>Oc. annulipes / Oc. cantans</i>	<i>Oc. annulipes</i>	<i>Oc. cantans</i>	<i>Oc. caspius</i>	<i>Oc. communis</i>	<i>Oc. flavescens</i>	<i>Oc. griseolatus</i>	<i>Oc. punctator</i>	<i>Oc. rusticus</i>	<i>Oc. arcticus</i>	Gesamt Individuen	Gesamt Pools	Gesamt Pools 12s Mito	Gesamt Pools D. repetens	Standort	
Bobenhe im-Röthe im	n Individuen									8	18	1	1	185		1					5												219				BR Ind	
Bobenhe im-Röthe im	n Pools									8	1	1	1	9		1					5													26			BR Pools	
Bobenhe im-Röthe im	n Pools pos 12s Mito																																	4			BR Pools 12s Mito	
Boote nsee	n Individuen	1	766	6	2				22	26	25														27	1							876				B Ind	
Boote nsee	n Pools	1	31	3	1				1	2	1														3	1							44				B Pools	
Boote nsee	n Pools 12s Mito		1									1																						3			B Pools 12s Mito	
Chemsee	n Individuen	81	157	2	3				2			9	11												7					35	338	645					C Ind	
Chemsee	n Pools	6	9	1	1				1			3	1												3					3	17		45				C Pools	
Chemsee	n Pools 12s Mito	1																													1			2			C Pools 12s Mito	
Dirnstein	n Individuen									176	2	2	323									15										518					DS Ind	
Dirnstein	n Pools									100	2	2	14									15											133				DS Pools	
Dirnstein	n Pools pos 12s Mito									5			4										2											11			DS Pools 12s Mito	
Eberstadt	n Individuen									36			156									2											194				ES Ind	
Eberstadt	n Pools									2			8									1												11			ES Pools	
Eberstadt	n Pools pos 12s Mito									2			5																					7			ES Pools 12s Mito	
Elbe / Coswig	n Individuen	2	132	12	1				74													5				9						235					E/C Ind	
Elbe / Coswig	n Pools	2	7	2	1				3													2				1							18				E/C Pools	
Elbe / Coswig	n Pools 12s Mito		1	1					1													1												4			E/C 12s Mito	
Greifswald / Eldena	n Individuen									85												50										135					GR Ind	
Greifswald / Eldena	n Pools									4												2												6			GR Pools	
Greifswald / Eldena	n Pools 12s Mito																																		0			GR 12s Mito
Großsachsen	n Individuen				1				75			327	20		70	71													3			567					G Ind	
Großsachsen	n Pools				1				4			17	2		4	9													2			39					G Pools	
Großsachsen	n Pools 12s Mito								4			14			4	2																	24				G 12s Mito	
Hemsbach	n Individuen								14	35		28	1																			78					HB Ind	
Hemsbach	n Pools								2	3		4	1																				10				HB Pools	
Hemsbach	n Pools pos 12s Mito								1			1																					2				HB Pools 12s Mito	
Insel Rott	n Individuen	21	645								24	19										2			1						1	713					IR Ind	
Insel Rott	n Pools	2	26								1	1										2				1					1	34					IR Pools	
Insel Rott	n Pools 12s Mito		9									1																					10				IR 12s Mito	
Isar	n Individuen	168	3710	3	8	4			61		7	15										37			6				2	69	4090						I Ind	
Isar	n Pools	10	181	3	5	3			3		1	1										5			2				1	5	220						I Pools	
Isar	n Pools 12s Mito	5	67						1																								74				I 12s Mito	
Kühkopf	n Individuen	9	1 5826	128	8	61			102		20	73	1									1	25		16	22					13	6306					K Ind	
Kühkopf	n Pools	7	1 253	24	2	10			16		2	5	1									1	4		6	10					4		346				K Pools	
Kühkopf	n Pools 12s Mito		44	4					2			2													1								53					K 12s Mito
Loissin	n Individuen						1		43														15										59					L Ind
Loissin	n Pools						1		2														1										4					L Pools
Loissin	n Pools 12s Mito																																	0				L 12s Mito
Mettenheim	n Individuen						1		3	7			172																				183					MH Ind
Mettenheim	n Pools						1		1	1			8																				11					MH Pools
Mettenheim	n Pools pos 12s Mito												3																				3				MH Pools 12s Mito	
Mümling-Grumbach	n Individuen					1			17	4	79				5	1	1															108						MG Ind
Mümling-Grumbach	n Pools					1			1	1	5				1	1	1																11					MG Pools
Mümling-Grumbach	n Pools pos 12s Mito								1	1	2				1	1																	6					MG Pools 12s Mito
Neckargebach	n Individuen								24			67											2										93					NG Ind
Neckargebach	n Pools								2			5											1										8					NG Pools
Neckargebach	n Pools pos 12s Mito								2			3																					5					NG Pools 12s Mito

Tabelle 19.6.: Übersicht über die in 2012 gefangenen Stechmücken - Auflistung nach Standort (Teil 2)

