

1284

FRANK KUHNERT

Untersuchungen
zur *in vitro* Zucht von
Schildzecken (Acari: Ixodidae)

**Untersuchungen
zur *in vitro* Zucht von
Schildzecken (Acari: Ixodidae)**

Thèse présentée à la Faculté des Sciences
de l'Université de Neuchâtel (Suisse)
pour obtenir le grade de docteur ès sciences

par
FRANK KUHNERT
1995

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Kuhnert, Frank:

Untersuchungen zur *in vitro* Zucht von Schildzecken (Acari: Ixodidae) / par Frank Kuhnert. - Göttingen : Cuvillier, 1995

Zugl.: Neuchâtel, Univ., Diss., 1995

ISBN 3-89588-286-0

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 1995

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-43218

Telefax: 0551-41860

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 1995

Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 3-89588-286-0

IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Untersuchungen zur *in vitro* Zucht von Schildzecken
(Acari: Ixodidae)

de M. Frank Kuhnert

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL
FACULTÉ DES SCIENCES

La Faculté des sciences de l'Université de
Neuchâtel sur le rapport des membres du jury,

Messieurs P.A. Diehl, P. Guerin, J.-F. Graf (St-Aubin),
J.Grunewald (Tübingen) et U. Feldmann (Vienne)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 11 juillet 1995

Le doyen:



H.-H. Nägeli

Alles Leben ist Problemlösen

(C. Popper, Philosoph)

und Kampf gegen den Schmutz

(A. Popova, Putzfrau)

INHALT

1. Einführung	1
1.1. Zur Biologie und Systematik der Zecken.....	1
1.2. Wirtsfindung, Paarung und Blutmahlzeit bei Schildzecken.....	4
1.3. <i>In vitro</i> Fütterung.....	9
1.3.1. Fütterung durch Kapillarröhrchen.....	10
1.3.2. Fütterung auf Membranen.....	10
1.4. Ziel der Arbeit.....	14
2. Tiere, Material und Methoden	15
2.1. Die Zecken	15
2.1.1. <i>Amblyomma hebraeum</i> und <i>Amblyomma variegatum</i>	15
2.1.2. <i>Boophilus microplus</i>	17
2.1.3. <i>Ixodes ricinus</i>	18
2.2. Substanzenverzeichnis.....	19
2.3. Das Futterblut.....	21
2.4. Begriffe und Definitionen.....	25
2.5. Die Kontamination <i>in vitro</i> mit Pilzen und Bakterien	28
2.5.1. Vorversuche	28
2.5.2. Pilzmyzel unter verschiedenen Versuchsbedingungen <i>in vitro</i>	28
2.5.3. Indirekter Nachweis bakterieller Kontaminationen <i>in vitro</i>	29
2.6. Die Durchfluß-Fütterungskammer	30
2.7. Die Fütterungsgläser	34
2.8. Die Membranen	37
2.8.1. Membranen für Vorversuche	37
2.8.2. Membranen für Fixierungs- und Fütterungsversuche	37
2.9. Die Fixierungsstimuli.....	44
2.10. Versuche mit adulten <i>A. hebraeum</i> auf Kaninchen und Rindern	52
2.10.1. Vorfütterung männlicher <i>A. hebraeum</i> auf Kaninchen.....	52
2.10.2. Infestierung von Rindern mit künstlichen adulten <i>A. hebraeum</i> ..	53
2.11. Die Versuchsauswertung.....	54
2.11.1. Fixierungsversuche	54
2.11.2. Fütterungsversuche.....	56
2.12. Akarizid-Test <i>in vitro</i> mit <i>A. hebraeum</i> Nymphen.....	59
2.12.1. Das Prinzip	59
2.12.2. Die Zecken.....	60
2.12.3. Die Substanzen	60
2.12.4. Die Auswertung	60

3. Ergebnisse.....	63
3.1. <i>In vitro</i> Fixierung.....	63
3.1.1. <i>In vitro</i> Fixierung von <i>I. ricinus</i>	63
3.1.2. <i>In vitro</i> Fixierung von <i>B. microplus</i>	63
3.1.3. <i>In vitro</i> Fixierung von <i>A. variegatum</i>	64
3.1.4. <i>In vitro</i> Fixierung von <i>A. hebraeum</i>	65
3.1.4.1. Larven.....	65
3.1.4.2. Nymphen.....	65
3.1.4.3. Adulte.....	70
3.2. <i>In vitro</i> Fütterung.....	74
3.2.1. Kontaminationsprobleme.....	74
3.2.1.1. Pilze.....	74
3.2.1.2. Bakterien.....	80
3.2.2. <i>In vitro</i> Pütterung von <i>I. ricinus</i>	81
3.2.3. <i>In vitro</i> Fütterung von <i>B. microplus</i>	82
3.2.3.1. Natürliche Larven.....	83
3.2.3.2. Künstliche Nymphen.....	83
3.2.3.3. Künstliche Adulte.....	84
3.2.3.4. Natürliche Adulte.....	84
3.2.4. <i>In vitro</i> Fütterung von <i>A. variegatum</i>	85
3.2.5. <i>In vitro</i> Fütterung von <i>A. hebraeum</i>	87
3.2.5.1. Larven.....	87
3.2.5.2. Nymphen.....	88
3.2.5.2.1. <i>In vitro</i> Standard-Behandlung.....	88
3.2.5.2.2. Verschiedene <i>in vitro</i> Behandlungen.....	90
3.2.5.2.3. Natürliche und künstliche Nymphen <i>in vitro</i>	94
3.2.5.3. Adulte.....	96
3.2.5.3.1. <i>In vitro</i> Behandlungen.....	96
3.2.5.3.2. Natürliche und künstliche Weibchen <i>in vitro</i>	99
3.2.5.3.3. Zirkadiane Rhythmik des Abfallens der Weibchen.....	100
3.2.5.3.4. Einflüsse auf die Entwicklung der Weibchen <i>in vitro</i>	100
3.2.5.3.5. Infestierung von Kindern mit künstlichen Adulten.....	103
3.2.5.4. Der Lebenszyklus <i>in vitro</i>	104
3.3. Akarizid-Test <i>in vitro</i> mit <i>A. hebraeum</i> Nymphen.....	107

4. Diskussion.....	109
4.1. Die Membranen.....	109
4.1.1. Tierisches Material.....	109
4.1.2. Teflon.....	110
4.1.3. Silikon.....	111
4.2. In vitro Fixierung.....	112
4.2.1. Fixierungsstimuli.....	112
4.2.2. In vitro Fixierung von <i>I. ricinus</i>	115
4.2.3. In vitro Fixierung von <i>B. microplus</i>	115
4.2.4. In vitro Fixierung von <i>Amblyomma</i>	118
4.2.4.1. <i>A. variegatum</i>	118
4.2.4.1.1. Nymphen.....	118
4.2.4.1.2. Adulte.....	119
4.2.4.2. <i>A. hebraeum</i>	120
4.2.4.2.1. Larven.....	120
4.2.4.2.2. Nymphen.....	120
4.2.4.2.3. Adulte.....	122
4.2.5. Zusammenfassung.....	124
4.3. In vitro Fütterung.....	125
4.3.1. Kontaminationsprobleme.....	125
4.3.2. Saugstimuli und Futterqualität.....	129
4.3.3. In vitro Fütterung von <i>I. ricinus</i>	132
4.3.4. In vitro Fütterung von <i>B. microplus</i>	133
4.3.5. In vitro Fütterung von <i>A. variegatum</i>	134
4.3.6. In vitro Fütterung von <i>A. hebraeum</i>	135
4.3.6.1. Larven.....	135
4.3.6.2. Nymphen.....	136
4.3.6.3. Adulte.....	139
4.3.6.4. Infestierung von Rindern mit künstlichen Adulten.....	148
4.4. Zu beiden in vitro Fütterungssystemen.....	149
4.5. Akarizid-Test in vitro mit <i>A. hebraeum</i> Nymphen.....	151
4.6. Ausblick.....	151
5. Zusammenfassung.....	153
6. Summary.....	155
7. Résumé.....	157
8. Dank.....	159
9. Tabellenverzeichnis.....	160
10. Abbildungsverzeichnis.....	162
11. Literatur.....	163
12. Anhang.....	177

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Es sind die im Text gebrauchten Abkürzungen aufgelistet.

AAP	aggregation attachment pheromone
AMB	Amphotericin B
ATP	Adenosintriphosphat
BEA	Benzaldehyd
d	Tag
2,6-DCP	2,6-Dichlorphenol
2,3-DPG	2,3-Diphosphoglycerat
DD	Dauerdunkel
DFK	Durchfluß-Fütterungskammer
DMSO	Dimethylsulfoxid
ENI	Enilconazol
PG	Fütterungsglas / -gläser
GEN	Gentamicin
GLF	Glycerolformal
GSH	Glutathion, reduziert
ITR	Itraconazol
IVM	Ivermectin
MES	Methylsalicylat
n. I.	nach Infestierung
NOA	Pelargonsäure (Nonansäure)
NYS	Nystatin
ONP	<i>ortho</i> -Nitrophenol
FIG	pheromoninprägnierte Gummikappe
PRG	Propylenglykol
PS	Penizillin / Streptomycin
rF	relative Luftfeuchte
SPM	synthetische Pheromon-Mischung
TMP	iso-Buttersäure (2-Methylpropansäure)
UV-C	UV-C-Bestrahlung
VE	Versuchseinheit
VB	Versuchsblock

1. EINFÜHRUNG

Schildzecken (Acari: Ixodidae) sind blutsaugende, in der ganzen Welt anzutreffende Parasiten. Ihre lange Blutmahlzeit schwächt den Wirt und führt bei starkem Befall oft zu Sekundärinfektionen und Schmerzen. Zudem können Schildzecken beim Sangakt folgenschwere Krankheiten auf Mensch und Tier übertragen. Dazu gehören u. a. Lyme-Borreliose und Frühsommer-Meningoenzephalitis bei Menschen, sowie Anaplasmosen, Babesiosen, Theileriosen und die Herzwasser-Krankheit bei Nutztieren in tropischen und subtropischen Regionen (Uilenberg, 1992). Auf diese Weise verursachen sie jährlich wirtschaftliche Einbußen in Milliardenhöhe. Die Suche nach modernen, wirtschaftlich und ökologisch vertretbaren Kontrollstrategien wie z. B. systemische Akarizide, fraßhemmende und abstoßende Substanzen, erzeugt eine rege Nachfrage nach allen drei Entwicklungsstadien solcher Zecken. Laborzuchten benötigen eine Reihe von Säugetieren als Wirte zur Fütterung der Larven, Nymphen und Adulten. Dazu gehören, je nach Zeckenart, Mäuse, Kaninchen, Schafe oder Rinder, die in der Regel jeweils nur einmal mit den Parasiten besetzt werden können. Seit einigen Jahren tauchen verstärkt ethische Fragen zum Einsatz von Säugetieren in Tierexperimenten auf. Dies gibt der Erforschung alternativer Fütterungsmethoden für blutsaugende Gliederfüßer im allgemeinen und für Schildzecken im besonderen neuen Auftrieb.

1.1. Zur Biologie und Systematik der Zecken

Die zu den Spinnentieren (nicht zu den Insekten) gehörenden human- und besonders veterinärparasitologisch wichtigen Schildzecken (Ixodidae) treten je nach Entwicklungsstadium als sechsbeinige Larve, als Nymphe oder Adultus (beide achtbeinig) in Erscheinung. Ihren Namen verdankt diese Gruppe dem bei den Männchen am größten ausgebildeten, harten Rückenschild, welches sie neben anderen Merkmalen von den unbedeutenderen, weichen Lederzecken (Argasidae) unterscheidet.

Jedes der drei Stadien Larve, Nymphe und Adultus, ist zur Weiterentwicklung auf ein Blutmahl an einem gewöhnlich warmblütigen Wirt angewiesen. Im allgemeinen schließt sich an die parasitische Phase der Blutaufnahme die Häutung zum nächsten Entwicklungsstadium

oder aber, bei erwachsenen weiblichen Zecken, die Bildung von Eiern, deren Ablage und der Tod an. Die Männchen leben länger und können sich mehrmals mit demselben und danach noch mit anderen Weibchen paaren, bevor auch sie zugrunde gehen (Oliver, 1982).

Die in dieser Arbeit verwendeten Zeckenarten sind

- *Boophilus microplus*
- *Ixodes ricinus*
- *Amblyomma variegatum*
- *Amblyomma hebraeum*

Die folgende Tab. 1-1 zeigt die systematische Stellung dieser Arten (insgesamt etwa 850 Arten in 3 Familien und 19 Gattungen), ausgehend von den Gliederfüßern (Arthropoda).

Tab. 1-1 -- Systematische Stellung der verwendeten Zeckenarten --

Stamm:	Arthropoda (Gliederfüßer)				
Klasse:	Chelicerata (Fühlerlose)				
Unterklasse:	Arachnida (Spinnentiere)				
Ordnung:	Acari (Milben)				
Unterordnung:	Metasigmata (Zecken)				
Familie:	Ixodidae		Argasidae	Nuttalliellidae	
	(Schildzecken)		(Lederzecken)		
Unterfamilie:	Ixodinae	Amblyomminae	Rhipicephalinae		
Gattung:	<i>Ixodes</i>	<i>Amblyomma</i>	<i>Boophilus</i>	<i>Argas, Ornithodoros</i>	<i>Nuttalliella</i>
Art:	<i>ricinus</i>	<i>hebraeum</i> <i>A. variegatum</i>	<i>microplus</i>		

Boophilus microplus (Canestrini, 1887), die Rinderzecke, hat die veterinärmedizinisch größte Bedeutung. Sie ist im Gegensatz zu den drei anderen Arten einwirtig, d. h., daß alle drei Entwicklungsstadien auf demselben Wirtstier verbleiben und sich dort vollsaugen und häuten. Dazu braucht es bei dieser Zecke insgesamt nur etwa 3 Wochen (Roberts, 1968), und der ganze Lebenszyklus kann bei kurzer Wirtssuche der Larven und hohen Temperaturen in 6 Wochen ablaufen (Núñez *et al.*, 1985), bei im Durchschnitt 25°C in 9 Wochen (Camino-Lavín, 1980, zitiert nach Barré, 1989). *B. microplus* finden wir meist auf Rindern in Teilen Mittel- und Südamerikas, Afrikas, und Ozeaniens, wo sie Anaplasmen (Bacteria: Ordnung Rickettsiales) und Babesien (Protozoa: Ordnung Piroplasmida) übertragen können.

Ixodes ricinus (Linneaus, 1758), der Holzbock, ist in Mitteleuropa heimisch und braucht für den Saugakt jedes Entwicklungsstadiums einen anderen Wirt (dreiwirtige Zecke). Während die Larven und Nymphen meist auf kleinen Wirbeltieren anzutreffen sind (z. B. Vögel, Mäuse, Kaninchen), finden wir die Adulten auf Rehen, Schafen, Hunden usw.. Auch der Mensch gehört bisweilen zum Wirtsspektrum aller drei Stadien, so daß dieser Zecke eine humanparasitologische Bedeutung als Überträger (Vektor) viraler (u. a. Frühsommer-Meningoenzephalitis; FSME) oder bakterieller Erkrankungen (u. a. Lyme-Krankheit) zukommt. Die nicht-parasitischen Phasen von *I. ricinus* können Monate am Boden (z. B. in der Laubstreu) als Ruhestadien überdauern. Eine weitere Besonderheit bildet die Paarung der Adulten der Gattung *Ixodes*. Diese läuft oft außerhalb des Wirtes ab (Graf, 1974; Fourie & Kok, 1995). Vor allem muß zuvor kein Blut gesaugt worden sein, wie es bei den anderen Vertretern der Ixodidae der Fall ist.

Amblyomma variegatum (Fabricius, 1794) ist in den meisten tropischen und subtropischen Regionen Afrikas und auf den Karibischen Inseln beheimatet und ist dreiwirtig. Larven und Nymphen bevorzugen kleine Wirbeltiere und Huftiere, Adulte findet man meist auf Wiederkäuern. Der Lebenszyklus dauert selbst unter Laborbedingungen, wo sich die Wirtssuche erübrigt, fast 5 Monate (Centurier & Klima, 1979; Garris, 1984; Barré, 1989). *A. variegatum* überträgt u. a. die rickettsialen Erreger der Herzwasser-Krankheit (*Cowdria ruminantium*) und des Q-Fiebers (*Coxiella burnetti*).

Amblyomma hebraeum Koch, 1844, hat einen, auch in Laborkolonien extrem langen Lebenszyklus (6 - 8 Monate; Norval, 1974). Das natürliche Vorkommen dieser Zecke ist auf das südliche Afrika begrenzt (Walker & Olwage, 1987). Wirtspräferenzen und Vektorpotential sowie übertragene Krankheiten entsprechen größtenteils denen der vorgenannten Art. Zusätzlich dient *A. hebraeum* auch als dreiwirtiges Zeckenmodell in der industriellen Akarizidforschung.

1.2. Wirtsfindung, Paarung und Blutmahlzeit bei Schildzecken

Im Gegensatz zu allen anderen blutsaugenden Gliederfüßern, deren Saugakt zwischen wenigen Sekunden und maximal einer Stunde dauert, bleibt bei den Schildzecken jedes Entwicklungsstadium an seinem Fraßort 2 - 14 Tage lang fest verankert. Solch eine beträchtliche Investition seitens der Zecke ist vom Auffinden eines geeigneten Wirtes bis hin zur Wahl des passenden Fraßortes von einer Folge festgelegter Verhaltensweisen begleitet (Waladde & Rice, 1982). Diese entscheidenden, der eigentlichen Blutmahlzeit vorausgehenden Schritte, stützen sich auf eine Mischung bestimmter thermischer, hygrischer, mechanischer, gustatorischer und ollaktorischer Stimuli (Lees, 1948; Waladde & Rice, 1982; Norval *et al.*, 1989ab; Steullet & Guerin, 1992ab, 1994ab).

So fühlten sich z. B. hungrige Nymphen und Larven von *I. ricinus* von einer Wärmequelle (37°C) angezogen und Weibchen fixierten *in vitro* nur auf Lamunfell, wenn seine Temperatur um 37°C lag, aber nicht bei Raumtemperatur (Lees, 1948). Doube & Kemp (1979) beobachteten die höchsten *in vitro* Fixierungsraten von *B. microplus* Larven auf Rinderfell im Bereich von 31°- 38°C. Bei geringer Luftfeuchte nahm die Sterblichkeit nicht-fixierter Larven in diesen Versuchen zu. Daraus läßt sich ableiten, daß Haare und Hautfalten des Wirtes nicht nur einen mechanischen Reiz für die Zecken darstellen, sondern ihnen auch erhöhten Schutz vor Austrocknung sowie vor Abschütteln und vor Freßfeinden bieten. Diese taktilen Reize sind *in vivo* stets mit Geruchs- und Geschmacksstimuli kombiniert. Zu den von Wirtstieren ausgehenden und von Zecken, beispielsweise *A. variegatum*, wahrnehmbaren und für das Auffinden der Wirte wichtigen, flüchtigen Substanzen gehören u. a. CO₂, H₂S, NH₃, bestimmte aliphatische Aldehyde und Fettsäuren (Steullet & Guerin, 1994ab). Haben die Zecken den Wirt erreicht, können sie u. a. in dessen Haaren und auf dessen Haut gustatorische Stimuli vorfinden, u. a. Salze, Harnstoff, Lipide (Altman & Dittmer, 1974; Downing *et al.*, 1987; Oku *et al.*, 1990). Ein Extrakt aus Rinderhaaren bewirkte bei *B. microplus* Larven ein Verbleiben auf einer damit behandelten Membranfläche (Guerin *et al.*, 1992) und dürfte so die Wahrscheinlichkeit zum Fixieren erhöhen. Der Kontakt mit Substanzen im Nährmedium scheint ebenfalls für die Wahl des Fraßortes mitentscheidend zu sein. Adenosintriphosphat (ATP) und reduziertertes Glutathion (GSH), die beide in Blutzellen von Wirbeltieren vorkommen, wirkten als gustatorische Stimuli *in vitro* und

verbesserten das Festsetzen weiblicher Rinderzecken über gezuckerter Salzlösung (Kemp *et al.*, 1982).

Bei der blutsaugenden Milbenart *Dermanyssus gallinae* sind für die Einleitung der Nahrungsaufnahme in den Hautlipiden ihrer Wirte (Geflügel) vorkommende Fettsäure-Diester verantwortlich (Zeman, 1988). Bei der an Larven und Puppen von Honigbienen parasitierenden Milbe *Varroa jacobsoni* sind es, neben flüchtigen aliphatischen Fettsäureestern und Palmitinsäure, Alkangemische auf der Kutikula von Arbeiterbienen, die ihnen den rechten Weg zum Fraßort weisen (LeConte *et al.*, 1989; Rickli *et al.*, 1992, 1994). Räudemilben der Hunde (*Sarcoptes scabiei* var. *canis*) werden u. a. von Fettsäuren und deren Methylestern in der Wirtshaut angelockt (Arlian & Vyszynski-Moher, 1995).

Aber auch von den Zecken selbstproduzierte Substanzen können anlockend wirken. Sie erleichtern das gegenseitige Auffinden und Ansammeln von Zecken in nicht-parasitischen Phasen sowie u. a. das Erkennen eines geeigneten Wirtes und sexuell reifer Geschlechtspartner. Guanin, ein Endprodukt des Stickstoff-Metabolismus in Spinnentieren, wurde von Hamdy (1972) im Kot mehrerer Schildzeckenarten nachgewiesen. Otieno *et al.* (1985) beobachteten eine von Guanin ausgehende attraktive Wirkung für *Amblyomma cohaerens* Larven und *Rhipicepholus appendiculatus* Adulte. Bei Waladde *et al.* (1991) hatte arteigener Kot einen positiven Effekt auf die *in vitro* Fixierung adulter *R. appendiculatus*.

Ein weiteres Beispiel von Zecken abgegebener Stoffe sind deren meist flüchtige Pheromone. Diese können im Fern- oder Nahbereich auf Artgenossen anziehend wirken und so z. B. zur Klumpenbildung (Cluster) von Zecken auf dem Wirt führen (Aggregations-Fixierungs-Pheromone). Oder sie greifen als (Kontakt-) Sexualpheromone direkt in die Kopulation der Zeckenpaare ein. Bei einigen *Amblyomma* Arten, u. a. *A. hebraeum* und *A. variegatum*, besteht ein Teil der für die Wirtsfindung und Fixierung wichtigen Geruchsreize aus den Aggregations-Fixierungs-Pheromonen ("aggregation-attachment pheromone"; AAP), die von den saugenden Männchen 3 - 5 Tage (d) nach Beginn ihrer Blutmahlzeit in zunehmender Menge abgegeben werden. Ein Rind, das mit einem Extrakt vorgefütterter *A. hebraeum*-Männchen als geeignete Futterquelle "markiert" worden war, lockte ungesogene Zecken beiderlei Geschlechts aus bis zu 9 m Entfernung an (Norval *et al.*, 1989a). Das Aggregations-Fixierungs-Pheromon von *A. variegatum* besteht aus *ortho*-Nitrophenol (ONP) und Methylsalicylat (MES) aus einem seitlich und am Bauch liegenden Hautdrüsentyp sowie u. a. Pelargonsäure (nonanoic acid,

Nonansäure; NOA) (Schöni *et al.*, 1984; Diehl *et al.*, 1991). Männliche *A. hebraeum* senden als Hauptbestandteile ONP, iso-Buttersäure (2-methylpropanoic acid; TMP) und Benzaldehyd (BEA) aus (Apps *et al.*, 1988; Price *et al.*, 1994). Ungesogene Männchen und Weibchen (Schöni *et al.*, 1984; Rechav *et al.*, 1977) und Nymphen (Rechav *et al.*, 1976; Norval *et al.*, 1992b) der jeweiligen Art werden auf diese Weise animiert, sich neben sexuell reifen, pheromonverströmenden Männchen festzusaugen, was Cluster erzeugt. In Abwesenheit dieser Pheromone fixieren sich die Weibchen gar nicht (Norval, 1974; Rechav *et al.*, 1977) und ungesogene Männchen, je nach Wirtstierart, nur zögernd (Norval *et al.*, 1992a).

Eine als Sexualpheromon vieldiskutierte Substanz ist das 2,6-Dichlorphenol (2,6-DCP). Es wurde zuerst in Weibchen von *Amblyomma americanum* (Berger, 1972) und später in mindestens 14 anderen Schildzeckenarten gefunden und als Sexualpheromon beschrieben (Wood *et al.*, 1975; Sonenshine, 1985). Es soll auf dem Wirt auf kurze Distanz und meist artunspecific die verschiedenen Geschlechter zusammenbringen ("attractant sex pheromone"). Auch in vorgefütterten Männchen und Weibchen von *A. variegatum* und *A. hebraeum* entdeckte man diese Verbindung (Lusby *et al.*, 1991; Price *et al.*, 1994). Die der Partnerfindung und der Paarung dienenden (Sexual)-Pheromone von *I. ricinus* und *B. microplus* sind noch nicht bekannt. De Bruyne & Guerin (1994) konnten zwar 2,6-DCP aus Extrakten verschiedener, auch ungesogener Entwicklungsstadien von *B. microplus* isolieren; auch wurde eine Erregung von Sinneszellen auf den Füßchen des ersten Beinpaars der Männchen durch diese Verbindung gemessen. Eine Verhaltensreaktion der Männchen, z. B. Aufsuchen der Substanzquelle oder Einleitung der Paarung bei Kontakt mit 2,6-DCP blieb jedoch aus. Welche genaue Rolle diesem artübergreifend vorkommenden Stoff im natürlichen Verhaltensrepertoire speziell der Rinderzecken zukommt, bleibt vorerst unklar.

Als nicht-flüchtiges Pheromon wurde bisher für *Dermacentor andersoni*, *Dermacentor variabilis*, *A. americanum*, *Amblyomma maculatum*, *Rhipicephalus sanguineus* und *R. appendiculatus* das "mounting sex pheromone" beschrieben. Treffen männliche auf weibliche Zecken, werden die Weibchen erklettert und von Bauch zu Bauch umklammert. Für das Erkunden und Besteigen der saugenden Weibchen wird der Kontakt der Männchen u. a. mit den auf der weiblichen Kutikula reichlich vorkommenden Sterolestern verantwortlich gemacht (Hamilton & Sonenshine, 1988; Hamilton *et al.*, 1989, 1994; Sonenshine *et al.*, 1992).

An diesem Punkt, so wird berichtet, tritt nun ein artspezifisches genitales Sexualpheromon ("genital sex pheromone") in Aktion, welches aus dem Bereich der weiblichen Geschlechtsöffnung stammt und die eigentliche Kopulation einleitet. Für vorgefütterte *D. andersoni* und *D. variabilis* handelt es sich dabei um Mischungen bestimmter Fettsäuren und deren Methylester (Allan *et al.*, 1988) sowie möglicherweise um Steroide (Sonenshine, 1985). Auch in *A. americanum* wurde ein ähnliches genitales Sexualpheromon entdeckt, jedoch nicht in *A. maculatum*, einer Zeckenart, die, wie schon oben für *A. hebraeum* und *A. variegatum* beschrieben, ein Aggregations-Fixierungs-Pheromon besitzt (Allan *et al.*, 1991). Aus dem Gesagten wird klar, daß die Trennungslinie zwischen Substanzen, welche die Zecken aktivieren, sie zum Wirt oder zu Artgenossen hinlocken, deren Festsetzen auf dem Wirt fördern oder in das Paarungsverhalten der Zecken eingreifen, nicht immer deutlich gezogen werden kann. Dies dürfte erst recht für *in vitro* Versuche gelten, in denen aufgrund der Platzverhältnisse die Konzentrationsgradienten flüchtiger Stoffe verändert sind und Verhaltensweisen zum Finden des Wirts keinen Sinn mehr haben.

Zwei der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zeckenarten (*A. hebraeum* und *A. variegatum*) zeigen, neben dem von sexuell reifen Männchen verströmten Aggregations-Fixierungs-Pheromon, eine weitere Besonderheit. Bei der geringsten Störung richten fixierte und sexuell gereifte Männchen beider Spezies ihren Hinterleib nach oben. Was auch immer sie mit ihren Beinen zu fassen bekommen, wird umklammert ('claspings') und in Paarungsposition gedreht (Obenchain, 1984; Schöni, 1987; Norval, 1974). Ergriffene weibliche Zecken setzen sich daraufhin bei diesen Männchen Bauch zu Bauch fest, die dann ihrerseits mit den Mundwerkzeugen die weibliche Genitalöffnung erkunden. Oft schon 20 min später, so beobachtete Norval, konnte bei *A. hebraeum* die erste von den Männchen übergebene, normalerweise mit Samenzellen und Sekreten gefüllte Spermatophore im Geschlechtstrakt der Weibchen gefunden werden. Die Möglichkeit einer ähnlich raschen Spermatophoren-Übergabe wurde auch für *Hyalomma (anatolicum) excavatum* und *R. sanguineus* berichtet (Feldman-Muhsam & Borut, 1971).

Fehlt die Paarung der Zecken oder ist sie unvollständig, bleiben die Weibchen deutlich unter ihrer üblicherweise erreichbaren Körpermasse und legen, von seltenen Ausnahmen der Jungferzeugung (Parthenogenese) abgesehen, keine oder wenige, oft unfruchtbare Eier (Diehl *et al.*, 1982; Oliver, 1986). Während bei *Ixodes*-Arten (Prostriata) die

Begattung meist zwischen ungesogenen Zecken und auch außerhalb des Wirtes stattfindet, läuft sie bei anderen Schildzeckenarten (*Metastrata*) nur im Rahmen des Saugaktes auf dem Wirt ab (Balashov, 1972; Diehl *et al.*, 1982). Die ordnungsgemäße Paarung setzt z. B. bei *A. hebraeum* und *A. variegatum* in den ersten Etappen zumindest sexuell gereifte, d. h. vorgefütterte Männchen voraus. Die zur eigentlichen Befruchtung nötigen Eizellen reifen in den Weibchen aber nur während ihrer Blutmahlzeit heran (Balashov, 1972; Diehl *et al.*, 1982). Die vollständige Paarung bedeutet bei *metastrati*en Zecken (u. a. *A. variegatum*, *A. hebraeum* und *B. microplus*) 1) bäuchlings zueinander fixierte und sich umklammernde Geschlechtspartner, 2) Bildung mindestens einer, Samenzellen und Sekrete der männlichen genitalen Anhangsdrüsen enthaltenden Spermatophore, 3) Einführen der männlichen Mundwerkzeuge in die weibliche Geschlechtsöffnung (Feldman-Muhsam & Borut, 1971), 4) unter reichlichem Speichelfluß des Männchens ablaufende Übergabe mindestens einer Spermatophore (Feldman-Muhsam *et al.*, 1970), 5) im weiblichen Genitaltrakt stattfindende Befruchtung reifer Eizellen mit den Samenzellen des Männchens (Diehl *et al.*, 1982) und 6) Verharren des fixierten Männchens beim Weibchen bis zu dessen Vollsaugen und Abfallen vom Wirt (Barré, 1989). Und natürlich dürfen die schon eingangs vorgestellten und wichtige Schritte der Kopulation einleitenden Sexualpheromone (attractant-, mounting-, genital sex pheromone) nicht fehlen.

Haben sich die Schildzecken erst einmal festgesetzt und ihre Blutmahlzeit begonnen, bringen sie mit ihrem Speichel zahlreiche physiologisch aktive Substanzen in die Wunde, auf die der Wirt seinerseits mit starken entzündlichen, gefäßerweiternden und immunologischen Prozessen antwortet (Tatchell & Moorhouse, 1968; Walker & Fletcher, 1986; Kemp *et al.*, 1982). In den ersten Tagen des Saugaktes nehmen Schildzecken nur wenig Blut zu sich. Dabei machen sie eine Reihe von Veränderungen durch, beispielsweise die Reifung ihrer Speicheldrüsen, einen erheblichen Zuwachs an Pro-Kutikula in Weibchen, um sich bei der Blutaufnahme ausdehnen zu können und die Bildung und Aussendung bereits oben erwähnter (Sexual)-Pheromone.

Nach erfolgreicher Begattung saugt sich das Weibchen üblicherweise in den letzten 24 Stunden der Blutmahlzeit voll. In dieser entscheidenden Phase nehmen weibliche Schildzecken 2 - 8 mal mehr Blut auf, als es ihrem tatsächlichem Körpermasse-Zuwachs entspricht (Lees, 1946; Balashov, 1964; Seifert *et al.*, 1968; Snow, 1970; Rechav *et al.*, 1994). Sie

dicken das empfangene Blut ein, in dem sie Wasser sowie zum größten Teil Na^+ und Cl^- -Ionen über die Speicheldrüsen zurück in den Wirt pumpen (Kaufman & Phillips, 1973; Kaufman, 1983; Sauer *et al.*, 1995). Auf diese Weise erhöhen sie ihre Körpermasse in manchen Fällen bis zu 100fach mit eiweiß- und fettreicher Nahrung, bestens geeignet für die sich dem Vollsaugen und Abfallen anschließende Eierproduktion (2000 - 20.000 Eier pro Weibchen, je nach Art). All dies macht aus Schildzecken sehr delikate Kandidaten für die Entwicklung einer *in vitro* Fütterung, da eine korrekt verlaufende Paarung unverzichtbar ist und über den gesamten Saugakt hinweg ihren Nahrungsanforderungen entsprochen werden muß.

1.3. In vitro Fütterung

In vitro Methoden zur Fütterung blutsaugender Insekten wurden bisher entwickelt für Tsetsefliegen (Mews *et al.*, 1977; Kabayo *et al.*, 1985), Stechmücken (Benzon & Apperson, 1987; Kogan, 1990), blutsaugende Raubwanzen ('kissing bugs') (Langley & Pimley, 1978; Gardiner & Maddrell, 1972) und Flöhe (Wade & Georgi, 1988). Auch für die schnell-saugenden Lederzecken (Acari: Argasidae) war die *in vitro* Fütterung auf Tierhäuten oder künstlichen Membranen erfolgreich (Mango & Galun, 1977; Osborne & Mellor, 1985; Wirtz & Barthold, 1986; Hokama *et al.*, 1987).

Einige dem Nährmedium hinzugefügte Substanzen zeigten eine fraßstimulierende Wirkung. In mehreren Arbeiten wurde Adenosinriphosphat (ATP), das wie das reduzierte Glutathion (GSH) in roten Blutzellen und Blutplättchen vorkommt, als förderlich für das Saugverhalten von Moskitos beschrieben (Hosoi, 1958; zitiert aus Galun & Kindler, 1968; Galun *et al.*, 1963; Moskalyk & Friend, 1994). Auch bei Pferdebremsen (*Tabanus nigrovittatus*; Friend & Stoffolano, 1990) und bei blutsaugenden Raubwanzen (*Rhodnius prolixus*) verbesserte sich die Aufnahme von Salzlösung, wenn diese mit ATP versetzt war. Zudem hatte bei *Rhodnius* das sonst in Blut natürlich vorkommende 2,3-Diphosphoglycerat einen saugstimulierenden Effekt, besonders in Kombination mit ATP (Smith & Friend, 1982). Auf Blut wurden die Saugleistungen von Katzenflöhen (*Ctenocephalides felis*) nach Zugabe von ATP jedoch nur sehr geringfügig verbessert (Wade & Georgi, 1988) und bei Tsetsefliegen (*Glossina morsitans morsitans*) überhaupt nicht (Mews *et al.*, 1976).

Bei den Lederzecken erhöhte sich die Zahl der auf blutfreiem Medium saugenden Weibchen von *Ornithodoros tholozani* durch Zugabe von Glukose. Dieser Effekt steigerte sich deutlich in Kombination mit ATP oder GSH (Galun & Kindler, 1968). Schon 1965 hatten diese Autoren alleine in Salzlösung angebotenes GSH als Saugstimulans für diese Zeckenart ausgemacht, später folgte der Nachweis auch für *Ornithodoros coriaceus* (Hokama *et al.*, 1987). Waladde und seine Mitarbeiter untersuchten 1979 detailliert die Saug- und Speichelfluß-Phasen bei Weibchen von *B. microplus in vitro* mit Hilfe elektrischer Widerstandsmessungen. Wurde zur NaCl-Lösung ATP addiert, verdoppelten sich nahezu die Phasen aktiven Saugens. Kemp *et al.* (1982) fanden bei diesen Zecken *in vitro* 4 h n. I. eine erhöhte Aufnahme von mit Glukose versetzter NaCl-Lösung, wenn sie ATP enthielt. Diese Literaturübersicht weist u. a. ATP und GSH als Saugstimuli für Insekten und potentiell auch für Zecken aus, insbesondere in unvollständigen, zum Blut isotonischen Nährmedien.

1.3.1. Fütterung durch Kapillarröhrchen

Ein Weg der *in vitro* Fütterung wurde mit der Kapillarröhrchen-Methode beschritten. Glaskapillaren, mit den verschiedensten Nährmedien gefüllt, wurden einzeln über die Mundwerkzeuge rücklings festgeklebter Zecken gestülpt und bei 24 - 29°C aufbewahrt. Chabaud (1950) ließ auf diese Art weibliche *Hyalomma excavatum*, *Hyalomma dromedarii*, *Dermacentor "pictus"* und *R. sanguineus* auf Wasser, Salzlösung und verschiedenen Blutzubereitungen saugen. Unter reichlicher Kotausscheidung erreichten die Zecken maximal Erbsengröße, verweigerten dann aber die Eiablage. Chabaud vermutete hier das Problem in der fehlenden Begattung der Weibchen. Auch zum Zwecke der Übertragung von pathogenen Mikroorganismen wurde die Kapillarfütterung benutzt. Versuche hierzu machten neben anderen Furnell & Joyner (1967) und Joyner & Furnell (1968) mit adulten *R. appendiculatus* sowie Jones *et al.* (1988) mit Nymphen dieser Zeckenart sowie *A. variegatum*. In all diesen Fällen mußten die Zecken jedoch, je nach Ziel der Versuche, auf dem Wirtstier "vor"- oder "nach" gefüttert werden.

1.3.2. Fütterung auf Membranen

Erste Versuche zur *in vitro* Fütterung von Schildzecken auf Membranen gehen bereits auf den Anfang unseres Jahrhunderts zurück. Hindle & Merriman (1912) berichteten von adulten *Hyalomma aegyptium*, die, ex-

perimentell ihrer Füßchen des ersten Beinpaars und damit eines wichtigen Geruchssinnesorgans (Haller'sches Organ) beraubt, durch Rattenfell von einer 0,8 %igen Salzlösung (42°C) zu saugen begannen. Totze (1933) brachte auf ähnliche Weise verstümmelte *I. ricinus* (Nymphen und Weibchen) dazu, bis zu 4 d lang durch Zellophan oder Meerschweinchenzwerchfell 37°C-warmes, defibriniertes Blut und Citrat-Blut vom Meerschweinchen aufzunehmen (Umgebungstemperatur 16 - 18°C).

In der als Fixierungs-Versuch geplanten, eintägigen *in vitro* Fütterung von *I. ricinus* über frischem Citrat-Menschenblut beendeten die Zecken das Saugen, das sonst durch die Ausscheidung unverdauten Blutes zu erkennen war, nach einigen Stunden (Lees, 1948). Als Grund dafür machte der Autor den wenig "frischen Zustand" des Blutes trotz häufigem Wechsel sowie Membranlecks verantwortlich.

Über das weitere Schicksal von in Fixierungsversuchen max. 2 d lang saugenden *B. microplus* Larven gaben Doube & Kemp (1979) in ihrer Arbeit keine Auskunft. Fütterungsversuche mit *B. microplus* Larven auf der inneren Schalen-Membran bebrüteter, aufpräparierter Hühnereier wurden von Pierce & Pierce (1956) durchgeführt. Es häuteten sich 36 % der an d 5 fixierten Larven nach dem Saugakt zu Nymphen. Von diesen fixierten die meisten erneut *in vitro* und saugten bis zu 8 d lang, entwickelten sich jedoch nicht zu Adulten.

Howarth & Hokama (1983) studierten die Übertragung von *Anaplasma marginale* zwischen den Entwicklungsstadien der Zecken und ihren Wirten. Dazu ließen sie Nymphen und Adulte von *D. andersoni*, die auf Kaninchen 4 - 6 d lang vorgefüttert worden waren, ihr Blutmahl *in vitro* durch präparierte Maus- oder Kaninchenhaut auf konzentrierten Rinder-Erythrozyten beenden (Wechsel 2x / d für Adulte, 3x / d für Nymphen). Die Tiermembranen wurden täglich erneuert. Dementsprechend mußten die Zecken jeden Tag abgezupft und auf frische Häute übertragen werden, wo sie sich wiederfixierten. Die Weibchen legten zumeist vitale Eier und die Nymphen entwickelten sich zum nächsten Stadium.

Die Tab. 1-2 faßt die Methoden und Ergebnisse der wichtigsten neueren Arbeiten zur *in vitro* Fütterung von Schildzecken zusammen. Einen umfassenden Überblick über die Prinzipien der *in vitro* Fütterung blutsaugender Arthropoden im allgemeinen bietet der deutschsprachige Artikel von Klunker (1979).

Bei Kemp und seinen Mitarbeitern (1975) sickerte mit Rinderseum oder Rinderalbumin versetztes Gewebekulturmedium kontinuier-

lich eine auf 35°C gehaltene Schräge hinunter, auf der sich Filterpapier befand (Tab. 1-2). Über dem auf diese Weise quer von Flüssigkeit durchströmten Filterpapier war Rinderfell gespannt, durch das Larven und Weibchen von *B. microplus* Nahrung einschließlich Mikrobizide aufnahmen. Während die Larven etwas verzögert mit *in vivo* vergleichbare Körpermassen erreichten und sich zu etwa einem Drittel erfolgreich zu Nymphen häuteten, kamen die Weibchen den Autoren zufolge über ein teilgesogenes Stadium nicht hinaus. Nicht nur für die bereits erwähnten Experimente zur Übertragung von Krankheitserregern war die künstliche Fütterung von Nutzen. Im Rahmen der Entwicklung eines Impfstoffes gegen *B. microplus* wurden Adulte dieser Art durch Tierdarm-Membranen (Baudruche) auf Blut von Rindern gefüttert, die man zuvor zur Produktion von Antikörpern gegen die Darmwand von Zecken angeregt hatte (Kemp *et al.*, 1986) (ohne Tab.). Als die Versuche nach spätestens 42 h abgebrochen wurden, wiesen sowohl *in vitro* als auch auf diesen Rindern gesogene Zecken im Gegensatz zu den Kontrollen deutliche und folgenschwere Darmschäden auf.

Adulte *Dermacentor nuttalli* wurden von Habedank & Hiepe (1993) im Brutschrank (37°C / 90 % rF) in einer Atmosphäre mit erhöhtem CO₂-Gehalt (4.5 %) auf glatten Silikon-Membranen gefüttert (Tab. 1-2). Auch hier wurden zusätzliche Fixierungsstimuli benutzt (Rinderhaare, Rinderhaar-Extrakt, Baumwollwatte). Das steril gewonnene, heparinisierte Rinderblut wurde gefrierengelagert, mit Bakteriziden sowie teilweise mit ATP und GSH (10⁻³ mol / l) angereichert und 3x / d ausgetauscht. Knapp 40 % der Weibchen saugten sich voll und brachten es dabei auf 50 % ihrer *in vivo* Körpermasse. Aus der Hälfte der anschließend abgelegten Eiern schlüpfen Larven. Auf vergleichbare Weise wurden von Habedank *et al.* (1994) *Hyalomma anatolicum excavatum* gefüttert, bei denen aus 40 % der von den Weibchen abgelegten Eier Larven schlüpfen (ohne Tab.).

Wie aus der schriftlichen Kurzfassung eines Posters anlässlich einer Tagung der Deutschen Gesellschaft für allgemeine und angewandte Entomologie (Jena, März 1993) hervorging, gelang Issmer & Grunewald bei *I. ricinus* und *Hyalomma truncatum* die erfolgreiche Eiblage nach Vollsaugen auf künstlichen Membranen (ohne Tab.). Weitere Details waren nicht aus der kurzen Note ersichtlich.

Tab. 1-2 – Literaturüberblick zur in vitro Fütterung von Schildzecken – Bei mehr als einer Art der Fütterung je Referenz wurde die erfolgreichste aufgelistet.

	KEMP <i>et al</i> (1975)		WALADDE <i>et al</i> (1991)	VOIGT <i>et al</i> (1993)	WALADDE <i>et al</i> (1993)	HABEDANK & HIEPE (1993)
Spezies / Stadium	<i>Boophilus microplus</i> Larven	dio. Weibchen	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i> Adulte	<i>Amblyomma variegatum</i> Larven, Nymphen, Adulte	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i> Nymphen	<i>Dermacentor nuttalli</i> Adulte
Membran	Rinderfell (0.3 - 0.5 mm dick)	dto.	Baudruche-Membran, mit Klebstoff bestrichen	Kaninchen und Rinderfell (0.5 - 1 bzw. 0.6 - 1.5 mm dick)	Baudruche-Membran, mit Klebstoff bestrichen	Silikon-Membran (0.16 - 0.20 mm dick)
Nährmedium	Steriles Gewebekultur-Medium TC 199 + 7 % Rinderserum oder Rinder-Albumin	dto.	unsteriles defibriniertes Sierblut, max. 3 d alt	steril gewonnenes Rinderblut (50 IE Heparin / ml), max. 3 d alt	steril gewonnenes Rinderblut (50 IE Heparin / ml), max. 1 d alt	steril gewonnenes Rinderblut (2 IE Heparin / ml), max. 20 Wochen gefrier-gelagert ‡
Medium-Wechsel	Dauerfluß ca. 8 ml/h	dto.	3x pro Tag	nicht genannt	6x pro Tag	3x pro Tag
Mikroblizide	Penizillin G 125 IE / ml, Streptomycinsulfat 125 IE / ml, Nystatin 100 IE / ml, letzteres auch topikal	dto.	Penizillin 50 IE / ml, Streptomycin 50 IE / ml	Penizillin 100 IE / ml, Streptomycin 100 µg / ml, Gentamicin 100 IE / ml ‡	keine	Penizillin 125 IE / ml, Streptomycin 125 IE / ml
Temperatur Feuchte CO ₂	35°C / 70 % rF, Brutschrank	dto.	Wasserbad 37°C, Umgebung 26 - 27°C / 70 - 80 % rF	Brutschrank 35 - 39°C / 90 - 95 % rF / 5 % CO ₂	Wasserbad 42°C, Umgebung 26 - 27°C / 70 - 80 % rF	Brutschrank 37°C / 90 % rF / 4.5 % CO ₂
Fixierungs-Stimuli	Rinderfell	dto.	Baumwollwatte, isotonische Salzlösung, R. a.-Kot, Rinderhaare, Rinderohr-Extrakt	Kaninchen- oder Rinderfell	siehe WALADDE <i>et al</i> (1991)	Baumwollwatte, Rinderhaare, Rinderhaar-Extrakt
Ergebnisse	Körpermasse nach 6 - 8 d Saugen vergleichbar mit <i>in vivo</i> , 47 - 83 % saugten sich voll, 51 - 71 % Häutungserfolg	'teil-gesogen'	Körpermasse 65 %, Eier-Konversionsfaktor 82 % bezogen auf <i>in vivo</i> ; 63 % saugten sich voll; Eiablage und Larvenschlupf normal	Körpermasse Larven: 100 %, Nymphen: 81 %, Weibchen: 38 % bezogen auf <i>in vivo</i> , 30 % saugten sich voll; Häutung, Eiablage und Larvenschlupf normal	Körpermasse Nymphen: ca. 50 % bezogen auf <i>in vivo</i> , Häubungsrate vergleichbar mit <i>in vivo</i>	Körpermasse Weibchen: 50 % bezogen auf <i>in vivo</i> , 38 % saugten sich voll; Eiablage; 50 % Larvenschlupfrate

‡ Tierfell-Innenseite mit Amphotericin B behandelt.

§ Bei länger als 4 d gefriergelagertem Blut zusätzlich ATP / Glutathion (beide: 10⁻³ mol/l).

Voigt *et al.* (1993) gelang die *in vitro* Fütterung aller Stadien von *A. variegatum* durch Tierhäute (Tab. 1-2). Die durch Kaninchen- oder Rinderfell auf sterilem heparinisierendem und mit Bakteriziden vermischem Rinderblut saugenden Zecken befanden sich in einem Brutschrank (35 - 39°C / 90 - 95 % rF) in erhöhter CO₂-Konzentration (5 %). Larven kamen auf 100 %, Nymphen auf 81 % und Weibchen, von denen sich ein Drittel vollsaugten, auf 38 % ihrer *in vivo* Körpermasse. Die Häutung zu Nymphen und Adulten sowie die Eiablage der Weibchen und der Schlupf der Larven waren gemäß den Autoren vergleichbar mit Werten *in vivo* gefütterter Zecken. Zur Zahl der Blutwechsel wurden keine Angaben gemacht. Die *in vitro* Fütterung verwendeten sie erfolgreich für die Übertragung von *Theileria mutans* und *Cowdria ruminantium* (Erreger der Herzwasser-Krankheit bei Wiederkäuern). Voigt und Mitarbeiter berichteten von schlechteren Fütterungsergebnissen, sobald die Luft nicht mit zusätzlichem CO₂ angereichert wurde, wenn das Blut defibriniert war, EDTA statt Heparin als Antikoagulan enthielt oder wenn Leibovitz L15 Gewebekulturmedium als Futter angeboten wurde. Versuche, die Zecken auf mit Rinderhaut-Extrakt bestrichenen Silikon-Membranen fixieren zu lassen, schlugen fehl. Über die Vollendung des Lebenszyklus, d. h. die aufeinanderfolgende künstliche Fütterung von bereits *in vitro* vollgesogenen und gehäuteten Individuen, idealerweise auf synthetischen Membranen, konnten keine Informationen gefunden werden.

1.4. Ziel der Arbeit

Die vorliegende Dissertationsschrift schildert Versuche zur *in vitro* Zucht der Schildzecken *I. ricinus*, *B. microplus*, *A. variegatum* und *A. hebraeum*. Für die letzte Art wird außerdem ein *in vitro* Akarizid-Test vorgestellt. Die Arbeit stützt sich auf das Prinzip 3R (Reduce, Refine, Replace), d. h. auf die Verringerung, Verfeinerung oder Vermeidung von Wirbeltierexperimenten. Ihr Ziel war, eine konkurrenzfähige Alternative zur herkömmlichen Schildzecken-Fütterung auf Säugern zu entwickeln und die praktische Anwendbarkeit der *in vitro* Methode anhand eines Tests für systemische Akarizide unter Beweis zu stellen.

Ein Teil der hier vorgestellten Arbeit wird in einer Fachzeitschrift veröffentlicht: KUHNERT F., DIEHL P.A. & GUERIN P.M. 1995. The Life-cycle of the Bont Tick *Amblyomma hebraeum* *In Vitro*. *International Journal for Parasitology* 00: 0-0 (im Druck).

2. TIERE, MATERIAL UND METHODEN

2.1. Die Zecken

2.1.1. *Amblyomma hebraeum* und *Amblyomma variegatum*

Larven, Nymphen und Adulte der dreiwirtigen Zeckenarten *Amblyomma hebraeum* Koch, 1844 und *Amblyomma variegatum* (Fabricius, 1794) stammten aus der auf dem Schwanz zeckenempfindlicher männlicher Jung-rinder (*Bos taurus*; Simmentaler, ca. 130 kg) durchgeführten Zucht bei der Ciba, landwirtschaftliche Versuchsstation, CH-1566 St. Aubin. *A. hebraeum* Zecken kamen vor etwa 8 Generationen aus Onderstepoort, Südafrika. *A. variegatum* stammten ursprünglich aus Westafrika (Adiopodoumé, Elfenbeinküste) und waren seit etwa 13 Generationen in der Laborzucht. Temperatur und relative Luftfeuchte (rF) in der klimatisierten Rinderbox sowie auf dem Tier selbst sind Abb. 2-1 zu entnehmen. Die rF wurde im Abstand von 10 - 12 mm über dem Tier gemessen, die Temperatur direkt auf der Hautoberfläche. Dazu fand ein Peuchte-Meßgerät (hygro-air 2, type 911 / 2h, Schiltknecht Messtechnik AG, CH-8625 Gossau) und ein Thermocouple-Thermometer (BAT - 12, Senso-tek Inc., Clifton, NJ 07013, USA) mit einer Punkt- und Oberflächen-Sonde Verwendung.

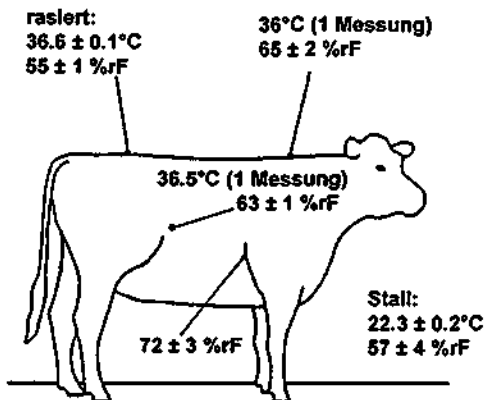


Abb. 2-1 – Temperatur und relative Feuchte an der Rinderhaut – Darstellung: Mittelwert \pm Standardabweichung (> 14 Messungen an einem Rind).

Am Institut für Zoologie in Neuchâtel wurden die Zecken während ihrer nicht-parasitischen Lebensabschnitte unter folgenden Bedingungen aufbewahrt: tags 25°C / 85 % rF, nachts 18°-20°C / 95 % rF (12 h : 12 h; Tag : Nacht). Vollgesogene Zecken wurden jedoch zunächst einige Wochen in 28°C / ca. 80 % rF im Dauerdunkeln (DD) gehalten, um durch die erhöhte Temperatur den Übergang ins Folgestadium oder die Eiablage zu beschleunigen. Gesogene Larven wurden meist in der pharaten (immobilen) Phase portionsweise (30 - 50, vereinzelt bis 130) in kleine, mit Wattestopfen verschlossene Pyrex-Glasröhren (90 mm lang, Durchmesser außen 11 mm, innen 6.5 mm) abgefüllt. So brauchten sie nach der Häutung bis zum Einsatz im Versuch als ungesogene Nymphen nicht mehr manipuliert zu werden. Ungehäutete Individuen blieben stets am Boden des Röhrchen; die vitalen Nymphen waren hingegen am oberen Wattestopfen zu finden (Zahnwatterollen, Durchmesser 8 mm, Flawa Nr.11091, CH-Flawil). Dadurch war der Häutungserfolg leicht erkennbar. Zur platzsparenden Aufbewahrung, besonders aber zum zügigen und sicheren Einbringen von ungesogenen Larven und Nymphen in die *in vitro* Fütterungsbehälter waren diese maßgefertigten Glasröhren ausgesprochen nützlich.

Vollgesogene Nymphen kamen einzeln in die Vertiefungen sorgfältig verschlossener, doch belüfteter 96-Loch Zellkultur-Platten ("multiwell plates"). So war deren individuelle Verfolgung bis zur Häutung zum Männchen oder Weibchen möglich. Ungesogene Adulte, die von auf Rindern gesogenen Nymphen stammten, wurden im Labor vor den Experimenten nach Geschlechtern getrennt und abgezählt aufbewahrt. Sofern die Eiablage individueller Weibchen beobachtet werden sollte, wurden diese nach ihrer Blutmahlzeit jeweils einzeln bäuchlings in eines der 18 Kompartimente (33 × 38 mm) eines verschließbaren Plexiglas-Tabletts gesetzt. Fünfundvierzig Tage später, nach Entfernen der Weibchen, wurde die Masse der gelegten Eier bestimmt und diese dann, falls gewünscht, zur Aufzeichnung des Schlüpfens der Larven sorgfältig im entsprechenden Kompartiment ausgebreitet und in sich verkürzenden Zeitabständen (wöchentlich bis täglich) die Embryonalentwicklung verfolgt. Mit Auftreten der ersten geschlüpften Larven, die anfangs kaum mobil waren und keine Reaktion auf Atemluft zeigten, wurden die Eigelege der jeweiligen Behandlung auf die o. a. Glasröhrchen verteilt (möglichst je ca. 80 mg Eier).

Für *in vitro* Fütterungsexperimente mit adulten Zecken wurden die Männchen 5 - 7 d *in vitro* oder auf dem Kaninchen vorgefüttert und dann auf frische Membranen gesetzt. Eine Stunde später kam die gleiche Anzahl ungesogener Weibchen hinzu. In den *A. hebraeum*-Behandlungen [1 - 3] (siehe Tab. 2-9, S. 51) verblieben die Männchen jedoch auf den Membranen der Vorfütterung auch während des gemeinsamen Blutmahls mit den Weibchen. In Versuchen mit *A. variegatum* wurden die Männchen 5 - 6 Tage vorgefüttert und blieben ebenfalls auf den Membranen. Von *A. hebraeum* wurden Larven im Alter von 3 - 6, Nymphen und Adulte im Alter von 3 - 12 Monaten benutzt. Nymphen und Adulte von *A. variegatum* waren etwa 3 - 7 Monate alt.

2.1.2. *Boophilus microplus*

Larven, Nymphen und Adulte der einwirtigen Art *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) stammten aus denselben Zuchtbedingungen wie schon *Amblyomma*, jedoch auf Rücken und Flanke des Rindes. Sie gehörten zur Varietät Biarra aus dem südlichen Queensland, Australien. Dieser gegen Organophosphat-Pestizide resistente Zeckenstamm befand sich seit etwa 30 Generationen in der Ciba-Laborzucht. Die Larven schlüpfen und lagerten bis zum Gebrauch (4 Wochen), in Portionen von etwa 2000 Tieren aufgeteilt, in Dauerdunkelheit bei 28°C und 97% rF. Vollgesogene Nymphen sowie sehr junge adulte Männchen und Weibchen wurden am d 12 bzw. 13 nach Infestation vom Rücken der Rinder abgesammelt (d 0 = Tag der Infestation). Dabei wurde die Betonung auf eine möglichst große Zahl vollgesogener Nymphen gelegt. Sämtliche Zecken wurden innerhalb 1 - 3 h in einem Thermobehälter nicht unter 25°C und mit sehr hoher rF in das Labor gebracht. Bereits adult geerntete Zecken können, streng genommen, nicht mehr als "ungesogen" bezeichnet werden, da sie sehr wahrscheinlich schon kurz am Wirt gesaugt haben. Diese Zecken wurden maximal zwei Tage lang in fest gesättigter Luftfeuchte, DD und tags 25° / nachts 18 - 20°C aufbewahrt, meist aber direkt in den Versuch überführt. Vollgesogene Nymphen wurden nach potentiellen Geschlechtern getrennt und in 28°C, 97 % rF und DD bis zur Häutung bzw. darüber hinaus in kleinen Tablettengläschen mit einer leicht angefeuchteten Zahnwatterolle gelagert. Nymphen, die zu Weibchen häuteten, waren deutlich größer und heller (hellbraun-orange) als ihre "männlichen" Kollegen. Die so gewonnenen Adulten hatten also vor dem Aufbringen auf die künstliche Membran weder Kontakt mit Sexualpartnern, noch mit dem Wirt gehabt. Die Weibchen, die vor dem Versuch einen geschwächten Eindruck machten, wurden verworfen. Auf dem

Wirt fixierten sich die frisch geschlüpften Weibchen meist direkt neben ihrer alten Nymphenhaut. Dort kopulierten die Männchen in der Regel mit fixierten Weibchen. *In vitro* wurden die Weibchen daher einige Minuten vor den Männchen auf die Membran gesetzt. So hatten sie die Möglichkeit sich zu fixieren, bevor sie durch die Männchen, die meist sofort nach Zusammenbringen mit den Weibchen Paarungsverhalten zeigten, behindert wurden. Die Experimente fanden im Geschlechterverhältnis 1:1 statt.

Dem Ort der Häutung abgesammelter Nymphen zu adulten Zecken *in vitro* kam eine besondere Bedeutung zu, um eine möglichst hohe Ausbeute an intakten, ungesogenen Adulten zu erreichen. Nur wenige pharate Adulte schafften es erfolgreich, sich aus der unverankerten Nymphenhaut herauszulösen, wenn dies auf den Membranen vorstatten ging. Gründe hierfür waren:

1. das Fehlen einer vorderen Befestigung durch die Mundwerkzeuge wie bei einer *in situ* belassenen Exuvie und der Mangel jeglichen Ansatzpunktes für die Hebelkräfte der sich häutenden, noch weichen Zecke;
2. die zusätzlich unvorteilhafte Rückenlage, in der abgesammelte Nymphen bzw. pharate Adulte zu liegen kommen konnten;
3. die größere Berührungsfläche abgesammelter, immobilisierter Zecken mit der Membran im Vergleich zu noch im spitzen Winkel fixierten. Die ersteren zogen häufig aufgrund von Kapillarkräften einen Serومتropfen um sich herum, der langfristig zu deren Tode führte.

Die besten Chancen für eine erfolgreiche Häutung boten sich in den erwähnten kleinen, mit einer leicht angefeuchteten Zahnwatterolle versehenen, gläsernen Tablettenröhrchen. Da man das Geschlecht adulter Zecken mit großer Sicherheit bereits im pharaten Stadium bestimmen konnte, wurden hier die Zecken entsprechend aufgeteilt.

2.1.3. *Ixodes ricinus*

Es wurden ungesogene Weibchen und Männchen (1:1) von *Ixodes ricinus* (Linneaus, 1758) aus einer Laborzucht auf Mäusen und Kaninchen verwendet. Diese Zucht existierte seit etwa 20 Jahren in unserem Institut und gründete sich auf in der Schweiz gesammelte Zecken (Graf, 1976). Die verwendeten Zecken waren im Dezember des Jahres als vollgesogene Nymphen vom Kaninchen abgefallen und befanden sich nachher bei Raumtemperatur und sehr hoher relativer Luftfeuchte unter dem natürlichen Lichtregime. In den Versuch kamen sie 10 Monate später als Adulte.

2.2. Substanzenverzeichnis

Tab. 2-1 – Verwendeten Substanzen – Die Substanzen sind in alphabetischer Reihenfolge genannt. Die Erläuterungen zu deren Funktion und Wirkweise beschränken sich auf den Zusammenhang mit dem bearbeiteten Thema.

Substanz	Abkürzung	Funktion	Wirkweise	Quelle	Bemerkungen
Adenosintri-phosphat, Dinatrium-salz	ATP	Wichtigste energiereiche Verbindung des Zellstoffwechsels, erhält die Membranfunktion roter Blutzellen aufrecht, Saugstimulus für blutsaugende Arthropoden (Galun & Kindler, 1968; Hosol, 1968; Galun et al., 1968; Moskalyk & Friend, 1994; Friend & Stoffolano, 1990; Smith & Friend, 1982)	--	Nr. 1432 Merck D-Darmstadt	u. a. Bestandteil roter Blutzellen
Amphotericin B	AMB	Breitband-Fungizid	Stört Pilz-Zellmembranfunktion durch Bindung an Sterole (bevorzugt Ergosterol)	Nr. A-9628, Sigma St. Louis, MO 63178, USA	Gruppe Polyene
Benzaldehyd	BEA	Aggregations-Führungs-Pheromon von <i>A. hebraeum</i> (Apps et al., 1968; Price et al., 1994)	--	Kat. Nr. 801756 Merck	einfachster aromatischer Aldehyd
Dimethylsulfoxid	DMSO	Lösemittel, Vehikel	--	Ciba, CH-4004 Basel; Spende	--
Dulbecco's phosphatgepufferte Saline	DPBS	Suspensionsmittel, Vehikel	--	Sigma	--
Enilconazol	ENI	Fungizid	Stört Ergosterol-Biosynthese und damit u. a. den Aufbau der Plättzelwand	Janssen Research Foundation, B-2340 Beerse, Spende	Imidazol-Derivat
Gentamicin	GEN	Bakterienzid	Stört Proteinsynthese in Prokaryonten durch Bindung an 30s Ribosomen-Untereinheit	Nr. G-1272, Sigma	Gruppe Aminoglykoside
D (+)-Glukose, wasserfrei	--	Stabilisiert Erythrozyten <i>in vitro</i> (Wolfe, 1985); Saugstimulus für die Lederzecke <i>Ornithodoros tholozani</i> (Galun & Kindler, 1968)	ATP-Gewinnung durch stufenweisen, anaeroben Abbau von Glukose zu Milchsäure	Nr. 49140, Fluka Chemie AG, CH-9470 Buchs	u. a. Bestandteil von Plasma und Blutzellen
Glutathion, reduziert	GSH	Antioxidans, Saugstimulus für Lederzecken (Galun & Kindler, 1965; Hokama et al., 1987)	Entgiftung von H ₂ O ₂ in roten Blutzellen	Nr. 4090, Merck	Bestandteil von Plasma u. roten Blutzellen, Tripeptid

Substanzenverzeichnis (Fortsetzung)

Substanz	Abkürzung	Funktion	Wirkweise	Quelle	Bemerkungen
Glyceroformal	GLF	Lösemittel, Vehikel	--	Ciba; Spende	--
Neparin, Natriumsalz	--	Antikoagulans	verstärkt inhibitorischen Effekt von anti-Thrombin 3 auf Proteine der Koagulationskaskade	Nr. H-5765, Sigma	Bestandteil u. a. von basophilen Granulozyten im Blut, 100 µg ≈ 17 IE
iso-Buttersäure (2-methylpropanoic acid)	TMP	Aggregations-Fixierungs-Pheromon von <i>A. hebraeum</i> (Apps <i>et al.</i> , 1988; Price <i>et al.</i> , 1994)	--	Nr. 800472, Merck	einfache Fettsäure
Itraconazol	ITR	Fungizid	Stört Ergosterol-Biosynthese und damit u.a. den Aufbau der Pilzzellwand	Janssen Research Foundation, B-2340 Beerse; Spende	Triazol-Derivat
Ivermectin (22,23-Dihydro-avermectin B1)	IVM	Nematozid, Akarizid	Greift in GABA-Neurotransmitter-Systeme ein	Ciba; Spende	Aktivsubstanz IVM extrahiert aus Ivomec® (Merck, Sharp, Dohm)
Methylsallylat	MES	Aggregations-Fixierungs-Pheromon von <i>A. variegatum</i> (Schöni <i>et al.</i> , 1984; Diehl <i>et al.</i> , 1991; Price <i>et al.</i> , 1984)	--	Nr. 84330 Fluka	Gruppe Ester
Methylparaben	MEP	Fungizid, Bakterizid	?	Nr. H-5501, Sigma	Gruppe para-Hydroxybenzoesäureester
Nystatin	NYS	Breitband-Fungizid	Stört Pilz-Zellmembranfunktion durch Bindung an Sterole (bevorzugt Ergosterol)	Nr. N-1638, Sigma	Gruppe Polyene 100 IE = 20 µg
ortho-Nitrophenol	ONP	Aggregations-Fixierungs-Pheromon von <i>A. hebraeum</i> u. <i>A. variegatum</i> (Schöni <i>et al.</i> , 1984; Apps <i>et al.</i> , 1988; Diehl <i>et al.</i> , 1991; Price <i>et al.</i> , 1994)	--	Nr. 806790, Merck	Gruppe Phenole
Pelargonsäure (nonanoic acid)	NOA	Aggregations-Fixierungs-Pheromon von <i>A. variegatum</i> (Schöni <i>et al.</i> , 1984; Price <i>et al.</i> , 1994)	--	Nr. 7168, Merck	Gruppe Carbonsäuren
Penizillin	P	Bakterizid	Stört Zellwand-Synthese in Bakterien	Nr. P-0781, Sigma	Gruppe Penizilline
Propylenglykol	PRG	Lösemittel, Vehikel	--	Ciba; Spende	--
Streptomycin	S	Bakterizid	Stört Proteinsynthese in Prokaryonten durch Bindung an 30s Ribosomen-Untereinheit	Nr. P-0781, Sigma	Gruppe Aminoglykoside

2.3. Das Futterblut

Es wurde wöchentlich am Schlachthof gesammeltes Blut von möglichst ruhigen, fast immer männlichen Rindern (Simmentaler) verwendet. Die Tiere wurden nach Tötung durch das Bolzenschußgerät an einem Hinterlauf zur Decke hinaufgezogen. Ein Mitarbeiter des Schlachthofes öffnete sodann den Hals des Rindes seitlich in Höhe der Drosselvene (*Vena jugularis*) mit einem tiefen Messerschnitt (unsteril). Der zuerst austretende Blutschwall wurde verworfen; mit dem weiteren Blutfluß wurde ein darunter gehaltener, steriler Polypropylen-Behälter gefüllt (ca. 4.5 l). Umgehend wurde das Blut dann 6 Minuten lang mit einem geschlitzten Edelstahl-Pfannenschieber gerührt. Das sich bei der Gerinnung bildende Fibrin (mitsamt eingebundener Blutzellen) lagerte sich daran an und konnte so einfach aus dem Blut entfernt werden. Beim Umfüllen in die Vorratsflaschen passierte das Blut ein steriles Porzellsieb (Büchnertrichter), um grobe Klumpen abzufengen. Es wurde für jedes neue Rind sauberes Sammel-, Rühr- und Filtergerät benutzt. Diese Art der "offenen" Blutsammlung beeinträchtigte den Schlachthausbetrieb nicht nennenswert. Es war jedoch unvermeidbar, daß durch Zuckungen des kopfüber hängenden Rindes auch vereinzelt vom Tierkörper herabtropfendes Wasser in den Sammelbehälter hineingeriet. Im Blut wird das zelluläre und humorale Immunsystem durch das sogenannte Komplementsystem ergänzt. Dieses bildet, auch unabhängig von Antikörpern, auf dem alternativen Aktivierungsweg durch eine Proteinkaskade lytische Komplexe, die eingedrungene körperfremde Zellen (z.B. Bakterien bei der Blutsammlung) zerstören können (Walport & Lachmann, 1993).

Das Blut definierter Individuen wurde nie vermischt, sondern nacheinander an die Zecken verfüttert. Falls das Blut z.B. durch Kontamination bereits in den Vorratsflaschen verdorben war oder ungewöhnlich roch (was jedoch sehr selten eintrat), brauchte nur das Blut dieses einen Tieres verworfen werden, das der anderen Rinder reichte aus, um den Versuchsblock beenden zu können. Die individuelle Sammlung und Verfütterung hat gegenüber dem Vermischen von Blut einen Nachteil: Sollte einmal ein Rind eine Blutanomalie aufweisen oder noch Reste eines Medikamentes oder Pestizids im Blut haben, so trafe dies unverdünnt alle saugenden Zecken des Versuchsblocks. Im Rahmen

dieser Arbeit wurden diesbezüglich keine Analysen des Spenderblutes vorgenommen.

Nach der Sammlung wurde dem spätestens innerhalb einer Woche verbrauchten Blutvorrat (max. 1B I; Lagerung +4°C) einmalig D (+)-Glukose (2 g / l) u. a. zur Stabilisierung der roten Blutzellen zugefügt. Bei jedem Blutwechsel wurden die entsprechenden Bakterizide oder Fungizide (Tab. 2-2 und Behandlungs-Übersicht Tab. 2-8 und 2-9) hinzugefügt, desweiteren die potentiellen Saugstimuli Adenosintriphosphat (ATP) und reduziertes Glutathion (GSH) aus einer wöchentlich zubereiteten, sterilfiltrierten (0,22 µm Porenweite) und portioniert eingefrorenen Stammlösung (NaCl 0,9 %ig; -18°C). Das Ziel war eine Endkonzentration beider Substanzen im Blut von 10^{-3} mol / l. Abweichende Dosierungen und Zugabezeitpunkte finden sich in Tab. 2-2. Zum Start eines neuen Versuchsblocks wurde immer frisches, am Morgen desselben Tages gesammeltes Blut verwendet.

Um die Verfügbarkeit roter Blutzellen für die saugenden Zecken in den Fütterungsglas-Versuchen mit *A. variegatum* zu verbessern, kam delibriertes Blut mit erhöhtem Gehalt dieser Blutzellen zum Einsatz. Dazu wurde unter sterilen Bedingungen nach schonender Zentrifugation (20 min, 1470 g, 3000 U/min, +4°C) ein Drittel des Blutvolumens als Serum abgeschöpft und verworfen.

Fütterungsgläser mit Adulten (Behandlung [9, 12B, 1E]) und mit Nymphen von *A. hebraeum* [13,16] wurden in ein Wasserbad mit permanent geschütteltem Drahtkorb gestellt (100 Richtungswechsel / min, horizontal in einer Ebene, einfache Strecke: ca. 10 cm). In einigen Nymphenversuchen (Behandlung [25]) wurden 10 vol% des Blutes durch Eidotter von Hühnern ersetzt. Eine solche Maßnahme wurde bereits zur Aufwertung der *in vitro* Diät von blutsaugenden Raubwanzen (Nufiez & Lazzari, 1990) und Stechmücken angewandt (Thomas, 1985; zitiert nach Hagen & Grunewald, 1990). Die Eier stammten von einem kontrolliert biologisch-organisch bewirtschafteten Hof in der Umgebung. Die Hühner erhielten nur Futter, das nicht mit Pestiziden behandelt worden war. Bei jedem Blutwechsel wurde aus einem frisch unter sterilen Bedingungen geöffneten Ei mit einer keimfreien Spritze Dotter entnommen und dieser mit ungebrauchtem Blut vermischt durch mehrmaliges Umschwenken und 10 s langes Vibrationsschütteln auf einem Vortex-Reagenzglasschüttler.

Tab. 2-2 – Zusätzliche Substanzen im Futterblut – Falls nicht anders erwähnt, wurden die Substanzen bei jedem Wechsel des Blutes hinzugefügt. Die Zeckenarten sind in der zeitlichen Abfolge der Versuche aufgelistet. Abkürzungen: DFK Durchfuß-Fütterungskammer; FG Fütterungsgläser.

Zeckenart / Stadium	natürliche Blutbestandteile			Mikrobizide		Blut	
	Glukose	ATP	GSH	Bakterizid	Fungizid	Hämato- krit erhöht	Wechsel pro Tag
<i>I. ricinus</i> Adulte (Weibchen)	nein	nein	nein	Penizillin 50 IE / ml, Streptomycin 50 µg / ml, 1 × wöchent- lich in den Blutvorrat	nein	nein	kontinu- ierlich (DFK)
<i>B. microplus</i> Adulte	nein	nein	nein	Penizillin 100 IE / ml, Streptomycin 100 µg / ml, 1 × wöchent- lich in den Blutvorrat	Amphote- ricin B 0.25 µg / ml, 1 × wöchent- lich in den Blutvorrat	nein	kontinu- ierlich (DFK)
<i>B. microplus</i> Larven u. Nymphen	nein	nein	nein	Penizillin 100 IE / ml, Streptomycin 100 µg / ml, 1 × wöchent- lich in den Blutvorrat	Amphote- ricin B 0.25 µg / ml, 1 × wöchent- lich in den Blutvorrat	nein	1 × (FG)
<i>B. microplus</i> Adulte	nein	nein	nein	Genlamicin 5 µg / ml	Nystafin 100 IE / ml	nein	2 × (FG)
<i>A. variegatum</i> Nymphen	2 g / l 1 × wöchent- lich in den Blutvorrat	10 ⁻³ mol / l, 1 × wöchent- lich in den Blutvorrat	10 ⁻³ mol / l, 1 × wöchent- lich in den Blutvorrat	Penizillin 100 IE / ml, Streptomycin 100 µg / ml	Nystafin 100 IE / ml	um ca. 30 %	1 × (FG)
<i>A. variegatum</i> Adulte	dto.	dto.	dto.	dto.	Nystafin 1000 IE / ml (Fütterungs- versuche: 100 IE / ml)	um ca. 30 %	1 × (FG)
<i>A. hebraeum</i> Larven, Nymphen	2 g / l 1 × wöchent- lich in den Blutvorrat	10 ⁻³ mol / l	10 ⁻³ mol / l	Gentamicin 5 µg / ml	Nystafin 100 IE / ml	nein	2 × (FG)
<i>A. hebraeum</i> Männchen (Vorfüterung)	dto.	dto.	dto.	dto.	dto.	nein	2 × (FG)
<i>A. hebraeum</i> Männchen u. Weibchen	dto.	dto.	dto.	dto.	dto.	nein	3 × (FG)

Das Blut für die Fütterungsgläser (10 ml für Larven, 15 ml für Nymphen und 20 ml für Adulte) wurde je nach Experiment 1-3 x täglich gewechselt. Nach einigen wichtigen methodischen Verbesserungen fanden in Fütterungsgläsern die Blutwechsel im allgemeinen wie folgt statt: *A. hebraeum* Adulte 3 x täglich, Nymphen und Larven 2 x täglich. Versuche mit *A. variegatum* Adulten und Nymphen sowie mit *B. microplus* (10 ml pro FG) wurden durchgeführt, bevor die durch *A. hebraeum* erlangten Erkenntnisse vorlagen. Daher fand der Blutaustausch nur 1 x täglich statt.

Bei den Blutwechseln wurde das verbrauchte Blut auf Geruchsveränderung (H₂S) geprüft sowie die Unterseite der Membran kräftig mit sterilem, entionisiertem Wasser abgespült und einmal pro Tag auf Pilzmyzel untersucht. Mit einer gebogenen, in Industrialkohol (70 %ige Lösung) sterilisierten Pinzette wurde dazu jeweils eine Probe (Zeckenzement, Gerinnsel, undefiniertes Material) entnommen und unter der Stereolupe im Durchlicht auf Pilzhyphen (Pilzfäden) untersucht. Im Zweifel half Anfärben mit einer Lösung aus "Baumwollblau" und Laktophenol. Die Blutmenge von 20 ml pro Blutwechsel für adulte Zecken war so bemessen, daß sich die Membran einige Millimeter unter dem Niveau des Blutes im Schraubglas befand. Auf diese Weise befanden sich die Mundwerkzeuge nicht in der obersten, an Erythrocyten armen Serumschicht, nachdem sich die Blutzellen etwas abgesetzt hatten.

2.4. Begriffe und Definitionen

Im folgenden seien in dieser Arbeit immer wiederkehrende, der Vereinfachung dienende Ausdrücke erklärt. Nähere Angaben zu einzelnen Chemikalien finden sich im Substanzenverzeichnis, Besonderheiten der Versuchsauswertung in Kapitel 2.11..

Zeckencharge. Da alle verwendeten Zecken aus Laborzuchten (*in vivo* und *in vitro*) stammten, war ihr Alter sowie die Generation bekannt. Waren in einer Gruppe alle Zecken gleichen Alters und von der gleichen Generation, wurde von einer Zeckencharge gesprochen. Zecken derselben Generation konnten jedoch parallel auf verschiedenen Wirtstieren gefüttert worden sein.

Versuchseinheit. Bei den *in vitro* Zeckenfütterungs- oder Fixierungsversuchen war die kleinste Versuchseinheit (VE; Sachs, 1984) ein Fütterungsglas oder eine Durchfluß-Fütterungskammer (DFK), mit einer bestimmten Anzahl Zecken auf der Membran.

Behandlungen bestanden bei Einsatz der Fütterungsgläser aus mehreren Versuchseinheiten (Sachs, 1984). Bei Verwendung der DFK war es nur diese eine VE. Alle VE einer bestimmten Behandlung waren "gleichbehandelt", d. h., sie enthielten Zecken der gleichen Charge, Blut vom gleichen Spendertier, wurden zeitlich parallel und mit denselben Mitteln durchgeführt und mit den gleichen Substanzen in gleicher Konzentration angesetzt usw.. Eine bestimmte Behandlung, also eine Anzahl auf genau definierte Art bestückte VE, wurde durch eine Nummer gekennzeichnet (z. B. [5], [17], [30] usw.). Bei der Wiederholung einer bestimmten Behandlung zu einem späteren Zeitpunkt mußte, obwohl sie unter grundsätzlich gleichen Bedingungen ablief, in der Regel eine andere Zeckencharge verwendet werden, um Zecken etwa gleichen Alters zu benutzen können oder einfach weil die restlichen Zecken der zuvor eingesetzten Charge nicht ausreichten. Eine wiederholte Behandlung unterschied sich zwangsläufig in einem weiteren Punkt von der vorangegangenen: Das Futterblut stammte von einem anderen Spenderindividuum. Eine wiederholte Behandlung erhielt dieselbe Stamm-Nummer, die um einen laufenden Buchstaben (unter Ausschluß von A) ergänzt wurde (z. B. [5B], [17F], [30D] usw.). Eine Auflistung, aller in der Ergebnissection berücksichtigten Behandlungen mit Nymphen und Adulten von *A. hebraeum* befindet sich in der Behandlungs-Übersicht Tab. 2-8 und 2-9.

Versuchsblock ist der Begriff für mehrere, zeitlich parallel durchgeführte, verschiedene Behandlungen (Sachs, 1984). Die Zecken eines Versuchsblocks entstammten, wo immer es sinnvoll und möglich war, derselben Charge. Gleich war auch das blutspendende Tier, d. h. es wurde immer erst das Blut eines Rindes in allen Behandlungen parallel aufgebraucht und dann zum Blut des nächsten Rindes gewechselt. In einem Versuchsblock liefen gleichzeitig Behandlungen mit verschiedenen Zeckenstadien. Für bestimmte Auswertungsschritte wurden die Ergebnisse gleicher Behandlungen aus verschiedenen Versuchsblocken zusammengelegt. Bei der *in vitro* Fütterung von *A. hebraeum* Nymphen war es möglich, Ergebnisse unterschiedlicher Behandlungen innerhalb eines Versuchsblocks auf die stets mitlaufende *in vitro* Kontrolle (Standardbehandlung; = 100 %) zu beziehen. Bei den Adulten dieser Art ging das Mitführen einer Kontrolle pro Versuchsblock leider nicht, da

- a) geeignete Zecken nicht in ausreichender Menge zur Verfügung standen,
- b) das Festlegen auf eine Standardbehandlung, die als Kontrolle hätte fungieren können, erst am Ende des praktischen Teils dieser Arbeit möglich war und
- c) der Versuchsblock technisch (organisierbare Menge Rinderblut) als auch vom Arbeitsaufwand her mit den bestehenden Mitteln undurchführbar geworden wäre.

Es galt einen Kompromiß zu bilden zwischen der Zahl neuer Behandlungen pro Versuchsblock (und damit Antworten auf die drängendsten Fragen) einerseits und der Übertragbarkeit der Resultate dieses Versuchsblock auf andere Versuchsblocke andererseits.

Bei der Zeckenfütterung *in vivo* (in der Regel zu Zucht- oder Kontrollzwecken) entsprach ein Rind einer Versuchseinheit. Die Anzahl an aufgesetzten Weibchen war mit 30-35 jedoch deutlich größer als in einem Fütterungsglas (5, selten 7). Darum kann ein Rind quasi auch als Behandlung angesehen werden, eine Behandlung jedoch, die mangels mehrerer Versuchseinheiten für einige der gemessenen Parameter keine beschreibende Statistik erlaubt (keine Standardabweichung usw.). Wie schon zum Teil *in vitro* wurden auch die auf verschiedenen "Kontroll"-Rindern (= gleiche Behandlungen, aber verschiedene Versuchsblocke) erhaltenen Resultate für bestimmte Auswertungsschritte zusammengefaßt.

Natürliche, künstliche und F₁-*in vitro* Zecken; vorgefütterte Zecken. Im Rahmen der Vollendung des Lebenszyklus von *A. hebraeum in vitro* und

bei der *in vitro* Fütterung von *B. microplus* wurde zwischen Zecken unterschieden, deren vorherige Entwicklungsstadien (Vorstadien) verschiedene Arten der Fütterung genossen hatten: Natürliche Zecken wurden solche genannt, deren Vorstadien *in vivo* ernährt worden waren (bei Larven sind mit "Vorstadien" die Eltern gemeint), künstliche Zecken jene, die sich aus *in vitro* gesogenen Individuen entwickelt hatten. Wenn unmittelbar im Anschluß an die *in vitro* Fütterung ein Generationswechsel stattgefunden hatte (wie es bei *in vitro* gesogenen, larvenerzeugenden Adulten der Fall war), waren künstliche Zeckenlarven auch als F₁-*in vitro* Zecken zu bezeichnen. Alle F₁-*in vitro* Zecken waren auch künstliche Zecken, aber nicht alle künstlichen Zecken gehörten bereits der F₁-*in vitro* Generation an. Vorgefütterte Zecken wurden Zecken genannt, die schon einen Teil ihres Blutmahls *in vivo* oder *in vitro* aufgenommen hatten, wie es bei vorgefütterten Männchen von *A. hebraeum* und *A. variegatum* der Fall war.

Infestierung. Das Aufbringen von Zecken sowohl auf Wirtstiere als auch auf Membranen wurde als Infestierung, der Tag der Infestierung als Tag 0 (d 0) bezeichnet.

Bakterizid, Fungizid, Mikrobizid. Bei der Benutzung der Begriffe Bakterizid und Fungizid wurde nicht unterschieden zwischen Substanzen, die aufgrund ihrer Wirkweise oder in geringer Konzentration nur vermehrungshemmend sind, aber Mikroorganismen nicht abtöten und streng genommen als Bakteriostatika bzw. Fungistatika bezeichnet werden müßten. Im Falle, wo sowohl von Bakteriziden (z. B. Penizillin) als auch von Fungiziden (z. B. Nystatin) die Rede war, wurde der Begriff Mikrobizide verwendet. Das Wort "Antibiotikum" wurde vermieden, da es nichts Näheres zur Gruppe der Zielorganismen aussagt.

Dezimalpunkt. Bei der Bezeichnung von Dezimalstellen in Zahlen ist das Komma durch einen Dezimalpunkt ersetzt worden.

2.5. Die Kontamination *in vitro* mit Pilzen und Bakterien

2.5.1. Vorversuche

Angelehnt an die Arbeit von Van Cutsem & Janssen (1988) wurden hohe Schraubdeckelgläser (200 ml) unsteril mit jeweils 9 ml aufgetautem, defibriniertem Rinderblut gefüllt. Hinzu kamen 5 mg Glukose / ml, die Bakterizide Penizillin (90 - 100 IE / ml) und Streptomycin (90 - 100 µg / ml), sowie 1 ml einer aus früheren, stark pilzkontaminierten Versuchen gewonnenen Pilzhyphe/-myzel-Suspension in Blut. Nach einer Inkubationsdauer von 2 d (ohne Öffnen der Gläser oder Blutwechsel) bei 37 - 38°C im Wasserbad (bis zur Füllhöhe des Blutes) wurde das Auftreten von Myzel in sechs Stufen quantitativ und Fruchtkörper (Konidien) qualitativ bewertet. Notiert wurde auch, wenn sich das Myzel noch nicht auf der Blutoberfläche ausgebreitet hatte, sondern nur darunter zu finden war. Beim Ansetzen dieser parallel durchgeführten Versuche wurde je drei Gläsern ein Fungizid hinzupipettiert: Amphotericin B 2.1 oder 21 µg / ml in 0.9 % NaCl-Lösung, Nystatin 182 IE, 1000 IE oder 2000 IE / ml suspendiert in DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline), Methylparaben 0.55 mg, 1.8 mg, 4.55 mg oder 18.2 mg / ml in reinem Äthanol. Fünf Gläser erhielten kein Fungizid, sechs Gläser wurden weder mit Fungizid, noch mit Pilzsuspension versetzt. Eine direkte Übertragung der Ergebnisse auf Fütterungsversuche mit Zecken war nicht möglich, da diverse Faktoren (Blutwechsel, zusätzliche Glukose, Membran und Zementablagerungen der Zecken) nicht vergleichbar waren. Auch ließen diese Versuche keine Aussage über die Verträglichkeit eines Fungizids für die Zecken selbst zu. Sie dienten aber dem Wirkungsvergleich zwischen verschiedenen Fungiziden bzw. Konzentrationen und konnten eine Auswahlhilfe bieten.

2.5.2. Pilzmyzel unter verschiedenen Versuchsbedingungen *in vitro*

Am Rande von ersten Experimenten mit der Rinderzecke *B. microplus* in Fütterungsgläsern wurde aufgezeichnet, in welcher Art Futterblut zuerst Pilzmyzel entdeckt werden konnte. Zur Wahl stand 1) Normalblut, 2) Blut mit Glukose / ATP-Zusatz, 3) eingefrorenes und wieder aufge-

tautes und dadurch hämolysiertes Blut sowie 4) Blut mit künstlich erhöhtem Gehalt an roten Blutzellen.

Nach diesem ersten Eindruck wurde die Entwicklung von makroskopisch bzw. mit der Stereolupe sichtbarem Pilzmyzel im Verlauf von verschiedenartigen Fütterungsversuchen mit adulten *A. hebraeum* genauer untersucht. Dazu wurde täglich von der Membran-Unterseite jedes Fütterungsglases mit einer gebogenen Pinzette eine Probe entnommen. Im Zweifel wurde das Material zur Sichtbarmachung der Pilzhyphen mit Baumwollblau/Laktophenol-Lösung angefärbt. Einige dieser Proben wurden zur näheren Bestimmung an PD Dr. O. Petri, Mikrobiologisches Institut, ETH Zürich geschickt. Pilzmyzel wurde je Fütterungsglas als "vorhanden" oder "nicht vorhanden" vermerkt. Fütterungsgläser, unter deren Membran am Folgetag kein Myzel mehr gefunden werden konnte, wurden dennoch weiter als pilzkontaminiert eingestuft. Zwischen jeder Probenentnahme verblieb die zuvor von Myzelresten befreite Pinzette ca. 15 s in 70 % Industriealkohol, um das Übertragungsrisiko von Hyphen auf das nächste Fütterungsglas zu verringern.

Zugleich wurden die am Untersuchungstag auf der jeweiligen Membran fixierten Weibchen gezählt. Dabei galt die Annahme, daß alle fixierten Weibchen auch Blut saugen. Es wurde das Verhältnis der auf pilzinfiziertem Blut saugenden Weibchen zu allen saugenden Weibchen dieser Behandlung bestimmt. Als "Behandlung" wurde eine genau definierte Art der Versuchsdurchführung bezeichnet, z. B. Verwendung eines bestimmten Fungizids, einer bestimmten Konzentration dieser Substanz, aber auch z. B. häufigere Blutwechsel usw.. Jede Behandlung wurde mit zehn Fütterungsgläsern angesetzt und die Myzelentwicklung von jeweils zwei verschiedenen Behandlungen verglichen. Es war nicht möglich, alle Behandlungen parallel durchzuführen. So wurden zwangsläufig auch solche gegenübergestellt, die Blut anderer Rinder und Zecken anderer Generationen enthielten.

2.5.3. Indirekter Nachweis bakterieller Kontamination *in vitro*

Bei der Haltung von unsterilem Blut bei 37 - 38°C während Zecken-Fütterungsversuchen trat manchmal schon nach wenigen Stunden, manchmal nach einigen Tagen ein mehr oder weniger starker H₂S-Geruch ("faule Eier") auf, begleitet von einer Dunkelfärbung des Blutes. Dies war

auch der Fall, wenn Pilzmyzel nicht entdeckt werden konnte. Vermutlich handelte es sich beim wahrgenommenen H_2S um ein Produkt bestimmter, sich übermäßig vermehrender anaerober Bakterien. Zur Untersuchung dieser Annahme und zur Kontrolle einer solchen, zum raschen Verderb des Blutes führenden Kontamination, wurden die Fütterungsversuche begleitende Beobachtungen angestellt. In parallel angesetzten Fütterungsgläsern mit einem täglichen Blutwechsel wurde, falls das Blut nach 1 d bei $38^\circ C$ noch neutral roch, beim Wechsel dem frischen Blut a) Penizillin 1000 IE / ml und Streptomycin 1000 μg / ml (PS 1000), b) Nystatin 500 IE / ml (NYS 500), c) Gentamicin 50 μg / ml (GEN 50) oder d) nichts hinzugegeben. Zudem wurde Fütterungsgläsern, die bereits H_2S -Geruch aufwiesen, beim Austausch des Blutes Gentamicin 50 μg / ml hinzugefügt. Der Inhalt aller Gläser wurde am Folgetag erneut auf H_2S -Geruch geprüft. Es wurde bei 27 Fütterungsgläsern an insgesamt 35 Blutwechseln eine systematische Geruchsbeurteilung vorgenommen. Daher übersteigt in Tab. 3-13 die "Anzahl Beobachtungen" im Falle von GEN 50 die "Anzahl an Fütterungsgläsern".

Wertvolle Informationen zu Konservierung, Sterilisation und Desinfektion konnten bei Wallhäuser (1988) gefunden werden. Einen aktuellen Überblick über medizinisch wichtige, systemische Fungizide geben Georgopapadakou & Walsh (1994).

2.6. Die Durchfluß-Fütterungskammer

Das Hauptmerkmal der Durchfluß-Fütterungskammer war, daß ständig ungebrauchtes Blut unter der Membran, auf der sich die Zecken festgesetzt hatten, vorbeigeführt wurde. Eine Peristaltikpumpe beförderte das Blut vom Vorrat im Kühlschrank durch dünne Silikon-Schläuche zur Fütterungskammer in der Klimakabine (Abb. 2-2). Die aus einem massiven Messingblock gefräste Durchfluß-Fütterungskammer wurde durch einen Warmwasserfluß auf $37-38^\circ C$ gehalten. Das langsam (max. 1 ml / min) einströmende Blut gelangte nach Erwärmung auf dem Weg ($23^\circ C$) zur Fütterungskammer und dann durch den Kontakt mit dem temperiertem Messing ($37-38^\circ C$) durch vier kleine parallele Öffnungen in den Raum zwischen Membran und Kammerboden (Abb. 2-3). Diese Öffnungen dienten der gleichmäßigen Verteilung des Blutes und sollten,

so die ursprüngliche Absicht, einen laminaren, also möglichst turbulenzfreien Blutdurchfluß durch das ganze Kammervolumen gewährleisten. Dies sollte die Sedimentation der Erythrozyten, deren Schädigung durch Scherkräfte, sowie Lakunenbildung beim Blutaustausch in der Kammer verhindern. Videoaufnahmen von Vorversuchen zeigten einen einwandfrei laminaren Durchfluß schwarzer Tusche (100 ml / min). Nach einmaliger Passage des Blutes durch die Kammer tropfte es durch einen relativ zur Membran in der Höhe verstellbaren Ausfluß in einen Abfallbehälter. So konnte der Blutdruck unter der Membran unabhängig vom Blutfluß (Massenfluß bzw. Geschwindigkeit) geregelt werden. In einer Durchfluß-Fütterungskammer betrug die für die Zecken nutzbare Membranoberfläche ca. 6 cm², was annähernd zwei Dritteln der eines Fütterungsglases (folgendes Kapitel) entsprach. Ihr Blutverbrauch lag jedoch 20 - 70 mal darüber.

Die Kammer und die zum Schutz zwischen zwei Silikon-Dichtungen (1 - 2 mm dick) eingebettete Membran waren von zwei überstehenden Aluminiumplatten eingeklemmt, die durch vier lange Schrauben mit Flügelnuttern zusammengehalten wurden. Das Silikon half auch zur Wärmeisolierung des Messingblocks. Die obere Platte besaß, wie schon beide Silikon-Dichtungen, eine Öffnung in Form der mit dem Blut in Kontakt stehenden Membranfläche. Vor dem Einbau der Membran wurde das Innere der Durchfluß-Fütterungskammer mit einem Antihafmittel (Teflon-Spray Typ 2000, Norton Pampus GmbH, D-47877 Willich) eingesprüht, um die vorschnelle Anlagerung von Blutzellen oder Mikroorganismen an der relativ rauen Messingoberfläche zu verhindern. Alle Komponenten der Durchfluß-Fütterungskammer, auch die Membran, befanden sich zum Versuchsbeginn in hitzesterilisiertem (180°C, 30 min), autoklaviertem (125°C, 30 min, 1.3 bar) oder bereits werksseitig sterilem Zustand. Schlecht zu reinigende Teile wie Tropfenzähler und dünne Schläuche wurden jeweils nur für einen Versuch verwendet. Mindestens einmal pro Tag wurde das komplette System aus einem fest installierten, raumtemperierten Vorrat mit keimfreier Saline (0.9 % NaCl, inkl. Bakterizide) für einige Minuten durchströmt.

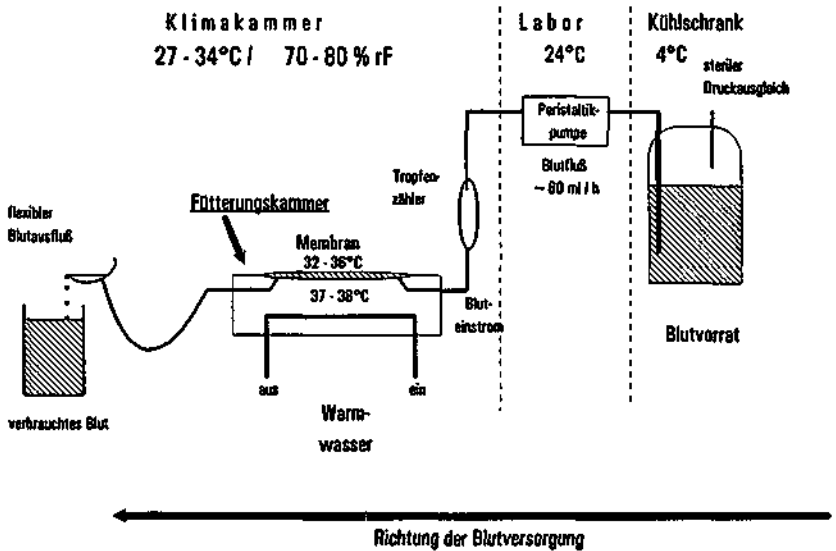
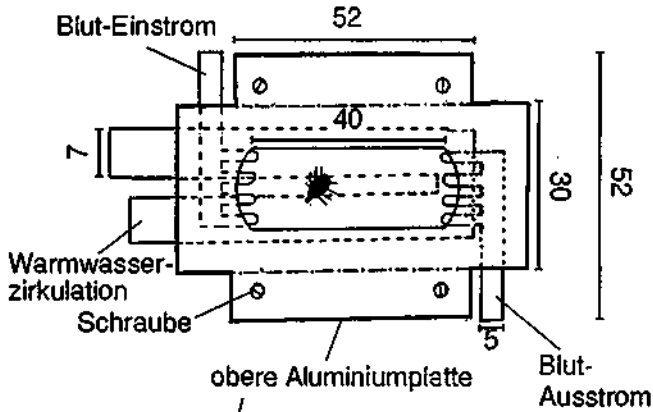


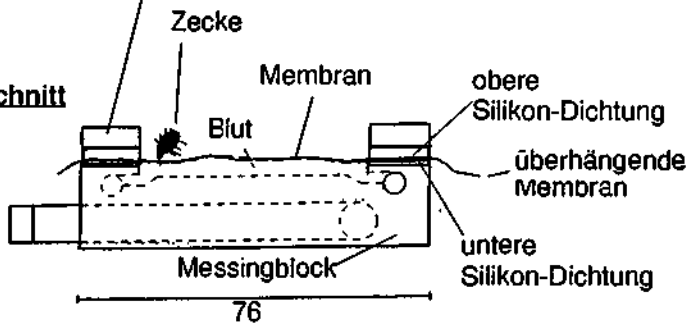
Abb. 2-2 – Aufbau des Durchfluß-Fütterungssystems – Die Größe der einzelnen Komponenten ist nicht maßstabgetreu.

Zusätzlich wurde die Fütterungskammer kurzzeitig durch mit erhöhtem Druck (200 ml-Spritze) eingespritztem und mit o. g. Bakeriziden versetztem destilliertem Wasser (Raumtemperatur) freigespült. Destilliertes Wasser führte sofort zur Hämolyse abgelagerter Blutzellen und sollte möglicherweise vorhandene Mykoplasmen (zellwandlose Bakterien, osmotisch äußerst labil) schädigen. Damit konnte teilweise eine Reinigung der Durchfluß-Fütterungskammer erreicht werden. Unmittelbar danach wurde mit Saline nachgespült und der Blutzufuß in Gang gesetzt. Um die durch die Klimaregelung bedingte Luftbewegung über der Membran zu verringern und die Zecken an der Flucht zu hindern, wurde zumindest in den ersten Versuchsstunden ein Käfig bzw. geschlitztes Deckglas aufgelegt. Eine 60 W-Glühbirne befand sich in 40 cm Abstand zur Membran (12 h : 12 h; Tag : Nacht). Der Versuchs-Klimaschrank war durch die räumlich getrennte Installation für die Luftvorbereitung völlig vibrationsfrei. Aufbau, vorherrschende Temperaturen und relative Luftfeuchte des kompletten Durchfluß-Fütterungssystems zeigt die Abb. 2-2.

Aufsicht



Längsschnitt



Querschnitt

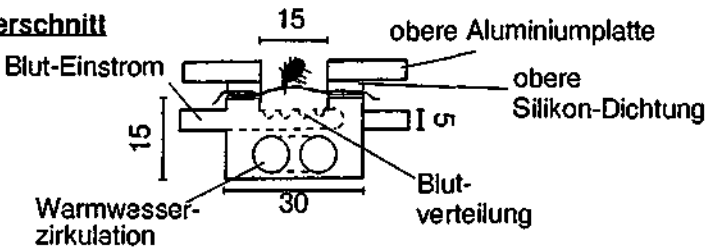


Abb. 2-3 - Aufbau der Durchfluß-Fütterungskammer - Die untere Aluminiumplatte sowie die durchgehenden Schrauben und Flügelmuttern zur Befestigung sind nicht eingezeichnet. Alle Maßangaben in mm.