Standort	Kategorie	<i>Ae. cinereus</i>	<i>Ae. rosâicus</i>	<i>Ae. vexans</i>	<i>An. claviger</i>	<i>An. maculipennis</i>	<i>An. plumbeus</i>	<i>Cx. annulata</i>	<i>Cx. modestus</i>	<i>Cx. pipiens molestus</i>	<i>Cx. pipiens pipiens</i>	<i>Cx. pipiens pipiens, Cx. pipiens molestus, Cx. torrentium</i>	<i>Cx. pipiens pipiens</i> x <i>Cx. pipiens molestus</i>	<i>Cx. pipiens pipiens, Cx. pipiens molestus</i>	<i>Cx. pipiens pipiens, Cx. torrentium</i>	<i>Cx. pipiens pipiens, unbekannt</i>	<i>Cx. pipiens pipiens / torrentium - negativ oder unbekannt</i>	<i>Cx. pipiens pipiens / torrentium - nicht näher bestimmt</i>	<i>Cx. terreans</i>	<i>Cx. torrentium, Cx. pipiens molestus</i>	<i>Cx. torrentium</i>	<i>Ma. richiardii</i>	<i>Oc. annulipes / Oc. cantans</i>	<i>Oc. annulipes</i>	<i>Oc. cantans</i>	<i>Oc. caaptus</i>	<i>Oc. communis</i>	<i>Oc. flavescens</i>	<i>Oc. geniculatus</i>	<i>Oc. punctor</i>	<i>Oc. rusticus</i>	<i>Oc. sticticus</i>	Gesamt Individuen	Gesamt Pools	Gesamt Pools 12s Mito	Gesamt Pools <i>D. repens</i>	Standort
Neustadt	n Individuen									36	15	6	125	6							22											210			Nstd Ind		
Neustadt	n Pools									36	2	1	7	6							22											74			Nstd Pools		
Neustadt	n Pools pos 12s Mito									2	1	1	1								2										7			Nstd Pools 12s Mito			
Oder Hohe nnutzen	n Individuen		94	94						147				125							23		4	12	4				4		507			OH Ind			
Oder Hohe nnutzen	n Pools		4	4						6				5							1		1	1	1				1		24			OH Pool			
Oder Hohe nnutzen	n Pools 12s Mito				2					2											1		1								6			OH 12s Mito			
Oder Hohe nnutzen	n Pools LuplmmRep				2																										2			OH LuplmmRep			
Oder Zollbrücke	n Individuen	2	249	1	20		13														11	25	1								322			OZB Ind			
Oder Zollbrücke	n Pools	1	12	1	2		1														1	1	1	1							20			OZB Pools			
Oder Zollbrücke	n Pools 12s Mito		1																					1							2			OZB 12s Mito			
Oder Zollbrücke	n Pools LuplmmRep		1																												1			OZB LuplmmRep			
Osterseen	n Individuen	5	5	2						1																			2	15				O Ind			
Osterseen	n Pools	1	1	1						1																			1	5				O Pools			
Osterseen	n Pools 12s Mito																														0			O 12s Mito			
Römerberg	n Individuen				2	2		79	413				1208	37																	1741			RB Ind			
Römerberg	n Pools				2	2		10	19				58	2																	93			RB Pools			
Römerberg	n Pools pos 12s Mito							1	6				20																		27			RB Pools 12s Mito			
Rusheimer Altrhein	n Individuen	3	817	5	1	4		132			21	57									1										1041			RA Ind			
Rusheimer Altrhein	n Pools	2	34	3	1	2		7			2	3									1										55			RA Pools			
Rusheimer Altrhein	n Pools 12s Mito		2							1																						3			RA 12s Mito		
Sandhausen	n Individuen						1	7	25				238																		261			SH Ind			
Sandhausen	n Pools						1	1	1				10																		13			SH Pools			
Sandhausen	n Pools pos 12s Mito												7																		7			SH Pools 12s Mito			
Strüth	n Individuen				407								1																		408			S Ind			
Strüth	n Pools				17								1																		18			S Pools			
Strüth	n Pools pos 12s Mito																														0			S Pools 12s Mito			
Waghäusel	n Individuen	1	380	92	5	14		19	25	30	66										1	57						1		691			WH Ind				
Waghäusel	n Pools	1	20	9	2	7		3	1	2	3										1	15						1		65			WH Pools				
Waghäusel	n Pools 12s Mito		6	3		1							2									1	2								15			WH 12s Mito			
Wałsee	n Individuen												48																		48			W Ind			
Wałsee	n Pools												2																		2			W Pools			
Wałsee	n Pools 12s Mito																														0			W 12s Mito			
Weinheim	n Individuen				2	11	1	37	347			1532	21		38	36											2			2027			W Ind				
Weinheim	n Pools				2	8	1	9	18			80	3		2	9											2			134			W Pools				
Weinheim	n Pools 12s Mito				1		3	8				41	1		1	3															58			W 12s Mito			
Zoo	n Individuen				1	3		73	229	1	11	608	6				51														983			Zoo Ind			
Zoo	n Pools				1	2		15	14	1	4	43	2				8														90			Zoo Pools			
Zoo	n Pools 12s Mito									1		4																			6			Zoo 12s Mito			

Tabelle 19.7.: Übersicht über die in 2012 gefangenen Stechmücken - Auflistung nach Standort (Teil 3)