2.7. Die Fütterungsgläser

B. microplus

Versuche mit *B. microplus* in den Fütterungsgläsern fanden zeitlich weit vor den Experimenten mit *Amblyomma* (nächster Abschnitt) und auf einem anderen Stand der Erkenntnisse statt. Die hier für *B. microplus* benutzten Membranen (Typ B1, B2, siehe Tab. 2-4) waren recht empfindlich gegenüber dem Hindurchtreten von Blut. Dies mußte jedoch unbedingt vermieden werden, da bereits wenig Flüssigkeit (Blut, Serum, Wasser) über einen längeren Zeitraum auf der Membran die Zecken zum Abfallen oder zum Absterben brachte und den Wuchs von Pilzen, insbesondere deren Pruchtkörper stark begünstigte. Dem wurde Rechnung getragen mit einem veränderten Aufbau gegenüber den Fütterungsgläsern für *Amblyomma*. Das Blutreservoir bestand aus einem 400 ml-Schraubglas breiten Typs (93 mm hoch, Außendurchmesser 86 mm, Kat. Nr. 9025204; Merck ABS, CH-8953 Dietikon) mit nach innen gewölbtem Boden und autoklavierbarem Twist-Off®-Deckel (Kat. Nr. 9331000; Merck ABS). Darin versenkt befiand sich ein Glasrohr (30 mm lang; Außendurchmesser 42 mm, Glasstärke ca. 1.5 mm), das nach oben 2 mm überstehend in den Deckel mit Silikon-Kleber eingebaut wurde. Die Glasrohreinsätze waren kurz vor ihrem unteren Rand mit einer rundum gefrästen Einkerbung zur Aufnahme eines Gummiringes versehen. Ein vom Talkum befreites Latex-Kondom wurde an der Spitze auf die geeignete Länge zurechtgeschnitten. Einige Zentimeter dieses Latex-Schlauches wurden über den Glasrohreinsetzung gestülpt und mit einem Gummiring gesichert. In die nun herabhängende untere Öffnung des Kondoms wurde in den angeschweißten Gummiring einen Polypropylen-Ring eingesetzt (Ausgießring PP für Schott-Duran®-Flaschen, DIN-Gewinde GL45, Kat. Nr. 3035702; Merck ABS, CH-8953 Dietikon) unter dem die entsprechende Membran mit Silikon-Kleber befestigt war. Zur besseren Haftung wurde das Polypropylen mit Silikon-Haftgrund bestrichen. Die Länge des Latex-Schlauches war passend, wenn die Membran die Blutoberfläche gerade berührte. Diese Art der "flexiblen Aufhängung" war arbeitsaufwendiger und erforderte bei gleicher Membranfläche aufgrund des größeren Schraubglases die doppelte Blutmenge (40 ml) als der im nächsten Kapitel vorgestellte starre Glasrohreinsetzung (Abb. 2-4), erschien aber bei den gegen Blutdurchtritt empfindlichsten Membran-Typen (Typ B1, B2) als die beste Lösung. Die Glasrohre mit den Membranen blieben unsteril, das Futterblut

wurde einmal täglich ausgewechselt und die Bedingungen im Versuchsklimaschrank waren 33°C / 80 % rF. Versuche mit ungesogenen adulten *B. microplus* auf viskosegestützten Silikon-Membranen wurden in den Fütterungsgläsern mit starrem Glasrohreinsatz (wie für *Amblyomma*) bei 23°C und ca. 80 % rF durchgeführt.

A. hebraeum und *A. variegatum*

Den prinzipiellen Aufbau der Fütterungsgläser zeigt die Abb. 2-4. Ein Fütterungsglas bestand aus einem 200 ml-Schraubglas (93 mm hoch, Außendurchmesser 61 mm, Kat. Nr. 9025003; Merck ABS, CH-8953 Dietikon) mit nach innen gewölbtem Boden und autoklavierbarem Twist-Off®-Deckel (Kat. Nr. 9930000; Merck ABS). Darin versenkt befand sich ein Glasrohr (85 mm lang; Außendurchmesser 42 mm, Glasstärke ca. 1.5 mm), das nach oben flach abschließend in den Deckel mit Silikon-Kleber eingepaßt wurde. Der untere Rand dieses Rohres, über den die je nach Zeckenart benötigte Membran (Ø 39 mm) gespannt wurde, endete 2-3 mm über dem Boden des Glases und war durch Anschmelzen sorgfältig geglättet. Zum Druckausgleich des Luftraums über dem Blut wurde das Loch im Deckel vor Einbau des Glasrohres am Rand eingekerbt. In diese Kerbe, mit Silikon überklebt, war für die Experimente eine sterile Einwegkanüle (0.5 / 16 mm bzw. 25G / 5/B) eingesetzt.

Um ein Entkommen der Zecken zu verhindern, war das obere Ende des Glasrohres für Larven und Nymphen mit einem Baumwoll-Wattestopfen und für die Adulten mit einem, in *n*-Hexan gewaschenen Sieb aus rostfreiem Stahl verschlossen. Wenn nicht anders angegeben, waren die Bedingungen in der klimatisierten Kammer, wo die Versuche abliefen, 23°C / 80 % rF in einem zwölfstündigen Licht / Dunkelheit-Wechsel bei normalen CO₂-Konzentrationen (0.03 %). Als Beleuchtung dienten zwei 25 W-Glühbirnen in 40 cm Abstand. Die Fütterungsgläser befanden sich bis auf Bluthöhe in einem 38°C-Wasserbad.

Es wurde versucht, möglichst wenig Keime in das System einzutragen. Sämtliche, mit dem Futterblut in Berührung kommenden Gegenstände und Behälter waren entweder bereits werksseitig sterilisiert oder wurden autoklaviert (125°C, 30 min, 1.3 bar). Die für Larven und Nymphen von *Amblyomma* benutzten viskosegestützten Silikon-Membranen (V1, V2) wurden nach Befestigung am Glasrohr des Fütterungseinsatzes von außen mit Industrialkohol (70 %ige Lösung) abgespült und

trocknen gelassen. Baudruche-Membranen (Typ B3) wurden unterseitig aus 7 cm Abstand 5 min lang mit einem UV-C-Strahler im Labor oberflächlich entkeimt (Wellenlänge λ 253 nm, UV-Strahler HNS 55 W OFR, Osram AG, D-Berlin). Dadurch wurden sie härter, glatter und wasserundurchlässig. Eine Skizze der hierzu gebastelten Vorrichtung findet sich im Anhang (Abb. 12-1). Die Fütterungsgläser für adulte *A. hebraeum* konnten inklusive angebrachter Membran (Typ W1) autoklaviert werden. Alle zusätzlich eingefüllten Lösungen (außer Itraconazol, Enilconazol und Heparin und für den Akarizid-Test Ivermectin und die Plazebo-Formulierungen, siehe Substanzenverzeichnis Tab. 2-2) waren steril (ggf. membranfiltriert; 0,22 μ m Porenweite) und unter dem Steril-Abzug eingefüllt. Die Blutwechsel fanden ungeschützt auf dem Laborplatz statt. Nach dem extrem starken Pilzbefall in zwei Behandlungen (7 B und 9, siehe Übersicht Tab. 2-8) wurden die Luftbewegungen im Labor und besonders der Einstrom von Außenluft via Ventilator stark reduziert. Beim Bluttausch wurden stets autoklavierte Schraubgläser benutzt. Am Ende eines Versuchsblocks fand die sorgfältige Reinigung und Sterilisation der benutzten Gerätschaften besondere Beachtung, um die Übertragung eventuell resistent gewordener Keime in Folgeversuche zu verhindern.

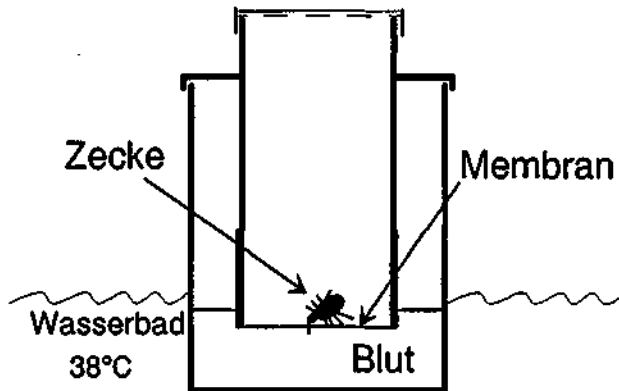


Abb. 2-4 – Prinzip der Fütterungsgläser –

2.8. Die Membranen

2.8.1. Membranen für Vorversuche

In Vorversuchen konnte ein Überblick über die für die *in vitro* Zeckenfütterung eventuell in Frage kommenden Membranen gewonnen werden. Die folgende alphabetische Liste (Tab. 2-3) zeigt das mehr oder weniger detailliert untersuchte Material. Tauglichkeitsprüfungen an Membranen wurden von Zeit zu Zeit durchgeführt, wann immer neue Informationen, neues Material oder neue Ideen es erlaubten. Dazu wurde optisch deren Struktur und Dicke und mechanisch deren Durchdringbarkeit, Elastizität und Reißfestigkeit beurteilt. Anschließend wurde ihr Verhalten (Benetzbarkeit, Quellung, Verformung, Schädigung) gegenüber Lösemitteln (Wasser, Äthanol, Azeton, Hexan, Xylol) beobachtet, sofern dies nicht schon aus materialkundlicher Literatur ersichtlich war.

2.8.2. Membranen für Fixierungs- und Fütterungsversuche

Membranen der engeren Wahl finden sich in Tab. 2-4. Diese Materialien wurden am häufigsten und am erfolgreichsten in der in dieser Arbeit geschilderten *in vitro* Fütterung eingesetzt.

Die künftig als Wiener Membran bezeichnete, 0,5 mm dicke, mit Terylene®-Netz verstärkte Silikon-Membran (Typ W1) fand bereits in der *in vitro* Tsetsefliegen-Zucht Verwendung und wurde mir freundlicherweise von Dr. E. Luger und Dr. U. Feldmann (IAEA, Entomologie Sektion, Seibersdorf, A-Wien) überlassen. Nach kurzem Waschen in *n*-Hexan und Azeton wurde die getrocknete Membran, die etwas glattere Seite dem Blute zugewandt, mit Silikon-Kautschuk auf das untere Ende des Glasrohres aufgeklebt. Das Glasrohr selbst wurde vorher ebenfalls innen und außen mit beiden Lösemitteln abgespült. Nach der Trocknung wurde überstehendes Silikon abgeschnitten und das Ganze durch Eintauchen in entionisiertes Wasser auf Dichtigkeit überprüft. Anschließend konnte alles locker zusammengeschrubt autoklaviert werden (125°C, 30 min, 1,3 bar).

Tab. 2-3 - Alle untersuchten Membranen im Überblick -

Nr.	Material	Präparation
1	Baudruche (Darmabschnitte von Rindern oder Schafen)	-
2	Baudruche (Darmabschnitte von Rindern oder Schafen)	bestrichen oder imprägniert mit diversen Klebstoff- und Silikon-Beschichtungen
3	Baudruche (Darmabschnitte von Rindern oder Schafen)	gekocht in destilliertem Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung
4	Baudruche (Darmabschnitte von Rindern oder Schafen)	dto, aber bestrichen mit diversen Klebstoffen
5	Femidom® (Polyurethan)	-
6	Glasfaserfilter	-
7	Kleenex™-Reinigungstücher	beschichtet mit Acryl-Wundpflasterspray oder Acryl-Nahtdichter
8	Kollagen-Glykosaminoglykan-Doppelschichtmembran für die Chirurgie (Yannas & Burke, 1980; Yannas <i>et al.</i> , 1969)	-
9	Latex-Kondome diverser Stärken	-
10	Linsen-Reinigungspapiere (Kodak, Hama)	beschichtet mit diversen Silikon-Kautschuken
11	Membranfilter, hydrophil, diverse Materialien und Stärken	beschichtet mit Teflon-Spray
12	Membranfilter, hydrophob, diverse Materialien und Stärken	-
13	Membranfilter, hydrophob, diverse Materialien und Stärken	bestrichen mit diversen Klebstoffen
14	Ornidern™ (Polyurethan-Membran für die Chirurgie)	-
15	Polyamidgewebe	-
16	Polypropylen-Gitter (Maschenweite 900 µm)	beschichtet mit Silikon-Kautschuk
17	PTFE-Folie, mit Polypropylen gestützt	-
18	Reinigungstücher (präzise, abriebfrei, für Reindräume)	beschichtet mit diversen Silikon-Kautschuken
19	Schlangenhaut, verbraucht abgestoßen (Ringelhaier)	-
20	Silastic® (reinste Silikon-Membran für die Chirurgie)	-
21	Silikon mit integriertem Terylene®-Netz (Bauer & Wetzel, 1976)	-
22	Teflon-Folie Gore-Tex® (PTFE)	-
23	Wurstpelle (Kunststoff)	-

Die viskosegestützte Silikon-Membran konnte in zwei Stärken (10 - 40 µm Typ VI und 50 - 90 µm Typ V2) selbst angefertigt werden. Als Basis diente Kodak® lens cleaning paper (Eastman Kodak, Rochester, N.Y., USA; für große Flächen: Typ LENSX 90, Berkshire Int. Ltd., D-73252 Lenningen), das mit transparentem Einkomponenten-Silikon-Kleber (Details siehe Tab. 2-4) imprägniert worden war.

Dazu wurden einzelne Blätter (124 × 71 mm) des aus regenerierter Zellulose (Viskose) bestehenden Linsen-Reinigungspapiers auf Parafilm

gelegt, an einem Ende befestigt und Silikon-Klebstoff mit Hilfe eines Schabers aus festem Silikon (3 mm stark) vorsichtig in die Fasern eingepreßt. Wichtig war, danach den überschüssigen Klebstoff mit dem Silikon-Schaber rasch und gleichmäßig in einem Zug abzustreifen. Der richtige Anpreßdruck entschied dabei über Dicke und Qualität der Membran. War deren Oberfläche nach dem Abstreifen leicht matt, d. h., konnte man die faserige Struktur des Linsen-Reinigungspapiers erkennen, wurden sofort die gereinigten Glasrohre aufgesetzt.

Nach einem Tag des Trocknens wurde das Ganze vom Parafilm gelöst, die überstehende Membran am Glasrohr hochgeschlagen, rechte Winkel abgeschnitten und mit zwei, zum Deckel hin versetzten "Runden" Klebeband (Tesa 4108; Beiersdorf AG, D-Hamburg) befestigt. Nach der Dichtigkeitsprüfung durch kurzes Eintauchen in entionisiertes Wasser wurde die Membran und das Glasrohr äußerlich mit 70 % Äthanol abgespritzt und trocken gelassen.

Die sogenannte Baudruche-Membran wird sehr wahrscheinlich aus Teilen des Darms (Blinddarm?) von Rindern (Galun & Kindler, 1968) oder Schafen hergestellt (Dicke: 10 - 50 μm , gemessen mit Mikrometerschraube von Preisser). Genaueres zum Ursprung der Membran konnte auch durch schriftliche Anfrage beim alleinigen Hersteller (Joseph Long Inc., 69 Roosevelt Avenue, Belleville, N. J. 07109, USA) nicht herausgefunden werden ("trade secret"). Regelmäßige und unbeschädigte Partien wurden je zweimal in *n*-Hexan und Azeton gewaschen und getrocknet. Es wurde jeder Hautkontakt mit der Membran vermieden. Gegen Aufweichen und Zersetzung durch Kontakt mit dem Blut wurde sie imprägniert durch mehrstündiges Eintauchen in verdünnten Klebstoffen: Membran-Typ B1 in Atlas Ago Plastikklebstoff 500 50 %ig in Azeton (besser Xylol); Typ B2 in Evo-Stik Impact Adhesive 25 %ig in Xylol (Details siehe Tab. 2-4). Nach kurzem Abstreifen konnten die Lösemittel 8 - 24 h bei Raumtemperatur verdunsten. Es folgten 1 h Aufenthalt im elektrischen Ofen bei 110°C (Typ B1). Zusätzlich fünfminütiges, unterseitiges Bestrahlen mit UV-C aus 7 cm Entfernung (Wellenlänge λ 253 nm, UV-Strahler HNS 55 W OFR, Osram AG, D-Berlin) verhärtete den Klebstoff (Atlas Ago 500) und bildete so den widerstandsfähigeren Membran-Typ B3. Die Skizze der hierzu gebauten Vorrichtung findet sich, wie schon erwähnt, im Anhang (Abb. 12-1).

Eine PTFE-(Polytetrafluoroethylene)-Membran (Teflon) auf einem Geflecht aus Polypropylen (Membrane Filter FSLW 04700, Typ FS, Porenweite 3 μm , Millipore Corp. USA) wurde oberseitig entweder

durch einen unverdünnt (Membran-Typ T1) oder zwei verdünnt (Membran-Typ T3) aufgetragene Klebstoffe teilversiegelt oder durch eine Kombination aus beiden (Membran-Typ T4, Details siehe Tab. 2-4). Membran-Typ T2 entstand durch kurzes Besprühen mit Acryl-Wundpflasterspray. Die Lösemittel wurden entweder durch heißes Wasser ausgespült (T1, Trocknung 1 h bei 70°C) oder verdunsteten mindestens 24 h bei 70°C (T2) oder bei Raumtemperatur (T3, T4). Die so präparierten Membranen konnten nach Einbau in die Durchfluß-Fütterungskammer (PTFE den Zecken zugewandt) ohne bleibende Größenveränderung autoklaviert werden. Ihre Stärke betrug gleichmäßig 30 µm (120 µm inklusive Polypropylen-Matrix; T1, T3). Welche Membranen zur Fütterung welcher Zeckenarten und -stadien verwendet wurden, zeigt die Tab. 2-5.

Tab. 2-4 -- Membranen für Fixierungs- und Filterungsversuche --

Typ	Bezeichnung	Material	Präparation	Herkunft	Verwendung
11	Klebstoffesiegelte PTFE-Membran (Teflon)	Matrix: PTFE-(Polytetrafluorethylen)- Membran auf einem Stützgerüst aus Polypropylen (PP) Dicke PTFE: 30 µm, PP: 90 µm Klebstoff: Evo-Silk	PTFE einmal beschichten mit Evo-Silk (unverdünn), dreimal gespült in destilliertem Wasser (90°C), Trocknung 1 h bei 70°C.	Matrix: Membrane Filter FSLW 04700, Typ FS, Porenweite 3 µm, Millipore Corp. USA Klebstoff: Evo-Silk, Evode Ltd., Common Road, GB-Stafford	<i>L. naevus</i> Weibchen
12	Klebstoffesiegelte PTFE-Membran (Teflon)	Matrix: dlo. Klebstoff: Federa Acryl Wundglasler- Spray	PTFE kurz mit Wundglasler besprühen, 24 h Trocknung bei 70°C	Matrix: dlo. Klebstoff: PanPharma CH-3000 Bern	<i>L. naevus</i> Weibchen
13	Klebstoffesiegelte PTFE-Membran (Teflon)	Matrix: dlo. Klebstoff: Rubber Cement & Evo-Silk	PTFE beschichten je einmal mit Rubber Cement (25 % in Petrolöl) und Evo-Silk (25 % in Xyol), Trocknung > 24 h bei Raumtemperatur (RT), Dicke PTFE: unverändert, 30 µm	Matrix: dlo. Klebstoff: Rubber Cement No. 00494L, San- ford Corp., Balmood, USA; Evo-Silk, Evode Ltd., Common Road, GB-Stafford	<i>B. microplus</i> Adulte
14	Klebstoffesiegelte PTFE-Membran (Teflon)	Matrix: dlo. Klebstoff: dlo.	PTFE beschichten je einmal mit Rubber Cement pur und Evo-Silk (25 % in Xyol), Trocknung > 24 h bei RT; Dicke nicht gemessen	Matrix: dlo. Klebstoff: dlo	<i>B. microplus</i> Adulte und Larven
91	Klebstoffimpfprägnier- te Baudruck- Membran	Baudrucke: Weichschichten (zweite seriere) Darmabschnitte von Rindern oder Schafen, Dicke 10 - 50 µm Klebstoff: Allen Ago Plastikklebstoff 500	Baudrucke zweimal gewaschen in n-Hexan und Aceton (jeweils), mehrschichtiges Einleichen in Klebstoff (50 % in Aceton, praktischer: Xyol), Ab- streifen und Trocknung 8 - 24 h bei RT, 1 h im Oven bei 110°C, Dicke Baudrucke: unverändert 10 - 50 µm	Baudrucke: Joseph Long Inc., 69 Roosevelt Avenue, Balaclava, N. J. 07109 USA Klebstoff: Degussa AG, D-63457 Hanau	<i>B. microplus</i> als Stadien
B2	Klebstoffimpfprägnier- te Baudruck- Membran	Baudrucke: dlo. Klebstoff: Evo-Silk Impreg Adhesive	Mischung wie oben, zweimal kurz eingetaucht in Klebstoff (25 % in Xyol), Abstreifen und Trocknung 24 h bei RT	Baudrucke: dlo. Klebstoff: Evode Ltd., Common Road, GB-Stafford	<i>B. microplus</i> Larven und Nymphen

Tab. 2-4 – Membranen für Fixierungs- und Fütterungsversuche – (Fortsetzung).

Typ	Bezeichnung	Material	Präparation	Herkunft	Verwendung
B3	Klebstoffimpregnier- te Baudrucke- membran, UV-C- bestrahit	Baudrucke: dfo. Klebstoff: Alles Ago Plusklebstoff 500 UV-C Strahler HNS 55W OFR, Strahlungsleistung UV: 15 W, Bestrahlungsstärke UV 253,7 nm in 1 m Abstand: 170 $\mu\text{W} \cdot \text{cm}^2$	wie B1, danach 5 min Bestrahlung mit UV-C, aus 7 cm Abstand zur Unterseite (führt zu starker Versegelung und Verhärtung der Membran)	Baudrucke: dfo. Klebstoff: Degussa AG, D-63457 Hanau Strahler: Osram AG, D-Berlin	A. variegatum Nymphen
W1	Wiener Membran	Silikon mit integriertem Terylene®-Netz mittlere Dicke: 520 \pm 100 μm , Extreme: (340 - 690 μm) autoklavierbar	nach Bauer & Wetzel (1976) gewaschen in destilliertem Wasser, n-Hexan und Azeton (technisch)	gebraucht erhalten aus der Entomologie- Abteilung der IAEA, Wien, dort benutzt zur Fütterung von Tsetsefliegen	A. hebraeum A. variegatum Adulte
V1	viskosesestizte Silikon-Membran	mit Silikon imprägnierte Viskose-Fasern Dicke: 10 - 40 μm	siehe Text	Metric Kodak® lens cleaning paper (Eastman Kodak, Rochester, N.Y., USA), einheitliche Dicke: 50 μm , Silikon-Klebstoff: Einkomponentenkleber auf Essigsäurebasis, raumtemperaturvernetzend (RTV-1), Härter: 45 - 55° shore, (Ad. Nr. 251470, Kunststoffe Rehau AG, D-95111 Rehau)	A. hebraeum Larven B. microptus Adulte
V2	viskosesestizte Silikon-Membran	mit Silikon imprägnierte Viskose-Fasern Dicke: 50 - 90 μm	siehe Text	dfo.	A. hebraeum Nymphen, auch Akantzidien

Tab. 2-5 – Verwendete Membran-Typen, sortiert nach Zeckenart und -stadium –

	Durchfluß-Fütterungskammer				Fütterungsgläser					
	Klebstoffversiegelte PTFE-Membranen				Klebstoffimprägnierte Bauartdrucke-Membranen			Wiener Membran	viskosegestützte Silikon-Membranen	
	T1	T2	T3	T4	B1	B2	B3	W1	V1	V2
<i>I. ricinus</i> , Weibchen	X	X								
<i>B. microplus</i> , Larven				X	X	X				
Nymphen					X					
Adulte			X	X	X				X	
<i>A. variegatum</i> , Nymphen							X			
Adulte								X		
<i>A. hebraeum</i> , Larven									X	
Nymphen										
Adulte								X		X

2.9. Die Fixierungsstimuli

Mit Fixierungsstimuli sind hier alle mechanischen oder chemischen, flüchtigen und nicht-flüchtigen Stimuli gemeint, die einzeln oder kombiniert auf die Membran gegeben wurden mit dem Ziel, für die *in vitro* Fütterung ausreichende Zeckenfixierungsraten zu erreichen. Auch können Temperatur und Feuchte, möglicherweise auch Licht und die Beschaffenheit und Oberflächenstruktur der Membran, Reize für die Zecken darstellen, sich festzusetzen. Die relative Feuchte in der Versuchsklimakabine wurde bei 70 - 80 % gehalten, die Temperatur im allgemeinen auf konstante 23°C eingestellt. Für *I. ricinus* lag sie bei 27°C, für einige Experimente mit *B. microplus* bei 33°C oder 28 - 34°C, für Adulte von *A. variegatum* ebenfalls bei 33°C (siehe auch Tab. 2-7). Die Beleuchtung bestand aus ein bis zwei Glühbirnen in ca. 40 cm Abstand mit insgesamt 50 - 60 W Leistung (12 h Tag, 12 h Nacht). Zu den Membranen siehe Tab. 2-5.

In Tab. 2-6 sind alle in Versuchen *in vitro* benutzten Stimuli einzeln aufgelistet. Tab. 2-7 zeigt die verwendeten Kombinationen dieser Stimuli mit Hinweis auf diejenigen Versuche, die nur zur Feststellung der Fixierungsraten angesetzt worden waren.

Wenn nicht anders vermerkt, wurden die synthetischen Pheromon-Mischungen in die Höhlung einer Gummikappe gegeben (Verschluß für Peva-Flaschen, Kat.-Nr. 9014200, Merck ABS). Jede Gummikappe erhielt die Menge für vier Fütterungsgläser, gelöst in insgesamt 400 µl Dichlormethan (analytischer Grad). Nachdem etwa 1 h später das Lösemittel in das Gummi eingedrungen und verdampft war (Butler & McDonough, 1979) wurde je ein Viertel einer solchen Kappe auf die Membran eines Fütterungsglases gelegt. Die Gummikappen wurden nur mit Azeton-gereinigten Pinzetten und Scheren berührt. Saline war schon Tage vorher aufgesprüht worden. Bei Wirtshaar-Extrakten auf der Membran, konnten ebenfalls die Lösemittel 1 h verdunsten, bevor eventuell noch andere Stimuli (Wirtshaare, Zeckenkot usw.) hinzukamen. Bis die Zecken in den Versuch gebracht wurden, verging eine weitere Stunde, in der sich die gesamte Fütterungseinheit einschließlich des Blutes durch das Heizwasser erwärmen konnte.

Zum Aufsetzen der Zecken und bei deren Beobachtung, wozu der Deckel oder Stopfen über der Membran entfernt werden mußte, wurde durch einen vom Versuchsaufbau wegweisenden Schnorchel ausgeatmet. Dies war besonders nötig bei den Larven sowie allen ungesogenen

Stadien von *Amblyomma*, die sich noch nicht auf der Membran festgesetzt hatten. Die Atemluft des Beobachters provozierte bei nicht-fixierten Zecken in der Regel aufgeregtes Umherlaufen und damit meist auch das Verlassen der Membranfläche oder gar der Fütterungsgefäßes. Waren die Zecken erst einmal fixiert und das Blutmahl schon fortgeschritten, konnte auf den Schnorchel verzichtet werden.

Am d 4 n. I. wurden in den Versuchen mit *Amblyomma* (Nymphen und Adulte) die Stücke der Gummikappen, ein Großteil der Tierhaare und die kleinen Zahnwattestopfen (sie fielen beim Auftragen der Zecken aus den Aufbewahrungsröhrchen) von den Membranen entfernt. Dies hatte den Vorteil, daß die Zecken besser beobachtbar waren und bei den Blutwechseln und beim Kontrollieren nicht ständig durch herumrollende Teile angestoßen wurden.

Es folgen Erläuterungen zu den beiden Übersichtstabellen (2-8 und 2-9) "A. hebraeum Nymphen / Adulte". Diese Tabellen fassen in schematischer Form Besonderheiten der Methodik der Fütterungsversuche mit *A. hebraeum* zusammen, z. B. Art und Konzentration der Mikrobizide, spezielle Blutzubereitungen, Anzahl der Blutwechsel usw.. Jede Behandlung ist mit ihrer Nummer sowie der Nummer ihres zugehörigen Versuchsblocks aufgeführt. Im weiteren Verlauf des Textes wird auf diese Nummern Bezug genommen. Dem verwendeten Futterblut war nach der Sammlung stets 2 g Glukose / l zugefügt worden. Wenn nicht anders angegeben, wurde es außerdem bei jedem Blutwechsel mit ATP und reduziertem Glutathion (beide 10^{-3} mol / l) versetzt.

Nymphen (Tab. 2-8)

Beide schraffierten Balken zeigen die Behandlungs-Nummern. In der oberen Blatthälfte befinden sich die Behandlungen [13] - [21] mit drei Blutwechseln pro Tag, in der unteren Hälfte die Behandlungen [22] - [32] mit täglich zweimaligem Blutwechsel. Alle Behandlungen hatten Mikrobizide im Futterblut. Deren Art und Konzentration sind abgekürzt eingetragen. Eine eventuelle UV C-Bestrahlung ist ebenfalls hier vermerkt. Die Bedeutung der Abkürzungen findet sich am unteren Blattrand. Direkt unter einer Behandlungsnummer ist Näheres zu den Versuchsbedingungen vermerkt. Insgesamt wurden 19 verschiedene Behandlungen in 6 Versuchsblöcken durchgeführt.

46 Tiere, Material und Methoden

Tab. 2-6 -- Verzeichnis der einzelnen Fixierungsstimuli -- Die Stimulus-Bezeichnungen sind in alphabetischer Reihenfolge angegeben. Kombinationen dieser Stimuli sind in Tab. 2-7 aufgelistet. Die Membranfläche pro Versuchseinheit (VE) betrug etwa 10 cm².

Nr.	Bezeichnung	Spezifikationen	Menge pro VE	Lagerung
1	Glaswolle	Laborqualität	kleingeschnitten, Membran leicht bedeckt	dto.
2	Kaninchenhaare	von männlichen Kaninchen, Rasse "New Zealand White"	kleingeschnitten, Membran leicht bedeckt	frisch
3	pheromonimprägnierte Gummikappe (PIG)	¼ Gummikappe war über Wochen im Kontakt mit <i>in vitro</i> saugenden, adulten Zecken der jeweiligen Art	¼ Gummikappe	-18°C, fest verschlossen
4	Rinderhaar-Extrakt A	frisch geschorene Stierhaare 3x je 20 min lang in Hexan / Diäthyläther-Gemisch (1:1) gewaschen (insgesamt 10 ml Lösemittel / g Haare); Überstand des Extraktes unter Luftstrom auf ca. 20 vol% eingengt	100 µl (= 0,5 g Haare bzw. 25 cm ² Rindfläche); Fettgehalt des eingengten Extraktes 37 - 60 mg / ml	kurzzeitig -18°C, sonst -80°C, fest verschlossen
5	Rinderhaar-Extrakt B	Extraktion wie oben, jedoch Lösemittel Dichlormethan (10 ml / 1,5 g Haare); auf ca. 30 vol% eingengt	50 µl (= 0,25 g Haare bzw. 12 cm ² Rindfläche); Fettgehalt ca. 10 mg / ml	dto.
6	Rinderhaare	von jungen Stieren (Simmentaler)	kleingeschnitten, Membran leicht bedeckt	kurzzeitig -18°C, sonst -80°C
7	Rinderohr-Extrakt	3x Waschung der Innenseite desselben Stierohres mit insgesamt 100 ml Hexan / Diäthyläther-Gemisch (1:1); Überstand des Extraktes unter Luftstrom auf ca. 5 vol% eingengt	Extrakt 6x dünn mit Pinsel auf Membran aufgetragen	kurzzeitig -18°C, sonst -80°C, fest verschlossen
8	Saline	NaCl-Lösung 0,9%	ca. 200 µl	+4°C
9	synthetische Pheromonmischung 1 für <i>A. variegatum</i> (SPM1-A.v.)	ortho-Nitrophenol : Methylsalicylat §, in Äthanol	0,01 : 100 µg §, aufgetragen direkt auf die Membran	SPM: -18°C, fest verschlossen
10	synthetische Pheromonmischung 2 für <i>A. variegatum</i> (SPM2-A.v.)	ortho-Nitrophenol : Methylsalicylat : Pelargonensäure ‡ (Nonansäure), in Dichlormethan	10 : 3 : 30 µg §, nach Verdampfen des Lösemittels (100 µl) und Eindringen in ¼ Gummikappe	dto.
11	synthetische Pheromonmischung für <i>A. hebraeum</i> (SPM-A.h.)	ortho-Nitrophenol : iso-Buttersäure (2-methylpropanoic acid) : Benzaldehyd §, in Dichlormethan	1 : 1 : 0,1 µg §, nach Verdampfen des Lösemittels (100 µl) und Eindringen in ¼ Gummikappe	SPM: -18°C, fest verschlossen;
12	(SPM-A.h.) × 10 ³	dto.	1 : 1 : 0,1 mg, sonst dto.	dto.
13	Zeckenkot der entsprechenden Art	von <i>in vitro</i> gefütterten adulten Zecken	ca. 20 mg (frisch gemörsert für Larven von <i>A. hebraeum</i>)	kurzzeitig -18°C, sonst -80°C, fest verschlossen
14	Zeckenkot der entsprechenden Art (+ kurze Wirtshaare)	von <i>in vitro</i> gefütterten adulten Zecken (enthält vereinzelt kurze Wirtshaare)	ca. 20 mg	dto.

§ Angelehnt an Norval *et al.* (1991); ‡ angelehnt an Schöni *et al.* (1984); § angelehnt an Apps *et al.* (1988).

Tab. 2-7 -- Benutzte Kombinationen von Fixierungstimuli -- Genaueres zu den Einzelstimuli findet sich unter der jeweiligen (-)Nummer in Tab. 2-6 auf der vorigen Seite. Membran-Typen sind in Tab. 2-4 erklärt. Abkürzungen: DFK Durchfluß-Fütterungskammer, FG Fütterungsgläser.

Zeckenart / Stadium	Stimulus-Kombination		Membran Typ	Klimakammer (80 % rF) Temperaturen	Fütte- rungs- system
	Typ	Einzelstimuli			
<i>I. ricinus</i> Adulte (Weibchen)	A	(2) Kaninchenhaare (7) Rinderohr-Extrakt	T1	27°C	DFK
<i>I. ricinus</i> Adulte (Weibchen)	B	(2) Kaninchenhaare (7) Rinderohr-Extrakt (8) Saline (13) Zeckenkot	T2	27°C	DFK
<i>B. microplus</i> Larven und Adulte	C	(4) Rinderhaar-Extrakt A (6) Rinderhaare (8) Saline (14) Zeckenkot (+Wirtshaare)	T3 (nur Adulte), T4	28 - 34°C	DFK
<i>B. microplus</i> Adulte	D	(5) Rinderhaar-Extrakt B (6) Rinderhaare	V1	23°C	FG
<i>B. microplus</i> Larven und Nymphen	E	(4) Rinderhaar-Extrakt A (8) Saline (14) Zeckenkot (+Wirtshaare)	B2	33°C	.
<i>B. microplus</i> alle Stadien	E	(4) Rinderhaar-Extrakt A (6) Saline (14) Zeckenkot (+Wirtshaare)	B1	33°C	.
<i>B. microplus</i> künstliche Adulte	F	(4) Rinderhaar-Extrakt A (8) Saline	B1	33°C	.
<i>A. variegatum</i> Nymphen	G	(9) SPM1-A.v. (4) Rinderhaar-Extrakt A (8) Saline	B3	23°C	.
<i>A. variegatum</i> Männchen (und Weibchen)	H	(4) Rinderhaar-Extrakt A (8) Saline (10) SPM2-A.v.	W1	33°C	.

Fortsetzung nächste Seite »

Tab. 2-7 Fortsetzung: ~ Benutzte Kombinationen von Fixierungsstimuli ~ Genaueres Angaben zu den Einzelstimuli finden sich unter der jeweiligen ()-Nummer in Tab. 2-6. Membran-Typen sind in Tab. 2-4 erklärt. Abkürzungen: DFK Durchfluß-Fütterungskammer, FG Fütterungsgläser.

Zeckenart / Stadium	Stimulus-Kombination		Membran Typ	Klimakammer (80 % rF) Temperatur	Fütte- rungs- system
	Typ	Einzelstimulus			
<i>A. hebraeum</i> Larven	J	(5) Rinderhaar-Extrakt B (6) Rinderhaare (11) SPM-A.h. (13) Zeckenkot	V1	23°C	FG
<i>A. hebraeum</i> Nymphen	J	(2) Kaninchenhaare (11) SPM-A.h.	V2	•	•
do.	K	(2) Kaninchenhaare (3) A.h.-pheromonimpräg- nierte Gummikappe	V2	•	•
<i>A. hebraeum</i> Männchen (Vorfütterung)	L	(6) Rinderhaare (13) Zeckenkot	W1	•	•
do. nur Fixierungstest	M	(1) Glaswolle (11) SPM-A.h.	•	•	•
do.	N	(1) Glaswolle (13) Zeckenkot	•	•	•
do.	O	(6) Rinderhaare (11) SPM-A.h.	•	•	•
do.	P	(1) Glaswolle (12) SPM-A.h., $\times 10^3$	•	•	•
do.	-	(11) SPM-A.h.	•	•	•
do.	-	(1) Glaswolle	•	•	•
do.	-	(6) Rinderhaare	•	•	•
<i>A. hebraeum</i> Männchen und Weibchen	-	(13) Zeckenkot	•	•	•

Die Versuchsdauer war auf 10 d begrenzt. Behandlung [17..] trat in zwei Versuchsblöcken auf (VB1: [17]; VB2: [17B]). Behandlung [22..] fand sich in 6 Versuchsblöcken, wobei in Behandlung [22E] erstmals F_1 -*in vitro* Nymphen eingesetzt wurden.

Adufte (Tab. 2-9)

Die obere Blatthälfte (Teil I) schildert die Art der Vorfütterung ungesogener Männchen, die entweder *in vivo* auf dem Kaninchen oder *in vitro* mit einem oder zwei Blutwechsein pro Tag stattfand. Diese (Vor-)Behandlungen sind in schraffierten Feldern mit Buchstaben [A - F] kenntlich gemacht. Im Laufe von 5 - 7 d der Blutaufnahme sollten die Männchen sexuell heranreifen. Mikrobizide in eckigen Klammern waren nicht ständig im Futterblut, sondern in einem Tauchbad, das der täglich 20 minütigen (Behandlung [1]: 10 min) Desinfektion der Membran-Unterseite diente. Die in Teil I vorgefütterten Männchen kamen erst in Teil II (untere Blatthälfte) mit ihren Partnerinnen zusammen.

So bildeten z. B. Männchen der (Vor-)Behandlung [C], nachdem sie mit Weibchen zusammengebracht worden waren, die darunter stehenden Behandlungen [3], [4], und [5]. in den Behandlungen [1 - 3] verblieben die Männchen auf den Membranen und ungesogene Weibchen wurden hinzugefügt, in den restlichen Behandlungen wurden sie von den Vorfütterungs-Membranen abgelöst und kamen in frischen Fütterungsgläsern mit den Weibchen zusammen. Es wurden insgesamt 16 Behandlungen in 5 Versuchsblöcken durchgeführt. In den Behandlungen [1 - 3] fand der Wechsel des Futterblutes nur einmal täglich, in allen anderen (außer [22C]: 2x täglich) dreimal pro Tag statt. Behandlung [17G] wurde in derselben Versuchsreihe mit F_1 -*in vitro* Nymphen wiederholt [17F].

Tab. 26 - Behandlungsbericht *Ambylyomma hebraeum* Nymphen -
 Allen Behandlungen wurde 2 g Glukose/l und wenn nicht anders vermerkt, ATP und Glukosen (beide 10 mmol/l) hinzugefügt.

NYMPHEN
 A. hebraeum

ungesogene Nymphen		Veruchsdauer: 19 Tage																	
Blutwechsel X mal pro Tag		i n v e r t i r o																	
Blutwechsel im Fütterbehälter		G E N 5		G E N 50		P S 100		G E N 5		G E N 50		P S 100		G E N 5		G E N 50			
Blutwechsel		U V C		5 ml		10 mg/l		10 mg/l		10 mg/l		10 mg/l		10 mg/l		10 mg/l			
Fungizid/Bestäubung		13.11.20		12.12.20		18.12.20		18.12.20		17.01.21		14.02.21		15.02.21		17.02.21		20.02.21	
E: Behandlung Nr.		22		23		24		25		26		27		28		29		30	
Bemerkungen		gesundheitlich		gesundheitlich		gesundheitlich		gesundheitlich		gesundheitlich		gesundheitlich		gesundheitlich		gesundheitlich		gesundheitlich	

Versuchsblock Nr. _____

Versuchsblock 1

Versuchsblock 2

Fütterung

ungesogene Nymphen

Veruchsdauer: 10 Tage

Blutwechsel X mal pro Tag		i n v e r t i r o																	
Blutwechsel im Fütterbehälter		G E N 5		G E N 50		P S 100		G E N 5		G E N 50		P S 100		G E N 5		G E N 50			
Blutwechsel		U V C		5 ml		10 mg/l		10 mg/l		10 mg/l		10 mg/l		10 mg/l		10 mg/l			
Fungizid/Bestäubung		22.12.20		23.12.20		24.12.20		25.12.20		26.12.20		27.12.20		28.12.20		29.12.20		30.12.20	
E: Behandlung Nr.		22		23		24		25		26		27		28		29		30	
Bemerkungen		Ei in vitro Nymphen		Blut mit 10 wolk Hühnerkot		kein ATP/GSH		durch Erhitzen / Aushen Bak		Nahrung		Vollkorn Mehl 30°C ca. 20w/uf		30°C ca. 50w/uf		Blut m 11, 01%		DMSO	

Versuchsblock Nr. _____

Versuchsblock 5

Versuchsblock 4

Abkürzungen: Bedeutung

ATP	Adenosintriphosphat (10 mmol/l)
DMSO	Dimethylsulfoxyd
Ekt 1000	Ectacarbazol 1000 µg/ml
GEH 5	Geraniol 5 µg/ml
GEH 50	Geraniol 50 µg/ml
GUF	Oxypropionat
GSH	Glutathion, reduziert (10 mmol/l)

Abkürzungen: Bedeutung

HR 63	Hexaconazol 0,1 µg/ml
HR 5 100	Nystatin 100 E./ml
HR 5 UV-C	Nystatin 100 E./ml und UV-C-Bestrahlung
PRG	Propylenglykol
PS 100	Panzinol 100 IE/ml und Streptomycin 100 µg/ml
UF	relative Luftfeuchte
UV-C	UV-C-Bestrahlung (Oslinear Zen)

2.10. Versuche mit adulten *A. hebraeum* auf Kaninchen und Rindern

2.10.1. Vorfütterung männlicher *A. hebraeum* auf Kaninchen

Durch das Vorfüttern ungesogener *A. hebraeum* Männchen auf dem Kaninchen sollten optimal sexuell gereifte Männchen in den *in vitro* Versuch mit Weibchen kommen. So konnte die Entwicklung dieser Weibchen eindeutig auf den Einfluß der eigenen, künstlichen Fütterung zurückgeführt werden. Dies war nötig, um bestimmte Behandlungen, d. h. Arten der *in vitro* Fütterung besser miteinander zu vergleichen. Es wurden natürlich auch Versuche mit *in vitro* vorgefütterten Männchen unternommen. Besonders erwähnt seien die Behandlungen [22C], [17G] und [17F].

Die Infestierung, d. h. das Aufbringen von ungesogenen *A. hebraeum* Männchen auf die Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) geschah folgendermaßen: Den 1.6 - 3.5 kg schweren männlichen, noch nicht mit Zecken in Berührung gekommenen Kaninchen (Weiße Neuseeländer) wurde frühestens eine Woche nach Ankunft in unserer Tierhaltung mit Hilfe einer Kleintier-Schermaschine mit geschärften Klingen großflächig die Rückenhaare kurzgeschoren (3 mm). Ein aus weißem Leinen gebautes "Stoffhaus" wurde mit Haushalts-Kontaktklebstoff auf dieser Fläche befestigt. Die Tiere erhielten einen gut sitzenden Plastikkragen, um ein Aufkratzen des Stoffhauses zu vermeiden.

Tags darauf wurde die synthetische Pheromon-Mischung für *A. hebraeum* (SPM-A.h., Nr. 11) auf die ca. 100 - 150 cm² große Hautfläche getropft. Diese Mischung bestand aus *ortho*-Nitrophenol : iso-Buttersäure (2-methylpropanoic acid) : Benzaldehyd im Verhältnis 10 : 10 : 1 µg in insgesamt 100 µl Dichlormethan. Die Substanzen und deren Verhältnisse wurden aus einer Studie von Apps *et al.* (1988) abgeleitet. Die auf das Tier aufgetragene Pheromonmenge entsprach (pro cm²) etwa derjenigen je Fütterungsglas *in vitro*. Die Konzentration an Pheromonen pro µl Dichlormethan lag *in vivo* 10fach höher als im *in vitro* Pheromongemisch; daher ist die letztendlich verabreichte Menge Lösemittel in beiden Fällen gleich (100 µl). Sekunden nach dem Auftropfen wurde entsprechend dem Gewicht des Kaninchens 40 oder 80 Zeckenmännchen hinzugesetzt und das "Haus" mit Klebeband verschlossen. Einige Male blieben die

Kaninchen in der folgenden halben Stunde außerhalb des Käfigs und wurden beobachtet, ob sie durch die Geschehnisse auf ihrem Rücken (Herumlaufen und Massendifixierung von Zecken) beunruhigt würden. Einen Tag später wurden nicht-fixierte Zecken abgesammelt. Die Kaninchen erhielten Standardtrockenfutter und Leitungswasser *ad libitum*.

Nach 5 - 7 Tagen wurde der Kragen entfernt, das Stoffhaus aufgeschnitten und die vorgefütterten Männchen mit einer gebogenen Pinzette vom Rücken abgezupft. Die festklebenden Teile des Stoffhauses verblieben auf dem Fell und lösten sich nach und nach von selbst. Hautirritationen durch den verwendeten Kleber wurden nicht beobachtet. Enge Holzkisten zur Immobilisierung der Kaninchen bei der Arbeit mit den Zecken konnten ersetzt werden durch Geduld und ruhiges Vorgehen. Um die Tiere schon vor der Infestierung an die Manipulationen und Geräusche zu gewöhnen, wurden sie einige Tage vorher täglich aus dem Käfig genommen, gestreichelt und ihnen zugeredet. Den Kragen, das Stoffhaus und die Zecken auf dem Rücken tolerierten die Kaninchen bemerkenswert rasch und gut. Trotz des massiven Besatzes von bis zu 80 Zeckenmännchen je Tier (3,5 kg) traten keine Probleme wie Beunruhigung oder gar Panik, Kratzen, Eitern oder nennenswerte Schwächung auf. Beim Ablösen der Zecken blutete es nicht oder nur geringfügig und die betreffenden Stellen verheilten rasch.

2.10.2. Infestierung von Rindern mit künstlichen adulten *A. hebraeum*

In den Rindboxen für die Zeckerzucht bei Ciba in St. Aubin wurden gleichzeitig die Schwänze von vier jungen Stieren zuerst mit 35 männlichen und drei Tage später mit 30 weiblichen *A. hebraeum* in den unterstehenden Kombinationen infestiert. Auf zusätzliche Fixierungsstimuli konnte verzichtet werden.

- Rind I: künstliche Männchen und künstliche Weibchen (beide hervorgegangen aus *in vitro* gesogenen, natürlichen Nymphen)
- Rind II: natürliche Männchen und natürliche Weibchen (beide geschlüpft aus auf Rindern gesogenen, natürlichen Nymphen)
- Rind III: künstliche Männchen und natürliche Weibchen
- Rind IV: natürliche Männchen und künstliche Weibchen

Einige Monate später wurde ein fünftes Rind infestiert:

- Rind V: F₁-*in vitro* Männchen und F₁-*in vitro* Weibchen

Am d 4 (d 0 = Tag der Infestierung mit Weibchen) wurden alle nicht-fixierten Männchen und Weibchen entfernt und ab d 7 der mit Leinenstoff umhüllte Schwanz täglich auf abgefallene Weibchen kontrolliert und diese herausgenommen. Spätestens zwei Wochen nach Aufsetzen der Weibchen wurden die Rinder von allen verbliebenen Zecken befreit. Die o. g. künstlichen Adulten [Rind I, III, IV] hatten sich aus *in vitro* gefütterten Nymphen der Behandlungen [14, 15] und [17] gehäutet und wurden vor der Verteilung auf die Rinder zusammengemischt. Ein Teil dieser Zecken wurde parallel zu den *in vivo* Versuchen über Membranen in den Fütterungsgläsern gefüttert (Behandlung [17F]; siehe Tab. 3-16). Die F₁-*in vitro* Zecken [Rind V] hätten ihren Lebenszyklus mit Hilfe der *in vitro* Fütterung vollzogen, zuletzt als F₁-*in vitro* Nymphen in Behandlung [22E]. Mit den daraus gehäuteten, ungesogenen F₁-*in vitro* Adulten wurde 10 Monate später das Rind infestiert.

2.11. Die Versuchsauswertung

Detaillierte Erläuterungen zu den Begriffen 'Versuchseinheit', 'Behandlung' und 'Versuchsblock' finden sich in Kapitel 2.4..

2.11.1. Fixierungsversuche

Zu Beginn der Arbeit wurde in Experimenten *in vivo* und *in vitro* die Anzahl fixierter Zecken 1 d nach Infestierung (n. I.) aufgezeichnet. Später und insbesondere in den zahlreichen Versuchen mit *A. hebraeum* Nymphen wurden die Fixierungsraten erst am d 4 bestimmt. Das Abzählen auf Membranen festsitzender Zecken 1 d n. I. bedeutete, außer für die leicht erkennbaren Adulten, immer auch eine erhebliche Störung des Experiments. Die meisten Versuche, in denen Fixierungsraten aufgezeichnet wurden, waren eigentlich zum Zwecke der Fütterung angesetzt worden. Diese Experimente sollten nach Möglichkeit nicht durch langwieriges Kontrollieren und Zählen festsitzender Zecken, besonders der Nymphen, beeinträchtigt werden. Daher empfahl sich eine Zeckenkontrolle erst am d 4, da spätestens dann auch alle fixierwilligen und -fähigen Zecken sich fixiert haben sollten (Rechav *et al.*, 1977; Norval *et al.*, 1992a) und gleichzeitig noch nicht mit vollgesogen abgefallenen Exemplaren gerechnet werden mußte. Larven-Fixierungsraten in den

Fütterungsgläsern konnten, von Ausnahmen abgesehen, nur durch visuelles Abschätzen der Differenz aus aufgetragenen und vollgesogen geernteten Zecken gewonnen werden.

Zur Beschreibung der Fixierung der Zecken wurde der Prozentsatz fixierter Zecken an allen in die Behandlung eingebrachten Zecken (relative Häufigkeit in der Stichprobe; $\hat{p} = x \cdot 100/n$) und das 95 %-Vertrauensintervall der Binomialverteilung von n und x berechnet (Sachs, 1984). In Behandlungen, die nur aus einer Versuchseinheit (VE) bestanden, z. B. *I. ricinus* auf der Durchfluß-Fütterungskammer oder *A. hebraeum* auf jeweils einem Rind, wurden sinngemäß der Prozentsatz fixierter Zecken pro VE bestimmt. Die exakten, unteren und oberen Vertrauensgrenzen (π_u ; π_o) für π (relative Häufigkeit in der Grundgesamtheit) ergaben sich nach den folgenden Formeln

$$\pi_o = \frac{(x + 1)F}{n - x + (x + 1)F} \quad \text{mit } F_{(FG_1 = 2(x+1), FG_2 = 2(n-x))}$$

$$\pi_u = \frac{x}{x + (n - x + 1)F} \quad \text{mit } F_{(FG_1 = 2(n-x+1), FG_2 = 2x)}$$

wobei n die Anzahl der verwendeten, x die Anzahl der fixierten Zecken war, FG_1 die Freiheitsgrade des Zählers (x), FG_2 die Freiheitsgrade des Nenners (n) und F die aus Tabellen ersichtlichen, oberen Signifikanzschranken der F -Verteilung für $P = 0.025$ waren (Sachs, 1984). Zur Vereinheitlichung wurden auch bei $n < 70$ die Werte für \hat{p} , π_u und π_o in % angegeben.

Das Vertrauensintervall umschloß umso enger den Wert \hat{p} , je größer n war, d. h., je mehr Zecken verwendet wurden. Auch wurde der Vertrauensbereich mit wachsendem n und mit \hat{p} nahe 0.5 zunehmend symmetrisch. Die Menge Zecken pro VE (Fütterungsglas) reichte im Extremfall (Larven ausgeklammert) von 5 Individuen (ungesogene Männchen) bis zu 118 Individuen (Nymphen).

Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz unterschiedlicher Fixierung zwischen zwei Behandlungen wurden die Rangsummen der in den jeweiligen Fütterungsgläsern erreichten Fixierungsraten mit dem verteilungsunabhängigen Mann-Whitney U -Test ausgewertet ($P < 0.05$).

2.11.2. Fütterungsversuche

Bei Infestierungen auf Tieren kam es zum regelrechten "Abfallen" voll-gesogener Zecken. Bei *in vitro* Versuchen hätte es hingegen eher "Ablösen" heißen müssen, da die Zecken ja nicht von den waagerechten Membranen "fallen" konnten. Aus Vereinfachung und zur Abgrenzung gegenüber manuell abgelösten Zecken wurden dennoch, unabhängig von der Fütterungsart, nur die Begriffe "Abfallen vom Wirt / von der Membran" und "abgefallene Zecken" verwendet.

Um den Effekt einer definierten Art der *in vivo* oder *in vitro* Fütterung (= Behandlung) auf die Zecken zu beschreiben, wurden möglichst viele der folgenden biologischen Parameter aufgezeichnet:

Larven

- Spitzentag des Abfallens
- Bereich der Tage des Abfallens
- Körpermasse selbständig abgefallener Zecken [mg]
- % Häutungsrate (Larve zur Nymphe)

Nymphen

Wie Larven, jedoch % Häutungsrate: (Nymphe zum Adultus)

- % Weibchen nach der Häutung der Nymphen

Weibchen

- Spitzentag des Abfallens
- Bereich der Tage des Abfallens
- Körpermasse selbständig abgefallener Weibchen [g]
- Prä-Ovipositionsdauer [d]
- Eier-Konversionsfaktor selbständig abgefallener Weibchen
- % Larvenschlupfrate
- % Larvenproduzierende Weibchen
- Fertile Eier-Produktion [mg pro Weibchen]

Männchen

Der Effekt der Fütterung auf männliche Zecken direkt wurde nur qualitativ durch Beobachtung ihres typischen Paarungsverhaltens (claspings) notiert. Indirekt wurde der Einfluß einer bestimmten Art und Weise der Fütterung auf die Männchen durch die Fortpflanzungsfähigkeit der mit ihnen gepaarten Weibchen erfaßt.

Es folgen nähere Erläuterungen zur Erfassung und Berechnung der bereits angeführten biologischen Parameter der Zecken.

1. Spitzentag des Abfallens [d]: Tag der absolut größten Zahl selbständig abgefallener Zecken (Modalwert; 'peak day'). Teilweise fiel an zwei Tagen die gleiche hohe Zahl an Zecken ab. Waren am letzten Versuchstag noch mehr Zecken fixiert, als je vorher an einem Tage abgefallen waren, so galt das Versuchsende als 'peak day'. Weibchen wurden nur lebend und > 200 mg berücksichtigt.

Die oben genannte Schwelie von 200 mg entsprach bei *A. hebraeum* etwa 7x der Körpermasse ungesogener Weibchen (28 ± 6 mg, Männchen 26 ± 4 mg; beide $n = 20$) und ca. 8 % der mittleren Masse *in vivo* voligesogen abgefallener Weibchen (2.56 g). Dieser Wert war aus mehreren Gründen gewählt worden:

- Norval (1974) fand bei *A. hebraeum* oberhalb 200 mg *in vivo* eine lineare Beziehung zwischen Masse der Weibchen und Masse der Ei-gelege, d. h., daß der Eier-Konversionsfaktor ab dieser kritischen Körpermasse unabhängig von der aufgenommenen Blutmenge des jeweiligen Weibchens stabil blieb.
 - Balashov (1972) nannte ca. 10 % der Körpermasse voligesogener Zeckenweibchen als das zur Eiablage nötige, kritische Gewicht.
 - Teilgesogene, unbegattete Weibchen von *D. variabilis* und *R. appendiculatus* legten Eier, wenn ihre Körpermasse etwa 10x über dem Gewicht ihres ungesogenen Zustandes lag (Diehl *et al.*, 1982).
2. Bereich der Tage des Abfallens [d]: Erster und letzter Tag des Abfallens von Zecken.
 3. Körpermasse selbständig abgefallener Zecken [mg] bzw. [g]: Gemessen durch Wägen innerhalb 2 d (Weibchen) nach Ende des Blutmahls (= Abfallen); Nymphen binnen 1 d. Abgefallene Larven blieben bis zum Versuchsende (d 10) im Fütterungsglas und wurden dann in Gruppen von 12 - 50 Tieren gewogen. Darstellung: Mittelwert mit 95 %-Vertrauensgrenzen des Mittelwertes. Diese wurden mit nachstehender Formel geschätzt:

$$\bar{x} \pm 1.96 \left(\frac{s}{\sqrt{n}} \right)$$

wobei \bar{x} dem arithmetischen Mittel, s dessen Standardabweichung und n dem Stichprobenumfang entspricht.

4. **Prä-Ovipositionsdauer [d]:** Mittlere Anzahl der Tage zwischen Abfallen der Zecke und Beginn der Eiablage mit Angabe der 95 %-Vertrauensgrenzen des Mittelwertes (siehe oben).
5. **Eier-Konversionsfaktor [dimensionslos]:** Verhältnis der Masse der gelegten Eier zur Körpermasse des abgefallenen Weibchens (egg conversion factor). Fünfundvierzig Tage nach Beendigung der Blutmahlzeit des Weibchens wurde jedes Eigelege gewogen. Darstellung: Mittelwert mit 95 %-Vertrauensgrenzen des Mittelwertes.
6. **Larvenschlupfrate [%]:** Bei Schlupfbeginn der ersten, noch fast immobilen Larven wurde per Augenmaß in fünf Stufen der Anteil der Eier mit deutlich erkennbaren Embryonen an der gesamten Eimenge abgeschätzt (0 - 5, 6 - 25, 26 - 50, 51 - 75 und 76 - 100 %). Eigelege mit < 5 % geschlüpfter Larven fielen somit unter "0 %". Darstellung: Mittelwert mit 95 %-Vertrauensgrenzen des Mittelwertes.
7. **Larvenproduzierende Weibchen [%]:** Prozentsatz larvenproduzierender Weibchen auf der Basis aller, am d 4 in einer Behandlung fixierten Weibchen (relative Häufigkeit in der Stichprobe; $\hat{p} = x \cdot 100 / n$). Darstellung: \hat{p} mit 95 %-Vertrauensintervall der Binomialverteilung von n (Weibchen fixiert an d 4) und x (larvenproduzierende Weibchen). (Formel siehe voriges Kapitel).
8. **Fertile Eier-Produktion [mg pro Weibchen]:** Um einen Gesamteindruck der Reproduktionsleistung der Zecken einer bestimmten Behandlung zu gewinnen, wurde die durchschnittlich gelegte Masse an fertilen Eiern pro Weibchen errechnet (Eimasse \times Larvenschlupfrate \times 0.01). Als Grundlage diente die Anzahl an d 4 fixierter Weibchen und die gesamte, in einer Behandlung produzierte fertile Eimasse. Darstellung: Mittelwert mit Angabe des minimalen und maximalen Wertes (Bereich). Durch diese Darstellung waren die Daten am besten charakterisiert.

Von der Berechnung der Parameter 3 - B wurden Weibchen ausgeschlossen, die bestimmte Kriterien nicht erfüllten: Körpermasse < 200 mg, Weibchen am Versuchsende oder binnen einer Woche danach gestorben, keine Eier gelegt oder Eigelege vertrocknet (die letzten beiden führten nicht zum Ausschluß bezüglich der "Körpermasse"). Wer ein Weibchen am Ende des Versuchs noch auf der Membran fixiert, wurde es nur von der Berechnung "Körpermasse" und "Eier-Konversionsfaktor" ausgeschlossen.

Häutungsrate (Larve zur Nymphe bzw. Nymphe zum Adultus) [%]: Verhältnis ins Folgestadium übergegangener Larven bzw. Nymphen (x) zu allen vollgekösterten abgefallenen (n) (relative Häufigkeit in der Stichprobe; $\hat{p} = x \cdot 100 / n$). Darstellung: \hat{p} mit 95 %-Vertrauensintervall der Binomialverteilung von n und x .

Anteil Weibchen nach der Häutung der Nymphen [%]: Verhältnis Weibchen zu Männchen nach der Häutung vollgekösteter abgefallener Nymphen.

Zur Datenverarbeitung

Die Tabellenkalkulation wurde in Microsoft Excel V. 4.0 auf IBM AT-kompatiblen Personalcomputern durchgeführt. Zu statistischen Berechnungen diente das Programm P-STAT V. 2.15 auf einer VAX 6320 Station. Bei Fragen hierzu und zu statistischen Problemen half J. Moret vom mathematischen Institut der Universität Neuchâtel.

2.12. Akarizid-Test *in vitro* mit *A. hebraeum* Nymphen

2.12.1. Das Prinzip

Als Basis diente die Art und Weise der *in vitro* Fütterung von *A. hebraeum* Nymphen in den Fütterungsgläsern (Standard-Behandlungen [22, 22D, F, G, H], beschrieben in den vorigen Kapiteln). Als Fixierungsstimulus auf der viskosegestützten Silikon-Membran (Typ V2) wurde die Kombination J verwendet. Diese bestand aus Kaninchenhaaren und der synthetischen Pheromon-Mischung für *A. hebraeum* aus ortho-Nitrophenol : iso-Buttersäure : Benzaldehyd, 1 : 1 : 0.1 μg in Dichlormethan, aufgesogen in $\frac{1}{4}$ Gummikappe. Die Versuche liefen über 10 d. Der Blutvorrat wurde unmittelbar nach der Sammlung mit D (+)-Glukose (2 g / l) versetzt und für maximal eine Woche bei +4°C aufbewahrt. Bei jedem Blutwechsel wurden Nystatin (100 IE / ml) und Gentamicin (5 μg / ml) hinzugefügt, desweiteren Adenosinriphosphat (ATP) und reduziertes Glutathion (GSH) mit dem Ziel einer Endkonzentration beider Substanzen im Blut von 10^{-3} mol / l. Der Blutaustausch fand zweimal täglich statt (8 h bzw. 16 h zwischen zwei Wechsein).

2.12.2. Die Zecken

Benutzt wurden ungesogene 20 Wochen alte *A. hebraeum* Nymphen aus der Laborzucht. Die letzten 8 Wochen vor den Versuchen waren sie bei tags 25°C / 85 % rF, nachts 20°C / 95 % rF in einem 12 h : 12 h Lichtzyklus gelagert. Zwei Stunden vor dem Test befanden sie sich in der Klimakabine, wo die Versuche abliefen (23°C / 80 % rF).

2.12.3. Die Substanzen

Ivermectin (22,23-Dihydroavermectin B1; IVM) wurde formuliert in einer Konzentration von 1 ppm und 10 ppm in einem Gemisch (Vehikel) aus Glycerolformal und Propylenglykol (1:1.5), gelagert bei 4°C. Die Endkonzentration an Vehikel im Futterblut war für alle Behandlungen und Placebo 0.1 vol%. In der Kontrolle fehlte das Vehikel. IVM wurde von Anfang an und bei jedem Blutwechsel aus der Stammlösung dem Blut hinzugegeben. Die Fläschchen mit den Blutportionen wurden mehrfach von Hand umgeschwenkt und zusätzlich einige Sekunden auf einen Vortex-Laborschüttler gepreßt.

2.12.4. Die Auswertung

Eine Behandlung (eine Substanz in einer Konzentration) bestand aus fünf parallel durchgeführten Versuchseinheiten (Fütterungsgläsern) mit je 32 ± 10 Nymphen. Am d 4 (d 0 = Tag der Infestierung) wurden nicht-fixierte Nymphen, die $\frac{1}{4}$ Gummikappe, der Zahnwattestopfen des Aufbewahrungsröhrchens und ein Großteil der Tierhaare von der Membran entfernt. Ab d 5 wurden die Versuche täglich vor dem zweiten Blutwechsel auf abgefallene Zecken untersucht. Diese wurden entfernt, gewogen und zur weiteren Beobachtung einzeln in die Kompartimente von verschlossenen, doch belüfteten 96-Loch Zellkulturplatten (multiwell plates) übertragen (28°C / > 90 % rF, DD). Am Versuchsende (d 10) wurden alle Zecken, auch jene, die sich noch lebend, tot, fixiert oder abgefallen auf der Membran befanden, einer der folgenden Gruppen zugeordnet:

- 1) tot;
- 2) lebend, aber nicht entwickelt;
- 3) lebend und entwickelt.

Diese Zuordnung ermöglichte einen raschen Überblick über die akarizide Wirkung dieser Substanz. Nach der Fütterung wurden Zecken als "entwickelt" bezeichnet, sofern sie mindestens 7 mg wogen. Dies war die für eine Weiterentwicklung zum nächsten Stadium benötigte Mindestkörpermasse.

3. ERGEBNISSE

3.1. In vitro Fixierung

Die Durchfluß-Fütterungskammer diente allen Versuchen mit *Ixodes ricinus* und anfangs auch denen mit *Boophilus microplus*. Später wurde die Arbeit mit der letzten Zeckenart unter Verwendung der Fütterungsgläser weitergeführt. *Amblyomma variegatum* und *Amblyomma hebraeum* wurden ausschließlich in den Fütterungsgläsern auf Membranen gesetzt.

3.1.1. In vitro Fixierung von *I. ricinus*

Zwei Versuche wurden mit der Durchfluß-Fütterungskammer auf klebstoffversiegelten PTFE-(Teflon)-Membranen (Typ T1 bzw. T2) gemacht. Die Membran T1 erhielt als Stimuli die Kombination A (Karinchenhaare, Rinderohr-Extrakt), Membran T2 die Kombination B (wie A, zusätzlich Saline und *I. ricinus*-Kot). In beiden Versuchen begannen sofort nach Aufbringen der adulten Zecken auf die Membran die Männchen mit den Weibchen zu kopulieren und ließen sich in dieser Stellung von ihren Partnerinnen umhertragen, ohne sich jemals selbst zu fixieren. Im ersten Versuch bedeckte der Rinderohr-Extrakt nur eine, parallel zum Blutfluß verlaufende Hälfte der Membran. Dort waren 23 h nach Infestierung (n. I.) 56 % der Weibchen (21 - 86 %; 5 / 9) fixiert, auf dem Extrakt-freien Teil der Membran keines (ohne Tab.). In den Stunden zuvor war ein wechselndes Lösen und Festsetzen der Weibchen zu beobachten, bevorzugt direkt neben- bzw. untereinander mit einem Maximum von 9 fixierten Weibchen 22 h n. I. Der später durchgeführte zweite Versuch zeigte 17 h n. I. 60 %, in Form einer Ansammlung (Klumpen, "Cluster") auf der Membran fixierte Weibchen (36 - 81 %; 12 / 20) (ohne Tab.).

3.1.2. In vitro Fixierung von *B. microplus*

Zuerst seien Versuche mit der Durchfluß-Fütterungskammer geschildert. In zwei, auf klebstoffversiegelten PTFE-Membranen (Typ T4) mit der Stimulus-Kombination C (Rinderhaar-Extrakt, Rinderhaare, Saline und art eigener Zeckenkot) gemachten Versuchen, waren nach einem halben Tag 30 - 50 % der Larven fixiert (Tab. 3-1). In drei Versuchen mit

vom Rind gesammelten, ungesogenen Adulten nutzte einer den Membran-Typ T3, die beiden anderen den Typ T4. Im ersten Versuch waren 1 d n. l. etwa 73 % der Weibchen fixiert, im zweiten und dritten Versuch 50 % bzw. 100 % (Tab. 3-1). Alle Versuche wurden mit Blut unterschiedlicher Rinder durchgeführt. Die Bildung von Clustern wurde nicht beobachtet, sehr wohl aber das Fixieren der 15 - 30 min nach den Weibchen aufgesetzten Männchen in deren unmittelbarer Nähe oder in Umklammerung derselben. Der Anteil fixierter Männchen betrug durchweg etwa 70 % - 80 %, schwankte indes, da es immer wieder zum selbständigen Ablösen und Festsetzen an anderer Stelle kam.

Fütterungsgläser für Versuche mit Larven wurden anschließend in zwei Versuchsblocken mit klebstoffimprägnierten Baudruche-Membranen (Typ B1 und B2) verwendet, jeweils bestückt mit der Stimulus-Kombination E (Rinderhaar-Extrakt, Saline und arteigener Zeckenkot). Visuell geschätzt, hatten sich auf diesen Membranen etwa 1 d n. l. 50 % bis über 70 % der Larven festgesetzt (Tab. 3-1).

In parallel dazu angesetzten Behandlungen mit zusätzlichen 5 g Glukose / l Blut bzw. mit durch Gefrierlagerung hämolysiertem Blut waren keine Unterschiede in den visuell geschätzten Fixierungsraten erkennbar (ohne Tab.).

Bei beiden Membran-Typen (B1 / B2) wurde beobachtet, daß sich viele der am d 1 fixierten Larven in den folgenden Tagen wieder von der Membran lösten. Aus dem zweiten Versuchsblock wurde daher bei einem Fütterungsglas (Normalblut, ohne Glukose-Zusatz) der Versuch am d 9 abgebrochen und exemplarisch die genaue Anzahl fixierter Larven bestimmt. Diese waren meist schon an einer Volumenzunahme oder an ihrer weiteren Entwicklung zu Nymphen erkennbar. Ausgehend von 84 mg in das Aufbewahrungsröhrchen eingefüllter Eier, einer mittleren Masse von $45 \pm 2 \mu\text{g}$ pro Ei und einem Verlust von ca. 10 - 20 Eiern (ungeschlüpfte Larven) wurde die Anzahl der auf die Membran dieses Fütterungsglases gebrachten Larven mit 1860 beziffert. Die Auszählung ergab für d 9 eine Rate von 31 % fixierter Zecken, lag also deutlich unter den visuell geschätzten Werten für d 1 (Tab. 3-1).

Tab. 3-1 - In vitro Fixierungsraten von *Boophilus microplus* - Dargestellt sind %-Werte mit dem 95 % Vertrauensintervall des Verhältnisses 'fixierte Zecken / auf die Membran gebrachte Zecken' sowie *n* als Anzahl Zecken oder Versuchseinheiten (VE). In der Spalte 'Spezifikationen' befindet sich der Buchstabe der Stimulus-Kombination sowie der Membran-Typ und die Art des Fütterungssystems. DFK Durchfluß-Fütterungskammer, FG Fütterungsglas, -gläser; h Stunden; d Tag.

Stadium / Ursprung	% Fixierung	Zeit nach Infixierung	<i>n</i> Zecken aufgesetzt	<i>n</i> VE	Spezifikationen	Bemerkungen
Larven	ca. 30 - 50	13 h	je ca. 200	2	C, T4, DFK	-
dto.	ca. 50 - 70	19 - 24 h	je 1770 ± 100	5	E, B1, FG	A)
dto.	> 70	21 h	je 1700 - 1900	2	E, B2, FG	-
<hr/>						
künstliche Nymphen	74 (70 - 79)	ca. 4 d	1860	1	E, B1, FG	B)
<hr/>						
Adulte (Weibchen)	73 (50 - 92)	17 h	15	1	C, T3, DFK	Männchen fixiert 70 - 80 %
dto.	50 (23 - 77)	23 h	14	1	C, T4, DFK	dto.
dto.	100 (63 - 100)	19 h	8	1	C, T4, DFK	dto.
dto.	62 (47 - 75)	1 d	50	3	F, B1, FG	Männchen fixiert: ca. 60 %
dto.	50 (35 - 65)	2 d	44	2	D, V1, FG	nicht gemessen
künstliche Adulte (Weibchen)	34 (19 - 53)	3 d	32	1	F, B1, FG	künstliche Männchen fixiert: 71 % (54 - 85 %; 25/35)

A) 1 FG am d 9 n. i. ausgezählt: 31 % Fixierung; B) in insgesamt 5 Fütterungsgläsern Wiederfixieren beobachtet.

Von diesen zu einem Drittel fixierten Larven gelang es nach Vollsaugen und Häuten zum nächsten Entwicklungsstadium 74 %, sich als ungesogene künstliche Nymphen auf derselben Membran erneut festzusetzen (Tab. 3-1). Auch in zusätzlichen Fütterungsgläsern kam es zur Häutung und zum Wiederfixieren eines großen Teils der Nymphen. Es war nicht möglich, deren Anzahl näher zu bestimmen.

In den beiden Versuchseinheiten mit B2-Membranen entwickelten sich ebenfalls, ausgehend von fixierten Larven, Nymphen, die sich jedoch deutlich weniger erfolgreich wiederfixierten als in den zuvor beschriebenen Experimenten (ohne Tab.). Genauere Angaben hierzu konnten nicht erhoben werden.

Weibchen und Männchen von *B. microplus* konnten z. T. aus den bereits im vorletzten Absatz geschilderten Versuchen mit wiederfixierten Nymphen auf der B1-Membran gewonnen werden. Von den 5 Fütterungsgläsern, in denen es zur Häutung und anschließend zum Wiederfixieren von Nymphen gekommen war, führten 2 zur Entwick-

lung ungesogener künstlicher Adler. Am d 3 nach Umsetzen auf eine frische Membran waren davon 34 % Weibchen und 71 % Männchen fixiert (Tab. 3-1).

In drei Fütterungsgläsern wurden auch vom Rind stammende Adulte auf Membranen desselben Typs mit der gleichen Stimulus-Kombination gesetzt. Nach einem Tag erreichten beide Geschlechter Fixierungsraten um 60 % (Tab. 3-1). Zum Vergleich: Auf Kaninchenohren wiederfixierten mehr als 75 % (Falk-Vairant *et al.*, 1994).

Auf einer völlig künstlichen Membran, der viskosegestützten Silikon-Membran (Typ V1), wurde unter Gabe der Stimulus-Kombination D (Rinderhaar-Extrakt und Rinderhaare) in zwei Fütterungsgläsern 2 d n. I. die Hälfte aller Weibchen fixiert vorgefunden (Tab. 3-1). Fixierung von Männchen fand auch hier statt, quantitative Angaben fehlen jedoch aus versuchstechnischen Gründen.

3.1.3. *In vitro* Fixierung von *A. variegatum*

Nymphen von *A. variegatum* wurden in Fütterungsgläsern auf eine klebstoffimprägnierte Baudruche-Membran (Typ B3) mit der Stimulus-Kombination G gesetzt. Diese bestand aus Rinderhaar-Extrakt, Saline und der synthetischen Pheromon-Mischung 1 (SPM1-A.v.) aus *ortho*-Nitrophenol und Methylsalicylat. Binnen eines Tages hatten sich 39 % der Nymphen festgesetzt (Tab. 3-2).

Männliche ungesogene *A. variegatum* fixierten innerhalb 1 d n. I. zu 48 % auf der mit einer Kombination von Fixierungsstimuli (Typ H) behandelten Wiener Silikon-Membran (Typ W1) (Tab. 3-2). Die Stimulus-Kombination H bestand aus Rinderhaar-Extrakt, Saline und der synthetischen Pheromon-Mischung 2 (SPM2-A.v.) aus *ortho*-Nitrophenol, Methylsalicylat und zusätzlich Pelargonsäure (Nonansäure). Wurde die Konzentration von SPM2-A.v. um den Faktor 5 erhöht, sank die Fixierungsrate signifikant auf 11 % (4 - 22 %; 10 VE mit je 6 ± 1 Zecken; ohne Tab.). Das sogenannte 'Clasping'-Verhalten der Männchen zeigte sich erstmals am d 5 der Vorfütterung, wenn die fixierten Männchen mit einer Vogelfeder, oder wirkungsvoller, von einem an einer Pinzette gehaltenen Weibchen berührt wurden.

Ungesogene Weibchen wurden *in vitro* zu Männchen hinzugesetzt, die während 5 - 6 d in Fütterungsgläsern vorgefüttert worden waren. Solche Weibchen hatten sich nach 4 d zu 67 % fixiert (Tab. 3-2).

Tab. 3-2 – *In vitro* Fixierungsraten von *Amblyomma variegatum* – Dargestellt sind %-Werte mit dem 95 % Vertrauensintervall des Verhältnisses 'fixierte Zecken / auf die Membran gebrachte Zecken' sowie Anzahl *n* Zecken oder Versuchseinheiten (VE). In der Spalte 'Spezifikationen' befindet sich die Nr. des Einzelsstimulus oder der Buchstabe der Stimulus-Kombination sowie der Membran-Typ, d. Tag.

Stadium	% Fixierung	Zeit nach Infizierung	<i>n</i> Zecken aufgesetzt	<i>n</i> VE	Spezifikationen	Bemerkungen
Nymphen	39 (34 - 44)	1 d	je 22 - 165	5	G, B3	-
Männchen	48 (35 - 62)	1 d	je 5	12	N, W1	-
Weibchen	67 (33 - 88)	4 d	15	3	13, W1	mit 9 reifen Männchen aus 'in vitro'

3.1.4. *In vitro* Fixierung von *A. hebraeum*

3.1.4.1. Larven

In zwei Fütterungsgläsern mit der viskosegestützten Silikon-Membran Typ V1 und der Stimulus-Kombination I (Rinderhaar-Extrakt, Rinderhaare, SPM-A.h., Kot von Zecken der gleichen Art) wurden je 200 - 300 natürliche Larven eingesetzt. Drei weitere Fütterungsgläser erhielten je 50 - 200 Larven der F₁-*in vitro*-Generation. Ab d 6 begannen vollgesogene Larven abzufallen und innen am Fütterungsglas hochzulaufen. Sie wurden jedoch erst am Versuchsende (d 10) entfernt und deren Zahl zusammen mit den noch fixierten Exemplaren visuell geschätzt. Der Anteil während des Versuchszeitraumes festgesetzter natürlicher Larven lag bei ca. 30 % und der von F₁-*in vitro*-Larven bei etwa 30, 60 und 90 % (ohne Tab.). Die Fixierungsrate von Larven *in vivo* wurde nicht untersucht.

3.1.4.2. Nymphen

Die Fixierungsrate von Nymphen auf dem Rind wurde 4 d n. i. auf 90 - 100 % geschätzt.

Bevor es in den Fütterungsgläsern zu standardisierten Behandlungen

Tab. 3-3 - *In vitro* Fixierung von *Amblyomma hebraeum* Nymphen: Einfluß der Versuchsblöcke (3 Blutwechsel / d) - Dargestellt sind %-Werte mit dem 95 %-Vertrauensintervall des Verhältnisses 'fixierte Zecken / auf die Membran gebrachte Zecken' sowie *n* als Anzahl Nymphen oder Versuchseinheiten (VE). Die eckigen Klammern nennen die Behandlungsnummer entsprechend der Übersicht Tab. 2-8. VB Versuchsblock; d Tag; n. l. nach Infestierung.

	% Fixierung d 4 n. l.	<i>n</i> Nymphen aufgesetzt	<i>n</i> VE
VB1 Behandlung [17]	90 (85 - 94)	je 58 ± 22	4
VB2 Behandlung [17B]	95 (91 - 98)	je 49 ± 14	4

kam, wurde eine Reihe unterschiedlicher Versuche durchgeführt.

Diese waren durch einen dreimaligen Blutwechsel pro Tag und die Verwendung der Sti-

mus-Kombination K (Kaninchenhaar und PIG) gekennzeichnet. Die PIG war eine mit natürlichen *A. hebraeum*-Pheromonen imprägnierte Gummikappe. Die Fixierungsraten zweier gleicher Behandlungen, jedoch in verschiedenen Versuchsblöcken durchgeführt, waren statistisch gleich (Tab. 3-3)

Die Zugabe der Bakterizide GEN 5, GEN 50 oder PS 100, einhergehend mit täglicher UV-C Bestrahlung der Membran-Unterseite oder mit NYS 100 im Futterblut, hatte keinen Einfluß auf die Fixierungsraten der Nymphen am d 4 n. l.. Sie lagen im Bereich von 85 - 90 % (Tab. 12-1 im Anhang). Im darauffolgenden Versuchsblock (VB2) wurde in der Behandlung [21] GEN 5, NYS 100 und zusätzlich noch UV-C verwendet (ohne Tab.). Auch diese Kombination hatte keinen Einfluß auf die Fixierungsrate, die hier bei 93 % lag (88 - 96 %; 4 VE mit je 38 ± 2 Nymphen).

Versuchsweise wurde völlig auf Bakterizide im Blut verzichtet. In diesen Behandlungen, in denen nur Kaninchenhaare als Fixierungsstimulus dienten, wurde das Blut mit den üblichen 2 g Glukose / l, doch ohne Zugabe von ATP / GSH, bis zum Abbruch des Versuchs und Zählen der fixierten Nymphen (1 d n. l.) nicht gewechselt. Das Blut in den 4 Fütterungsgläsern (je 43 ± 3 Zecken) ohne Bakterizid war im Gegensatz zur GEN 5-haltigen Behandlung (5 VE mit je 42 ± 5 Zecken) dunkler und roch auffällig nach H₂S. Die Fixierungsrate lag mit 45 % (37 - 53 %) signifikant unter den durch GEN 5 vor zu schnellem Verderb geschützten Fütterungsgläsern mit 71 % (64 - 77 %; ohne Tab.).

Zusätzliches ATP / GSH im Futterblut hatte keinen signifikant positiven Einfluß auf die Fixierungsraten der Nymphen an d 4 n. l.. Bei 3 Blutwechsel / d waren diese mit und ohne Zusatz gleich (95 % bzw.

96 %), bei 2 Blutwechsel / d war nur eine tendenzielle Verschlechterung (92 % gegenüber 81 %) auszumachen (Tab. 3-4).

Tab. 3-4 -- In vitro Fixierung von *A. hebraeum* Nymphen: Einfluß von zusätzlichem ATP / GSH -- In der Spalte 'Spezifikationen' befindet sich der Buchstabe der Stimulus-Kombination sowie der Membran-Typ.

	% Fixierung d 4 n. l.	n Nymphen aufgesetzt	n VE	Spezifikationen
mit ATP / GSH (10^{-3} mol / l) [17B]	95 (91 - 98)	je 49 ± 14	4	J, V2, 3x Blut / d
ohne Zusatz [20]	96 (92 - 98)	je 38 ± 3	5	dit.
mit ATP / GSH (10^{-3} mol / l) [22G]	92 (86 - 96)	je 49 ± 2	3	J, V2, 2x Blut / d
ohne Zusatz [26]	81 (74 - 87)	je 49 ± 2	3	dit.

Andauerndes Schütteln der Fütterungsgläser (100 Richtungswechsel / min; in einer Ebene) brachte tendenziell, jedoch nicht signifikant geringere d 4-Fixierungsraten in verschiedenen Behandlungen desselben Versuchsblocks. Sie lagen bei Gabe von GEN 5 ungeschüttelt bei 89 %, geschüttelt bei 82 %. Mit PS 100 waren es ungeschüttelt 88 %, geschüttelt 81 % (Tab. 3-5). Die Unterseite der Membranen aller 4 Behandlungen wurde täglich mit UV-C bestrahlt.

Tab. 3-5 -- In vitro Fixierung von *A. hebraeum* Nymphen: Einfluß ständigen Schüttelns --

	% Fixierung d 4 n. l.	n Nymphen aufgesetzt	n VE	Spezifikationen
ungeschüttelt (mit GEN 5) [12]	89 (85 - 93)	je 56 ± 18	4	J, V2, 3x Blut / d
geschüttelt (mit GEN 5) [13]	82 (77 - 86)	je 63 ± 18	5	J, V2, 3x Blut / d
ungeschüttelt (mit PS 100) [12]	92 (86 - 96)	je 64 ± 18	5	J, V2, 3x Blut / d
geschüttelt (mit PS 100) [13]	81 (74 - 87)	je 59 ± 18	5	J, V2, 3x Blut / d

Aus der nächsten Abbildung 3-1 wird deutlich, daß die Anzahl Nymphen pro Fütterungsglas (Membranfläche ca. 9 cm^2 ; 16 - 118 Individuen) nicht auf die Fixierungsrate wirkt. Doch wurde aus Gründen der Vereinheitlichung in der Folge versucht, jeweils 30 - 40 lebende Nymphen pro VE zu benutzen.

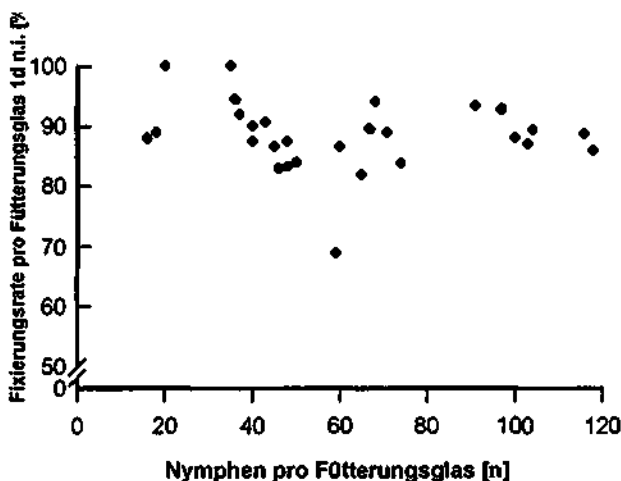


Abb. 3-1 - *In vitro* Fixierung von *A. hebraeum* Nymphen: Einfluß der Besatzdichte - Alle Fütterungsgläser kamen aus verschiedenen Behandlungen eines Versuchsblocks mit dreimaligem Blutwechsel pro Tag unter Verwendung der Stimulus-Kombination K. Die Behandlungen hatten vergleichbare Fixierungsraten ($P < 0.05$; Mann-Whitney U-Test).

In einigen Versuchen wurde die Fixierung von Nymphen nicht nur am d 4, sondern auch am d 1 n. I. aufgezeichnet und nicht-fixierte Zecken dann entfernt. Es ließ sich feststellen, daß die Anzahl fixierter Nymphen in 5 von 11 Behandlungen von d 1 zu d 4 nur um 1-3% zurückgegangen und in den restlichen völlig stabil geblieben war (ohne Tab.).

Nun wurden die beiden Stimulus-Kombinationen K und J, die beide Kaninchenhaare enthielten, verglichen. Die Kombination J besaß jedoch statt der PIG eine Gummikappe mit SPM-A.h.. Die Fixierungsrate der Nymphen waren mit 94 % bzw. 95 % gleich (Tabelle 3-6).

Die Häufigkeit, mit der das Futterblut gewechselt wurde, beeinflusste die Fixierungsrate der Nymphen nicht.

Diese betrug (Versuchsblock 2) 95 % bei 3x Bluttausch / d (Tab. 3-3) und 94 % bei 2x Bluttausch / d (Tab. 3-7).

Tab. 3-6 - *In vitro* Fixierung von *A. hebraeum* Nymphen bei verschiedener Pheromon-Herkunft - Abkürzungen: PIG mit natürlichen *A. hebraeum*-Pheromonen Imprägnierte Gummikappe; SPM-A.h. synthetische Pheromon-Mischung für *A. hebraeum*.

	% Fixierung d 4 n. I.	n Nymphen aufgesetzt	n VE
mit PIG [22]	94 (89 - 97)	je 36 ± 10	5
mit SPM-A.h. [22D]	95 (90 - 98)	je 29 ± 9	5

Bei der *in vitro* Fütterung von *A. hebraeum* Nymphen trat die Behandlung [22] je einmal in 5 verschiedenen Versuchsblöcken auf, d. h. mit einer anderen Zeckencharge und dem Blut eines anderen Rindes. Sie war damit die am häufigsten durchgeführte Behandlung. Dadurch lagen Fixierungsraten über einen längeren Zeitraum und über Versuchsblöcke hinweg vor. Das machte diese Behandlung zum *in vitro* 'Standard' der Nymphen-Fixierungs- und Fütterungsversuche in dieser Arbeit. Drei der fünf Behandlungen dieses Typs konnten gewertet werden (Tab. 3-7). Sie zeigten vergleichbare Fixierungsraten von 92 %, 94 % und 95 %. Wie beim schon geschilderten Beispiel der Behandlungen [17] und [17B] mit 3x Blutwechsel / d war auch bei 2x Blutwechsel / d das Festsetzen der Nymphen auf den Membranen unbeeinflusst von Zeckencharge und Spender-Rind.

Tab. 3-7 - *in vitro* Fixierung von *A. hebraeum* Nymphen: Einfluß verschiedener Versuchsblöcke (2 Blutwechsel / d) - Die Fixierungsraten der Behandlungen [22F] und [22H] aus Versuchsblock 4 (VB4) bzw. VB6 wurden aus versuchs-technischen Gründen nicht gewertet.

	% Fixierung d 4 n. l.	n Nymphen aufgesetzt	n VE	Spezifikationen
VB2 Behandlung [22]	94 (89 - 97)	je 36 ± 10	5	K, V2
VB3 Behandlung [22D]	95 (90 - 98)	je 29 ± 9	5	J, V2
VB5 Behandlung [22G]	92 (86 - 96)	je 49 ± 2	3	J, V2

Aufbauend auf der Standard-Behandlung [22] wurden die Fixierungsraten für fünf weitere Behandlungen [25, 27, 28, 31, 29] aufzeichnet: Weder die Zugabe von Hühnereidotter (96 %) noch ehemals eingefrorenes (1 Woche) und dadurch hämolysiertes Blut (94 %) vermochten die Fixierung der Nymphen zu ändern. Ebenso wenig waren dazu mit Heparin versetztes Vollblut (90 %) oder der Einsatz von 0.1 vol% eines Lösemittelgemisches (Plazebo) aus Propylenglykol und Glycerolformal in stande (95 %). Nur der Aufenthalt der Fütterungsgläser in einem Brutschrank bei 36°C / ca. 20 % rF führte zu einem tendenziellen, doch wegen der wenigen VE nicht signifikanten Rückgang an fixierten Nymphen (70 %) (Tab. 12-2 im Anhang).

Die Fixierung von F_1 -*in vitro* Nymphen [22E] lag bei 97 %. Die Rate dieser künstlichen Nymphen war sowohl identisch mit der von im selben Versuchsblock vorhandenen natürlichen Nymphen [22D] (95 %) als auch vergleichbar mit der zusammengefaßten Fixierungsrate natürli-

cher Nymphen aus zwei verschiedenen Versuchsblöcken (93 %) (Tab. 3-8).

Tab. 3-8 – *In vitro* Fixierung von *A. hebraeum* Nymphen verschiedenen Ursprungs –

Ursprung	% Fixierung d 4 n. I.	n Nymphen aufgesetzt	n VE	Spezifikationen
natürliche Nymphen	93 (90 - 96)	je 37 ± 13	8	J, V2
F ₁ - <i>in vitro</i> Nymphen	87 (95 - 99)	je 48 ± 18	5	db.

3.1.4.3. Adulte

Die Fixierungsraten männlicher ungesogener *A. hebraeum* auf dem Kaninchen nach Auftropfen von SPM-A.h. bzw. auf dem Rind, wo keine zusätzliche Stimulus-Gabe nötig war, betrug 1 d n. I. stets 95 %- 100 %. Dies galt *in vivo* auch für Weibchen, die zu bereits 3 d lang am Rind saugenden Männchen hinzugesetzt wurden (ohne Tab.). Praktisch alle Männchen zeigten ab d 5 der Blutaufnahme auf dem Kaninchen spontanes 'claspung', d. h. ohne daß man sie mit einem Gegenstand berühren mußte. Beobachtungen zu diesem Verhalten nach dreitägiger Fütterung der Männchen auf dem Rind wurden nicht angestellt.

Sämtliche *in vitro* Versuche mit adulten *A. hebraeum* fanden auf der Wiener Membran (W1) in Fütterungsgläsern statt (Tab. 3-9). Praktisch keine Männchen fixierten sich binnen 1 h, wenn die synthetische Pheromon-Mischung (SPM-A.h.) oder Glaswolle alleine auf die Membran gegeben worden waren. Hinzufügen von arteigenem Kot oder SPM-A.h. zur Glaswolle oder die Benutzung von Rinderhaaren verbesserte das Fixieren der Männchen. Signifikant wurde diese Verbesserung, wenn die Rinderhaare zusammen mit SPM-A.h. verabreicht wurden (32 % Fixierung). Überdosierte ($\times 10^3$) SPM-A.h., zusammen mit Glaswolle gegeben, führte nicht zum Fixieren von Zecken.

Tab. 3-9 – *In vitro* Fixierung ungesogener *A. hebraeum* Männchen – Die Tabelle zeigt %-Fixierungsraten mit dem 95 %-Vertrauensintervall des Verhältnisses 'fixierte Zecken / auf die Membran gebrachte Zecken' von 9 - 10 Versuchseinheiten mit je 5 Männchen. Fixierungsraten ohne einen gemeinsamen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich ($P < 0.05$; Mann-Whitney U-Test). Einzelheiten zu den Stimuli und deren Konzentrationen finden sich in Kapitel 2.9.

Bezeichnung der Stimuli auf der Membran	Nr. des Stimulus bzw. Kombinations-Typ	% Fixierung 1 h nach Infestierung	
SPM-A.h.	11	0 (0 - 7)	a
Glaswolle	1	2 (0 - 11)	ab
SPM-A.h. $\times 10^3$ + Glaswolle	P	4 (1 - 14)	ac
Zeckenkot (A. h.)	13	18 (9 - 31)	cd
Zeckenkot (A. h.) + Glaswolle	N	20 (10 - 34)	cd
SPM-A.h. + Glaswolle	M	20 (10 - 35)	bcd
Rinderhaare	6	24 (13 - 38)	ad
Rinderhaare + SPM-A.h.	O	32 (20 - 47)	d

Nach den soeben beschriebenen Tests von Fixierungsstimuli wurden Versuche zur *in vitro* Vorfütterung der Männchen durchgeführt. Dazu dienten Rinderhaare zusammen mit Zeckenkot als Fixierungsstimuli auf der Silikon-Membran (Kombination L; Tab. 3-10). Die folgenden Behandlungen wurden parallel in einem Versuchsblock durchgeführt. Ungesogene künstliche Männchen fixierten sich 1 d n. I. mit 60 % signifikant besser als natürliche mit 31 % (Tab. 3-10). Nach 5 - 7 Tagen *in vitro* Vorfütterung wiederfixierten alle Männchen bereitwilliger auf frischen, nur mit Zeckenkot (Stimulus Nr. 13) bestreuten Membranen (6 - 7 Männchen je Versuchseinheit). Künstliche Männchen erreichten dabei 1 d n. I. Werte von 93 %, ihre natürlichen Kollegen signifikant niedrigere 75 %. Spätestens am d 4 hatten sich die Raten der natürlichen Männchen (87 %) denen der künstlichen angeglichen (96 %). Auf dem Kaninchen über den gleichen Zeitraum vorgefütterte natürliche Männchen fixierten sich *in vitro* 1 d n. I. mit 63 % und steigerten dieses Resultat bis zum d 4 auf 74 % und damit in den in den Bereich *in vitro* vorgefütterter natürlicher Männchen (Tab. 3-10).

72 Ergebnisse

Tab. 3-10 -- *In vitro* Fixierung adulter *A. hebraeum* -- Dargestellt sind die %-Werte mit dem 95 %-Vertrauensintervall des Verhältnisses 'fixierte Zecken / auf die Membran gebrachte Zecken' sowie *n* als Anzahl Zecken oder Versuchseinheiten (VE). Aussagen zu signifikanten Unterschieden zwischen Resultaten befinden sich im Text. In der Spalte 'Spezifikationen' befindet sich die Nr. des Einzelstimulus oder der Buchstabe der Stimulus-Kombination sowie der Membran-Typ. Eine eventuelle Vorfütterung der Männchen dauerte 5 - 7 Tage (d). Abkürzung: n. l. nach Infestierung.

Geschlecht / Ursprung	% Fixierung d 1 n. l.	% Fixierung d 4 n. l.	<i>n</i> Zecken aufgesetzt	<i>n</i> VE	Spezifikationen
Männchen, ungesogen	31 (26 - 37)	40 (35 - 46)	je 28 ± 1	10	L, W1
künstliche Männchen, ungesogen	60 (53 - 69)	67 (59 - 75)	je 30	5	dto.
Männchen, <i>in vivo</i> vorgefüttert	63 (51 - 74)	74 (64 - 82)	je 7	10	13, W1
Männchen, <i>in vitro</i> vorgefüttert	75 (61 - 88)	87 (74 - 94)	je 6	9	dto.
künstliche Männ., <i>in vitro</i> vorgef.	93 (85 - 98)	95 (89 - 99)	je 7	10	dto.
Weibchen (mit <i>in vivo</i> vorgefütterten Männ.)	33 (22 - 45)	68 (55 - 80)	je 7	10	dto.
Weibchen (mit <i>in vitro</i> vorgefütterten Männ.)	46 (32 - 61)	69 (55 - 81)	je 6	9	dto.
künstliche Weibchen (mit <i>in vitro</i> vorgefütterten künstlichen Männ.)	53 (51 - 74)	71 (59 - 82)	je 7	10	dto.

Klammer-('Clasping')-Verhalten der Männchen *in vitro* zeigte sich erstmals am d 6. Dazu mußten die fixierten Männchen mit einer Vogelfeder oder, wirkungsvoller, von einem an einer Pinzette gehaltenen Weibchen berührt werden. Zu spontanem 'clasping' wie auf dem Kaninchen (ab d 5) kam es nicht. Auch trat es weniger verbreitet und intensiv als *in vivo* auf.

Wurde 1 h nach dem Besatz der Fütterungsgläser mit *in vitro* vorgefütterten natürlichen Männchen die gleiche Anzahl natürlicher Weibchen hinzugesetzt, erreichten die letzteren nach 1 d Fixierungsraten von 46 % (Tab. 3-10). Waren beide Geschlechter künstliche Zecken, fixierten die Weibchen ähnlich mit 63 %. Am d 4 n. l. verhielten sich Weibchen beiderlei Herkunft gleich gut (69 % bzw. 71 %). Wurden natürliche Weibchen auf Membranen gebracht, auf denen sich auf dem Kaninchen 'gereifte' Männchen befanden, betrug die weibliche Fixierungsrate 1 d n. l. 33 %, am d 4 n. l. 68 % (Tab. 3-10). Versuche, Weibchen ohne die Anwesenheit vorgefütterter Männchen fixieren zu lassen, wurden nicht unternommen.

Zusammenfassung der *in vitro* Fixierung von *A. hebraeum*

Larven, ob natürlichen Ursprungs oder aus der F₁-*in vitro*-Generation fixierten sich zu mindestens einem Drittel auf dünnen Silikon-Membranen. Für Nymphen jeglicher Herkunft lagen, bei Kaninchenhaaren und arteigenen Pheromonen als Fixierungsstimuli, die Festsetzraten auf dünnen Silikon-Membranen über 90 %, d. h. genauso hoch wie auf dem Rind. Die *in vitro* Fixierung zeigte sich unbeeinflusst durch die Zeckencharge, Spender-Rind, Häufigkeit des Blutwechsels sowie die Besatzdichte der Nymphen. Sie war auch robust gegenüber unterschiedlichen Blutzubereitungen sowie zusätzlichem ATP / GSH und unterschiedlichen Mikrobiziden im Blut. Ungesogene natürliche Männchen fixierten sich signifikant schlechter (31 %) als ungesogene künstliche (60 %). Ungeachtet ihrer Vorgeschichte fixierten sich vorgefütterte Männchen signifikant besser als ungesogene. Bis zu zwei Drittel der Weibchen setzten sich binnen eines Tages in Anwesenheit vorgefütterter Männchen auf dicken Silikon-Membranen fest.

3.2. *In vitro* Fütterung

3.2.1. Kontaminationsprobleme

3.2.1.1. Pilze

Zu Beginn des Projektes wurde versucht, Zecken auf einer Durchfluß-Fütterungskammer zu ernähren, meist ohne den Einsatz von Mikrobiziden. Dabei traten ständig Schwierigkeiten auf wie Verstopfungen der Schläuche, der Kammer-Ein- und Auslässe, sowie Blockierung der Polypropylen-Unterseite der Membranen (Typ T1 - 4). Grund hierfür waren zum Teil Blutgerinnsel, meist aber ungehemmt wachsendes Pilzmyzel. Anstelle der Anwendung wirksamer Fungizide wurde auf eine Erhöhung des Blutflusses, verstärktes Durchspülen mit Saline und die aufwendige Entkeimung aller Systemkomponenten gesetzt. Das Einsprühen der Innenseite der Kammer mit Teflon-Spray verhinderte zwar das Anhaften von Myzel am Metall, jedoch nicht an der Membran-Unterseite. Dem Problem des unerwünschten Wachstums von Pilzmyzel in der *in vitro* Zeckenfütterung wurde erst nach Einführung der Fütterungsgläser nachgegangen. Aus diesen Versuchen entnommene Pilz-Stichproben wurden von PD Dr. O. Petrini (Mikrobiologisches Institut, ETH Zürich) als *Aspergillus fumigatus*, vereinzelt als *A. ochraceus* identifiziert. *Aspergillus* ist eine fakultativ anaerobe, praktisch überall vorkommende Gattung. Sie gehört zu den Höheren Pilzen (Eumycetes).

Unterhalb von Membranen, auf denen sich zahlreiche Zecken festgesetzt hatten, befanden sich entsprechend viele Zementscheiden. Diese waren von den Zecken um ihre Mundwerkzeuge herum gebildet worden. Die Verbreitung von Pilzmyzelien unter der Membran begann überwiegend an solchen Zementscheiden. Ein Kontrollexperiment ohne Zecken und damit auch ohne Zement bildete erst in den letzten Versuchstagen zwei Myzelien aus: eines an einer blasigen Aufwerfung auf der Unterseite des Silikons, die mit Blut und Luft gefüllt war; ein zweites am Rand der Membran, wo ein Teil des Terylene-Netzes ins Blut hing. Die Möglichkeit für Pilze, sich in einer VE anzuhafte und bei den regelmäßigen Kontrollen entdeckt zu werden, stieg also mit der Anzahl der dort fixierten Zecken. Daher schien es sinnvoller, das täglich festgestellte Ausmaß des Pilzbefalls in einer Behandlung und dessen Bedeutung für die Zecken nicht durch die Zahl kontaminierter VE darzustellen, sondern durch den Anteil an Weibchen, die auf pilzinfiziertem Blut saugten (Abb. 3-2, Besprechung weiter unten).

Die Beschichtung der Unterseite der Wiener Membran (W1) mit einer monomolekularen, abweisenden Schutzschicht aus Polydimethylsiloxan (Kiss-Cote®, autorisierter Vertrieb: Emil Müller, electronics / chemicals, CH-8152 Glattbrugg/ZH) verringerte nicht das Auftreten von Pilzmyzel.

Der Versuch, Myzel- und Fruchtkörperwachstum von *A. fumigatus* durch Erhöhen des CO₂-Gehaltes der Luft auf ca. 5 % zu beeinflussen, schlug fehl. Auf geeigneten Agar-Platten (37°C) ausgestrichene Myzelstücke wuchsen und bildeten Konidien hier ebensogut wie in normaler Atmosphäre.

Einen Eindruck über die Bedeutung verschiedener Blutzubereitungen für das Pilzwachstum vermittelten 27 VE aus unterschiedlichen Versuchsblöcken mit *B. microplus* Zecken (Tab. 3-11). Allen gemein war die Verwendung der Bakterizide Penizillin (90 - 100 IE / ml) und Streptomycin (90 - 100 µg / ml) sowie des Fungizids Amphotericin B (0.25 µg / ml). Die Mikrobizide wurden beim täglich einmaligen Wechsel

Tab. 3-11 – Pilzmyzel in unterschiedlichen Blutzubereitungen – Untersucht wurden 27 Fütterungsgläser mit *B. microplus*. Darstellung als Mittelwert ± Standardabweichung (n), d Tag.

	Zeit bis zum Auftreten von Pilzmyzel [d]
Blut mit 30 % mehr Erythrozyten	11.3 ± 6.1 (4)
Normalblut	6.5 ± 4.5 (10)
Durch Gefrierlagerung hämolysiertes Blut	4 (1)
Blut mit 5 g Glukose / l	3.3 ± 2.2 (12)

des defibrinierten Rinderblutes hinzugegeben. Tendenziell am längsten pilzfrei (≈ 11 d) blieb die Zubereitung mit dem geringsten Serum- bzw. dem höchsten Erythrozytenanteil. Bei normalem Verhältnis dieser beiden Blutkomponenten trat nach etwa 7 d Pilz auf. Wurde durch Hämolyse der Inhalt der roten Blutzellen den Mikroorganismen zugänglich gemacht, entwick-

elte sich Myzel bereits nach 4 d (1 Fütterungsglas). Dies beschleunigte sich, wurde dem Blut 5 g Glukose pro Liter hinzugefügt (≈ 3 d). Das in allen Versuchseinheiten vorhandene Amphotericin B (0.25 µg / ml) konnte das Auftreten von Pilzen nicht verhindern.

Es wurde eine Versuchsreihe konzipiert, die ohne Zecken auskam und den Pilzen optimale Wachstumsbedingungen bot. Damit konnten in relativ kurzer Zeit und in einem Zustand größtmöglicher Kontamination verschiedene Fungizide getestet werden (Tab. 3-12).

Tab. 3-12 → Blut-Pilzkulturen mit verschiedenen Mikrobizidgaben - Alle Versuchsgläser (außer Nr. 1a-f "nicht beimpft") erhalten 1 ml einer aus kontaminierten Versuchen gewonnenen, hochangereicherten Pilzhyphen-/myzel-Suspension, unsteril aufgefüllt auf 10 ml mit aufgetautem Rinderblut (Glukose 5 g/l; Penicillin 90-100 IE/ml; Streptomycin 90-100 µg/l). Nach einer Inkubationsdauer der geschlossenen gehaltenen Versuchsgläser von 2 d bei 37-38°C wurde das Myzelwachstum quantitativ sechsstufig bewertet (leeres Kästchen = kein Myzel; fünf schwarze Kästchen = gesamte Blutoberfläche mit Myzel bedeckt).

Nr.	Art der Behandlung	Pilzmyzel nach zweitägiger Inkubation	Bemerkungen
1a	nicht beimpft, kein Fungizid	□	
b	"	□	
c	"	□	
d	"	□	
e	"	□	
f	"	□	
2a	kein Fungizid	■ ■ ■ ■ ■	+ Konidien
b	"	■ ■ ■ ■ ■	"
c	"	■ ■ ■ ■ ■	"
d	"	■ ■ ■ ■ ■	"
e	"	■ ■ ■ ■ ■	"
3a	Amphotericin B 2.1 µg/ml	■ ■ ■ ■ ■	+ Konidien
b	"	■ ■ ■ ■ ■	"
c	"	■ ■ ■ ■ ■	"
4a	Amphotericin B 21 µg/ml	■ ■ ■ ■ ■	+ Konidien
b	"	■ ■ ■ ■ ■	"
c	"	■ ■ ■ ■ ■	"
5a	Nystatin 182 IE/ml	■ ■	+ Konidien
b	"	■ ■	"
c	"	■	"
6a	Nystatin 1000 IE/ml	□	keine Konidien
b	"	□	"
c	"	□	"
7a	Nystatin 2000 IE/ml	□	keine Konidien
b	"	□	"
c	"	□	"
8a	Methylparaben 0.55 mg/ml	■ ■	keine Konidien
b	"	■ ■	"
c	"	■	"
9a	Methylparaben 1.8 mg/ml	■	keine Konidien, Myzel nicht bis zur Blutoberfläche
b	"	■	"
c	"	□	"
10a	Methylparaben 4.55 mg/ml	□	keine Konidien, Blut leicht denaturiert
b	"	□	"
c	"	□	"
11a	Methylparaben 18.2 mg/ml	□	keine Konidien, Blut stark denaturiert
b	"	□	"
c	"	□	"

in der Kontrollgruppe ($n = 6$), die weder Fungizid noch Myzel-Suspension erhielt, wurde nach 2 d Inkubationszeit, während der die Gläser nicht geöffnet wurden, kein Pilz entdeckt. Die mit Suspension beimpfte, aber nicht mit Fungiziden versetzte zweite Kontrollgruppe ($n = 5$) bot erwartungsgemäß den besten Nährboden für ungehemmtes Myzelwachstum und Ausbildung von Fruchtkörpern (Konidien) an der Blutoberfläche. Starke Myzelbildung konnte auch mit Dunkelfärbung des Blutes ohne H_2S -Geruch einhergehen.

Selbst in hoher Konzentration (Gruppe 4, $n = 3$) blieb Amphotericin B unbefriedigend und wurde als Fungizid für Fütterungsversuche zugunsten des wirksameren Nystatin (Gruppe 5) aufgegeben (Tab. 3-12). Die Bildung von Konidien ausgehend vom Myzelpolster wurde auch von Nystatin erst bei 1000 IE / ml unterbunden. Dies war aber in Zeckenversuchen kaum ein Problem, da das Blut durch eine Membran abgedeckt war. Tatsächlich war Nystatin in Versuchen mit Zecken auch bei 100 IE / ml ausreichend und kam in manchen Behandlungen sogar in 10fach geringerer Konzentration zum Einsatz. in Blut mit Nystatin 1000 IE / ml und höher (Gruppe 6 / 7), sowie mit Methylparaben 4.55 mg / ml (Gruppe 10) konnte kein Pilzmyzel entdeckt werden. Bereits ab 1.8 mg Methylparaben / ml Blut wurde Myzel nur unter der Blutoberfläche gefunden (Gruppe 9). Nachteil dieser auch in geringerer Menge (Gruppe 8 / 9) ausreichend fungizid wirkenden und preiswerten Substanz war indes das benötigte Lösemittel (Äthanol), das zu deutlich sichtbarer Denaturierung des Blutes führte (Gruppe 10 / 11) (Tab. 3-12). Zwei 'moderne' Fungizide, die Azolderivate Enilconazol (Gruppe Imidazole) und Itraconazol (Gruppe Triazole) wurden direkt im Zeckenversuch getestet (siehe Abb. 3-2).

Die Abb. 3-2 A-F zeigt die Wirkung verschiedener Behandlungen auf das Auftreten von Pilzmyzel in Fütterungsglas-Versuchen mit adulten *A. hebraeum*. Sie vergleicht jeweils zwei Behandlungen, die sich nur in einem Parameter unterscheiden. Eine Ausnahme hiervon bildet Teilabbildung C, wo nicht nur die Fungizide, sondern auch die Bakterizide in beiden Behandlungen ungleich waren. Es zeigte sich, daß Nystatin 100 IE/ml (NYS 100) der 10fach niedrigeren Konzentration eindeutig überlegen war (A). Das war auch die chemische Bekämpfung mit hoher Dosis (NYS 100) verglichen mit der Bestrahlung der Membran-Unterseite aus kurzer Distanz (7 cm) mit einem starken UV-C-Strahler (täglich 5 min) (B).

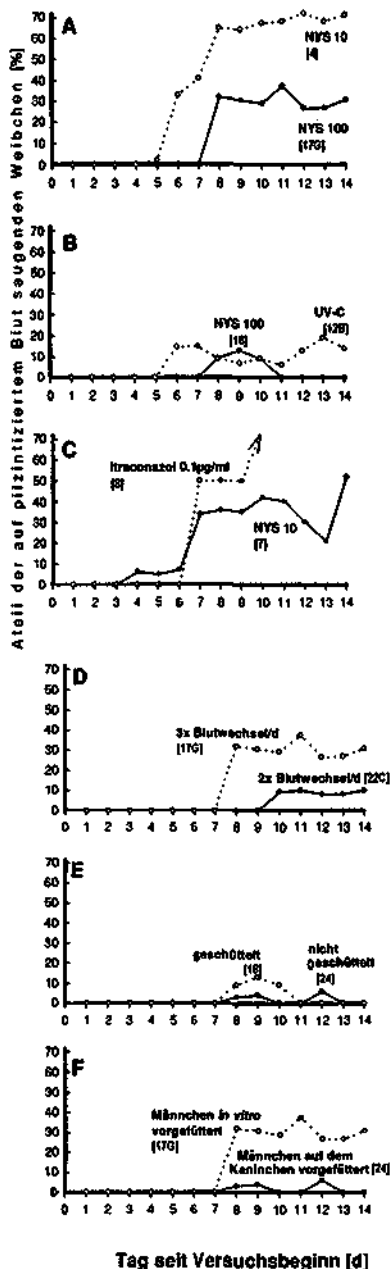


Abb. 3-2 A-F – Auftreten von Pilzmyzel *in vitro* in verschiedenen Behandlungen – Dargestellt ist der Anteil der auf pilzkontaminiertem Blut saugenden *A. hebraeum* Weibchen an allen in einer Behandlung an diesem Tag fixierten Weibchen. In eckigen Klammern sind die entsprechenden Behandlungsnummern angegeben (siehe Übersichtstab. 2-9). Die schwankenden Kurvenverläufe erklären sich a) aus der sich täglich ändernden Gesamtzahl aller fixierten Weibchen durch Abfallen vollgesogener Exemplare; b) durch Auftreten von Pilz in zuvor unkontaminierten Fütterungsgläsern; c) seltener durch Ausfall eines Fütterungsglases aufgrund eines Membranlecks. Behandlung [8] hatte als Bakterizid Penicillin 100 IE / ml und Streptomycin 100 µg / ml, Behandlung [7] hingegen Gentamicin 5 µg / ml. NYS 10 Nystalin 10 IE / ml; UV-C Bestrahlung der Membran-Unterseite mit UV C (täglich 5 min aus 7 cm Entfernung).

Die Gabe eines 'modernen' Fungizids, dem Triäzolderivat Itracozazol in der geläufigen Konzentration von 0.1 µg / ml hatte, verglichen mit NYS 100, eine deutlich schlechtere Wirkung (C). Es wurde versucht, die Pilze durch ein tägliches 20minütiges Eintauchen der Membran-Unterseite in ein extrem hoch konzentriertes Imidazolderivat Enilconazol (1000 µg/ml) zu kontrollieren. Dies war etwa so effektiv wie NYS 10 im Futterblut (ohne Abb.). Die Reduzierung der Blutwechsel von drei- auf zweimal pro Tag verringerte auch das Risiko einer Pilzinfektion (D), das Schütteln der Fütterungsgläser hingegen schied es geringfügig zu erhöhen (E). Belanden sich die Zeckenmännchen bereits seit 5-7 d zur Vorfütterung im *in vitro*-System, so kam es nach deren Umsetzen auf eine frische Membran (zusammen mit ungesogenen Weibchen) erheblich häufiger zur Pilzentwicklung als mit auf Kaninchen vorgefütterten Männchen (F).

Auch bei nur einem Blutwechsel / d (Behandlungen [1-3]) war NYS 100 der geringeren Konzentration (NYS 10) überlegen (ohne Abb.). Erstes Auftreten von Pilzmyzel konnte hier von d 3 auf d 7 hinausgezögert werden. Nur ein Zehntel anstatt der Hälfte der Fütterungsgläser war am Versuchsende von Pilz befallen.

Der mißlungene Versuch, auf ein Fungizid im Futterblut ganz zu verzichten und durch ein täglich einmaliges, desinfizierendes Tauchbad zu ersetzen [1], unterstrich nur erneut die Notwendigkeit, unter diesen Versuchsbedingungen NYS permanent und in mindestens 100 IE / ml zu verabreichen.

Wie eine defekter Ventilator, der einen starken Einstrom staubiger Außenluft in das Labor verursachte, zu unerwarteter Pilzkontamination führen konnte, zeigten die Behandlungen [7B] und [9] (beide NYS 10 mit 3x Blutwechsel / d). Hier war in bisher noch nie dagewesenem Maße eine Verpilzung aller VE bereits nach 1 Woche festzustellen (ohne Abb.). Dabei füllte in manchen Fütterungsgläsern ein dichtes Myzelpolster, von der Membran ausgehend, das gesamte Blutreservoir aus.

Zwei andere, parallel dazu durchgeführte Behandlungen, die täglich ein Tauchbad in hoch konzentriertem Enilconazol und Gentamicin [10] bzw. UV-C-Bestrahlung [11] erhielten, aber kein Bakterizid im Futterblut hatten, waren mäßig verpilzt. Doch fiel hier spätestens am d 7 in allen Experimenten eine starke Dunkelfärbung und penetranter H₂S-Geruch des Blutes auf (Näheres dazu im folgenden Kapitel).

Die Bildung von Pilzfruchtkörpern auf den Membranen wurde nie in Versuchen mit der Wiener Membran (W1) beobachtet, selbst dann

nicht, wenn es unterhalb der Membranen viel Myzel gab. In Experimenten mit klebstoffimprägnierten Baudruche-Membranen (B1 / B2) hingegen, kam es in allen Fällen zu Konidienwachstum auf der Membran – je mehr Zecken (hier: *B. microplus* Larven) fixiert waren, umso schneller und ausgeprägter. Es schien, als sei diese dünne, halborganische Membran von Pilzfäden (Hyphen) durchwachsen worden. Es blieb aber unklar, ob dies von einer Verpilzung der reichlich von den Zecken erzeugten Exkremente ausgehend geschah (von oben nach unten) oder vom Pilzmyzel unterhalb der Membran aus beginnend (von unten nach oben).

NYS 100 wurde zum "Standard-Fungizid" in der *in vitro* Fütterung von *A. hebraeum* Nymphen. Wertvolle Erfahrungen bezüglich der Kontamination mit Pilzen waren zuvor durch die Arbeit mit adulten Zecken dieser Art gewonnen worden. Daher trat Pilzmyzel in Nymphen-Experimenten nur selten, in geringer Menge und meist erst dann auf, wenn schon ein Großteil der Zecken vollgesogen von der Membran gefallen waren.

Eine Ausnahme war die Behandlung [30] im Brutschrank bei 36°C und 95 % rF dank einer wassergefüllten Wanne. Dort kam es, vermutlich nach jedem Blutwechsel, aufgrund der hohen Luftfeuchte zur Bildung von Kondensationswasser am abgekühlten Glasrohr über der Membran (Typ V2). Dieses tropfte herab auf die saugenden Nymphen und deren Exkremente. Es kam rasch zur Ausbreitung eines alles überwuchernden Konidienrasens, was zum Abbruch des Experimentes zwang. Ansonsten wurde sich bei Versuchen mit Nymphen auf eine routinemäßigen "Pilzbeobachtung" der Membranen beschränkt, um Außergewöhnliches zu erfassen, aber ohne eine weitere Auswertung vorzunehmen.

3.2.1.2. Bakterien

Nachdem immer wieder, trotz Gabe der Bakterizide Penizillin und Streptomycin, Versuche mit stark nach H₂S riechendem, dunklem Blut aufgetreten waren, mußten wirksamere Mikrobizide gefunden werden. Es wurde bei 27 Fütterungsgläsern an insgesamt 35 Blutwechseln mit verschiedenen Mikrobizid-Gaben eine systematische Geruchsbeurteilung vorgenommen (Tab. 3-13). Fütterungsgläser, die den typischen H₂S-Geruch aufwiesen, behielten ihn auch am Folgetage trotz Wechsel des Blutes. Dies war gleichermaßen der Fall, wenn dem Blut das Fungizid Nystatin oder Penizillin zusammen mit Streptomycin in sehr hoher Dosis

zugeführt wurden. Gentamicin 50 µg / l ließ hingegen in allen 19 Fällen seiner Anwendung den üblen Geruch bei der nächsten Überprüfung verschwinden. In keinem von 9 Fällen prophylaktischer Zugabe von Gentamicin (50 µg / ml) trat am Folgetag H₂S-Geruch auf. Spätere durchgeführte Versuche zeigten diesen vorbeugenden Effekt von Gentamicin bereits in 10fach geringerer Konzentration (5 µg / ml; 'GEN 5'). GEN 5 wurde so zum "Standard-Bakterizid" aller weiteren Experimente. Es wurden keine weitergehenden, systematischen mikrobiologischen Untersuchungen unternommen.

Tab. 3-13 -- Einfluß verschiedener Mikrobizidgaben auf H₂S-Geruch im Futterblut – Aus 27 Fütterungsgläsern wurde an insgesamt 35 Blutwechsell eine Prüfung auf H₂S-Geruch vorgenommen. Die Tabelle gibt die Anzahl der Proben (beim täglichen Blutwechsel) an, deren Geruchseindruck der jeweiligen Kategorie "neutral" oder "H₂S" entsprach. Nach eingeleiteter Behandlung wurden dieselben Fütterungsgläser am Folgetag erneut begutachtet.

Geruch des Blutes vor Behandlung	Behandlung mit		Geruch des Blutes nach Behandlung		n Beobachtungen	n Fütterungsgläser
	H ₂ S	Bakterizid / Fungizid	neutral	H ₂ S	n	n
.	3	keine	.	3	3	3
.	2	Nystatin 500 IE / ml	.	2	2	2
.	2	Penizillin 1000 IE / ml Streptomycin 1000 IE / ml	.	2	2	2
.	19	Gentamicin 50 µg / ml	19	.	19	13
9	.	Gentamicin 50 µg / ml	9	.	9	7

3.2.2. In vitro Fütterung von *I. ricinus*

Die Körpermasse von auf dem Kaninchen vollgesogenen, selbständig abgefallenen *I. ricinus* Weibchen wurde von Graf (1978) mit 263 ± 71 mg (Bereich: 130 - 440 mg; n = 88) beziffert.

In vitro Versuche an dieser Zeckenart wurden mit der Durchfluß-Fütterungskammer (DFK) auf den mit Klebstoff versiegelten PTFE-Membranen T1 und T2 gemacht. Als Fixierungsstimuli dienten die Stimulus-Kombination A aus Kaninchenhaaren und Rinderohr-Extrakt bzw. B, die zusätzlich noch Saline und arteigenen Kot enthält. Bis zum d 8 nahmen 4 der insgesamt 29 auf die Membranen gesetzten Weibchen erheblich an Körpermasse zu (53 / 61 / 168 / 256 mg), fielen aber nicht

selbständig von der Membran und mußten zwischen d 9 und d 11 mit der Pinzette entfernt werden. *In vitro* legte ein einziges Weibchen (61 mg) nach ca. 3 Wochen wenige Eier (Masse nicht bestimmt), die aber nach kurzer Zeit vertrockneten. Die 3 anderen Zecken färbten sich schwarz, verpilzten und starben nach wenigen Tagen. Bereits im Versuchsverlauf verendeten die restlichen saugenden Weibchen, ohne sich von der Membran gelöst zu haben (ohne Tab.).

Beide Versuche waren begleitet von Pannen wie z. B. Überflutung oder Luftblasen unter der Membran. Auch geschah es, daß die DFK gelegentlich trockenfiel. Nach Abbruch der Versuche zeigten sich die Fütterungskammern mit einer Art 'Schlamm' gefüllt, der an der Membran-Unterseite haftete, aber nicht am Metall der Kammer selbst. Diese tiefrote Masse bestand aus Pilzmyzel, Fibrinresten und verklebten roten Blutzellen. Die starke Myzelbildung sowie die u. a. deshalb aufgetretenen Pannen dürften der Hauptgrund für den geringen Erfolg der Weibchen sein.

3.2.3. *In vitro* Fütterung von *B. microplus*

In der Laborzucht auf Rindern erschienen erste aus Nymphen gehäutete Männchen ab d 11 (Tag der Infestierung = d 0), die Weibchen ab d 12 (Falk-Vairant *et al.*, 1994). Nach der Blutmahlzeit lag die Körpermasse selbständig vom Rind abgefallener Weibchen bei 236 ± 34 mg ($n = 100$).

Die *in vitro* Ergebnisse sind in Gruppen gleicher Entwicklungsstadien zusammengefaßt. Versuche mit der einwirtigen *B. microplus* wurden überwiegend mit ungesogenen Larven gestartet, so daß sich die Entwicklung zur vollgesogenen Larve und danach über die Nymphe zur adulten Zecke auf derselben Membran abspielte. Erst diese Adulten wurden auf eine frische Membran übertragen.

Im letzten Abschnitt dieses Kapitels finden sich *in vitro* Versuche mit natürlichen, d. h. vom Rind statt von Membranen abgesammelten Adulten. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert mit dem 95 %-Vertrauensintervall des Verhältnisses der beiden in Frage kommenden Größen oder \pm Standardabweichung. Da es in manchen Versuchen unmöglich war, die Anzahl Zecken zuverlässig zu bestimmen oder auch nur nach Augenschein abzuschätzen, blieb in diesen Fällen die Angaben rein qualitativ.

3.2.3.1. Natürliche Larven

Begonnen wurde mit zwei Versuchen mit je ca. 200 Larven in der Durchfluß-Fütterungskammer auf klebstoffversiegelten PTFE-Membranen (T4) und der Stimulus-Kombination C. Nach etwa 2 d saugte maximal $\frac{1}{4}$ der Larven aktiv, was an ihrer Kotausscheidung zu erkennen war. Während in einem der beiden Versuche am d 5 n. I. alle Zecken tot waren, hatten sich in anderen $< 5\%$ der Larven vollgesogen und gingen zur pharaten Phase über. Beide Versuche waren reich an Pilzmyzel / -konidien und Membranüberschwemmungen (ohne Tab.).

In den Fütterungsgläsern wurden zwei Versuchsblöcke (VB) durchgeführt (Stimulus-Kombination E). Einer (VB1) bestand aus 2 VE auf der klebstoffimprägnierten Baudruche-Membran B2 und jeweils 1700 - 1900 angesetzter Larven, ein zweiter (VB2) aus 5 VE mit je 1770 ± 100 Larven auf dem Membran-Typ B1. In VB1 fanden sich am d 3, visuell geschätzt, maximal 10 % der Larven in vollgesogenem Zustand und tags darauf in der pharaten Phase.

In VB2 erschienen ab d 4 in allen 5 Fütterungsgläsern vollgesogene Larven. Schon die Bestimmung der Fixierungsraten (siehe Kapitel 3.1.2.) gestaltete sich in diesen Versuchen sehr schwierig, was ebenso für das Abschätzen der Menge vollgesogener Larven galt. Das beispielhafte Auszählen eines Fütterungsglas ergab 26 % (24 - 28 %; 479 von 1860) vollgesogene Larven, bezogen auf alle eingesetzten, oder 84 % (81 - 87 %; 479 / 568) auf alle tatsächlich fixierten Larven (ohne Tab.)

In 4 parallelen VE, in denen das Futterblut zusätzlich 5 g Glukose / l enthielt, traten bereits ab d 1 starke Pilzentwicklung, aber keine vollgesogenen Larven auf. In zwei weiteren Parallelgläsern mit durch Gefrierlagerung hämolysiertem Blut wurden vollgesogene Larven ab d 5 entdeckt.

3.2.3.2. Künstliche Nymphen

In einem Versuch mit der Durchfluß-Fütterungskammer kam es am d 7 n. I. zur Häutung von Nymphen ($< 3\%$ der ursprünglich aufgesetzten Larven), die sich aber nicht wiederfixierten und vertrockneten.

In den beiden Fütterungsgläsern mit der B2-Membran (VB1) traten zwischen d 4 und d 5 n. I. die ersten pharaten Nymphen auf, die am nächsten Tag begannen, sich zu häuten. Insgesamt erreichten $< 1\%$ der in den Versuch gebrachten Larven dieses Entwicklungsstadium. Die Nymphen gingen innerhalb weniger Tage zugrunde, vermutlich wegen

des Pilzes, der sich auf der zu einem Drittel überfluteten Membran ausgebreitet hatte.

Der Zeitpunkt des Auftretens pharater und gehäuteter Nymphen in den 5 Fütterungsgläsern der VB2 (Membran-Typ B1) entsprach dem der VB1. In dem einen, ausgezählten Fütterungsglas häuteten sich 21 % (19 - 23 %; 392/1860) aller aufgesetzten bzw. 82 % (78 - 85 %; 392 / 479) aller vollgesogenen Larven zum nächsten Entwicklungsstadium (ohne Tab.).

Enthielt das verfütterte Blut zusätzliche Glukose, konnten, wohl wegen der regelrechten Überwucherung der Zecken mit Pilzfruchtkörpern, nur in einer von 4 Versuchseinheiten pharate (d 5) und gehäutete (d 6) Nymphen entdeckt werden. Nur eines von 2 Fütterungsgläsern mit gefrierengelagertem Blut brachte es, trotz starker Blasenbildung unter der Membran, am d 6 zu pharaten Nymphen und am d 8 zur Häutung erster ungesogener Exemplare.

In allen Versuchen mit Larven und Nymphen in Fütterungsgläsern begannen früher oder später die von den in großer Zahl saugenden Zecken reichlich abgesetzten Exkremeute zu verpilzen. Zusammen mit dem sich unter der Membran ausbreitenden Myzel des Pilzes war dies der Hauptgrund für den vorzeitigen Abbruch des Experiments.

3.2.3.3. Künstliche Adulte

In 4 Fütterungsgläsern (Membran B1, VB2) waren ab d 15 n. l. pharate Adulte zu finden. In Zweien davon, in denen Pilz erst spät aufgetreten war, häuteten sich die pharaten Zecken ab d 16 zu Männchen ($n = 51$) und ab d 17 zu Weibchen ($n = 48$). Dies entsprach insgesamt in etwa 3 % der als Larven in den Versuch gebrachten Zecken. Wurden nun die künstlichen Adulten auf eine frische Membran überführt (Stimulus-Kombination F: Rinderhaar-Extrakt und Saline), so saugten 3 Tage später 34 % der Weibchen (19 - 53 %; 11 / 32) und 71 % der Männchen aktiv (54 - 85 %; 25 / 35). Unter der Membran fand sich schon nach 2 d Pilzmyzel. Die Weibchen nahmen, noch deutlicher als die Männchen, eine unnatürlich kugelförmige Gestalt an und färbten sich dunkel. Ihre Beine versteiften sich, andere wiederum trockneten ein. Das Experiment wurde nach 5 d abgebrochen.

3.2.3.4. Natürliche Adulte

Es wurden 3 Versuche auf der Durchfluß-Fütterungskammer und der Stimulus-Kombination C (Rinderhaare, -Extrakt, Saline und arteigener

Zeckenkot) unternommen. Benutzt wurden ungesogene adulte Zecken, die, entweder noch pharat oder gerade frisch zum Adultus gehäutet, vom Rinderrücken abgesammelt worden waren. Dabei kam es in 2 Versuchen (Membran-Typ T4) zu erwähnenswerten Körpermassenzunahmen der Weibchen. Im ersten konnte 1 Weibchen (von 14 aufgesetzten bzw. 7 aktiv saugenden) am d 10 mit der Pinzette abgezupft werden (68 mg; kugelige Gestalt). Es wurde dabei leider verletzt und vertrocknete. Im zweiten Versuch fielen 3 von 8 aufgesetzten bzw. aktiv saugenden Weibchen selbständig von der Membran ab:

- 66 mg (abgefallen am d 7 n. I.)
- 58 mg (d 8; Eiablage; kein Larvenschlupf)
- 152 mg (d 8; Eiablage; 11 Larven geschlüpft).

Die Masse der Eier wurde nicht bestimmt. Alle 3 Versuche waren stark verpilzt und, wie bei der Durchfluß-Fütterungskammer üblich, von diversen Pannen heimgesucht worden.

Am Ende der experimentellen Phase der Arbeit wurden 2 Fütterungsgläser mit *B. microplus* entsprechend den Erfahrungen mit der *in vitro* Fütterung von *A. hebraeum* angesetzt. Zum Einsatz kam eine dünne, mit Viskosefasern gestützte Silikon-Membran (Typ V1) mit der Stimulus-Kombination D (Rinderhaare und -Extrakt). Das Futterblut (2 Blutwechsel täglich) enthielt als Mikrobizide GEN 5 und NYS 100. Am d 8 / 9 waren 39 % der zu Beginn aufgesetzten Weibchen (24 - 55 %; 17 / 44) aktiv bei der Blutaufnahme. Am d 9 fiel ein Weibchen (167 mg) von der Membran. Die restlichen 10, am d 10 / 11 noch fixierten Weibchen, wurden abgezupft und die Versuche abgebrochen. Die Körpermasse von den Membranen geernteter Weibchen betrug 110 ± 60 mg ($n = 11$; *in vivo*: 236 mg). Von einigen wurden Eier abgelegt, Angaben über deren Eimasse und zu den Larvenschlupfraten muß ich dem Leser leider schuldig bleiben, da das entsprechende Datenblatt nach dem Umzug in ein anderes Labor auch nach eifrigem Suchen nie wieder auftauchte. Beide Fütterungsgläser waren bis zum Versuchsende frei von Pilz.

3.2.4. In vitro Fütterung von *A. variegatum*

Nymphen. Das Gewicht ungesogener Nymphen lag nach Barré (1989) bei 0.85 ± 0.14 mg ($n = 42$). Nach deren Fütterung auf Ziegen fand er 55 % daraus schlüpfender Weibchen. Auf dem Rind erreichten vollgesogene Nymphen eine Körpermasse von 70 ± 11 mg ($n = 200$).

In vitro wurden zwei Fütterungsgläser mit insgesamt 180 ungesogenen Nymphen auf klebstoffimprägnierten Baudruche-Membranen (Typ B3) und der Stimulus-Kombination G (SPM1-A.v., Rinderhaarextrakt und Saline) angesetzt. Das Futterblut enthielt ca. 30 % mehr Erythrozyten als normal, die Bakterizide PS 100, das Fungizid NYS 100 sowie zusätzlich Glukose (2 g / l), ATP und GSH (10^{-3} mol / l). Es wurde einmal täglich ausgetauscht. Die meisten Nymphen beendeten ihr Blutmahl am d 8 (Spitzentag des Abfallens). Die Körpermasse aller 39 abgefallenen Nymphen lag bei 44 ± 13 mg. Alle *in vitro* vollgesogenen Nymphen häuteten sich zu adulten Zecken, jedoch mit einem Weibchen-Anteil von nur 13 %.

Adulte. Barré (1989) fand die Körpermasse ungesogener Männchen bei 16.1 ± 2.2 mg ($n = 31$), die der Weibchen bei 31.7 ± 3.5 mg ($n = 51$). Auf Ziegen verzeichnete er bei abgefallenen Weibchen eine Körpermasse von 3.86 ± 0.86 g ($n = 130$), einen Eier-Konversionsfaktor von 0.58 ± 0.04 und eine Larvenschlupfrate von $94 \% \pm 7 \%$ ($n = 11$). Auf Rindern wogen die Weibchen 2.05 ± 0.64 g ($n = 30$) (Centurier & Klima, 1979).

In vitro wurden drei Fütterungsgläsern mit der Wiener Silikon-Membran (Typ W1) und der Stimulus-Kombination H (SPM2-A.v., Rinderhaar-Extrakt, Saline) ausgestattet. Nachdem dort insgesamt 9 Männchen 5 - 6 Tage lang Blut gesaugt hatten und sexuell gereift waren, wurden 15 ungesogene Weibchen hinzugesetzt. Die Zubereitung des einmal pro Tag ausgetauschten Futterblutes entsprach derjenigen der Nymphen, enthielt jedoch sehr hoch dosiertes Nystatin (1000 IE / ml).

Das Abfallen der Weibchen von den Membranen begann an d 9, der Spitzentag war d 11. Am letzten Versuchstag waren fünf von zehn der am d 4 fixierten Weibchen noch fixiert und wurden nicht gewertet. Die Körpermasse der abgefallenen Weibchen betrug 1.8 ± 0.5 g. Von diesen legten 3 Weibchen Eier mit einem Eier-Konversionsfaktor von 0.20 ± 0.04 (ohne Tab.). Die Prä-Ovipositionsdauer wurde nicht gemessen. Die Larvenschlupfrate der 3 Weibchen belief sich auf 0%, 42 % und 85 %. In dieser Behandlung, d. h. bei dieser Art der Fütterung von *A. variegatum*, lag der Anteil an larvenproduzierenden Weibchen bei 20 % (3 - 56 %), die fertile Eierproduktion bei 42 mg pro Weibchen. Die beiden letzten Parameter beziehen sich auf die am d 4 fixierten Weibchen. Pilzmyzel wurde in diesem Experiment nicht entdeckt.

3.2.5. In vitro Fütterung von *A. hebraeum*

3.2.5.1. Larven

Auf dem Rind saugende Larven fielen von d 4 - d 6 n. l. vom Wirtstier ab und wogen 2.1 mg (vergleichbar auf 3 Rindern; Tab. 3-14).

Durchgeführt wurden die *in vitro* Versuche in Fütterungsgläsern auf dünnen, viskosegestützten Silikon-Membranen (Typ V1) und der Stimulus-Kombination I, bestehend aus Rinderhaaren und -Extrakt, SPM-A.h. und arteigenem Zeckenkot (Tab. 3-14). Ab d 6 n. l. war zu beobachten, daß Larven nach der *in vitro* Blutmahlzeit innen am Fütterungsglas nach oben krochen. Noch fixierte Exemplare wurden nicht gewertet. Die Körpermasse *in vitro* gefütterter, abgefallener Larven war mit 2.0 mg für natürliche und 2.4 mg für F_1 -*in vitro* Larven nicht statistisch verschieden von den 2.1 mg *in vivo*. *In vitro* Versuche mit täglich nur zweistatt dreimaligem Blutwechsel brachten ebenfalls gute Körpermassen (2.7 mg; 2.2 - 3.3 mg; 3 Gruppen mit je 41 - 70 Larven). Es handelte sich jedoch in dem Fall um Larven von Eltern aus verschiedenen *in vitro* Behandlungen (ohne Tab.). Die Häutungsrate *in vivo* gesogener Larven zum nächsten

Tab. 3-14 - Entwicklung von *A. hebraeum* Larven *in vivo* und *in vitro* - Gezeigt sind Spitzentag des Abfallens (Modawert und Bereich), mittlere Körpermasse mit 95 %-Vertrauensbereich, Häutungsrate mit dem 95 %-Vertrauensintervall des Verhältnisses 'vollgesogen abgefallene Larven / zu Nymphen gehäutete Larven', sowie die Anzahl abgefallener Larven (*n*), Gruppen (je 50 Larven) oder Versuchseinheiten (VE). Blutwechsel *in vitro*: 3 x täglich. Ergebnisse innerhalb einer Spalte, gefolgt von unterschiedlichen Buchstaben, waren signifikant verschieden ($P < 0.05$; Mann-Whitney U-Test). Abkürzung: n.g. nicht gemessen. d Tag nach Infestierung.

Parameter \ Behandlung	Larven			
	Spitzentag des Abfallens	Bereich des Abfallens	Körpermasse abgefallener Larven (mg)	% Häutungsrate (zur Nymphe)
natürliche Larven <i>in vivo</i>	d 5 (> 10,000)	d 4 - d 6	2.1 a (2.0 - 2.2) (13 Gruppen)	72 (1 VE)
natürliche Larven <i>in vitro</i>	n.g.	d 6 - d 10 †	2.0 a (1.9 - 2.1) (6 Gruppen)	85 b (80 - 89) (6 VE)
F_1 - <i>in vitro</i> Larven <i>in vitro</i>	n.g.	d 6 - d 10 †	2.4 ‡ (2.1 - 2.7) § (3 Gruppen)	84 ab (79 - 88) (5 VE)

‡ Gewogener Mittelwert (Weber, 1980); § Gruppengröße unterschiedlich (12 - 50 Larven); † am letzten Versuchstag (d 10) noch Larven auf der Membran fixiert (Anzahl nicht bestimmt).

ven zum nächsten

Entwicklungsstadium lag bei 72 % (1 Rind); die *in vitro* Raten waren für natürliche (85 %) und F₁-*in vitro* Larven (84 %) gleich (Tab. 3-14).

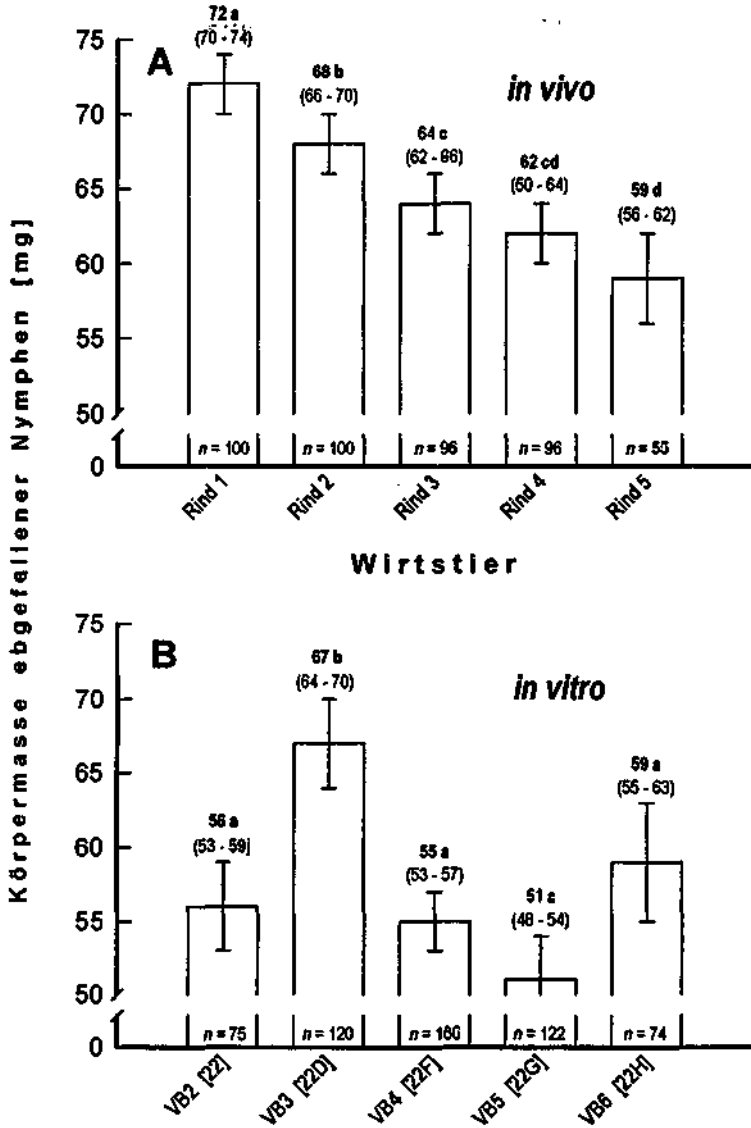
3.2.5.2. Nymphen

Ungesogene, natürliche *A. hebraeum* Nymphen (8 Monate alt) wogen 0.7 mg (0.6- 0.8 mg; 10 Gruppen mit je 10 Nymphen). Vom Wirt fielen die Nymphen von d 4 - d 7 vollgesogen mit einer mittleren Körpermasse, je nach Rind und Zeckencharge, von 59 - 72 mg ab (gesamt: 66 mg). Dabei waren die Ergebnisse z. T. signifikant unterschiedlich und zeigten im Laufe des Jahres eine abnehmende Tendenz (Abb. 3-3A). Die Häutungsrate zum adulten Stadium betrug 98 % und der Anteil an weiblichen Zecken (auf zwei verschiedenen Rindern) 53 % bzw. 61 %. Norval (1974) fand 60 % der Zecken weiblichen Geschlechts.

3.2.5.2.1. *In vitro* Standard-Behandlung

In vitro wurde in allen Fütterungsgläsern die viskosegestützte Silikon-Membran (Typ V2) verwendet. Versuchsblock 1 erhielt die Stimul-Kombination K (Kaninchenhaare und pheromon-impregnierte Gummikappe), alle weiteren Versuchsblöcke (VB 2 - 6) die Kombination J (Kaninchenhaare und SPM-A.h.).

Nachdem sich in Vorversuchen das Bakterizid GEN 5 und das Fungizid NYS 100 als geeignet erwiesen hatten, wurden diese als Behandlung [22] standardmäßig in jedem der VB 2 - 6 eingesetzt. Diese *in vitro* Standard-Behandlung [22] erhielt in jedem VB eine andere Zeckencharge und anderes Rinderblut. *In vitro* waren, wie schon auf individuellen Rindern, z. T. signifikante Abweichungen in den Resultaten zwischen den VB zu finden. Die mittlere Körpermasse der Nymphen in der *in vitro* Standard-Behandlung lag zwischen 51 mg und 67 mg (gesamt: 57 mg) (Abb. 3-3B). Der relative Variationskoeffizient V_R , d. h. der prozentuale Anteil der Standardabweichung am jeweiligen Mittelwert (einer Behandlung oder Infestierung) lag *in vitro* bei 25.2 %, *in vivo* bei 17.8 %. Die Variabilität der Einzelwerte einer *in vitro* Behandlung war signifikant höher als *in vivo* ($P < 0.05$; Mann-Whitney *U*-Test).



in vitro Versuchsblock und Behandlung

Abb. 3-3 A/B – Körpermasse vollgesogener *A. hebraeum* Nymphen nach Abfallen vom Rind (A) bzw. von der Membran (B) – Darstellung: Mittelwert mit 95 %-Vertrauensintervall des Mittelwertes; Anzahl Nymphen n. Ergebnisse ohne gemeinsamen Buchstaben innerhalb einer Teilabbildung waren signifikant verschieden ($P < 0.05$; Mann-Whitney U-Test). In vivo und in vitro Werte sind in der Reihenfolge der Versuche gezeigt (Zeitraum ca. 1 Jahr). Jedes Rind bzw. jeder Versuchsblock (VB) hatte eine andere Zekkencharge. Der negative Teil des Vertrauensbereiche-Balken [22G] ist aus technischen Gründen gekürzt.

3.2.5.2.2. Verschiedene *in vitro* Behandlungen

Die Abbildung 3-4 A - F zeigt zusammenfassend und über die Grenzen der einzelnen Versuchsblöcke hinweg den Einfluß verschiedener *in vitro* Behandlungen auf die Körpermasse von *A. hebraeum* Nymphen. Dazu wurde die Körpermasse der "Kontrolle" oder Standard-Behandlung des jeweiligen Versuchsblocks auf 100 % normalisiert und die Werte der zu vergleichenden Behandlung(en) darauf bezogen. Die absoluten Körpermassen, die Anzahl Nymphen pro Behandlung sowie weitere Parameter befinden sich in den nach Versuchsblöcken geordneten Tab. 12-3 bis 12-6 im Anhang.

- (A) Die Körpermasse abgefallener Nymphen zeigte sich praktisch unbeeinflusst von der Konzentration des Bakterizids GEN (5 µg bzw. 50 µg / ml). Wurde stattdessen PS 100 verwendet, war sie (mit NYS als Fungizid) leicht, aber signifikant gegenüber GEN 5 verringert (-5 %).
- (B) Permanentes Schütteln führte bei UV-C-bestrahlten Versuchseinheiten (Membran-Unterseite; 5 min täglich) zu einer signifikant niedrigeren Körpermasse (-6 %) gegenüber Fütterungsgläsern in Ruhe. Solch ein Effekt war nur tendenziell vorhanden, wenn NYS 100 zur Pilzkontrolle gewählt wurde.
- (C) zeigt den signifikant negativen Einfluß der täglichen UV-C-Bestrahlung der Membran-Unterseite auf die Körpermasse der Nymphen (-20 %). Dies war der Fall in zwei Versuchsblöcken (VB1 / VB2), wobei in VB2 die Bestrahlung zusätzlich zur Gabe von NYS 100 erfolgte.
- (D) Die Reduzierung der Blutwechsel von pro Tag drei auf zwei führte bei Nymphen zu einer Körpermasse-Zunahme von signifikanten +12 %.
- (E) Bei -18°C eine Woche gelagertes, wieder aufgetautes und dadurch hämolysiertes Blut schnitt signifikant schlechter ab (Körpermasse Nymphen -18 %) als frisches, bei +4°C gekühlt aufbewahrtes Blut. Das Aufstellen der Fütterungsgläser in einem Brutschrank (36°C; ca. 20 % rF) anstatt in einem Wasserbad sowie der Einsatz von mit Na-Heparin versetztem Vollblut anstelle von manuell defibriniertem Blut brachten einen signifikanten Zuwachs in der erreichten Körpermasse (+12 % bzw. +14 %). Bei dem Versuch im Brutschrank in niedriger Feuchte fiel die größte Zahl Zecken jedoch erst am letz-

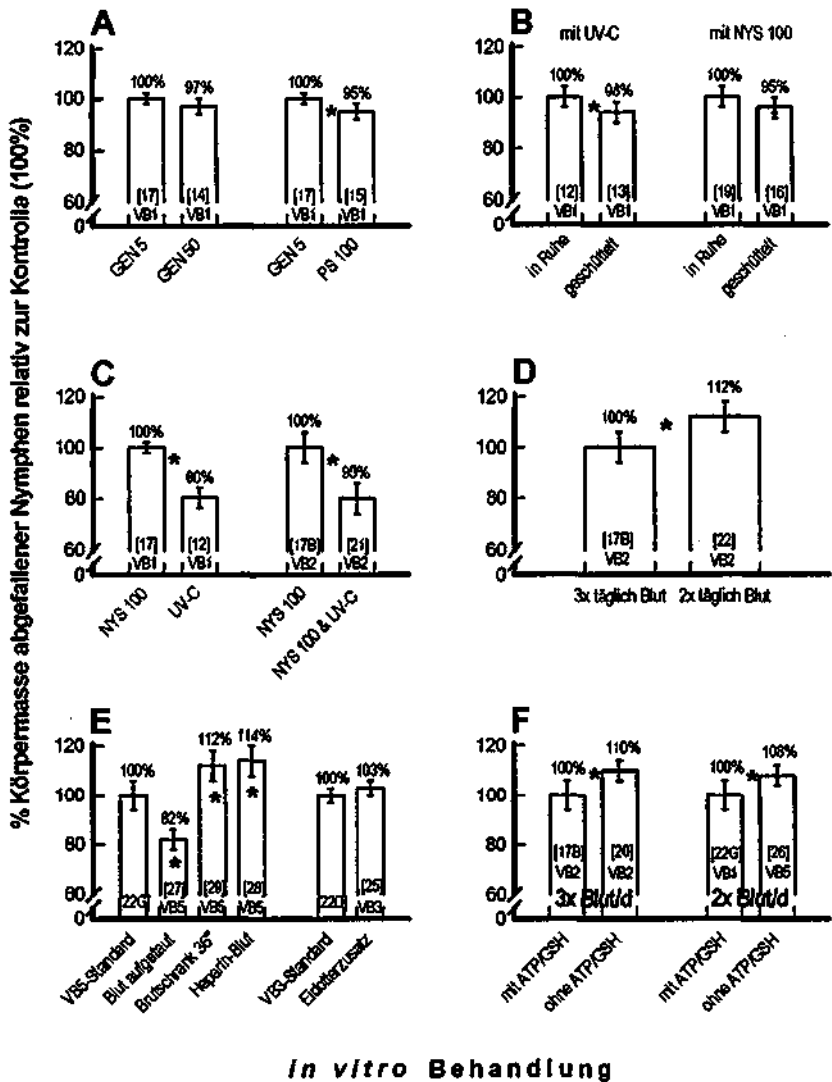
ten Versuchstag (d 10) ab und fast genauso viele (47) blieben fixiert. Die in VB3 Blut zugesetzten 10 vol% Hühnereidotter hatten keine Wirkung. Das Futterblut war in diesem Falle beim Austausch durchweg dunkler als die Kontrolle und roch leicht süßlich, jedoch nicht verdorben.

- (F) Einen unerwarteten, doch signifikanten Zuwachs erfuhr die Körpermasse der Nymphen durch den Verzicht auf zusätzliches ATP/Glutathion 10^{-3} mol / l, sowohl bei täglich dreimaligem (VB2; +10 %) als auch zweimaligem Wechsel des Blutes (VB5; +8 %).

Der positive Effekt einer verringerten Blutwechselfrequenz (2 statt 3x / d) auf die Körpermasse wurde bereits in der anfangs vorgestellten Standard-Behandlung [22] genutzt. Andere Verbesserungen, wie die Verwendung heparinisierten Blutes oder der Verzicht auf zusätzliches ATP / GSH, stellten sich erst am Ende des praktischen Teils heraus. Sie konnten daher nicht mehr im "Standard" berücksichtigt werden.

Im VB4 (ohne Tab.) wurden die Fütterungsgläser ein weiteres Mal nicht in einem Wasserbad, sondern in einem Brutschrank gleichmäßig auf 36°C gehalten, diesmal jedoch in sehr hoher Feuchte (ca. 95 % rF) [30]. Ab d 6 nach Infestierung kam es hier zu massivem Pilzwachstum über und unter der Membran, ausgelöst durch Kondenswasser. Dieses Wasser entstand vermutlich nach jedem (bei Raumtemperatur stattfindenden) Blutwechsel nach Zurückstellen der leicht abgekühlten Gläser in den feuchtwarmen Brutschrank. Es lief an der Innenseite des Glasrohr-einsatzes herab auf die Membran, die Zecken und deren Kot. Der Spitzentag des Abfallens war hier am d 8 und somit signifikant später als in der Standard-Behandlung [22F] (d 6). Die Körpermasse lag bei 48 mg (45 - 51 mg; n = 50) gegenüber 55 mg (53 - 57 mg; n = 180) in [22F]. Da von Behandlung [30] keine Einzeldaten vorlagen, konnte kein Mann-Whitney U-Test angewandt werden.

In der Behandlung [32] im VB6 (ohne Tab.) war dem Futterblut 0.1 vol% des geläufigen Vehikels DMSO (Dimethylsulfoxid) für systemische Akarizide zugesetzt worden. Der Spitzentag des Abfallens (d 7) und eine Körpermasse von 56 mg (53 - 59 mg; n = 105) waren praktisch identisch mit den Werten für die Standard-Behandlung [22H] dieses VB (59 mg).



in vitro Behandlung

Abb. 3-4 A-F - % Körpermasse *in vitro* vollgezogener *A. hebraeum* Nymphen bezogen auf *in vitro* Kontrolle (100 %) - Darstellung: Mittelwert mit 95 %-Vertrauensbereich des Mittelwertes, Signifikanzstern ($P < 0.05$; Mann-Whitney U-Test); Nummer der Behandlung [...] und des Versuchsblocks (VB...). Absolutwerte und Anzahl Nymphen pro Behandlung (n) finden sich im Anhang in Tab. 12-3 - 12-6. Abkürzungen: GEN 5 bzw. 50 Gentamicin 5 bzw. 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$; PS 100 Penicillin 100 IE/ ml und Streptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$; UV-C täglich 5 min Bestrahlung der Membran-Unterseite aus 7 cm Abstand; ATP Adenosin-triphosphat; GSH reduziertes Glutathion. Die Signifikanzsterne in Teil E beziehen sich jeweils auf VB5-Standard.

Wie die Abb. 3-5 zeigt, beeinflusste eine variierte Besatzdichte im Rahmen von etwa 20 - 120 Nymphen pro Fütterungsglas deren Körpermasse nach dem Blutmahl nicht sichtbar.

Die Abb. 3-6 A zeigt beispielhaft die absolute Häufigkeitsverteilung der Körpermasse *in vitro* gesogener Nymphen anhand der vergleichbaren Behandlungen [14] und [17]. Die Kurve entspricht der theoretischen Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov 'Goodness of fit'-Test; $P < 0.05$) (Sokal & Rohlf, 1981). Trennt man die Körpermasse der zu Männchen häutenden von der zu Weibchen häutenden Nymphen, so sind beide Kurven grafisch gut unterscheidbar, überschneiden sich aber im Bereich 40 - 80 mg (Abb. 3-6 B). Die mittlere Körpermasse der "männlichen" Nymphen lag bei 58 mg (56 - 60 mg) und unterschied sich signifikant von den 72 mg der "weiblichen" Nymphen (70 - 72 mg). Der Spitzentag des Abfallens war für beide Geschlechter identisch (d 9).

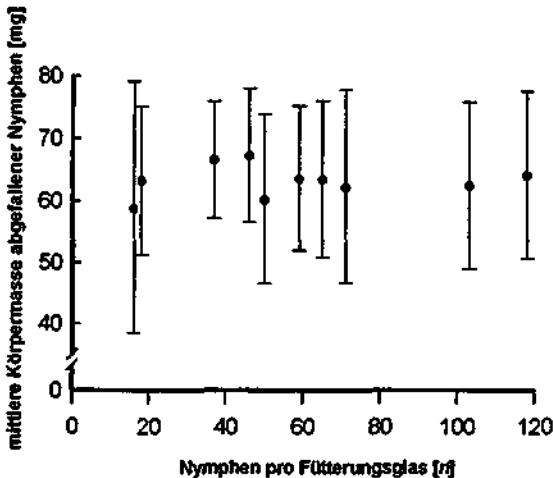


Abb. 3-5 - *In vitro* Körpermasse vollgesogener *A. hebraeum* Nymphen: Einfluß der Besatzdichte - Dargestellt ist jeweils der Mittelwert (\pm Standardabweichung) aus Nymphen eines Fütterungsglases. Die Abbildung umfaßt insgesamt 10 Fütterungsgläser der Behandlungen [14] mit Gentamicin 50 μg / ml und [15] mit Penicillin 100 IE / ml und Streptomycin 100 μg / ml. Die Ergebnisse beider Behandlungen zeigten keinen signifikanten Unterschied und konnten daher gemeinsam herangezogen werden ($P < 0.05$; Mann-Whitney U-Test).

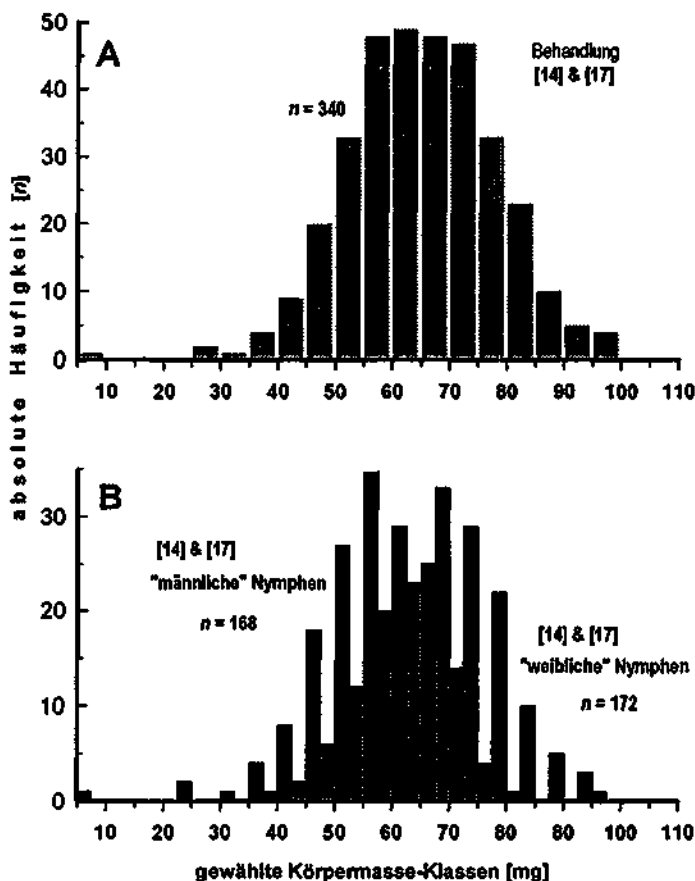


Abb. 3-6 A/B - Typische Häufigkeitsverteilung der Körpermasse *in vitro* vollgesezogener abgefallener *A. hebraeum* Nymphen - Als Datenbasis dienen die nicht signifikant unterschiedlichen Ergebnisse der Behandlungen [14] & [17] der VB1 ($P < 0.05$; Mann-Whitney U-Test). A) Verteilung der Körpermasse aller Nymphen. B) Die Werte der Nymphen, die später zu Männchen bzw. Weibchen häuteten, sind getrennt dargestellt.

3.2.5.2.3. Natürliche und künstliche Nymphen *in vitro*

Die Tab. 3-15 stellt vier Entwicklungsparameter von *A. hebraeum* Nymphen verschiedener Herkunft zusammen: 1) natürliche Nymphen auf Rindern gefüttert; 2) natürliche Nymphen *in vitro* gefüttert; 3) F_1 -*in vitro* Nymphen *in vitro* gefüttert. Insgesamt blieb die Körpermasse natürlicher, *in vitro* vollgesezogener *A. hebraeum* Nymphen mit 57 mg um 13 % si-

gnifikant unter derjenigen von auf Rind 1 - 5 gefütterten Nymphen (66 mg). Dazwischen lagen, signifikant abgesetzt von den beiden anderen Gruppen, die F_1 -in vitro Nymphen mit 63 mg. Während der Spitzentag des Abfallens von Gruppe 1 (d 5) über Gruppe 2 (d 7) sich hin zur Gruppe 3 bis auf d 8 verschob, war der Häutungserfolg von der Nympe zur adulten Zecke in allen Gruppen mit 96 - 98 % gleich hoch.

Tab. 3-15 - Entwicklung natürlicher und künstlicher *A. hebraeum* Nymphen in vitro - Gezeigt sind der Tag des Abfallens (Modalwert und Bereich), die mittlere Körpermasse mit 95 %-Vertrauensbereich, deren Häutungsrate zu Adulten mit dem 65 %-Vertrauensintervall des Verhältnisses 'vollgesogen abgefallene Nymphen / gehäutete Nymphen', sowie die Anzahl abgefallener Nymphen (n) und Versuchseinheiten (VE). Die Behandlungsnummern (in eckigen Klammern) entsprechen denjenigen der Übersicht in Tab. 2-8. Standard-Behandlung [22] aus Versuchsblock 2 - 6; Behandlung [22E] aus Versuchsblock 3, Blutwechsel in vitro: 2x täglich. Ergebnisse innerhalb einer Spalte, gefolgt von unterschiedlichen Buchstaben, waren signifikant verschieden ($P < 0.05$; Mann-Whitney U-Test). Abkürzung: d Tag nach Infestierung.

Nymphen				
Parameter / Behandlung	Spitzentag des Abfallens	Bereich des Abfallens	Körpermasse abgefallener Nymphen [mg]	% Häutungs- rate (zu Adulten)
natürliche Nymphen in vivo	d 5 (> 10,000)	d 4 - d 7	66 a (65 - 67) (442)	98 (96 - 100) (2 Rinder)
natürliche Nymphen in vitro [22]	d 7 a (571)	d 5 - d 10 †	57 b (55 - 58) (571)	98 a (92 - 98) (12 VE)
F_1 -in vitro Nymphen in vitro [22E]	d 8 b (214)	d 5 - d 10 §	63 c (61 - 65) (205)	98 a (95 - 99) (5 VE)

† Nicht alle der noch am letzten Versuchstag (d 10) fixierten Nymphen gezählt.
§ Noch 9 Nymphen am d 10 fixiert.

3.2.5.3. Adulte

Ungesogene Männchen von *A. hebraeum* wogen 25.5 ± 4.4 mg, Weibchen 27.8 ± 6.0 mg (jeweils $n = 20$). Die Männchen erreichten nach 1 Woche Vorfütterung auf dem Kaninchen 35.6 ± 7.2 mg ($n = 32$) (ohne Tab.). Die Körpermasse vollgesogener natürlicher Zeckenweibchen über insgesamt 5 Kontrollinfestierungen auf Rindern betrug 2.56 g (95 %-Vertrauensbereich: 2.44 - 2.68 g; $n = 106$). Die Infestierungen, die jeweils mit einer anderen Zeckencharge durchgeführt wurden, ergaben auf verschiedenen Rindern mittlere Zeckengewichte von 1.7 - 3.3 g (Abb. 3-7). Der Eier-Konversionsfaktor, gemessen bei Weibchen auf Rind D, lag bei 0.57 (0.55 - 0.58), die Larvenschlupfrate bei 87 % (78 - 96 %) (beide: $n = 29$; ohne Abb.). Von den 30, zu 34 vorgefütterten Männchen hinzugesetzten Weibchen waren an d 4 n. l. alle fixiert und fielen bis d 14 ab. Alle wogen über 200 mg. Von diesen produzierten 29 Weibchen vitale Larven (= 97 %).

Die erwähnte 200 mg-Grenze entsprach etwa dem 7fachen der Körpermasse ungesogener und ca. 8 % der von vollgesogenen Weibchen. Ab diesem Wert blieb der Eier-Konversionsfaktor unabhängig von der aufgenommenen Blutmenge des jeweiligen Weibchens stabil (Norval, 1974). Um diese Zahl bewegt sich auch die zur Eiablage nötige Mindestkörpermasse (Balashov, 1972; Diehl *et al.*, 1982).

3.2.5.3.1. *In vitro* Behandlungen

Versuchsblock I (ohne Abb.). Hier wurden die vorgefütterten Männchen auf ihren Membranen belassen und die hungrigen Weibchen hinzugesetzt. Der Blutwechsel fand 1× täglich statt. In Behandlung [1] befand sich kein Fungizid im Futterblut. Stattdessen wurde die Unterseite der Membranen täglich für 10 min in ein hochkonzentriertes Gemisch aus dem bakteriziden GEN (5000 µg/ml) und dem fungiziden ENI (1000 µg/ml) getaucht.

Keine der Behandlungen [1; 2; 3] des VB I führte zur Entwicklung von Weibchen mit durchschnittlich mehr als 120 mg Körpermasse. Zudem hatte sich keine dieser Zecken bis zum Ende der Versuche (d 14) selbständig von der Membran gelöst. Sie alle waren unnormaler, meist kugeligere Gestalt. Zur Eiablage kam es nicht. Etwa zwei Drittel aller, an d 4 fixierten Weibchen erreichten dieses Stadium, die anderen starben noch auf den Membranen.

Dieser VB zeigte, das ein täglich einmaliger Blutwechsel bei gleichzeitig auftretendem Pilzmyzel für eine befriedigende Blutaufnahme und Weiterentwicklung der adulten Zecken völlig unzureichend war.

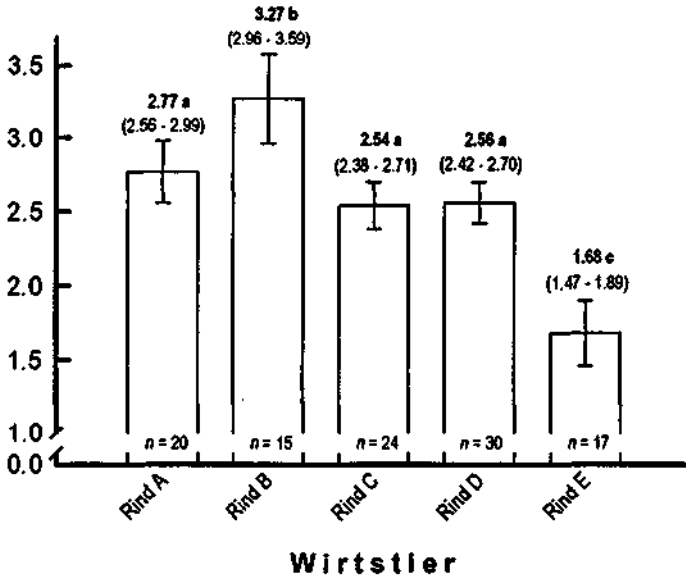


Abb. 3-7 – Körpermasse vollgesogener Weibchen von *A. hebraeum* auf Rindern – Darstellung: Mittelwert [g] mit 95 %-Vertrauensbereich des Mittelwertes; Anzahl Weibchen (n); Auflistung in der Reihenfolge der Durchführung. Für jedes Rind wurde eine andere Zeckencharge verwendet. Ergebnisse, gefolgt von verschiedenen Buchstaben, waren signifikant unterschiedlich ($P < 0,05$; Mann-Whitney U-Test).

Versuchsblock II. (Tab. 12-7 im Anhang). In diesem und allen folgenden VB wurden die Männchen nach der Vorfütterung (*in vivo* oder *in vitro*) abgesammelt und auf frischen Membranen mit ihren Partnerinnen zusammengebracht. Der Blutwechsel fand hier 3× täglich statt. Bei Zeckenpaaren mit *in vitro* vorgefütterten Männchen war der Spitzentag des Abfallens der Weibchen trotz verschiedener Mikrobizid-Kombinationen gleich. In Paaren mit *in vivo* statt *in vitro* vorgefütterten Männchen tendierten die Weibchen zu höheren Körpermassen. Signifikant wurde diese Beobachtung dort, wo das Futterblut GEN 5 / NYS 10 anstelle von PS 100 / ITR 0.1 enthielt. Die in Behandlung [7] und [8] gemessenen Mit-

telwerte von 1.78 g bzw. 1.95 g waren die höchsten aller *in vitro* Behandlungen.

Den schlechtesten Eier-Konversionsfaktor, d. h. das Verhältnis der gelegten Eimasse zur Körpermasse, hatten mit 0.27 die Weibchen der Behandlung [6], in der die *in vitro* gefütterten Männchen und Weibchen PS 100 und ITR 0.1 mit dem Futterblut aufnahmen.

Die Larvenschlupfrate zeigte sich von den verschiedenen Mikrobizid-Kombinationen und der Art der Männchen-Vorfütterung statistisch unbeeindruckt und pendelte im Mittel zwischen 25 % und 43 %. Dasselbe galt für den Anteil larvenproduzierender Weibchen sowie deren fertile Eier-Produktion. In diesem VB erwies sich NYS als Fungizid wirksamer als ITR.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Weibchen *in vitro* höhere Körpermassen erreichten, wenn deren männliche Partner *in vivo* vorgefüttert wurden. Ferner schien die Mikrobizid-Kombination GEN 5 mit NYS 10 besser von den Zecken toleriert zu werden als PS 100 mit ITR 0.1.

Versuchsblock III (Tab. 12-8 im Anhang) Die Behandlungen [10] und [11], in denen keine Mikrobizide kontinuierlich verabreicht wurden, waren außergewöhnlich schwer bakteriell kontaminiert. Ebenso stark kontaminiert, jedoch mit Pilzmyzel, waren die Behandlungen [7B] und [9] mit GEN 5 und NYS 10. Der Grund schien verunreinigte Laborluft zu sein. Kein einziges Weibchen der vier Behandlungen legte Eier ab und es kam überhaupt nur in der geschüttelten Behandlung [9] zu einer nennenswerten Zahl überlebender Weibchen ($n = 19$). Hier fielen fast 30 % der an d 4 nach Infestierung fixierten Weibchen bis zum Versuchsende von den Membranen ab – bei einer mittleren Körpermasse von 0.93 g (0.72 - 1.16 g; $n = 19$) (ohne Tab.). In den ungeschüttelten Behandlungen [7B; 10; 11] dieses Versuchsblocks fielen nur 2 % der an d 4 fixierten Weibchen selbständig von der Membran ab. Alle anderen wogen unter 200 mg, waren bereits tot an d 14 oder starben wenig später.

Dieser VB zeigte, daß saubere Umgebungsluft zur Vermeidung massiver, unkontrollierbarer Kontaminationen und damit für eine befriedigende Entwicklung der Zecken, selbst bei täglich dreimaligem Blutwechsel, unverzichtbar waren. Schütteln der Fütterungsgläser beeinflusste positiv die Körpermasse sowie die Überlebens- und Abfallrate der Weibchen.

Versuchsblock IV (Tab. 12-9 im Anhang). Nach den unvorhersehbaren Kontaminationsproblemen in VB III wurde die Luftbewegung am Arbeitsplatz drastisch reduziert. Als Folge zeigten die beiden geschüttelten und mit auf Kaninchen vorgefütterten Männchen versehenen Behandlungen [12B] und [18] eine nur mäßige Pilzentwicklung.

Ob NYS 100 im Futterblut [18] war oder mit UV-C bestrahlt wurde [12B] -- die Entwicklungsparameter für die Weibchen beider Behandlungen waren gleich (Körpermasse 1.3 - 1.4 g; Eier-Konversionsfaktor 0.34). Durch das kontinuierliche Schütteln der Fütterungsgläser erreichte ein mit $\geq 80\%$ ungewöhnlich hoher Anteil der an d 4 fixierten Weibchen eine Körpermasse > 200 mg.

Versuchsblock V (Tab. 12-10 im Anhang). In diesem VB mit ungeschüttelten Fütterungsgläsern und GEN 5 und NYS 100 wurden Pilzmyzelien frühestens ab d 8 oder gar nicht [17F] entdeckt.

Interessanterweise führte die probeweise Reduzierung der Blutwechselfrequenz von $3\times$ [17G] auf $2\times$ täglich [22C] bei keinem der Entwicklungsparameter der Weibchen zu signifikanten Verschlechterungen, auch nicht bei der Körpermasse.

Bei der *in vitro* Fütterung künstlicher, d. h. als Nymphe bereits *in vitro* gefütterter Männchen und Weibchen [17F] fiel gegenüber natürlichen Zecken *in vitro* [17G] vor allem der signifikant geringere Anteil an larvenproduzierenden Weibchen (10 % gegenüber 46 %) und die deutlich niedrigere fertile Eier-Produktion pro Weibchen auf (15 mg vs. 109 mg).

3.2.5.3.2. Natürliche und künstliche Weibchen *in vitro*

Die Tab. 3-16 vergleicht detailliert die z. T. schon oben erwähnten *in vitro* Behandlungen [17G] und [17F] mit Kontrollzecken auf dem Rind. Von den natürlichen Weibchen fielen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* die meisten an d 9 n. l. ab. Signifikant späteres Abfallen war jedoch bei künstlichen, *in vitro* gefütterten Weibchen zu verzeichnen (d 14 n. l.). Während die Körpermasse *in vitro* gesogener Weibchen verschiedenen Ursprungs ähnlich war (natürlich: 0.98 g / künstlich: 1.23 g) lag sie auf dem Rind mit im Durchschnitt 2.56 g signifikant höher. Die Prä-Oviposition dauerte *in vivo* 8 d, verdoppelte sich *in vitro* auf 15 d, um sich noch einmal signifikant bei künstlichen Weibchen *in vitro* auf 19 d zu verlängern. Der Eier-Konversionsfaktor, gemessen an 29 Weibchen einer Rind-Infestierung, war mit 0.57 signifikant besser als die 0.27 (natürliche

Zecken) bzw. 0.24 (künstliche Zecken) der *in vitro* Versuche. Die Larvenschlupfrate fiel von 87 % *in vivo* auf 69 % *in vitro* mit natürlichen und auf 39 % mit künstlichen Zecken. Während auf dem Rind nahezu alle der an d 4 fixierten Weibchen Larven produzierten (97 %), waren es *in vitro* nur etwa die Hälfte und von künstlichen Weibchen nur ein Zehntel. Die fertile Eier-Produktion je Weibchen, bezogen auf alle an d 4 fixierten, fiel um den Faktor 10 von 1.2 g *in vivo* auf 109 mg *in vitro* und nochmals um dieselbe Größenordnung auf 15 mg bei künstlichen Weibchen *in vitro*.

Wird von allen, zum Versuchsbeginn auf den Wirt bzw. auf die Membran gebrachten Weibchen ausgegangen, bezieht man also die Fixierungsrate in die Beurteilung der Fortpflanzungsfähigkeit mit ein, so ergab sich folgendes Bild: Auf dem Rinderschwanz produzierten 97 % der Weibchen vitale Larven, *in vitro* waren es bei natürlichen Weibchen 33 %, bei künstlichen nur noch 7 %.

3.2.5.3.3. Zirkadiane Rhythmik des Abfallens der Weibchen *in vitro*

Es wurden kurz vor jedem neuen Blutwechsel (3× täglich) die seit dem letzten Bluttausch abgefallenen Weibchen aus jedem Fütterungsglas entfernt und die Uhrzeit notiert. Die Abb. 3-8A zeigt für jedes einzeln nummerierte Weibchen (hier typischerweise die Behandlung [7]) in Form einer waagerechten Linie den Zeitraum zwischen zwei Kontrollen, im Verlaufe dessen sich die entsprechende Zecke demnach selbständig von der Membran gelöst hatte. Die Teilabbildung B stellt die relative Häufigkeit dar, mit der abgefallene Weibchen angetroffen wurden. Zwischen 11 Uhr vormittags und 17 Uhr (MEZ) nachmittags, d. h. in der Hellphase, waren nie abgefallene Weibchen zu verzeichnen, dafür aber gehäuft in der zweiten Nachthälfte bzw. den Morgenstunden.

3.2.5.3.4. Einflüsse auf die Entwicklung der Weibchen *in vitro*

Die Anzahl gleichzeitig in einem Fütterungsglas sich vollsaugender Weibchen und deren Reproduktionsfähigkeit waren nicht negativ korreliert (ohne Tab.). Ferner bestand beispielsweise zwischen der Körpermasse von einzeln (1.3 ± 0.5 g, $n = 13$) oder in Gruppen zu fünf sich vollsaugenden Weibchen (1.4 ± 0.3 g; $n = 5$) kein signifikanter Unterschied ($P < 0.05$; Mann-Whitney *U*-Test; Behandlung [18])

In vitro nahm die von saugenden Weibchen erreichte Körpermasse ab, je länger die Zecken für ihr Blutmahl benötigten. In 7 von 11 gemessenen Behandlungen war dieser Einfluß signifikant (Tab. 12-11 im

Tab. 3-18 — Entwicklung natürlicher und künstlicher A. hebraeum Weibchen *in vitro* — Die Zeckenweibchen wurden mit Männchen zusammengebracht, die zuvor 3 Tage auf dem Rind (erste Reihe) oder 5-7 Tage *in vitro* (zweite und letzte Reihe) zur Erzeugung sexueller Reife vorgelüftet worden waren. Natürliche Zecken stammen von dem Rind vollgezeugten Nymphen ab. Künstliche Zecken hatten sich aus *in vitro* geblühten Nymphen gehäutet. Die Balanzierungsummern (in eckigen Klammern) entsprechen denjenigen der Übersicht in Tab. 2-9. Unter 'Parameter' finden sich die Ergebnisse des Modalkörpers ('Spitzenlag', Bereiche ('... des Abkälens') oder Mittelwerte mit Vertrauensintervall (95 %) oder mit Bereichsangabe ('Fertile Eierproduktion'). Eine schwarzkende Anzahl Weibchen (♀) in einer Reihe ergab sich aus den bei Berechnungen jedes Parameters zugrundegelegten und in Kapitel 2.11.2. erklärten Kriterien. Die % Larvenproduzierende Weibchen und die fertile Eierproduktion bezogen sich dementsprechend auf die Anzahl aller an d 4 findenden Weibchen. Ergebnisse innerhalb Spalten ohne einen gemeinsamen Buchstaben waren signifikant unterschiedlich ($P < 0.05$; Mann-Whitney U-Test). Abkürzung: d Tag nach Infestierung; VE Versuchseinheiten.

Parameter / Behandlung	Weibchen <i>in vitro</i> und <i>in vitro</i>									
	Spitzenlag des Abkälens	Bereich des Abkälens	Körpermasse Weibchen [g]	Prä-Ovip- ositions- dauer [d]	Eier- konversions- faktor	% Larven- schlüp- rate	% Larven- produzierende Weibchen	Fertile Eier- produktion (mg / Weibchen)		
natürliche Männchen und Weibchen <i>in vivo</i>	d 9 a (240) §	d 8 - d 14	2.56 e (2.44 - 2.66) (106) §	7.8 a (7.5 - 8.1) (29)	0.57 a (0.55 - 0.59) (29)	87 a (78 - 96) (29)	97 (83 - 100) (1 VE)	1229 e (0 - 1845) (30)		
natürliche Männchen und Weibchen <i>in vitro</i> (17C)	d 6 / 9 ad †	d 7 - d 14	0.98 b (0.79 - 1.18) (22)	15.4 b (13.9 - 16.6) (17)	0.27 b (0.22 - 0.32) (17)	89 b (58 - 80) (17)	46 a (30 - 63) (9 VE)	109 b (0 - 588) (37)		
künstliche Männchen und Weibchen <i>in vitro</i> (17F)	d 14 b ‡	d 8 - d 14 §	1.23 b (0.98 - 1.46) (4)	19.0 c (16.1 - 21.9) (7)	0.24 b (0.17 - 0.30) (4)	39 c (13 - 66) (7)	10 b (3 - 22) (10 VE)	15 c (0 - 202) (50)		

† Absolute Zahl abgestellener Weibchen war an beiden Tagen gleich.

‡ Nach Weibchen am letzten Versuchstag (d 14) fixiert.

§ Große Zahl an Weibchen noch am Versuchsende fixiert.

§ Zecken mehrerer Rind-Infestierungen zusammengefaßt.

Anhang). Kontrollen auf 4 Rindern zeigten, im Gegensatz zu *in vitro*, keinen solchen negativen Zusammenhang.

Tendenziell, jedoch nicht signifikant nahm die Fähigkeit der Weibchen zur Reproduktion ab, je mehr Tage ihres Saugaktes auf pilz-infiziertem Blut stattfanden (Tab. 12-12 im Anhang).

A

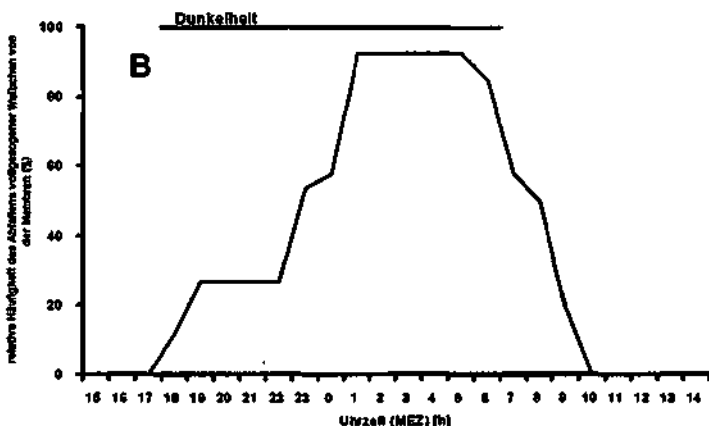
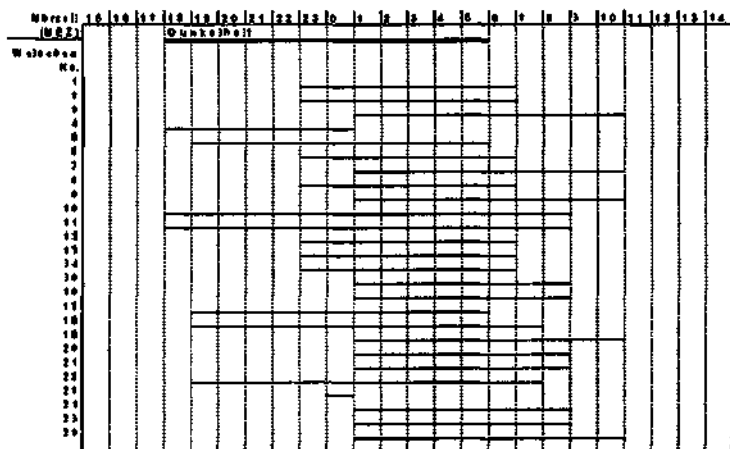


Abb. 3-8 A / B – Typischer Zeitraum des Abfallens von der Membran bei vollgezeugten *A. hebraeum* Weibchen – Dargestellt sind Werte der Behandlung [7]. A) Jede durchgezogene Linie zeigt den Zeitraum, innerhalb dessen das entsprechende Weibchen (Nr., erste Spalte) abgetallen auf der Membran angetroffen worden war. Ferner repräsentiert sie die vergangene Zeit zwischen zwei Blutwechseln. Das Abfallen der Weibchen dieser Behandlung geschah während 6 Tagen. B) Eine andere Form der Darstellung ist die relative Häufigkeit, mit der abgetallene Zecken in einem bestimmten Zeitraum (Periode zwischen zwei Blutwechseln) gefunden wurden.

3.2.5.3.5. Infestierung von Rindern mit künstlichen adulten

A. hebraeum

Es sollte die Frage beantwortet werden, wie sich künstliche adulte Zecken nach einem Blutmahl auf dem Rind entwickelten, d. h., ob die *in vitro* Aufzucht bei den Zeckenindividuen bleibende Veränderungen bewirkt hatte und deren Rückführung auf Rinder noch ohne Einschränkung möglich war. Geschaut wurde auch, ob dabei die Kombination der Geschlechter verschiedener Herkunft (natürlich / künstlich) eine Rolle spielte. Zur Klärung dienten vier, zeitlich parallel durchgeführte *in vivo* Infestierungen mit natürlichen und künstlichen Zecken. Auf Rind [II] und [III] waren die zusammengebrachten Männchen und Weibchen jeweils gleichen Ursprungs (natürlich bzw. künstlich). Die Rinder [III] und [IV] erhielten "gemischte" Paare. Ferner standen nach einer Reihe von *in vitro* Versuchen auch Adulte zur Verfügung, die bereits *in vitro* einen Generationswechsel durchgemacht hatten, sogenannte F_1 -*in vitro* Zecken. Mit ihnen wurde ein fünftes Rind [V] infestiert.

Bei der Beurteilung der Ergebnisse (Tab. 12-13 im Anhang) mußte die Variabilität berücksichtigt werden, die sich bereits zwischen verschiedenen Rindern ergab. Daher wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet. Der Spitzentag des Abfallens lag zwischen d 9 und d 11, die Prä-Oviposition dauerte 8 - 9 d. Die mittlere Körpermasse auf dem Rind vollgesogener Weibchen wurde durch deren Ursprung (natürlich, künstlich oder F_1 -*in vitro* Generation) oder den ihrer Partner kaum beeinflusst und betrug 2 - 2.6 g. Der Eier-Konversionsfaktor war ebenfalls recht gleichförmig mit Werten um 0.56 und die Larvenschlupfrate bewegte sich zwischen 70 % und 87 %. Der Anteil larvenproduzierender Weibchen (41 - 97 %) und die fertile Eier-Produktion (445 - 1229 mg / Weibchen) variierten stärker.

Die niedrigsten der beiden letzten Parameter stammten von Rind [IV], auf dem natürliche Männchen mit künstlichen Weibchen kombiniert waren. Hier begannen nur 11 von 22 Weibchen, obwohl alle > 200 mg, überhaupt Eier abzulegen. Die anderen starben einige Tage nach dem Abfallen. Die nach dem Blutmahl erreichte Körpermasse eierlegender, larvenproduzierender Weibchen unterschied sich mit 2.64 g (2.37 - 2.91; $n = 11$) nicht signifikant von der Weibchen ohne Eier- und Larvenproduktion (2.56 g; 2.26 - 2.86 g; $n = 11$; $P < 0.05$; Mann-Whitney U-Test) (ohne Tab.). Ob der Grund für dieses auffällige Ergebnis bei den Zecken oder beim Rind [IV] zu suchen ist, bleibt unklar.

Insgesamt betrachtet erlauben die Resultate den Schluß, daß sowohl künstliche Weibchen als auch solche der F_1 -*in vitro* Generation

nach Rückführung auf das Rind wieder naturnahe Saug- und Fortpflanzungsleistungen erbringen können.

3.2.5.4. Der Lebenszyklus *in vitro*

In den vorangegangenen Kapiteln über Fütterungsversuche wurden alle gemessenen biologischen Parameter gesogener natürlicher und künstlicher Zecken sowie die der F_1 -*in vitro* Generation ausführlich präsentiert. Im Laufe dieser Versuche wurde der Lebenszyklus von *A. hebraeum in vitro* geschlossen (Abb. 3-9). Begonnen worden war mit ungesogenen 'natürlichen' Adulten, die von auf Rindern gefütterten Nymphen stammten. Der Zyklus endete mit der Häutung ungesogener Adulter (F_1 -*in vitro* Generation) aus künstlich gesogenen Nymphen.



Abb. 3-9 – Die Vollendung des Lebenszyklus von *A. hebraeum in vitro* – Begonnen wurde mit ungesogenen, 'natürlichen' Adulten, die sich aus rindgefütterten Nymphen gehäutet hatten. Geschlossen wurde der Zyklus mit ungesogenen, künstlichen Adulten der F_1 -*in vitro* Generation, die aus membrangefütterten Nymphen hervorgegangen waren.

Die Abb. 3-10 zeigt auf einen Blick die Körpermasse von Larven, Nymphen und Weibchen der wichtigsten Behandlungen, immer bezogen auf die auf Rindern erreichte Körpermasse (100 %). *In vitro* gefütterte, 'natürliche' Weibchen kamen auf 38 % der Körpermasse ihrer rindgesogenen Kolleginnen. 'Künstliche' Weibchen lagen *in vitro* etwa auf gleicher Höhe. *In vitro* wurde die Blutnahlzeit indes nur etwa halb so effektiv in Ei-masse umgewandelt wie auf dem Rind, was mit zu einer geringeren Anzahl Eier pro Weibchen beitrug (ohne Abb.). Der Anteil der aus einem Eigelege schlüpfenden Larven sank von ca. 90 % *in vivo* auf unter 70 % *in vitro* bei natürlichen und unter 40 % bei künstlichen Weibchen. Nur 33 % aller auf Membranen gesetzten natürlichen Weibchen produzierten lebende Larven; von den künstlichen schafften dies gar nur 7 %. Im Gegensatz dazu sorgten bei den auf ein Rind aufgebrachten Weibchen 97 % für Nachkommen (ohne Abb.). Zusammengefasst brachte dies eine deutlich geringere Fortpflanzungsleistung bei *in vitro* gefütterten Weibchen.

Die *in vitro* Körpermassen von Larven und Nymphen reichten sehr nahe an die auf Rindern gemessenen Resultate heran. Deren Schlupf- bzw. Häutungsraten lagen gleichauf mit denen von Zecken *in vivo*. Brachte man 100 ungesogene, natürliche Nymphen auf eine Membran, so war nach durchlaufener, maximal 10 d dauernder Fütterung und anschließender Häutung mit ca. 83 ungesogenen adulten Zecken zu rechnen, davon etwa 50 Weibchen. Von 100 F₁-*in vitro* Nymphen erreichten bei künstlicher Fütterung 91 das adulte Stadium (47 Weibchen). *In vivo* kam man mit natürlichen Nymphen auf ca. 93, davon 53 weibliche, ungesogene Adulte, wobei diese Zahlen eventuell noch tiefer liegen können, da hier der Anteil nach Versuchsende noch auf dem Rind fixierter Nymphen nicht gemessen worden war und somit auch nicht in die Berechnung einfließen konnte.

Von natürlichen Larven ausgehend wurden *in vitro* etwa 26 %, bei F₁-*in vitro* Larven 25 - 75 % "Ausbeute" erreicht, d. h. ungesogene Nymphen erzeugt. Auf dem Rind waren es knapp 70 %. Die Larvenwerte beruhen auf z. T. groben visuellen Schätzungen und schließen die am Versuchsende noch fixierten Zecken mit ein.

Die aufeinanderfolgende künstliche Fütterung von Zeckenindividuen aller Entwicklungsstadien mündete in die Vollendung des Lebenszyklus von *A. hebraeum* *in vitro*. Während die Entwicklung von Larven und besonders der Nymphen naturnahe Werte erreichte, blieb bei künst-

lich ernährten Adulten die Ausbeute an Nachkommen deutlich hinter den Erwartungen zurück.

Körpermasse *in vivo*  und *in vitro*  gefütterter Zecken

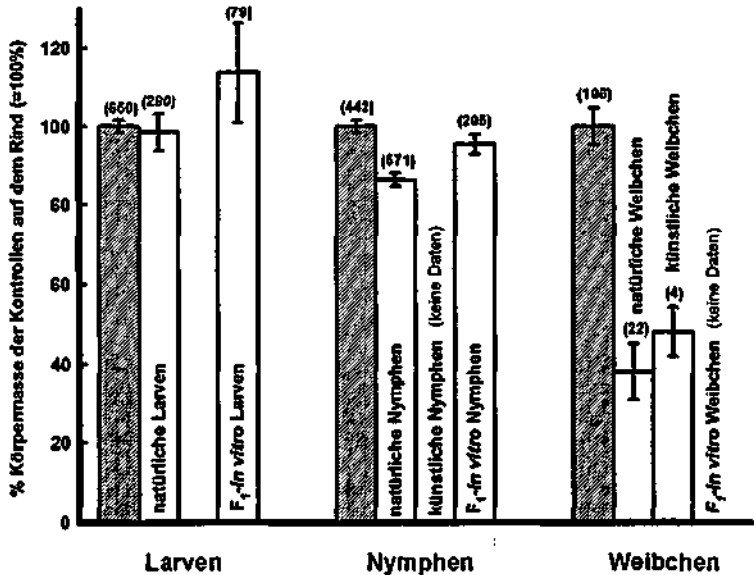


Abb. 3-10 - *In vitro* Körpermasse aller gesogenen Entwicklungsstadien von *A. hebraeum* relativ zu Werten auf dem Rind - *In vivo* Ergebnisse (100 %; schraffiert) stammten aus 3-5 nicht-parallel Infestierungen, 'natürliche' Nymphen *in vitro* aus 5 nicht-parallel Behandlungen. Bei den dargestellten F₁-*in vitro* Larven fand der Wechsel des Futterblutes 3x täglich statt. Nymphen der F₁-*in vitro* Generation stammten sowohl von diesen ehemaligen F₁-*in vitro* Larven ab, als auch zusätzlich von Larven, bei denen das Blut nur 2x pro Tag getauscht worden war. *In vitro* Weibchen saugten Blut desselben Rindes. Dargestellt sind Mittelwerte mit 95%-Vertrauensgrenzen und der Anzahl Zecken (n). Künstliche Larven sind direkt F₁-*in vitro* Larven. Die Vertrauensgrenzen für F₁-*in vitro* Larven stützten sich auf nur 3 Gruppen mit je 12-50 Larven. Weitere Details finden sich für Larven in Kapitel 3.2.5.1., Tab. 3-14; für Nymphen in Kapitel 3.2.5.2., Tab. 3-15; für Weibchen in Kapitel 3.2.5.3., Tab. 3-16.

3.3. Akarizid-Test *in vitro* mit *A. hebraeum* Nymphen

Zunehmende Resistenzbildung von veterinärmedizinisch bedeutsamen Schildzeckenarten gegenüber gebräuchlichen Akariziden und höhere Ansprüche an deren Umweltverträglichkeit und Preis zwingen, nach neuen Wegen in der Zeckenkontrolle zu suchen (Schröder, 1992). Dazu gehört u. a. die Entwicklung systemisch wirkender Verbindungen. Als Möglichkeit eines *in vitro* Tests solcher Substanzen bot sich die Membranfütterung von *A. hebraeum* Nymphen an. Diese war einfach und effizient durchführbar und bestach, wie schon in den vorigen Kapiteln geschildert, durch sehr gute, naturnahe Resultate. Als Akarizid-Standard diente Ivermectin® (IVM), das ursprünglich gegen Nematoden entwickelt worden war, aber auch Wirkung als GABA-Agonist im Nervensystem von Arthropoden zeigte.

Die Fixierungsrate der Nymphen auf der Membran wurde an d 4 n. I. bestimmt (ohne Tab.). Sie lag für die *in vitro* Kontrolle und das Placebo (0.1 vol% eines Vehikelmisches aus Glycerolformal und Propylenglykol) bei 94 % (95 %-Vertrauensbereich: 90 - 98 %) bzw. 95 % (90 - 98 %), für IVM 1 ppm bei 71 % (64 - 77 %) und für IVM 10 ppm bei

Tab. 3-17 — Entwicklung von *A. hebraeum* Nymphen *in vitro* auf Ivermectin-behandeltem Blut — Dargestellt sind der Spitzentag des Abfallens als Modalwert oder Bereich sowie die Körpermasse als Mittelwert mit Vertrauensintervall (95 %) und Anzahl Zecken (n). Resultate innerhalb Spalten ohne gemeinsamen Buchstaben waren signifikant unterschiedlich ($P < 0.05$; Mann-Whitney U-Test). Die Behandlungsnummern (in eckigen Klammern) entsprechen denjenigen der Übersicht in Tab. 2-8. Abkürzung d Tag nach Infestierung.

	Spitzentag des Abfallens	Bereich des Abfallens	Körpermasse abgefallener Nymphen [mg]
Kontrolle <i>in vitro</i> [22D]	d 7 / 8 a † (125)	d 5 - d 10 ‡	67 a (64 - 70) (120)
Placebo [31]	d 7 b (130)	d 5 - d 10 ‡	64 a (61 - 67) (122)
Ivermectin 1 ppm	•	•	< 7 §
Ivermectin 10 ppm	•	•	< 7 §

† An beiden Tagen fiel dieselbe Anzahl Nymphen von der Membran.

‡ Noch Nymphen noch am letzten Versuchstag fixiert (d 10):
[22D] 5; [31] 8.

• Nicht zu berechnen, da Nymphen teilweise schon an d 4 von der Membran abgefallen waren (tot oder lebend).

§ Überwiegend tote Nymphen, abgefallen oder noch fixiert an d 10.

38 % (30 - 46 %). Jedoch wurden in beiden IVM-Versuchen beim Kontrollieren der Membranen vor dem d 4 bereits abgefallene tote oder nur sich schwach bewegende Nymphen gefunden. Im Gegensatz zu völlig ungesogenen Nymphen war bei diesen der durchscheinende Darm etwas gefüllt. Auch zeigten sich nicht-fixierte Nymphen in der Kontrollbehandlung selbst an d 4 noch in guter körperlicher Verfassung. Dies erlaubt den Schluß, daß es sich bei den vor d 4 unter IVM-Gabe gefundenen, nicht-fixierten Zecken vielmehr um bereits einmal fixierte und nach kurzer Blutaufnahme wieder abgefallene Exemplare handelt. Es kann daher davon ausgegangen werden, daß die Anteile fixierter Zecken auf IVM-behandeltem Blut tatsächlich höher als die oben angegebenen Werte waren.

Die Zunahme der Körpermasse von Nymphen, die *in vitro* auf Blut mit 1 ppm und 10 ppm IVM saugten, war drastisch reduziert. Keine von ihnen häutete zur adulten Zecke (Tab. 3-17 und 3-18). Die Sterberate der Nymphen während der Versuchsdauer war tendenziell dosisabhängig und betrug 54 % bzw. 93 %. Das Plazebo unterschied sich nicht von der *in vitro* Kontrolle - weder in der Körpermasse (64 mg vs. 67 mg), noch bei der Sterblichkeit (12 % bzw. 11 %) (Tab. 3-18).

Tab. 3-18 — Der Effekt von Ivermectin auf die *in vitro* Entwicklung von *A. hebraeum* Nymphen — Dargestellt ist die Wirkung in % mit 95 %-Vertrauensintervall aller, mindestens einmal zwischen Tag (d) 1 und d 4 fixierten Nymphen in einer Behandlung, bestehend aus je 5 Versuchseinheiten. Ergebnisse innerhalb Spalten ohne gemeinsamen Buchstaben waren signifikant unterschiedlich ($P < 0.05$; Mann-Whitney U -Test). Die Behandlungsnummern (in eckigen Klammern) entsprechen denjenigen der Übersicht in Tab. 2-8.

	tot	lebend, aber nicht entwickelt *	lebend und entwickelt *
Kontrolle <i>in vitro</i> [22D]	11 a (2 - 29)	1 a (0 - 13)	88 a (66 - 96)
Plazebo [31]	12 a (2 - 27)	2 a (0 - 12)	86 a (68 - 96)
Ivermectin 1 ppm	54 b (35 - 75)	47 b (25 - 65)	0 b (0 - 13)
Ivermectin 10 ppm	93 b (77 - 99)	6 c (0 - 18)	0 b (0 - 12)

* Nymphen wurden als "entwickelt" bezeichnet, sofern ihre Körpermasse 7 mg überschritt (Mindestgewicht für die Entwicklung zur adulten Zecke).

4. DISKUSSION

4.1. Die Membranen

4.1.1. Tierisches Material

Abgezogenes Fell oder andere Häute von Labor- oder Schlachttieren fanden zur Membranfütterung von Schildzecken von Beginn des Jahrhunderts bis in unsere Zeit Verwendung (Hindle & Merriman, 1912; Kemp *et al.*, 1975; Voigt *et al.*, 1993). Tierfell konnte beispielsweise bis zu 16 d *in vitro* über Blut installiert bleiben und war zu dreimonatiger Gefrierlagerung geeignet. Dennoch gab es Grund zur Unzufriedenheit, da die Präparation recht aufwendig war, eine Neigung zu Undichtigkeiten bestand und vor allem Tiere als Quelle dieser organischen Membranen nicht mit dem Ziel einer möglichst 'künstlichen' Fütterung vereinbar waren (Voigt *et al.*, 1993). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit weitestgehend synthetische Membranen von vornherein favorisiert.

Die aus Eingeweiden von Schlachttieren kommerziell hergestellte, sogenannte 'Baudruche'-Membran, war in der Vergangenheit zur *in vitro* Fütterung blutsaugender Arthropoden recht verbreitet (Überblick: Klunker, 1979). Sie zeichnete sich durch eine geringe Dicke (10 - 50 µm) und einen relativ niedrigen Preis aus. Bei dem über Tage dauernden Säugakt der Schildzecken offenbarte sich jedoch bald ein gravierender Nachteil dieser Membran. Zwar wurde sie im Normalzustand, d. h. unimprägniert, mühelos von Zeckenmundwerkzeugen durchdrungen, doch leider auch von Flüssigkeiten, die sich darunter befanden. Zudem quoll diese organische Membran im Kontakt mit Blut binnen weniger Tage auf, zersetzte sich oder wurde zumindest so porös, daß auf ihr fixierte Zecken unweigerlich ertranken. Erst durch Imprägnierung mit Klebstoffen konnte die Durchlässigkeit der Membran für Flüssiges reduziert und ihre Standzeit über Blut auf mehrere Tage verlängert werden. Solche mit Klebstoffen imprägnierte Baudruche-Membranen wurden in dieser Form erstmals von Waladde *et al.* (1979) zur stundenweisen *in vitro* Fütterung weiblicher *Boophilus microplus* verwendet. In der vorliegenden Arbeit kamen diese Membranen für alle Stadien dieser Zeckenart zum Einsatz. Diese Art der Modifikation änderte praktisch nicht die Dicke der Membran, jedoch ihre Durchdringbarkeit für die Zecken. Der Membrantyp B1

wurde dabei besser von den Nymphen angenommen als Typ B2. Trotz der Klebstoffimprägnierung begann bei diesen Typen nach etwa einer Woche Flüssigkeit an manchen Stellen durch die Membran zu ziehen, was zu sehr störendem Pilzwachstum führte. Zusätzliches Bestrahlen mit UV-C, wie beim Typ B3 geschehen, verlieh ihr eine ausgezeichnete Widerstandsfähigkeit dem Blut gegenüber, glättete und verhärtete sie jedoch zu sehr und machte sie dadurch ungeeignet für *B. microplus*. Dieser Typ bewährte sich aber für die vermutlich kräftigeren *Amblyomma variegatum* Nymphen. Baudruche-Membranen waren schon aufgrund ihrer natürlichen Herkunft recht inhomogen, was Dicke, Materialstruktur und Festigkeit anbelangte. Überdies war die unverzichtbare Imprägnierung mit Klebstoffen nicht ausreichend standardisierbar. Als Membran für Versuche ausgehend von den winzigen *B. microplus* Larven bildete der Membrantyp B1 jedoch den einzigen akzeptablen Kompromiß.

4.1.2. Teflon

Die für Larven und Adulte von *B. microplus* und Adulte von *Ixodes ricinus* gewählten PTFE-Membranen (Teflon) waren ursprünglich serienmäßige, chemisch und biologisch inerte und sehr hitzebeständige Membranfilter-Scheiben. Ihre gleichmäßige, geringe Dicke (30 µm), leichte mechanische Durchdringbarkeit, gerillt strukturierte Oberfläche, Resistenz gegenüber biologischer Zersetzung, Formstabilität sowie ihre anti-adhäsiven und wasserabstoßenden Eigenschaften ließen sie trotz des sehr hohen Preises vielversprechend erscheinen. Nun veränderte sich aber besonders der letztgenannte Punkt nach dem Auftragen der als Fixierungsstimuli dienenden, fetthaltigen Tierhaar-Extrakte, so daß dennoch Nährmedium die Zecken überschwemmte. Durch Bestreichen mit Klebstoffen (Membrantyp T1 - T4) konnte dem recht wirksam begegnet werden. Dadurch kam es aber wieder zu Problemen der Standardisierung. Zudem wurden so die meisten Vorteile des teuren PTFE zunichtegemacht. Ohnehin erwies sich das Stützgeflecht aus Polypropylen-Fasern, auf dem die eigentliche Membran befestigt war, als schlecht zu reinigendes und daher hervorragendes Substrat für das Einnisten und Wachsen von Pilzhyphen. Daraufhin wurden die Experimente mit diesem Membran-Typ eingestellt.

4.1.3. Silikon

Zur Gruppe der dünnen Membranen gehörten auch die beiden Typen V1 und V2 aus viskosegestütztem Silikon. Sie basierten auf einer gleichmäßig gepreßten Schicht Viskosefasern in der Form im Handel erhältlichen Linsenreinigungspapiers. Das Papier wurde mit einfachen, wiederholbaren Handgriffen in Silikon-Klebstoff eingebettet. Diese preiswerten Membranen konnten in Dicken zwischen 10 - 40 µm, geeignet für *Amblyomma hebraeum* Larven und Adufte von *B. microplus*, oder 50 - 90 µm für Nymphen von *A. hebraeum* hergestellt werden. Da das Ausgangsmaterial stets gleichhoher Qualität war, genügte zur Standardisierung die Dickenmessung der kompletten Membran nach Aushärten des Silikons. Während die den Zecken zugewandte Membranseite aufgrund der sich abzeichnenden Fasern eine hautähnliche Rauheit aufwies, war die Seite zum Blut hin glatt und bot Pilzhyphen wenig Gelegenheit zum Anhaften. Ihre positiven Eigenschaften wie Dichtigkeit bezüglich Flüssigkeiten, Elastizität, Resistenz gegenüber biologischer Zersetzung und Formstabilität, änderten sich auch nach dem Auftragen von fetthaltigen Extrakten und Verdampfen des Lösemittels nicht. Die sehr dünne Membran des Typs V1 neigte bereits bei ihrer Herstellung zur Bildung von Lecks, so daß hier ein kritischer Dichtigkeitstest vor Versuchsbeginn besonders wichtig war. In dieser Arbeitsgruppe, aber nicht vom Autor durchgeführte Vorversuche mit Larven von *B. microplus* auf den dünnsten Exemplaren des Typs V1 waren erfolglos. Eine dünnere Fasermatrix mit anderen, weicher aushärtenden Silikonen sollte als potentielle Alternative zur klebstoffunprägnierten Baudruche-Membran getestet werden. Alles in allem betrachtet, erwiesen sich die viskosegestützten Silikon-Membranen in der Praxis als ideale Lösung.

Die 0,5 mm dicke, für adulte *Amblyomma* benutzte Wiener Silikon-Membran wurde ursprünglich zur *in vitro* Fütterung von Tsetsefliegen in einem Standardverfahren hergestellt (Bauer & Wetzel, 1976). Sie besaß alle Vorteile der oben angeführten, dünnen Silikon-Membranen. Sie hielt in der Regel selbst in Clustern fixierenden *Amblyomma*-Adulten stand. In künftigen Versuchen wäre einmal zu prüfen, ob etwas dünnere, eventuell weichere Membranen die Fixierungsraten der Zecken verbessern könnten.

4.2. *In vitro* Fixierung

4.2.1. Fixierungsstimuli

Lees (1948), der mit *I. ricinus* arbeitete, hatte thermische, mechanische, olfaktorische und gustatorische Stimuli, wie sie von erwärmtem Schafsfell ausgehen, als wichtige Fixierungsfaktoren ausgemacht. In seinen 24 stündigen *in vitro* Versuchen auf Schafsfell sowie auf dem Zwerchfell von Kaninchen (beide 37°C) fixierten *I. ricinus* nur auf dem Schafsfell. *In vitro* Experimente mit Lammfell bei etwa 23°C und 37°C zeigten die Notwendigkeit des thermischen Reizes. In den Versuchen der vorliegenden Arbeit lag die Membrantemperatur bei 32 - 38°C, die Umgebungstemperatur bei 23 - 34°C. Ein vertikaler Temperaturgradient war für das Festsetzen der Zecken nicht nötig, wie auch schon in anderen Arbeiten beobachtet worden war (Lees, 1948; Doube & Kemp, 1979). So zeigten z. B. bei Lees *I. ricinus* in ihren Versuchskapseln, sei es durch eine Heizplatte von unten, sei es im Brutschrank rundum erwärmt, vergleichbares Fixierungsverhalten.

Saubere Glaswolle als ein mechanischer Reiz, kombiniert mit Wärme, führte nicht zum Festsetzen männlicher *A. hebraeum* auf der glatten Wiener Silikon-Membran. Eine andere Silikon-Membran (Typ V2) mit hautähnlicher Oberflächenstruktur hingegen brachte in Vortests, obwohl frei von anderen aufgetragenen Stimuli, zumindest geringe Fixierungsraten für Nymphen dieser Art. Vermutlich ist die Feinstruktur der Membranoberfläche wichtig. In Vorversuchen auf glatten Silikon-Membranen setzten sich weder Nymphen von *A. hebraeum* (diese Arbeit), noch von *A. variegatum* fest (Voigt *et al.*, 1993). Auf leeren Baudruche-Membranen, die ein hautähnliches Muster besaßen, fixierten sich bei Kemp *et al.* (1975) jedoch von *B. microplus* keinerlei Larven und "nur einige Nymphen und Weibchen". Dies könnte daran gelegen haben, daß die einwirtigen *B. microplus* in ihrer Wirtswahl stärker auf Rinder ausgerichtet sind als auf die dreiwirtigen *A. hebraeum* und daß ihnen rindspezifische Stimuli fehlten. In eigenen Experimenten konnte beobachtet werden, daß die Wirtshaare von den Zecken wenig zum Herumklettern, sondern viel mehr zum Unterkriechen genutzt wurden. Beim Fixieren zeigten die Zecken häufig eine Vorliebe für Winkel und Ecken, z. B. am Übergang der Membran zum Glasrohreinsatz. Diese Thigmotaxis trug möglicherweise, neben den chemischen Stimuli, zur Clusterbildung von Zecken bei. Die Wirtshaare besaßen nicht nur eine mechanische Reiz-

komponente, sondern auch eine olfaktorische und gustatorische aufgrund der ihnen anhaftenden Wirtssubstanzen.

Ein olfaktorischer Reiz in Form der SPM-A.H. verbesserte bei Nymphen und Männchen von *A. hebraeum* die Fixierung auf warmen Silikon-Membranen. Norval *et al.* (1992b) hatten bereits *in vivo* von einer "fixierungsfördernden" Wirkung des Aggregations-Fixierungs-Pheromons bzw. Komponenten hiervon berichtet. In eigenen Tests mit Männchen konnten ähnliche Ergebnisse wie mit der Kombination SPM-A.H. und Glaswolle auch durch u. a. olfaktorisch-gustatorische Stimuli in Form von Rinderhaaren (Kaninchenhaare bei Nymphen) erreicht werden. Von Nutzen war ein Rinderohr-Extrakt in Versuchen mit adulten *I. ricinus*. Waladde *et al.* (1991) hatten ihn bereits erfolgreich an adulten *Rhipicephalus appendiculatus* getestet. Da von einer Bevorzugung der Rinderohren als Fraßort des Holzbocks jedoch nichts bekannt ist (Aeschlimann, 1972; Gigon, 1985), enthält der Ohr-Extrakt vermutlich eine allen Hautabsonderungen gemeinsame Komponente. Von *B. microplus* setzten sich keine Larven und nur "einige" Nymphen und Weibchen auf leeren Membranen fest, jedoch bis zu 85 % der Weibchen, sobald Rinderhaare und Rinderhaar-Extrakt vorhanden waren (Kemp *et al.*, 1975; Waladde *et al.*, 1979). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit für diese Zeckenart immer zumindest ein Extrakt aus Rinderhaaren benutzt. Der Rinderhaar-Extrakt bewirkte bei *B. microplus* Larven ein Verbleiben auf einer damit behandelten Membranfläche (Guerin *et al.*, 1992) und dürfte so die Wahrscheinlichkeit zum Fixieren erhöhen. An einer chemischen Aufschlüsselung der für dieses 'Verharren' verantwortlichen Substanzen aus Rinderfell wird derzeit durch Thomas Kröber am Zoologischen Institut der Universität Neuchâtel gearbeitet. Attraktive Kontakt-Chemostimuli sind bereits für andere Milben (Acari) bekannt, z. B. Fettsäure-Diester in den Hautlipiden von Geflügel, den Wirten der blutsaugenden *Dermanyssus gallinae* (Zeman, 1988). Räudemilben der Hunde (*Sarcoptes scabiei* var. *canis*) werden u. a. von Fettsäuren und deren Methylestern in der Wirtshaut angezogen (Arlan & Vyszynski-Moher, 1995). Bei an Bienen parasitierenden Milben fanden Phelan *et al.* (1991), daß Kohlenwasserstoffe der Wirtskutikula auf den Tracheenbewohner *Acaripis woodi* anlockend wirkten. Dieselbe Rolle erfüllten kutikuläre Alkangemische für die an der Bienenbrut schmarotzenden Milbe *Varroa jacobsoni* (Rickli *et al.*, 1994).

Waladde und Mitarbeiter (1991) wiesen auch auf die fixierungsstimulierende Wirkung von Zeckenkot hin. In eigenen Experimenten mit

A. hebraeum Männchen förderte arteigener Kot aus früheren *in vitro* Fütterungen deutlich das Festsetzen. Neben der mechanischen und olfaktorischen Komponenten der Exkremente durch vermutlich absorbierte Zeckenpheromone (Diehl *et al.*, 1991) gingen wahrscheinlich noch weitere, zeckenrelevante chemische Stimuli vom Kot selbst aus, wie zuvor schon für Lederzecken entdeckt worden war (Leahy *et al.*, 1973, 1975). So wurde u. a. Guanin, ein Endprodukt des Stickstoff-Metabolismus in Spinnentieren im Kot mehrerer Schildzeckenarten (*I. ricinus* nicht geprüft) nachgewiesen (Hamdy, 1972); und Otieno *et al.* (1985) beobachteten eine von Guanin ausgehende, attraktive Wirkung für *Amblyomma cohaerens* Larven und *R. appendiculatus* Adulte. Die aus dem Kot von Lederzecken stammenden Purine Xanthin und Hypoxanthin zogen ebenfalls andere Zecken an (Dusbábek *et al.*, 1991). Weibchen, Nymphen und junge Adulte von *V. jacobsoni* nutzten, wie *in vitro* Verhaltensbeobachtungen von Donzé *et al.* (1994) zeigten, ein vom Weibchen abgesetztes Fäkalienpaket als Versammlungs- bzw Paarungsort. Diese Autoren beschäftigen sich zur Zeit mit der Identifizierung der entscheidenden Substanzen (Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Sektion Ziegen, CH-3097 Liebfeld / SE).

Die Verwendung von Saline in manchen Versuchen ging auf eine Arbeit von Waladde *et al.* (1991) mit adulten *R. appendiculatus* zurück. Es sollte damit ein Teil der auf der Wirtshaut vorkommenden Salze simuliert werden. Dieser potentielle Fixierungsstimulus wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht systematisch untersucht und später fallengelassen. Die Salzlösung war auf den Membranen nicht gleichmäßig verteilt und nach Abtrocknen blieben nur einzelne, große Salzkristalle übrig. Seine Bedeutung wurde als gering eingeschätzt.

Beim Festsetzen kommen die Zecken auch mit gustatorischen Stimuli aus dem Nährmedium in Kontakt. Waladde & Rice (1977) fanden in elektrophysiologischen Studien an den Cheliceren weiblicher *B. microplus* ATP- und GSH-sensitive Rezeptorneurone. Die Cheliceren sind zusammen mit dem Hypostom der in die Wunde hineinragende Teil der Zecken-Mundwerkzeuge und kommen so mit den Gewebeflüssigkeiten des Wirtes in Kontakt. Beim Einbohren in die Haut tritt vermutlich ATP und GSH lokal aus Blutplättchen (Thrombozyten) bzw. roten Blutzellen (Erythrozyten) des Wirtes aus und signalisieren der Zecke einen interessanten Fraßort (Galun & Rice; 1971; Smith, 1979). In den ersten Stunden nach der Infestierung, wenn es für den Parasit darum geht, sich dort fest zu verankern, fanden die Autoren die stärkste neuronale

Antwort auf beide Verbindungen. Kemp und Mitarbeiter (1982) berichten von höheren *in vitro* Fixierungsraten weiblicher *B. microplus*, wenn die NaCl-Lösung unter der Membran ATP und GSH enthielt. Larven dieser Art schienen weniger wählerisch und fixierten sich sehr gut ungeachtet des Nährmediums unter dem Rinderfell (Rinder- oder Kaninchenserum, Phosphat-gepufferte Saline) (Doube & Kemp, 1979). In eigenen Versuchen mit *A. hebraeum* Nymphen wurde die Fixierungsrate meist erst an d 4 n. I. bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt waren, unabhängig von einer ATP / GSH-Zugabe, gleichviele Zecken fixiert. ATP und GSH spielen aber vermutlich in den ersten Stunden des Festsetzens eine Rolle.

4.2.2. *In vitro* Fixierung von *I. ricinus*

Auf einer, mit Klebstoff versiegelten PTFE-Membran (Teflon) waren 1 d nach Infestierung (n. I.) ca. 60 % der Weibchen fixiert. Zu Beginn zeigten sie Unruhe, lösten sich mehrfach von der Membran und fixierten sich wieder. Es ist denkbar, daß dieses Verhalten auf das Fehlen von zusätzlichem ATP und GSH im Futterblut zurückzuführen ist. Die gleichzeitig anwesenden Männchen wurden nie beim Festsetzen beobachtet. Die zusätzlich zu den Kaninchenhaaren und dem Rinderohr-Extrakt als Fixierungsstimuli gegebene Salzlösung und *I. ricinus*-Kot hatten, im Gegensatz zu Erfahrungen von Waladde *et al.* (1991) mit *R. appendiculatus*, keinen Effekt. Der von diesen Autoren festgestellte Nutzen von Rinderohr-Extrakt bestätigte sich indes auch für *I. ricinus*: Alle Weibchen fixierten auf der damit bestrichenen und mit Kaninchenhaaren bestreuten Hälfte der Membran, der Teil mit den Kaninchenhaaren allein wurde verschmäht.

4.2.3. *In vitro* Fixierung von *B. microplus*

Larven. Bei *B. microplus* als einer einwirtigen, hauptsächlich auf Rindern anzutreffenden Zecke (Roberts, 1965), liegt die Wahl des richtigen Wirtes und eines geeigneten Fraßortes einzig bei den Larven, da sich Nymphen und Weibchen kaum noch vom Fleck bewegen. Eine gesteigerte Empfindlichkeit ihrerseits gegenüber suboptimalen Fixierungsstimuli *in vitro* darf also angenommen werden. Die Kürze ihrer Mundwerkzeuge (Hypostom < 80 µm; nach Nuñez *et al.*, 1985) ließ schon kleine lokale Schwankungen in der Dicke der Membranen (ca. 10 - 50 µm) problematisch werden. Im Gegensatz zu *Ixodes* oder *Amblyomma* bohren *Boophilus*

ihr Hypostom nicht in voller Länge in die Haut oder die Membran ein. Sowohl *in vivo* wie *in vitro* werden die Palpen nur in einem Winkel $< 45^\circ$ abgespreizt und ein Zementkegel zwischen diesen und dem Hypostom geformt. Dadurch kann das Hypostom nur maximal bis zur Grenze Epidermis / Dermis in den Wirt eindringen (Moorhouse, 1969). Die Dicke der Rinderepidermis gaben Moorhouse & Tatchell (1966) mit durchschnittlich $50 \mu\text{m}$ an. Neben der Dicke spielt die Durchdringbarkeit der Membranen eine ebenso entscheidende Rolle für die Akzeptanz durch Larven, konnte aber nicht gemessen und damit auch nicht standardisiert werden.

Das Bestimmen der Anzahl fixierter Larven gestaltete sich sehr schwierig, da alle Versuche zur weiteren Fütterung angesetzt worden waren und daher nur wenig gestört werden sollten. Geschätzt lagen die Fixierungsraten 1 d n. l. bei 50 - 70 % in 7 Fütterungsgläsern mit Rinderhaar-Extrakt, Saline und vom Rind gebürsteten Zeckenkot. Ein exakt ausgezähltes Experiment ergab 31 % (d 9 n. l.). Diese Stimulus-Mischung wurde benutzt, da in eigenen Vorversuchen mit *B. microplus* Larven auf Baudruche-Membranen sowie in Arbeiten anderer Autoren mit *R. appendiculatus* (Waladde *et al.*, 1979; Waladde *et al.*, 1991) die Kombination aus Tierhaaren, -Extrakt und Zeckenkot die besten Ergebnisse gebracht hatte. Sie scheint jedoch nicht vollständig zu sein, da *B. microplus* Larven *in vitro* auf frischem Rinderfell 1 d n. l. Fixierungsraten von ca. 80 % erreichen konnten (Doube & Kemp, 1979). Dieser Wert zeigte sich dabei unbeeinflusst von der Wahl des Nährmediums (Rinder- oder Kaninchenserum, Phosphat-gepufferte Saline). Eigene Resultate wiesen in dieselbe Richtung, nach denen auch 5 mg Glukose / ml Futterblut oder durch Gefrierlagerung hämolysiertes Blut die geschätzten Fixierungsraten nicht zu ändern vermochten.

Etwa 30 - 70 % fixierter Larven auf attraktiv gemachten, klebstoff-impregnierten Baudruche-Membranen zeigen, daß die Übertragung eines großen Teils, jedoch nicht aller auf dem Rind verfügbaren Stimuli in die *in vitro* Situation gelungen war. Die geringe Fixierungsrate wird ausgeglichen durch die Verfügbarkeit der Larven in großer Zahl.

Nymphen. Die Wiederfixierungsrate der aus *in vitro* gezogenen Larven hervorgegangenen *B. microplus* Nymphen auf derselben Membran lag auf Baudruche-Membranen des Typs B1 mit ca. 70 % deutlich höher als bei Typ B2. Dies wird auf die unterschiedliche Durchdringbarkeit beider Membranen durch die Zeckenmundwerkzeuge zurückgeführt.

Adulte. Der Versuch von Pierce & Pierce (1956) schlug fehl, adulte *B. microplus* auf der, u. a. mit Rinderspeichel und "Hautabsonderungen" benetzten inneren Schalen-Membran bebrüteter Hühnerembryos fixieren zu lassen. An einem Mangel an attraktiven Substanzen auf der Membran allein hat dies möglicherweise nicht gelegen, da Kemp *et al.* (1975) notierten, daß sich zumindest "einige Nymphen und Weibchen auch auf Baudruche-Membranen fixierten", die frei von zusätzlich aufgetragenen Fixierungsstimuli waren. Einen größeren Erfolg hatten dann aber Waladde *et al.* (1979), die von bis zu 85 % fixierter Weibchen auf klebstoffbehandelten Baudruche-Membranen berichteten. Auf ihren Membranen befanden sich Rinderhaare und deren Extrakt, darunter heparinisieretes Vollblut.

Alle in der vorliegenden Arbeit für *B. microplus* benutzten Stimuliekombinationen enthielten Rinderhaar-Extrakt. Die natürlichen Weibchen, die pharat oder bereits gehäutet vom Rind abgesammelt worden waren, hatten sich 1 d n. I. zu 50 - 100 % auf klebstoffbehandelten PTFE- oder Baudruche-Membranen fixiert, die Männchen zu 60 - 80 % (d 3: ca. 50 % bzw. ca. 60 %). Letztere waren unruhiger, schienen aber weniger delikat in ihren Fixierungs-Ansprüchen, saugten meist in unmittelbarer Nähe bereits saugender Weibchen und zeigten, soweit ohne Störung der Zecken beobachtbar, normales Paarungsverhalten (wie beschrieben bei Falk-Veirant, 1991; Guerin *et al.*, 1992). Wurden vom Rind gesammelte Adulte auf Kaninchenohren gesetzt, wiederfixierten mehr als 75 % beider Geschlechter (Falk-Veirant *et al.*, 1994).

Künstliche Weibchen, gehäutet aus *in vitro* gesogenen Nymphen, waren an d 3 n. I. zu 34 %, entsprechende Männchen zu 71 % fixiert und lagen damit etwa im Rahmen der natürlichen Adulten *in vitro*.

Bei Einsatz geeigneter Fixierungsstimuli (hier: Rinderhaar-Extrakt und Rinderhaare) akzeptierten adulte *B. microplus* auch völlig synthetische Membranen. Auf der viskosegestützten Silikon-Membran (Typ VI; siehe Kapitel 2.B.2.) waren an d 2 n. I. die Hälfte der Weibchen fixiert. Es wäre zu prüfen, ob eine Zugabe von ATP / GSH ins Futterblut hier das Festsetzen erleichtern könnte (Kemp *et al.*, 1982). Diese Autoren hatten höhere *in vitro* Fixierungsraten 4 h n. I. beobachtet, wenn einer mit Glukose angereicherten NaCl-Lösung ATP oder GSH hinzugefügt worden war.

4.2.4. *In vitro* Fixierung von *Amblyomma*

Beiden Spezies gemein ist die Produktion und Aussendung von Aggregations-Fixierungs-Pheromonen (aggregation-attachment-pheromones; AAP) durch die nach 3 - 5 d des Blutsaugens auf dem Wirt sexuell gereiften Männchen. Diese Pheromone bestehen bei *A. variegatum* aus *ortho*-Nitrophenol (ONP), Methylsalicylat (MES) und Pelargonsäure (nonanoic acid, Nonansäure; NOA) (Schöni *et al.*, 1984; Diehl *et al.*, 1991). Schöni und Mitarbeiter wiesen auf die synergistische Wirkung der Komponenten dieses Pheromgemisches hin, wenn es um das Auslösen des kompletten Aggregations-Fixierungs-Verhaltens von *A. variegatum in vitro* ging. Bei *A. hebraeum* sind die Hauptbestandteile ONP, iso-Buttersäure (2-methylpropanoic acid; TMP) und Benzaldehyd (BEA) (Apps *et al.*, 1988; Price *et al.*, 1994).

Durch Aussendung dieser Substanzen wird der Wirt als gute Futterquelle markiert (Norval *et al.*, 1989a; Hess & Castro, 1986). Auf dem Wirt werden so Männchen, Weibchen (Schöni *et al.*, 1984; Rechav *et al.*, 1977) und Nymphen (Rechav *et al.*, 1976; Norval *et al.*, 1992b) der gleichen Art angelockt und deren Festsetzen in Clustern bewirkt. Norval und Mitarbeiter (1992b) beobachteten, daß beispielsweise die Fixierung von Nymphen beider Arten auf Kaninchenohren an d 1 n. l. von weniger als 20 % auf 60 - 70 % zu steigern war, wurden Extrakte von mindestens einer Woche lang gefütterten Männchen der jeweiligen Art hinzugefügt. Ähnliches, auf diese Weise verbessertes Fixieren wurde auch von ungeschlechten Männchen auf Kaninchen berichtet (Norval *et al.*, 1991).

4.2.4.1. *A. variegatum*

4.2.4.1.1. Nymphen

in der vorliegenden Arbeit war die Fixierung von Nymphen *in vitro* mit ca. 40 % 1d n. l. relativ gering, gemessen an den etwa 70 % auf, mit dem Extrakt vorgefütterter Männchen bestrichenen Kaninchenohren (Norval *et al.*, 1992b). Dafür könnten folgende Punkte verantwortlich sein:

1. Die für die Nymphen zusammen mit Rinderhaar-Extrakt und Saline benutzte, synthetische Pheromon-Mischung 1 (SPM1-A.v.) bestand nur aus ONP und MES, NOA fehlte.
2. Möglicherweise mangelte es an volatilen Substanzen, die sonst von der Haut des Wirtes oder dessen Haaren abgegeben werden und aufgrund ihrer Flüchtigkeit nicht mehr im Rinderhaar-Extrakt vorhanden waren.

3. Eventuell war die Baudruche-Membran des Typs B3' nicht leicht genug zu durchdringen.
4. Es fehlten mechanische Stimuli, a) da dieser Membran-Typ durch den Klebstoff und die weitere Behandlung recht glatt wurde und b) das Fehlen von Tierhaaren.

4.2.4.1.2. Adulte

Männliche, ungesogene *A. variegatum* waren an d 1 auf der sonst zur Tsetsefliegen-Zucht benutzten Wiener Silikon-Membran (W1) etwa zur Hälfte, meist in Clustern, fixiert. Die zusammen mit Rinderhaar-Extrakt und Saline verwendete synthetische Pheromon-Mischung 2 (SPM2-A.v.) enthielt nun neben ONP und MES auch NOA. Schöni *et al.* (1984) stellten eine untere, im Nanogramm-Bereich liegende Konzentrationsschwelle dieses Substanzgemisches zum Auslösen des Aggregations-Fixierungs-Verhaltens bei Zecken fest. Eigene Versuche wiesen auf einen nach oben sehr eng begrenzten Konzentrationspielraum hin. So sank die Fixierungsrate bei Männchen an d 1 signifikant von 48 % auf 11 %, wenn die Konzentration der SPM nur um das 5fache erhöht war. Die richtige Dosierung der Pheromon-Mischung erwies sich somit als sehr kritisch.

Typisches Klammerverhalten ("claspig behaviour") zum Ergreifen sich nähernder Weibchen zeigten die Männchen *in vitro* ab d 5, sobald man sie mechanisch reizte. Auf dem Rind geschah dies spontan ab d 3 - 4 (Schöni, 1987). Daß dieses Verhalten *in vitro* verspätet, nicht spontan und weniger intensiv auftrat, liegt auch daran, daß die Männchen z. T. in einer zum "claspig" ungünstigen Stellung mit dem Bauch zum Glas hin fixiert waren. Der Hauptgrund ist aber wahrscheinlich die nicht ausreichende Qualität des Futterblutes, die ihrerseits zu einer verminderten sexuellen Reifung der Männchen geführt hat. Hinzugesetzte, ungesogene Weibchen waren 4 d später zu fast 70 % festgesetzt, während sich auf dem Rind praktisch alle fixierten.

Die hier benutzten Fixierungs-Stimuli brachten für den Einsatz zur *in vitro* Fütterung befriedigende Fixierungsraten. Die Werte für die Nymphen ließen sich sehr wahrscheinlich durch die Verwendung der für die *A. hebraeum* Nymphen bewährten dünnen Silikon-Membran (Typ V2; siehe nächstes Kapitel) und eventuell durch die Ergänzung der SPM1-A.v. mit NOA deutlich steigern.

Um eine verbesserte Fixierung der Adulten zu erreichen, sollte zum einen eine größere Membranfläche ausprobiert werden. Dadurch würden sehr aktive Zecken nicht so schnell den unattraktiven Glasrohr-

einsatz herauflaufen. Zum anderen könnte eine leichter zu durchdringende Membran und insbesondere eine auf maximal 5 % erhöhte CO₂-Konzentration der Luft (nach Voigt *et al.*, 1993) geprüft werden. Diese Autoren ließen alle Stadien von *A. voregatum* *in vitro* ohne eine synthetische Pheromon-Mischung fixieren (Rate nicht angegeben). Inwieweit das von ihnen als Membran verwendete frisch abgezogene, komplette Kaninchen- oder Rinderfell, das zusätzliche CO₂ oder die Kombination aus beidem dabei hilfreich war, bleibt unklar.

4.2.4.2. *A. hebraeum*

4.2.4.2.1. Larven

Die für die Larven als Fixierungsstimulus gegebene synthetische Pheromon-Mischung (SPM-A.h.) enthielt ONP, TMP und BEA. Zusätzlich wurden noch Rinderhaare, Rinderhaar-Extrakt und aus *in vitro* Experimenten mit Adulten gesammelter Kot verwendet. Die Kombinierung mehrerer Stimuli hatte sich bereits bei *B. microplus* Larven als vorteilhaft erwiesen. Die Fixierungsraten der *A. hebraeum* Larven schwankten stark (30 - 90 %), doch wurden die teilweise geringen Raten durch die Verfügbarkeit von ungesogenen Larven in großer Zahl wieder ausgeglichen.

Der verwendete Typ V1 der viskosegestützten Silikon-Membran eignete sich gut für die Larven, doch war er mit 10 - 40 µm Dicke recht porös und mußte daher vor der Infestierung mit Zecken sorgfältig auf Dichtigkeit geprüft werden.

4.2.4.2.2. Nymphen

Auf der verwendeten viskosegestützten Silikon-Membran Typ V2 (50 - 90 µm dick) fixierten schon mit Kaninchenhaaren als einzigem aufgebrachten Stimulus etwa 70 - 80 % der Nymphen. Dies wurde durch die zusätzliche SPM-A.h. auf mit 'in vivo' vergleichbare 93 % erhöht und bestätigt die "fixierungsfördernde" Wirkung des Aggregations-Fixierungs-Pheromons bzw. Komponenten hiervon (Norval *et al.*, 1992b). Nymphen der F₁-*in vitro* Generation erreichten praktisch gleichhohe Werte. Auf dem Wirt ist auch das Fell in der Umgebung saugender Männchen sowie deren Kot mit den AAP imprägniert (Diehl *et al.*, 1991), die ihre Wirkung nach Entfernen der Männchen noch 2 - 4 d beibehalten (Rechav *et al.*, 1977). Daher wurde während der gesamten Versuchsdauer eine kleine Gummikappe auf die Membran zu den adulten Zecken hinzugelegt. Diese mit Pheromonen imprägnierten Gummikappen (PIG) konnten in

Experimenten mit Nymphen die fixierungsfördernde Wirkung der SPM-A.h. ersetzen.

Die Frage, ob sich für *A. hebraeum* Nymphen die Fixierungsraten *in vitro* (d 4 n. I.) mit zusätzlichem ATP / GSH (beide: 10^{-3} mol / l) signifikant verändert haben, muß anhand der vorliegenden Zahlen von vier Behandlungen in zwei verschiedenen Versuchsblöcken verneint werden. Es fehlen jedorh Daten über das Verhalten der Zecken in den ersten Stunden nach der Infestierung, wenn die neuronale Antwort auf ATP / GSH, gemessen an *B. microplus*, am stärksten war (Waladde & Rice, 1977).

Überhaupt ließen sich die Nymphen kaum von dem, was sich unter der Membran befand, beim Festsetzen stören. Ob Penizillin / Streptomycin statt Gentamicin als Bakterizid, ob mit oder ohne Nystatin als Fungizid, ob heparinisertes, hämolysiertes oder defibriniertes Blut, ob Hühnereidotter als Nährzusatz, ob mit oder ohne Propylenglykol / Glycerolfomal oder DMSO (als Vehikel für systemische Akarizide) – signifikante Unterschiede zeigten sich nicht. Das galt ebenso für das Blut individueller Spender-Tiere. Auch die bis zum d 4 n. I. insgesamt 20 Minuten dauernde UV-C-Bestrahlung der Membran-Unterseite aus nur 7 cm Entfernung hatte keinen Effekt auf das Festsetzen der Zecken.

Um trotz geeigneter, über der Haut liegenden Stimuli die Fixierung der Zecken vom Nährmedium her zu behindern sind anscheinend genau auf den "Geschmack" der Zecken abgestimmte Substanzen nötig: Histamin z. B., daß bei Überempfindlichkeitsreaktionen in der Wirtshaut freigesetzt wird, führte nach Injektion *in vivo* und *in vitro* zum Abfallen von *B. microplus* Larven (Kemp, 1978; Kemp & Bourne, 1980), wobei der Mechanismus dieser Wirkung ungeklärt blieb. Weibchen dieser Art fixierten *in vitro* deutlich schwächer, wenn ihnen 0.15 molare NaCl-Lösung anstelle von heparinisieretem Vollblut angeboten wurde (Waladde *et al.*, 1979). In eigenen Versuchen setzten sich signifikant weniger *A. hebraeum* Nymphen fest, wenn das Blut durch H_2S -bildende Bakterien verdorben war. Diese letzten Beispiele zeigen, daß, bei günstigen Stimuli auf der Membran, nur recht radikale Veränderungen im Nährmedium die Fixierung der Zecken beeinträchtigen kann.

Bei sehr niedriger relativer Luftfeuchte (Brutschrank $36^\circ C$ / ca. 20 %rF) waren an d 4 nur 70 % statt 95 % der Nymphen fixiert und die meisten der nicht-fixierten waren tot. Ein ähnlicher Effekt sehr niedriger Luftfeuchte *in vitro* wurde von Doube & Kemp (1979) an

B. microplus Larven demonstriert und auf das Vertrocknen von sich nicht rasch genug festsetzenden und saugenden Individuen zurückgeführt.

Die tendenziell schlechteren Fixierungsraten (-7 %) in ständig geschüttelten Versuchseinheiten (100 Richtungswechsel / min, horizontal in einer Ebene, eine Strecke ca. 10 cm) liegen möglicherweise in einer Störung der Nymphen infolge der Beschleunigungskräfte oder auf der Membran herumrollender Teile (Zahnwatteröllchen, Stück Gummikappe) begründet.

Die Besatzdichte der Nymphen pro Pütterungsglas beeinflusste im getesteten Bereich von 2 - 13 Individuen / cm² die Fixierungsrate nicht. Auch setzten sie sich bereits innerhalb eines Tages nach der Infestierung fest und hielten den Anteil fixierter Nymphen bis zum d 4 praktisch konstant. Norval (1974) registrierte einen Zeitraum von anderthalb Tagen, bis sich *A. hebraeum* Nymphen maximal auf Kaninchenohren (ohne Zusatz weiterer Stimuli) festgesetzt hatten.

Die aufgezeichneten Fixierungsraten lagen gleichauf mit *in vivo*-Werten und zeigten, daß alle wichtigen Stimuli in den Fütterungsgläsern vorhanden waren. Die verwendete viskosegestützte Silikon-Membran erfüllte ihren Zweck ausgezeichnet. Die Nymphen fixierten sich unbeeindruckt von den hinzugefügten Substanzen im Futterblut oder der Art der Blutzubereitung.

4.2.4.2.3. Adufte

Ungesogene *Amblyomma* Männchen fixieren sich unterschiedlich gut auf verschiedenen Wirtstierarten. So fanden Norval *et al.* (1992a) für *A. hebraeum* nach einem Tag Fixierungsraten auf Rind, Schaf und Kaninchen von 93 %, 43 % und 41 %, respektive. Zudem berichteten Rechav *et al.* (1977) und Apps *et al.* (1988) von zeitlich verzögertem Festsetzen von Männchen dieser Art auf Kaninchen. Zur Vorfütterung der Männchen auf dem Kaninchen wurde deshalb SPM für *A. hebraeum* (SPM-A.h.) auf den Wirt aufgetragen, was auf dem sonst recht unattraktiven Kaninchen zu Fixierungsraten von fast 100 % innerhalb 1 h führte.

Ein chemischer, flüchtiger Stimulus wie die SPM-A.h. oder aber ein mechanischer Reiz wie Glaswolle führten, einzeln auf die Wiener Silikon-Membran gegeben, binnen 1 h nicht zum Festsetzen ungesogener Männchen von *A. hebraeum*. Eine bessere Fixierung erhielt man bei gleichzeitigem Auftragen.

Praktisch keine Männchen setzten sich binnen 1 h fest, wenn Glaswolle gemeinsam mit überdosierter SPM-A.h. (Konzentration x1000)

verabreicht wurde. Hier wurde möglicherweise die obere Grenze der noch zu Aktivität führenden Substanzkonzentration überschritten, ähnlich dem für *A. variegatum* beobachteten Phänomen (Kapitel 4.2.4.1.2.). Da bei Norval *et al.* (1991) trotz noch weit höheren Konzentrationen dieser Verbindungen Zecken auf Kaninchenohren fixierten, ist nicht auszuschließen, daß *in vitro* der geringere Luftaustausch in den Fütterungsgläsern eine Rolle spielt.

Fixierungsraten ähnlich denen von niedrig dosiertem SPM-A.h. zusammen mit Glaswolle riefen auch isoliert verabreichter, arteigener Zeckenkot oder Rinderhaare hervor. Diese beiden Stimuli repräsentierten ebenfalls mehr als eine Reizmodalität. So stellten die Rinderhaare sowohl einen mechanischen, als auch durch anhaftende Hautfette und flüchtige Substanzen einen gustatorischen und olfaktorischen Reiz dar. Die potentielle mechanische Komponente der Zeckenexkremate war deren Struktur in Form von kleinen Brocken oder Kugeln, die olfaktorische vermutlich absorbierte Zeckenpheromone (Diehl *et al.*, 1991). Sehr wahrscheinlich gehen noch weitere, für die Zecken wichtige, chemische Stimuli vom Kot selbst aus. Rinderhaare, kombiniert mit SPM-A.h. brachten die höchste Fixierungsrate (32 % 1 h n. I.). Doch auch einen Tag nach Infestierung *in vitro* ging der Anteil festgesetzter natürlicher Männchen kaum über 30 % hinaus (Rinderhaare und Zeckenkot), während Norval auf dem Rind im gleichen Zeitraum über 90 % fixierte Zecken zählte. Künstliche Männchen fixierten sich hingegen doppelt so gut (60 %). Diese Zecken waren möglicherweise selektionierte, besser an suboptimale *in vitro* Stimuli angepaßte Individuen, da bei der künstlichen Fütterung des vorangehenden Nymphen-Stadiums etwa ein Viertel der Zecken durch Nicht-Fixieren, Tod oder die Unfähigkeit zur Häutung verlorengegangen war.

Das typische Klammerverhalten der Männchen ("clamping") trat *in vitro* erstmals an d 6 auf, auf dem Kaninchen einen Tag früher. Ein solche Verzögerung konnte schon bei *A. variegatum* beobachtet werden. Es war *in vitro* weniger spontan und intensiv als auf dem Wirt, hauptsächlich wegen des negativen Einflusses der *in vitro* Ernährung auf die sexuelle Reifung der Männchen und teilweise auch wegen der ungünstigen Fixierungsposition mancher Männchen, die sich bäuchlings zum Glasrand hin festgesetzt hatten.

Männchen, die 5 - 7 d lang *in vitro* oder *in vivo* vorgefüttert worden waren, begannen schon wenige Minuten nach Aufbringen auf nur mit Zeckenkot bestreuten Membranen mit dem Wiederfixieren (d 1:

80 - 90 %). Eine Stunde nach den Männchen wurden Weibchen hinzugefügt. Diese waren, gleich ob natürlicher oder künstlicher Herkunft, nach 1 d etwa zur Hälfte fixiert, an d 4 zu etwa 70 %. Künstliche Membranen wurden von vorgefütterten Männchen deutlich besser angenommen als von ungesogenen.

Für *A. hebraeum* läßt sich festhalten: Adulte und Nymphen bilden beim Festsetzen oft Gruppen, Larven nicht. Die der Hautoberfläche ähnliche Struktur der Larven- und Nymphen-Membranen stellte einen wichtigen Fixierungs-Stimulus dar. Die Zecken benötigten anscheinend immer mindestens zwei gleichzeitig angebotene Stimuli auf der Membran (thermisch / mechanisch / olfaktorisch/ gustatorisch), während vom Blut herrührende eine weniger große Rolle spielten. Die *in vitro* Fixierungsraten vorgefütterter Männchen und ungesogener Weibchen im Beisein dieser Männchen war zufriedenstellend. Das Festsetzen ungesogener Männchen hingegen könnte verbessert werden. Dazu sollten die gleichen, wie schon für *A. variegatum* (Kapitel 4.2.4.1.2.) im einzelnen erklärten Punkte, getestet werden: A) eine größere Membranfläche für die Zecken, B) eine leichter, d. h. schneller zu durchdringende Membran und C) eine höhere CO₂-Konzentration der Umgebungsluft.

4.2.5. Zusammenfassung

Untersuchungen zur *in vitro* Fixierung wurden nur so weit angestellt, bis sich für die künstliche Fütterung ausreichend Zecken festgesetzt hatten. Die Experimente mit 4 Zeckenarten und 3 Entwicklungsstadien wurden in insgesamt 9 Kombinationen durchgeführt. Die Ergebnisse waren zu heterogen für eine alle Kombinationen umfassende Stimulus-Empfehlung.

Sie erlauben dennoch einige allgemeine Schlüsse:

- So scheint ein Temperaturgradient zwischen Membran und Umgebung für die Fixierung der Zecken minderwichtig.
- Dagegen ist die mechanische Beschaffenheit der Membranen ein kritischer Faktor.
- Stimuli über der Membran beeinflussen stärker deren Festsetzen als solche im Futterblut.
- Die Bedeutung olfaktorisch-gustatorischer Reize auf der Membran ist für die Zeckenarten und -stadien verschieden groß.

- Bei Zecken, die auf Aggregations-Fixierungspheromone ansprechen, spielt deren Dosis eine entscheidende Rolle.
- Zecken scheinen zur Fixierung *in vitro* mindestens zwei Reizarten (thermisch und mechanisch / gustatorisch) gleichzeitig zu benötigen.

4.3. In vitro Fütterung

4.3.1. Kontaminationsprobleme

Ein Großteil der vorliegenden Arbeit zur *in vitro* Fütterung von Schildzecken wurde in die Untersuchung und Lösung von Kontaminationsproblemen investiert. Die Diskussion dieses Themas soll hier den entsprechenden Raum finden.

Pilze. Im Futterblut wachsende Pilzmyzelien (*Aspergillus fumigatus*; *A. ochraceus*) waren der Hauptgrund, weshalb das Durchfluß-Fütterungssystem zugunsten der Fütterungsgläser aufgegeben wurde. Die sich ausbreitenden Myzelien führten zusammen mit Fibrin-Resten und aggregierenden roten Blutzellen ständig zu Verstopfungen der ableitenden Schläuche oder der Durchfluß-Fütterungskammer (DFK) selbst. Mit der Einführung der Fütterungsgläser wurden zur Auswahl von passenden Fungiziden sogenannte 'Blutkulturen' angelegt (angelehnt an Van Cutsem & Janssen, 1988). Das Ziel war, rasch und ohne Verschwendung kostbarer Zecken ein wirkungsvolles Fungizid zu finden. Das zur Gruppe der Polyene gehörende Breitband-Fungizid Amphotericin B (AMB; Handelsname u. a. Fungizone) war, wie schon Versuche mit der DFK gezeigt hatten, völlig unzureichend, selbst in einer 100fach über der Laborempfehlung liegenden Konzentration. Ein anderes Polyen, Nystatin (NYS; Handelsname u. a. Mycostatin) hatte dagegen schon in der halben vorgeschlagenen Dosis einen deutlichen Effekt. AMB und NYS stören durch Bindung an Sterole die Durchlässigkeit einer Vielzahl biologischer Membranen (Überblick in Kinsky, 1970 und Kinsky, 1971, zitiert aus De Kruijff *et al.*, 1974). Ihr Bindungsbestreben zu Ergosterol (in Pilzen) ist aber mehrfach höher als zu Cholesterol (im Futterblut) (Georgopapadakou & Walsh, 1994).

In Fütterungsversuchen mit adulten *A. hebraeum* wurden auch 'moderne' Fungizide eingesetzt, welche in die Biosynthese des Ergosterol in Pilz-Zellmembranen eingreifen: das zu den völlig synthetischen Azol-Abkömmlingen gehörende, pilzhemmende Triazol Itraconazol (ITR; Van Cutsem *et al.*, 1984) in niedriger Dosierung (0.1 µg / ml) und das pilzabtötende Imidazol Enilconazol (ENI; Van Cutsem & Janssen, 1988; Van Cutsem *et al.*, 1984), extrem hoch dosiert (1 mg / ml) zur täglich 10-20minütigen Desinfektion der Silikon-Membran-Unterseite. Die beste Wirksamkeit erreichte NYS (100 IE / ml), gefolgt von der täglich 5minütigen Bestrahlung der Membran-Unterseite mit UV-C, dann NYS (10 IE / ml) und ITR (0.1 µg / ml). Die Desinfektionen mit ENI oder UV-C brachten mäßigen Erfolg gegen Pilze, lassen sich aber wegen der gleichzeitig aufgetretenen bakteriellen Kontaminationen nicht abschließend bewerten.

In Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß NYS wirksamer war, wenn es bei jedem Blutwechsel neu hinzugefügt wurde als bei einmaliger Zugabe in den Blutvorrat (+4°C) direkt nach der wöchentlichen Blut-sammlung. Dies ist damit zu erklären, daß sich die Menge biologisch verfügbarer, fungizider Aktivsubstanz im Blut mit der Zeit verringert, wenn nicht häufiger neue Substanz nachgeführt wird (Van Cutsem & Janssen, 1988).

Trotz des Bemühens, so aseptisch wie möglich zu arbeiten, blieben Kontaminationsrisiken bestehen. Die Fixierungsstimuli auf den Membranen, speziell Tierhaare und Zeckenkot, stellten eine reiche Quelle von Keimen jeglicher Art dar. Sie erhöhten das Risiko von Pilzwachstum auf der Membran.

Die Mundwerkzeuge der Zecken waren von Natur aus mit Kontaminanten behaftet. Pilzmyzel wurde überwiegend an den von den saugenden Zecken in die Membran 'eingebauten' Zementscheiden gefunden. Haben die Zecken selbst über ihre Mundwerkzeuge die Pilze eingeschleppt oder kamen diese als Sporen von außen ins Blut hinein und fanden im Zeckenzement nur einen idealen Ort zum Anhaften? Der wahrscheinlichere Weg ist der Sporeneintrag über die Luft, da auch Pilzmyzel in zeckenfreien Kontrollversuchen entdeckt wurde (an den einzigen rauen Stellen der Membran) und aufgrund weiter unten genannten Punkte zum Blutwechsel.

Zur offenen, d. h. unsterilen Blutsammlung von Schlachtrindern gab es aufgrund der benötigten Menge (bis zu 1 l Stierblut pro Woche) und örtlicher Gegebenheiten keine Alternative. Jedoch ist das Komple-

ment-System im Rinderblut noch aktiv und kann gegen eingetragene Fremdzellen vorgehen (Walport & Lachmann, 1993). Die Bedeutung der Art des Blutsammelns für die Kontamination des Futterblutes wird im Vergleich zur Phase des Blutwechsell als zweitrangig eingestuft.

Beim Blutwechsel waren das Einfüllen des Blutes (Fütterungsgläser) und Abspülen der Membran-Unterseiten aus organisatorischen Gründen, wie der Zahl der Fütterungsgläser und der Häufigkeit der Blutwechsel, nur unsteril auf dem Laborarbeitsplatz und über der Spüle möglich. Hier kam es zum Eintrag von Luftkeimen wie z. B. *Aspergillus*-Sporen, begünstigt durch die räumlichen Bedingungen. Folgende Punkte sprechen für den Blutaustausch als den für Verunreinigungen entscheidendsten Moment:

1. Die Kontaminationen nahmen durch den versehentlichen Einstrom verschmutzter Außenluft (adulte *A. hebraeum* Behandlung [7B; 9; 10; 11]) drastisch zu. Die Situation normalisierte sich nach Einschränken der Luftzufuhr.
2. Es gab praktisch keine Pilzkontamination bei Experimenten in einem anderen, saubereren Labor (ohne Pilzrasen an der Decke....).
3. Pilz trat bei zwei- statt dreimaligem Blutaustausch später und in geringerem Maße auf.
4. Blutwechsel wurden während des Versuchs häufiger (40x) als Blut-sammlungen (2x) durchgeführt.

Das von unten mit den klebstoffversiegelten PTFE-Membranen (T1 - T4) verschweißte Stützgeflecht aus Polypropylen bot leider aufgrund seiner Rauheit und Struktur ein ideales Substrat für das Anhaften von Pilzhypen, weswegen bei Kontaminationsgefahr mit Pilzen vom Einsatz dieser Membranen abzuraten ist.

Warum wurden Pilzkontaminationen in anderen Arbeiten zur künstlichen Fütterung ixodider Zecken nie erwähnt? Zumal die Versuche meist ohne Fungizide im Blut durchgeführt wurden? Die Tatsache, daß dort das Futterblut durchweg steril gewonnen wurde, ist aus den bereits oben diskutierten Gründen zwar wichtig, aber nicht der alleinige Punkt. Bedeutsamer scheint zu sein:

1. die außergewöhnliche Sporenexposition meiner Versuche aufgrund der räumlichen Umstände;

2. der Verzicht der anderen Autoren auf den Zusatz von 2 g Glukose / l Blut sowie ATP und GSH (10^{-3} mol / l) [z. T. jedoch ATP / GSH bei Habadank & Hiepe, 1993]. In eigenen Vorversuchen mit *B. microplus* trat Pilz am frühesten dann auf, wenn dem Blut 5 g Glukose / l zugesetzt worden waren.

Andere Autoren (Voigt *et al.*, 1993 und Habadank & Hiepe, 1993) steigerten die CO_2 -Konzentration der Umgebungsluft der saugenden Zecken auf 4.5 - 10%. Verhindert vielleicht erhöhtes CO_2 , welches möglicherweise auch durch die Membranen diffundiert und den pH-Wert des Blutes beeinflussen kann, das Myzel-Wachstum? Eine daraufhin angelegte *Aspergillus fumigatus* Kultur auf geeignetem Agar und bei 5 % CO_2 -Gehalt der Luft wuchs indes genauso gut wie die Kontrolle in normaler Atmosphäre.

Bakterien. Ein intensiver H_2S -Geruch des Blutes galt als Indiz für eine starke bakterielle Kontamination. Das dann vorherrschende anaerobe Milieu wurde auch an der tiefdunklen Farbe des Blutes erkennbar. Gentamicin, ein Bakterizid der Aminoglykosid-Gruppe, wirkte schon ausgezeichnet in sehr geringer Dosis ($5 \mu\text{g} / \text{ml}$). Die meistbenutzte Kombination in anderen Arbeiten, Penizillin ($100 \text{IE} / \text{ml}$) mit Streptomycin ($100 \mu\text{g} / \text{ml}$), waren dagegen völlig machtlos. Das galt auch für zeitlich begrenzte Desinfektionsmaßnahmen wie UV-C-Bestrahlung oder Eintauchen der Membran in niedrig dosiertes Gentamicin ($50 \mu\text{g} / \text{ml}$). Systematische Untersuchungen zur verantwortlichen Bakteriengruppe oder Qualitätskontrollen an unauffälligem Blut wurden nicht durchgeführt. Waladde *et al.* (1993) benutzten zur Fütterung von *R. appendiculatus* Nymphen überhaupt keine Mikrobizide und berichteten nichts von Kontaminationen. Vermutlich half der Umstand, daß das Rinderblut täglich frisch und steril entnommenen und in den Fütterungskammern 6x pro Tag ausgetauscht wurde.

Zusammenfassend wären zur Reduzierung des Kontaminationsrisikos durch Pilze und Bakterien vorzuschlagen:

- Die Umgebungsluft sollte möglichst keimarm sein. Arbeitsschritte mit offenem Blut sind eventuell unter einem sterilem Abzug auszuführen.
- Das Blut sollte steril gesammelt werden, sonst so sauber wie möglich.

- Bei der Materialauswahl sind glatte, antiadhäsive Oberflächen zur Verringerung des Anlagerns von Keimen zu bevorzugen.
- Hochdosierte Zusätze von z. B. Glukose oder ATP machen das Blut nahrhafter für Kontaminanten. Wenn für die Zecken vertretbar, sollte darauf verzichtet werden.

Bei geringem Kontaminationsrisiko könnten probeweise die Fungizide niedriger dosiert oder gänzlich weggelassen werden. Versuche zur *in vitro* Übertragung von Krankheitserregern, z. B. *Borrelia*, müßten außerdem ohne oder mit anderen Bakteriziden durchgeführt werden.

4.3.2. Saugstimuli und Futterqualität

Daß sich Larven durchaus auf Futter mit wenigen roten Blutzellen oder sogar ohne vollsaugen können, wurde *in vivo* bei *Amblyomma americanum* und *Hyalomma anatolicum anatolicum* beobachtet (Sauer & Hair, 1972, zitiert in Kemp *et al.*, 1982; Snow, 1970). Larven von *B. microplus*, die *in vitro* auf Gewebekulturmedium TCM 199 plus Serumfraktionen, aber ohne Erythrozyten oder Hämoglobin saugten, verhielten sich ähnlich und entwickelten sich zu Nymphen (Kemp *et al.*, 1975). Bestand hingegen Zugang zu Erythrozyten (*in vivo*), so waren diese durchaus schon nach einem Tag im Darm von *B. microplus* zu finden (Seifert *et al.*, 1968). Larven können demnach fakultativ auch ohne Blutzellen oder deren Inhalt auskommen.

Anekdotischen Beobachtungen zufolge scheinen auch adulte Zecken, z. B. *R. appendiculatus*, in der Lage, sich ohne den roten Blutfarbstoff und nur auf der Basis von weißen Blutzellen (Leukozyten) in der Form von Eiter zu ernähren. Der Normalfall ist aber die Aufnahme von Vollblut, wie leicht an den hell- bis tiefroten Exkrementen saugender Zecken gesehen werden kann. Daher wurden die Versuche der vorliegenden Arbeit mit Hämoglobin-haltigem Blut, welches entweder noch intakte Blutzellen enthielt oder aber hämolysiert war, durchgeführt.

ATP und GSH kommen in Thrombozyten und Erythrozyten des Wirtsblutes vor und gelten als Saugstimuli für Lederzecken (Galun & Kindler, 1968) und andere Arthropoden (Überblick bei Galun, 1987ab). Die Präsenz von Rezeptorneuronen für beide Substanzen an den Cheliceren weiblicher *B. microplus* (Waladde & Rice, 1977) und *in vitro* Fütterungsergebnisse mit diesen Zecken deuteten bei beiden Verbindungen

auf eine Funktion als Saugstimulus auch bei Schildzecken hin (Kemp *et al.*, 1982). Doch wurden sie bisher in keiner Arbeit mit Zecken normalem, zellhaltigem Blut zugesetzt. Stets handelte es sich um Salzlösungen oder, wie bei Habedank *et al.* (1993, 1994), um hämolysiertes Blut. Bei der künstlichen Fütterung von Insekten mit normalem Blut hatte ein ATP-Zusatz nur geringen bis keinen Effekt auf deren Saugleistung (Wade & Georgi, 1988; Mews *et al.*, 1976). Die Konzentration von ATP ist, da es unter Glukoseverbrauch erzeugt wird, indirekt vom Glukosespiegel des Blutes abhängig und nimmt in gelagertem Blut umso schneller ab, je höher die Temperatur ist (Widmann, 1985; Wetzel, 1979, zitiert in Feldmann, 1988). ATP ist aber zur Stabilisierung der Erythrozyten-Membranen nötig. Daher wurde dem Blut bei der Sammlung Glukose und bei jedem Blutwechsel u. a. ATP hinzugefügt. Eigene Versuchsergebnisse lassen jedoch am Vorteil einer Supplimentierung des Futterblutes mit ATP (und GSH), zumindest für *A. hebraeum* Nymphen, zweifeln, da deren Körpermasse auf Blut ohne Zusatz signifikant höher war.

Zwei Gründe für diese unerwartete Reaktion der Zecken stehen zur Diskussion:

1. **Unbemerkte bakterielle Kontamination.** Die Stammlösung beider Substanzen wurde, unmittelbar nach Zubereitung in physiologischer Kochsalz-Lösung, sterilfiltriert und portioniert bei -18°C eingefroren. Ein Einschleppen irgendwelcher Keime durch Zugabe dieser Lösung zum Futterblut, wie es Mews *et al.* (1976) zu berichten wußten, ist daher unwahrscheinlich.
2. **Überdosis.** Plausibler scheint die Idee einer Überdosierung, insbesondere von ATP (10^{-3} mol / l). Nach Wetzel (1979, zitiert in Feldmann, 1988) sind von dieser Menge 4 h nach Zugabe in 37°C warmes Blut noch mehr als $3 \cdot 10^{-4}$ mol / l vorhanden. Dagegen wurde in Kaninchen-Vollblut z. B. nur $5 \cdot 10^{-5}$ mol / l gemessen (Dennemann, 1961; zitiert in Feldmann, 1988). Zudem befindet sich ATP, wenn keine Hämolyse vorliegt, innerhalb der Erythrozyten und Blutplättchen, so daß der Normalwert im Plasma noch deutlich niedriger anzusetzen ist. Eine höhere ATP-Konzentration können Zecken auf dem Wirt nur im Moment des Einbohrens in die Haut erfahren, wenn dabei Blutzellen beschädigt werden.

Eine systematische Untersuchung über den Nutzen einer ATP-Supplimentierung bei der künstlichen Fütterung von Schildzecken konnte in der Literatur nicht gefunden werden.

GSH, das wie ATP in Thrombozyten und Erythrozyten vorkommt, gilt in Salzlösung als Saugstimulus für *Ornithodoros* (Galun & Kindler, 1965; Hokamã *et al.*, 1987) und für *B. microplus* (Kemp *et al.*, 1982). In eigenen Versuchen wurde es stets gemeinsam und in der gleichen Konzentration wie ATP verabreicht. Die Gefahr einer Überdosierung, wie für ATP diskutiert, war hier geringer, da der Gehalt an GSH z. B. in Menschenblut etwa der zugesetzten Menge entspricht und sich somit allenfalls verdoppeln würde (Wiss. Tab. Geigy, 1979). Außerdem wirkte GSH selbst noch in einer Konzentration von 10^{-2} mol / l in gezuckerter Saline saugstimulierend (Kemp *et al.*, 1982)

Glukose allein in Salzlösung hatte keinen Effekt auf die Saugraten weiblicher *B. microplus* (Kemp *et al.*, 1982). Die Lederzecke *O. tholozani* sprach jedoch positiv auf den Zucker an und besonders dann, wenn er zusammen mit ATP oder GSH gegeben wurde (Galun & Kindler, 1968). In Humanblut wurde bei 37°C ein Glukoseverbrauch von 0.2 - 0.4 mg / ml / h gemessen (Wiss. Tab. Geigy, 1979). Diese Rate, auf das Rinderblut *in vitro* übertragen, würde schon nach wenigen Stunden den Glukose-Gehalt in den Fütterungsgläsern gegen null gehen lassen und damit einen u. a. einen Rückgang an ATP und eine Destabilisierung der Erythrozyten nachschieben. Aus diesen Gründen schien der einmalige Zusatz von Glukose (2 g / l) ins Futterblut gerechtfertigt.

Dem in Erythrozyten anzutreffenden Zuckerphosphat 2,3-Diphosphoglycerat (2,3-DPG) wurde für Raubwanzen (*Rhodnius prolixus*) eine saugstimulierende Wirkung nachgewiesen (Smith & Friend, 1982; Friend & Stoffolano, 1990). Seine Konzentration in gekühlt gelagertem Menschenblut sank in drei Wochen um 50 % (Widmann, 1985). Eigene Versuche zum Effekt auf Zecken wurden wegen des sehr hohen Preises jedoch nicht unternommen.

Die maximal einwöchige Lagerung des Futterblutes bei 4°C war relativ kurz, verglichen mit den fünf Wochen erlaubter Lagerzeit für menschliche Blutkonserven (Widmann, 1985). Doch war die durch freies Hämoglobin verursachte Peroxidierung von Blut-Phospholipiden, von denen einige für Zecken essentiell sein dürften, bereits nach einer Woche nachweisbar (Knight *et al.*, 1993). In hämolysiertem Blut, wie es nach Gefrierlagerung auftritt, wird sich dieser Effekt durch die größeren Mengen freien Hämoglobins noch verstärken. Dies kann die Ergebnisse mit *A. hebraeum* Nymphen erklären, die nur etwa 80 % der Körpermasse der *in vitro* Kontrolle auf Normal-Blut erreicht hatten.

Wurde heparinisertes statt defibriniertes Blut verwendet, lag die Körpermasse von *A. hebraeum* Nymphen signifikant um +14 % höher. Dies wundert nicht, da heparinisertes Blut mehr Plasmaproteine und Blutzellen enthält und weniger hämolysiert ist. Voigt *et al.* (1993) berichteten von +22 % höherer Körpermasse von *A. variegatum* Nymphen *in vitro* auf Heparin-Blut verglichen mit defibriniertem Blut.

Alle verwendeten Fungizide zeigen ein teilweises Bindungsbestreben zu Cholesterol, was damit für die Ernährung der Zecken ausfiel. Die gebundene Menge Cholesterol wurde aber als gering und für die Entwicklung der Weibchen als unbedeutend eingeschätzt. Diese Auffassung wird durch die Arbeit von Voigt *et al.* (1993) unterstützt. Dort lagen die Fütterungsergebnisse mit *A. variegatum*, obwohl kein Fungizid ins Blut gegeben wurde, nicht über denen der vorliegenden Arbeit.

Körpermasse, Eier-Konversionsfaktor und Larvenschlupfrate von *A. hebraeum* Weibchen, die sich auf dem Rind vollsaugten, waren nicht von deren Tag des Abfallens abhängig. *In vitro* hingegen bestand ein solcher Zusammenhang, und zwar am deutlichsten bezüglich der erreichten Körpermasse und besonders, wenn nur zwei- statt dreimal pro Tag das Futterblut gewechselt wurde. Das heißt, daß Zecken, die *in vitro* länger zum Vollsaugen brauchten, ein geringeres Endgewicht erreichten. Mehrere Gründe könnten dafür in Frage kommen: Zum einen wäre die bereits diskutierte, mit der Zeit voranschreitende Peroxidierung von Blut-Phospholipiden zu nennen, was eine Verringerung des Nährwertes des Blutes zur Folge hätte. Zum anderen könnte der Rückgang potentieller Saugstimuli, z. B. 2,3-DPG, die Blutaufnahme der Zecken beschränken. Schließlich ließe sich eine Zunahme von schädigenden Mikroben oder deren Produkte vermuten, selbst wenn das Maß der Kontamination noch gering war. Systematische, mikrobiologische Untersuchungen, auch an unauffälligem Blut, wurden nicht angestellt.

4.3.3. *In vitro* Fütterung von *I. ricinus*

Die Versuche mit Weibchen dieser Art blieben auf die Durchfluß-Fütterungskammer beschränkt und waren bestimmt von massiv auftretendem Pilzmyzel und den daraus resultierenden Problemen für eine geeignete, kontinuierliche Ernährung der Zecken. Dies wird als der Hauptgrund für das schlechte Fütterungsergebnis erachtet: nur 4 von insgesamt 29 Weibchen erreichten binnen 9 - 11 d eine nennenswerte Körpermasse (53 - 256 mg) ohne jedoch Eier abzulegen. Graf (1978) nannte eine Kör-

permasse *in vivo* von 130 - 440 mg und bei begatteten Weibchen eine untere Grenze für Eiablage und Larvenschlupf von 22.3 mg.

4.3.4. In vitro Fütterung von *B. microplus*

Auch hier, wie schon bei der vorigen Zeckenart, waren Versuche auf der Durchfluß-Fütterungskammer (mit PTFE-Membranen Typ T3 und T4) von schweren Kontaminationen gekennzeichnet. Es kam nur in einem Experiment zum Vollsaugen einiger Larven mit Häutung zur Nymphe.

Von den Fütterungsglas-Versuchen werden hier diejenigen mit der 'erfolgreichsten' Membran, der klebstoffimprägnierten Baudruche-Membran (Typ B1), diskutiert. Das Futterblut wurde einmal täglich ausgetauscht. Die ersten vollgesogenen Larven erreichten am d 4 - 5 n. I. das pharate Nymphen-Stadium. Insgesamt 84 % aller fixierten Larven wurden pharat. Der Zeitpunkt entspricht den *in vitro* Ergebnissen von Kemp *et al.* (1975) auf Rinderfell über kontinuierlich erneuertem, künstlichem Nährmedium mit einem Anteil an vollgesogenen Larven von ca. 50 - 80 %. Auf dem Rind beobachteten Nuñez *et al.* (1985) erste pharate Nymphen etwas früher, nämlich nach dreieinhalb Tagen. Die dann folgende Häutung zur künstlichen Nymphe ab d 5 - 6 war zu ca. 80 % erfolgreich (Kemp *et al.*, 1975: 50 - 70 %; ab d 8). Nuñez *et al.* (1985) fanden gehäutete Nymphen ab d 6 auf dem Rind. Während die Entwicklung der Larven *in vitro* noch zufriedenstellend war, verlangsamte sich die der Nymphen gegenüber '*in vivo*': Die ersten ungesogenen künstlichen Adulten erschienen 3 - 5 Tage später als auf dem Rind, jeweils die Männchen einen Tag früher als die Weibchen. Bei Männchen war es d 16, bei Weibchen d 17 verglichen mit d 13.5 und d 14.5 nach Nuñez *et al.* (1985) bzw. d 11 und d 12 mit dem gleichen Zeckenstamm (Falk-Vairant *et al.*, 1994). Gemessen an der Zahl aufgesetzter Larven, erreichten *in vitro* etwa 3 % das ungesogene Adult-Stadium (beide Geschlechter). In dieser Größenordnung liegen auch die Werte bei der Fütterung auf dem Kaninchen (Loomis, 1971), auf dem Rind ist es schätzungsweise das Zehnfache (Roberts, 1968).

Daß es *in vitro* nicht gelang, künstliche, vollgesogene Weibchen zu erhalten, wird auf folgendes zurückgeführt:

1. die niedrige Blutaustauschrates ($1x / d$);
2. den damit zusammenhängenden Mangel an geeigneten Nährstoffen;
3. zunehmende Kontamination mit Pilzen im Verlauf des Saugaktes.

Der recht gute Erfolg mit den Subadulten, besonders den Larven, spricht dafür, daß sich diese beiden Stadien auch mit Serum allein vollsaugen und entwickeln können (Gregson, 1935, zitiert in Kemp *et al.*, 1982; Kemp *et al.*, 1975).

Natürliche Adulte. Zwei Fütterungsgläser mit ungesogenen, vom Rind stammenden Adulten und zweimaligem Blutwechsel pro Tag blieben bis zum Versuchsende (d 11) dank NYS 100-Gabe pilzfrei. Auf der hier verwendeten, viskosegestützten Silikon-Membran (Typ V1) saugten sich etwa 40 % der aufgesetzten Weibchen bis zur Hälfte der *in vivo* erreichbaren Körpermasse voll und legten Eier ab. Bedauerlicherweise fehlen aus organisatorischen Gründen weitere Angaben zur Fruchtbarkeit.

Die Verdoppelung der Blutwechselrate und die Vermeidung von Pilzmyzel wirkte sich positiv auf die Entwicklung der Weibchen aus. Zu einer weiteren Körpermasse-Erhöhung der Weibchen bieten sich folgende Verbesserungen an:

- Es wäre interessant, zumindest aufgrund der Resultate von Kemp *et al.* (1982) mit *B. microplus*, ATP und GSH als potentiellen Saugstimuli für diese Art zu testen.
- Durch gelegentliches Schütteln könnte die Sedimentation von Blutzellen verringert werden.
- Der Einsatz heparinisierten Blutes böte den Zecken proteinreichere, weniger hämolysierte und daher höherwertige Nahrung.

Die parasitische Lebensphase von 3 Wochen ist bei dieser einwirtigen Zecke sehr kurz; der gesamte Lebenszyklus kann in 6 Wochen ablaufen (Nufiez *et al.*, 1985). Durch den raschen Generationswechsel treten Selektionseffekte und mögliche Entwicklungsschwierigkeiten schnell zutage. Neben der wirtschaftlichen Bedeutung dieser Zecke machen auch diese Gründe aus *B. microplus* ein lohnendes Modell zur Optimierung einer *in vitro*-Fütterung und -Zucht.

4.3.5. *In vitro* Fütterung von *A. variegatum*

Bei nur einem täglichen Blutwechsel kamen Nymphen dieser Spezies auf 63 % der *in vivo* Körpermasse. Alle häuteten sich zu Adulten, aber nur 13 % waren Weibchen gegenüber ca. 55 % *in vivo* (Barré, 1989). Dieser Autor notierte eine höhere Körpermasse bei vollgesogenen, weiblichen Nymphen (65.8 mg) verglichen mit männlichen (42.4 mg). Das bedeutet,

daß die *in vitro* gemessene Körpermasse nicht nur von den *in vitro* Bedingungen, sondern auch stark durch den geringen Anteil an Weibchen beeinflusst wurde. Der Grund dieser unnormalen Geschlechterverteilung ist nicht klar.

Von den auf der Wiener Silikon-Membran (Typ W1) fixierten Weibchen fielen die Hälfte binnen 14 d mit 88 % der sonst auf Rindern bzw. 47 % der sonst auf Ziegen erreichten Körpermasse ab (Barré, 1989; Centurier & Klima, 1979). Die Umwandlung des aufgenommenen Blutes in Eimasse (Eier-Konversionsfaktor) war wenig effizient (0.20) und nur zwei von ihnen erzeugten vitale Larven.

Die erreichte Körpermasse der Weibchen war trotz des nur einmaligen Blutwechseis pro Tag im Vergleich zu *A. hebraeum* (Kapitel 3.2.5.3.) sehr hoch. Dies ist vermutlich auf die in diesem Experiment völlige Abwesenheit von Pilzmyzel zurückzuführen. Ein negativer Effekt der ungewöhnlich hohen Nystatin-Dosis (1000 IE / ml) auf die Eiproduktion kann nicht ausgeschlossen werden.

Der Einfluß der Blutzubereitung mit 30 % höherem Erythrozyten-Anteil auf die Körpermasse wurde nicht systematisch untersucht. Die dahinterstehende Hoffnung, durch vermehrt angebotene rote Blutzellen die Körpermasse der Nymphen und die Fortpflanzungsleistung der Weibchen deutlich in den natürlichen Bereich heben zu können, blieb unerfüllt. Die erreichten Werte rechtfertigten nicht den Arbeitsaufwand für die Konzentrierung des Blutes und das zusätzliche Kontaminationsrisiko.

4.3.6. In vitro Fütterung von *A. hebraeum*

4.3.6.1. Larven

Die Körpermasse *in vitro* vollgesogener Larven unterschied sich nicht von der auf einem Rind gemessenen. Die Häutungsrate natürlicher Larven war *in vitro* sogar signifikant besser als *in vivo*. Erste abgefallene Larven fielen ab d 6 von der Membran wie auch vom Kaninchen (Norval, 1974). Auf dem Rind geschah dies einen Tag früher.

Die *in vitro* von den Larven abgesetzten bernsteinfarbenen Exkremente, wiesen auf eine sehr geringe Aufnahme von Erythrozyten bzw. Hämoglobin hin. Die Resultate zeigen aber, daß die angebotene Diät den Bedürfnissen der Larven gerecht wurde, selbst wenn Blutzellen

für deren Mundwerkzeuge kaum erreichbar waren und das Futterblut nur zweimal täglich ausgetauscht wurde.

Die gemessenen Entwicklungsparameter von F₁-*in vitro* Larven, deren Eltern bereits *in vitro* gesaugt hatten, waren vergleichbar mit denen *in vitro* gesogener natürlicher Larven. Die verwendete, dünne Silikon-Membran (Typ V1) wurde von den Larven akzeptiert und war bei sachgemäßer Behandlung eine gute Alternative zu Tierhaut-Membranen oder frischem Tierfell.

4.3.6.2. Nymphen

Natürliche Nymphen erreichten in den *in vitro* "Standard-Behandlungen [22..]" 86 % (57 mg) der Körpermasse von Nymphen auf dem Rind (66 mg). Die Ergebnisse innerhalb mehrerer Versuchsblöcke waren sowohl *in vitro* als auch *in vivo* sehr variabel und z. T. sogar signifikant unterschiedlich, ähnlich wie es auch auf Wirten wie Kaninchen und Schafen beobachtet wurde (Norval, 1974). Dieser Autor fand eine mittlere Körpermasse der Nymphen von 43 mg auf Kaninchen und 62 mg auf Schafen. Ferner beobachtete er signifikante Gewichtsunterschiede zwischen "männlichen" und "weiblichen" vollgesogenen Nymphen. Deren Geschlechterverhältnis lag bei 40 : 60. Auch *in vitro* trat dieser Sexualdimorphismus auf mit einem Weibchen-Anteil von 54 - 65 %.

Die Körpermasse *in vitro* gesogener F₁-*in vitro* Nymphen (63 mg) lag zwischen der natürlicher Nymphen *in vitro* (57 mg) und der auf Rindern (66 mg). Der Häutungserfolg war in allen drei Gruppen gleich hoch (96 - 98 %). Einzig beim Spitzentag des Abfallens waren die *in vitro* gefütterten Nymphen um zwei bis drei Tage im Verzug.

Die Serie der 5 Standard-Behandlungen in 5 verschiedenen Versuchsblöcken vereinigte mehrere, aus anderen *in vitro* Behandlungen gewonnene Verbesserungen: Um bakteriellen Kontaminationen vorzubeugen, genügte GEN 5. Jede höhere Dosierung oder andere Bakterizide (PS 100) führten nicht zu verstärktem Schutz und verminderte zudem geringfügig die Körpermasse der Nymphen (siehe Mikrobizid-Diskussion in Kapitel 4.3.1.).

Die desinfizierende UV-C-Bestrahlung der Unterseite der Membranen übte, im Gegensatz zum Fungizid NYS 100, einen deutlich negativen Effekt auf die Entwicklung der Nymphen aus. Dafür könnten folgende Punkte verantwortlich sein: Eine direkten Strahlenschädigung der Zecken wäre denkbar, da die Membranen sehr dünn und die Bestrah-

lungsstärke des UV sehr hoch war. Es entstand deutlich wahrnehmbares, schädliches Ozon während der Bestrahlung (Dauer: 5 min / d). Gegenüber der unbestrahlten Kontrolle befanden sich diese Nymphen länger fernab des Futterblutes. Diese Saugunterbrechung wird als Störung mit nachhaltiger Wirkung interpretiert. Für das Letztere spricht auch die Steigerung der Körpermasse, die mit einer Reduzierung der Blutwechsel (eine "Saugstörung" weniger...) von dreimal auf zweimal täglich einherging. Versuche mit einem einzigen Blutaustausch pro Tag wurden mit *A. hebraeum* Nymphen nicht gemacht. Angesichts der Ergebnisse für *A. variegatum* wäre hier ein Test sicher lohnenswert.

Nymphen in geschüttelten Fütterungsgläsern zeigten eine verminderte Körpermasse. Schuld daran könnte die dabei auftretende Beschleunigung sein (100 Richtungswechsel / min; einfache Strecke: ca. 10 cm; horizontal in einer Ebene). Diese ständige Bewegung mag die Verankerung der Mundwerkzeuge in der Membran (50 - 90 μm dick) und damit den Zugriff der Nymphen auf das Futterblut beeinträchtigt haben. Auch könnte das Berührtwerden durch abgefallene, während einiger Stunden auf den Membranen herumrollender Zecken ein Grund sein. Die durch das Schütteln verbesserte Versorgung mit Blutzellen wurde von den Zecken nicht in eine höhere Körpermasse umgesetzt.

Während die Standard-Behandlung wiederholt befriedigende Ergebnisse lieferte, sorgte derweil in anderen Behandlungen die gezielte Veränderung bestimmter Faktoren für Überraschungen. So war bei drei als auch bei zwei Blutwechseln täglich eine signifikante Körpermassenzunahme von 8 - 10 % zu verzeichnen, wenn auf die Zugabe von ATP / GSH (beide: 10^{-3} mol / l) verzichtet wurde. Diese als potentiellen Saugstimuli angesehenen Substanzen erreichten vermutlich zusammen mit ihrer normalen Menge im Futterblut eine unnatürlich hohe, eher fraßhemmende Konzentration (siehe Kapitel 3.2.5.2.2). Da diese Verbesserung erst spät im praktischen Teil der Arbeit auftrat, behielten die nachfolgenden Standardbehandlung weiter diese Stoffe bei, um eine möglichst häufig und immer identisch wiederholte Kontrolle zu gewährleisten. Außerdem wurden die unerwarteten Ergebnisse durch Verzicht auf ATP / GSH erst nach Wiederholung in einem zweiten Versuchsblock als Tatsache akzeptiert.

Es ist nicht auszuschließen, daß beim Einsatz von Fungiziden wie NYS ein Teil des von den Zecken benötigten Cholesterol gebunden wird. Um den Cholesterol-Gehalt im Blut zu erhöhen, wurde 10 vol% Hühnereidotter hinzugefügt. Es kam aber zu keiner signifikanten Änderung

der Körpermasse oder anderer, gemessener biologischer Parameter bei den saugenden Nymphen. Ursache des leicht süßlichen (nicht verdorbenen!) Geruchs dieser Blutzubereitung wurden nicht untersucht.

Durch Gefrierlagerung hämolysiertes Blut enttäuschte ebenfalls. Die erreichte Körpermasse der Nymphen lag -18 % unter der Kontrolle, obwohl hier durch Verhinderung der Sedimentation alle Inhaltsstoffe der Blutzellen gleichmäßig verteilt waren. In der Literatur findet sich hierzu Widersprüchliches: So berichtet Thomas *et al.* (1985) von einem negativen Effekt gefriergelagerten Blutes auf *Anopheles albimanus* Mücken; bei Burg *et al.* (1993) hatten aber Fliegen (*Haematobia irritans*) keine Probleme mit dieser Diät. Hadedank & Hiepe hatten gefriergelagertes Blut für die *in vitro* Fütterung von Aduften der Schildzeckenart *Dermacentor nuttalli* verwendet. Ihre Arbeit enthält indes keinen Vergleich zu frischem, unhämolysiertem Blut. Da im hämolysierten Blut die Erythrozyten-Membranen aufgeplatzt sind, liegt mehr freies Hämoglobin vor, was vermutlich eine schnellere Peroxidation von Phospholipiden im Blut, von denen einige wahrscheinlich essentiell für die Zecken sind, zur Folge hat (Knight *et al.*, 1993).

Wurde heparinisieretes statt defibriniertes Blut verwendet, lag die Körpermasse der Nymphen signifikant um +14% höher. Dies wundert nicht, da heparinisieretes Blut einen höheren Nährwert besitzt. Auch Nymphen von *A. variegatum* wogen +22 % mehr auf Heparin-Blut im Vergleich zu defibriniertem Blut (Voigt *et al.*, 1993). Andere Antikoagulanzen wie Äthylendiamin-tetracetat (EDTA) waren, so die Autoren, für die Zecken nicht geeignet. Ähnliches hatte sich schon früher mit Citrat-Blut für Lederzecken gezeigt (Wirtz & Barthold, 1986). Diese Unverträglichkeit ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß beide Substanzen Ca^{++} -Ionen im Blut in Chelatkomplexe einbinden.

Wurden die Fütterungsgläser während der Blutmahlzeit der Nymphen rundum erwärmt (Brutschrank 36°C), stieg deren erreichte Körpermasse signifikant um +12 %. Möglicherweise führte die im Brutschrank herrschende geringe relative Feuchte von etwa 20 % zum Austrocknen derjenigen Nymphen, die sich nicht schnell genug fixierten und Blut saugten. In diesen Fällen wird der Tod sehr wahrscheinlich die Kleinsten unter ihnen, d. h., die mit der relativ zum Körpervolumen größten Oberfläche zuerst ereilt haben. Die o. g., gesteigerte Körpermasse ist daher vermutlich auf einen höheren Anteil ursprünglich etwas größerer, saugender Zecken zurückzuführen.

Die Nymphen von *A. hebraeum* erbrachten in der *in vitro* Fütterung die vergleichsweise besten Resultate aller Zeckengruppen dieser Arbeit. Sie ließen sich leicht handhaben, die benutzten Membranen waren problemlos und zügig herzustellen und sehr sicher. Die Möglichkeit eines zweimaligen Blutwechsel pro Tag war angepaßt an einen normalen Arbeitstag (ca. 8 h bzw 16 h Pause zwischen dem Bluttausch). Diese offensichtlichen Vorteile führten letztlich zu dem in Kapitel 4.5. diskutierten *in vitro* Test mit einem systemischen Akarizid an *A. hebraeum* Nymphen. Der Vorschlag, statt defibriniertem künftig heparinisiertes Blut zu benutzen, stellt bei großen Blutmengen einen ernststen Kostenfaktor dar. Dies wird aber teilweise durch den zweiten Vorschlag, auf ATP und GSH zu verzichten, wieder wettgemacht. Durch die Kombination von beiden besteht die Aussicht, die Entwicklung *in vitro* gefütterter Nymphen vollends der auf dem Rind angleichen zu können.

4.3.6.3. Adulte

Wie schon für die Nymphen zeigte sich auch bei den Adulten, daß jedes einzelne Wirtstier (Rind) einen maßgeblichen Einfluß auf die Körpermasse der auf ihm sich vollsaugenden Weibchen hatte (Bereich der mittleren Zeckengewichte: 1.7 - 3.3 g; 5 Rinder). In der mit den Nymphen in jedem Versuchsblock wiederholten *in vitro* "Standard-Behandlung", zeigten sich auch solche Unterschiede aufgrund jedes individuellen Blutspender-Tieres. Mit den Adulten waren solche wiederholt durchgeführten "Standard-Behandlungen" nicht möglich, da weder die verfügbare Zeckenzahl, Blutmenge noch die Zeit ausgereicht hätten, um sie zusätzlich zu den anderen Adulten-Behandlungen durchzuführen. Es ist aber sehr wahrscheinlich, daß die Körpermasse der Weibchen ebenfalls diesem Einfluß durch das jeweilige Spender-Rind unterworfen ist.

Jeder Versuchsblock, ob *in vivo* oder *in vitro*, erhielt anderes Blut, aber auch Zecken einer anderen Charge. Deren Einfluß auf die Zeckenkörpermassen wird aber im Vergleich zum Faktor Blut als gering eingeschätzt. Versuche mit verschiedenen Zeckenchargen auf demselben Futterblut bzw. gleicher Zeckencharge auf dem Blut verschiedener Rinder wurden nicht gemacht.

Körpermasse, Eier-Konversionsfaktor und Larvenschlupfrate von Weibchen *in vivo* waren unabhängig von deren Tag des Abfallens. *In vitro* jedoch gab es einen solchen negativen Zusammenhang, und zwar am deutlichsten bezüglich der Körpermasse. Besonders fiel dies in Be-

handlungen mit dem Bakterizid GEN 5 auf. Die Larvenschlupfrate litt eher unter einer längeren Einwirkung der Mikrobizid-Kombination PS 100 / ITR 0.1. Diese negative Abhängigkeit war sogar signifikant für die Körpermasse und den Eier-Konversionsfaktor in der Behandlung [22C] mit nur zwei- statt dreimaligem Blutwechsel pro Tag. Der Grund dieser Korrelation dürfte daher weniger in einer giftigen Wirkung der Mikrobizide auf die Zecken liegen, als vielmehr in einem, durch den fehlenden Bluttausch verstärkt zur Geltung kommenden Faktor im Futterblut.

Mikrobielle Kontaminationen

Je mehr Tage ein Weibchen während seiner Blutmahlzeit auf pilz-infiziertem Blut saugte, desto mehr litten tendenziell darunter bestimmte, die Fortpflanzung betreffende Parameter wie Körpermasse, Eier-Konversionsfaktor und Larvenschlupfrate. Offensichtlich war dies in extrem kontaminierten Behandlungen ([7B; 9]). Eine tendenzielle Abhängigkeit herrschte in mäßig bis schwach kontaminierten Behandlungen. Extremes Auftreten von Bakterien (H_2S -Geruch) führten ebenfalls bei den Weibchen zu völligem Entwicklungsstillstand. Der schädigende Effekt der Kontaminanten auf die Zecken könnte durch deren giftige Stoffwechselprodukte oder über die Reduzierung des Nährstoffangebots ausgeübt worden sein.

Blutwechsel

In den Behandlungen mit nur einem Blutwechsel pro Tag kamen die Weibchen von *A. hebraeum* im Schnitt nicht über 120 mg Körpermasse hinaus und zeigten kein selbständiges Abfallen und keine Eiablage. Ein Grund dafür ist wahrscheinlich das frühe Erscheinen von Pilzmyzel, u. a. deshalb, weil die Membranen der Männchen-Vorfütterung hier für die Weibchen übernommen worden waren. Doch auch Behandlung [2], wo dank NYS 100 der Pilz erst später auftrat, war erfolglos. Der einmalige Austausch des Futterblutes war für die Bedürfnisse der Aduften offensichtlich völlig unzureichend.

Ein häufigerer Blutwechsel (3x / d; verteilt über 24 h), gepaart mit der Verwendung sauberer Membranen beim Zusammenbringen der ungesogenen Weibchen mit den vorgefütterten Männchen führte zu 40 - 60 % selbständig abgefallener Weibchen (> 200 mg), bezogen auf alle in den Versuch gebrachten. Etwa 50 % der *in vivo* Körpermasse wurden

erreicht. Es kam zur Eiablage und zum Schlupf vitaler Larven bei der Hälfte der an d 4 fixierten Weibchen. Ausgehend von allen auf die Membran gesetzten Weibchen, waren dies bei ca. einem Viertel der Fall.

Eine Verringerung der Blutwechsel-Frequenz auf arbeitnehmerfreundlichere 2x pro Tag war möglich, ohne signifikante Einbußen in der Fortpflanzungsleistung der Weibchen verzeichnen zu müssen. Doch hingen, wie schon im ersten Abschnitt besprochen, diese Leistungen hier stärker vom Tag des Abfallens des Weibchen ab.

Schütteln der Fütterungsgläser

Das Hin- und Herbewegen der Fütterungsgläser verhinderte das Absetzen von Blutzellen und sorgte möglicherweise auch für eine bessere Sauerstoffversorgung des Blutes (hellere Farbe). Die Vorfütterung der in den betreffenden Experimenten eingesetzten Männchen hatte auf Kaninchen stattgefunden, um den Effekt des Schüttelns auf die Entwicklung der Weibchen zu betonen. In geschüttelten Behandlungen erreichte eine deutlich größere Anzahl Weibchen eine Körpermasse über 200 mg. Die mittlere Körpermasse selbständig abgefallener Weibchen war aber im Vergleich zu ungeschüttelten Behandlungen nicht verschieden. Der Wert von 200 mg entsprach etwa dem 7fachen der Körpermasse ungesogener Weibchen und ca. 8 % der mittleren Masse *in vivo* vollgesogener abgefallener Weibchen. Wie bereits in Kapitel 2.11.2. ausgeführt, war dies *in vivo* etwa die untere Grenze für eine Eiablage der Weibchen (Balashov, 1972) und für einen gleichförmigen, von einem weiteren Anstieg der Körpermasse unabhängigen Eier-Konversionfaktor (Norval, 1974). Die Eier-Konversionsfaktoren der Behandlungen [12B] und [18] im Schüttelbad gehörten zu den höchsten (0.34) aller *in vitro* Behandlungen mit gleichfalls *in vivo* vorgefütterten Männchen (Weibchen *in vivo*: 0.57). Zusätzlich wiesen diese Versuche die größte Anzahl an Weibchen > 200 mg auf. Da keine weiteren Fortpflanzungsdaten aufgezeichnet wurden, bleibt es bei der Vermutung, daß durch Schütteln der Fütterungsgläser, der Schlupf vitaler Larven vorausgesetzt, der Anteil larvenproduzierender Weibchen sowie die fertile Eier-Produktion deutlich gesteigert werden könnte.

Selbst im extrem pilzverseuchten Versuchsblock III wurde der Anteil selbständig abgefallener Weibchen (> 200 mg) durch das Schütteln versiebenfacht. Eier wurden in diesem Fall indes nicht gelegt. Der Spitzentag des Abfallens änderte sich durch das Schütteln nicht.

Offensichtlich konnten die adulten Zecken wenigstens teilweise von der durch das Schütteln verbesserten Vermischung des Blutes profi-

tieren. Dies steht im Gegensatz zu den Nymphen, die in geschüttelten Fütterungsgläsern gar eine reduzierte Körpermasse aufwiesen. Unter zwei Annahmen ließe sich dieser Widerspruch klären: 1) Die ständige, bei dieser Form des Schüttelns auftretende Beschleunigung hat einen negativen Einfluß auf Nymphen und Adulte. 2) Subadulte Stadien wie die Nymphen können sich wahrscheinlich auch auf Erythrozyten-ärmerem Blut vollsaugen und entwickeln, wie von Kemp *et al.* (1975) an *B. microplus* beobachtet worden war, und Adulte wären auf eine komplettere Diät angewiesen. Im vorliegenden Falle "litten" dann sowohl Nymphen als auch Adulte unter dem Schütteln, die Adulten würden aber alles in allem daraus einen Vorteil ziehen können. Interessant wären Versuche, in denen durch sanfteres Schütteln der potentiellen Nachteil dieser Art der Blutvermischung wegfiel.

UV-C-Bestrahlung

Im Gegensatz zu den Nymphen war die Entwicklung der Weibchen durch die Bestrahlung der Membran-Unterseite (täglich 5 min) in keiner Weise beeinträchtigt. Vermutlich schützt die 10x dickere Wiener Silikon-Membran (0,5 mm) die Adulten vor den Strahlen. Die Desinfektion durch UV-C stünde als Alternative zur Verfügung, wenn auf Fungizide im Futterblut verzichtet werden soll.

Zirkadiane Rhythmik

Abgefallene Weibchen wurden *in vitro* typischerweise nachts bzw. morgens auf den Membranen angetroffen und zeigten somit auch bei künstlicher Fütterung eine zirkadiane Rhythmik. Bei Larven und Nymphen von *A. hebraeum* beobachtete Rechav (1978) das Abfallen vom Wirt am späten Nachmittag und frühen Abend. Weibchen von *A. variegatum* (auf Ziegen) bevorzugten dazu die frühen Vormittagsstunden (Barré, 1989). Wharton & Utech (1969) schlossen aus Beobachtungen an *B. microplus*, daß die Zecken nach Eintritt der Dunkelphase (d. h. Wechsel von hell nach dunkel) auf ein Lichtsignal warteten, das den nächsten Morgen signalisiert und zum Abfallen vom Wirt anregt. Dieses "Morgenlicht" nach einer dunklen Nacht wurde *in vitro* möglicherweise durch den nachts, aber bei hellem Licht erfolgten Blutwechsel simuliert. Die nächste Kontrolle auf abgefallene Zecken fand erst wieder beim darauffolgenden Bluttausch in der Hellphase statt. Es kann daher nicht gesagt werden, ob der beginnende "Tag" oder der kurze Lichteinfluß während der Nacht

das Abfallen eingeleitet hat und wann dies genau geschah. Die vorliegende Literatur zu Weibchen von *A. hebraecum* ließ diesbezüglich keinen Vergleich mit den *in vitro* Resultaten zu.

Mit ihren wirtsunabhängigen, kontrollierbaren Bedingungen böte die künstliche Fütterung nach kleineren Änderungen, wie z. B. Blutwechsel nur am "Tag", "nachts" bei Rot- oder Schwachlicht oder automatisiert, ein interessantes Werkzeug für weitergehende Experimente zu diesem Thema.

Künstliche Adulte

Im Gegensatz zu den guten Ergebnissen *in vitro* gefütterter Larven und Nymphen (F₁-*in vitro* Generation) zeigten *in vitro* künstliche Weibchen im Vergleich zu natürlichen eine erniedrigte Fähigkeit sich fortzupflanzen. Zum Ausdruck kam dies besonders in der spärlichen Anzahl Weibchen, die, einmal fixiert, nach dem Blutmahl Larven produzierten. Dies ist zur Zeit noch der limitierende Faktor für eine *in vitro*-Zucht. Die Limitierungen dieser Weibchen bezüglich erreichter Körpermasse, dem Eier-Konversionsfaktor und der Prä-Ovipositionsdauer schienen eher an die Abwesenheit eines lebenden Wirtes und damit an die Qualität der *in vitro* Ernährung *per se* und nicht an den Ursprung der Adulten (natürlich / künstlich) gekoppelt zu sein.

Mögliche Gründe der beschränkten Fortpflanzung der Weibchen

Daß es den Weibchen in der Phase der schnellen Blutaufnahme am d 8 / 9 an Erythrocyten mangelt, ist wenig wahrscheinlich. Nehmen wir einmal einen Zuwachs an Körpermasse um 3 g in den letzten 8 h der Blutmahlzeit an. Ein Weibchen, das nur 20 % des aufgesaugten, defibrierten Blutes als Konzentrat im Darm zurückhält und den größten Teil des Restes in Form von Wasser und Na⁺ und Cl⁻-Ionen ins Fütterungsglas zurückpumpt, würde insgesamt 15 ml Blut pro Fütterungsglas benötigen. Es enthielt aber 20 ml, die zudem dreimal täglich erneuert wurden. Auch waren die Fütterungsergebnisse von Weibchen, die sich einzeln oder zu fünf am selben Tag über einer Membran vollsaugten, nicht verschieden. Dies erlaubt den Schluß, daß die jedem Weibchen beim Vollsaugen zur Verfügung stehende Blutmenge kein begrenzender Faktor war.

In vivo wird der Fraßort um die Zecken-Mundwerkzeuge herum als Teil der entzündlichen Reaktion des Wirtes von einer großen Anzahl polymorphkerniger, neutrophiler Leukozyten bevölkert (Walker &

Fletcher, 1986; Tatchell & Moorhouse, 1968). Diese Zellen fehlen natürlich in der *in vitro* Situation. Wurde nun aber die Zahl dieser Zellen in mit *Rhipicephalus sanguineus* infestierten Hunden durch die Injektion von Mechlorethamin (Senfgas) künstlich niedrig gehalten, saugten sich die Weibchen dennoch wie gewöhnlich voll und produzierten vitale Larven (Tatchell & Moorhouse, 1970). Daher könnte man vermuten, daß die Abwesenheit solcher Zellen *in vitro* auch die Entwicklung von *Amblyomma*-Weibchen nicht beeinträchtigen sollte.

Voigt *et al.* (1993) berichteten von besseren Ergebnissen für *A. variegatum* Weibchen *in vitro*, wenn diese das komplettere Heparin-Blut anstatt defibriertes Blut zu sich genommen hatten. Doch überschritt die von diesen Autoren genannte Zecken-Körpermasse (relativ zu *in vivo*) nicht die, ebenfalls auf *in vivo* bezogenen Werte für *A. hebraeum* auf defibriertem Blut. Die positiven Ergebnisse mit *A. hebraeum* Nymphen auf heparinisiertem Blut sprechen dafür, daß mit solchem Blut auch Weibchen von *A. hebraeum* eine höhere Körpermasse erreichen könnten.

Die o. g. Autoren verzeichneten eine gesteigerte Körpermasse von weiblichen *A. variegatum* durch die Erhöhung der Kohlendioxid-Konzentration (4.5 - 5 %) der Umgebungsluft. Eigene Experimente mit *A. hebraeum* bei normalen (0.03 %) CO₂-Werten brachten zwar vergleichbaren Leistungen (jeweils bezogen auf *in vivo*), doch sollte in zukünftigen Versuchen mit *A. hebraeum* auf jeden Fall die Wirkung von CO₂ getestet werden.

Die Verwendung von Mikrobiziden im Futterblut wirft natürlich die Frage auf, ob eventuell dadurch in den Zecken enthaltene symbiotische, z. B. für die Versorgung mit Vitaminen benötigte Mikroorganismen, geschädigt würden. Es gibt keine klaren Beweise für das Vorhandensein derartiger Symbionten in Zecken. Der Bakterienstamm *Wolbachia* (Rickettsiales) wird zwar in allen Geweben der meisten Zeckenarten angetroffen, doch erachtet man ihn eher als einen Kommensalen, also unschädlichen, aber auch unnützen 'Begleiter', denn als einen unverzichtbaren Symbionten (Überblick in Balashov, 1972). Möglicherweise könnten Fungizide aus dem Futterblut hefe-ähnliche, extrazelluläre Mikroorganismen (*Adlerocystis spec.*) beeinträchtigen, wie sie aus den Anhangdrüsen der männlichen Geschlechtsorgane bei allen Schildzeckenspezies bekannt sind (Feldman-Muhsam, 1970, 1974, 1986). Sekrete aus diesen Drüsen förderten bei der Lederzecke *Ornithodoros parkeri* die weibliche Eientwicklung (Oliver, 1986).

Als ein weiterer, möglicher Grund sei ein ganz einfacher, mechanischer genannt. Die Zecken fixierten sich auf den Membranen der Fütterungsgläser meist nahe des Glasrandes. Im Laufe der dramatischen Zunahme des Körpervolumens in der letzten Phase des Saugaktes, könnte womöglich aufgrund eines durch Hebelkräfte bewirktes, einfaches Hineinziehen der Mundwerkzeuge in die 0.5 mm dicke Membran, die Blutaufnahme behindert worden sein. Fütterungsversuche mit Adulten auf dünneren, aber dennoch stabilen Membranen wären zur Lösung dieser Frage hilfreich.

Die Rolle der Männchen

Obwohl die Fortpflanzungsleistungen der Weibchen die detailliertesten Informationen über den Effekt einer bestimmten Behandlung liefern, darf die Rolle der Männchen nicht vernachlässigt werden. In manchen Behandlungen wurden die Männchen auf Kaninchen vorgefüttert; in diesen Fällen handelte es sich also nicht um eine *in vitro* Fütterung der Adulten im strengen Sinne. So war aber gewährleistet, daß nur sexuell tatsächlich gereifte Männchen mit den ungesogenen Weibchen *in vitro* zusammenkamen und die Ergebnisse der Weibchen auf deren eigene *in vitro* Ernährung zurückgeführt werden konnten.

Die *in vitro* Vorfütterung von Männchen fand mit einem (Behandlungen [A - D]) oder zwei Blutwechselln täglich statt (Behandlung [F]; NYS 100 statt NYS 10). Die Körpermasse von Weibchen im Paar mit *in vitro* vorgefütterten Männchen (1x Blutwechsel / d) war signifikant niedriger als die von Weibchen gepaart mit vom Kaninchen stammenden Männchen. Es waren jedoch keine solchen Unterschiede mit den Männchen aus Behandlung [F] festzustellen. Daraus läßt sich schließen:

- Bei den, mit einem Bluttausch pro Tag *in vitro* vorgefütterten Männchen ist ein für das Vollsaugen der Weibchen wichtiger Faktor nicht oder nur in geringerem Maße vorhanden.
- Dieser Mangel wird teilweise behoben, wenn die Männchen mit zweimaligem Blutwechsel täglich und höherer Fungizid-Dosis (NYS 100) vorgefüttert werden.

Die Qualität der *in vitro* Vorfütterung der Männchen hat demnach Einfluß auf die Fütterungs- und Fortpflanzungsergebnisse der späteren Partnerinnen.

In vitro wurde beobachtet, daß manche Männchen nicht während der gesamten Blutmahlzeit des Weibchen bei diesem fixiert blieben, wie

es *in vivo* der Fall ist (Norval, 1974). Sehr wahrscheinlich hat die Verweildauer beim Weibchen aber zur Begattung ausgereicht, da auf dem Wirt die Übergabe der ersten von möglicherweise mehreren Spermatophoren vom Männchen in die weibliche Genitalöffnung häufig bereits 20 min nach Beginn des Umklammerens abgeschlossen war (Norval, 1974).

Barré (1989) entfernte aus Gruppen von auf Ziegen saugenden *A. variegatum* Paaren nach 2, 4, 6, 8, oder 5 Tagen die Männchen. Je kürzer die Zeit war, die Männchen bei ihren Partnerinnen beiessen wurden, desto geringer war die weibliche Körpermasse, deren Eier-Konversionsfaktor, Larvenschlupfrate und der Anteil an larvenproduzierenden Weibchen. Blieben die Paare mindestens 8 d zusammen, näherten sich die Werte der Kontrolle (15 d). Kürzere Verweilzeiten der Männchen führten indes zu gestörter Fortpflanzungsfähigkeit, ähnlich wie sie in eigenen Versuchen mit *A. hebraeum* Weibchen anzutreffen waren. Allgemein gesprochen, war somit der körperliche Kontakt zwischen beiden Geschlechtern während möglichst des ganzen Saugaktes für eine normale Fortpflanzung unverzichtbar.

Eine individuelle Markierung alleinstehender Zeckenweibchen oder solcher, die bis zum Abfallen von der Membran im Paar mit einem Männchen waren, wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Es ist auch nicht bekannt, welches Geschlecht die Kopulation vorzeitig beendet hat. Der Anteil jener Weibchen, die zusammen mit einem Männchen fixiert waren, lag im Durchschnitt zwischen 50 % und 70 %. Demzufolge waren 30 - 50 % aller fixierten Weibchen bei ihrer Blutmahlzeit früher oder später ohne Partner. Man fand, daß ein Männchen im Laufe der Zeit mehrere Spermatophoren an seine Partnerin übergeben kann und daß die erste Spermatophore manchmal auch steril sein kann (Oliver, 1982; Feldman-Muhsam, 1986). Dies kann ein Grund sein für die Unfruchtbarkeit mancher, zu früh von ihrem männlichen Partner getrennten Weibchen. Es erklärt zwar die geringe Fruchtbarkeit vieler Weibchen – jedoch nur zum Teil, denn, obwohl manche Weibchen bis zum Ende mit einem Männchen zusammen saugten, waren die Fortpflanzungsleistungen stets geringer als *in vivo*, namentlich der Eier-Konversionsfaktor. Und dies selbst dann noch, wenn die Männchen auf dem Kaninchen vorgefüttert worden waren. Das schließt zwar nicht aus, daß der mechanischen Stimulus des Umklammerseins durch das Männchen wichtig sein könnte, doch ist es sicher nicht der einzige Faktor. Anscheinend verlieren selbst einwandfreie, *in vivo* vorgefütterte Männchen bereits nach kurzer Blut-

aufnahme *in vitro* an Vitalität und es stellt sich eine ähnliche Schwächung wie bei *in vitro* vorgefütterten Exemplaren ein.

Die Aussendung der sogenannten Aggregations-Fixierungs-Pheromone ONP, BEA und TMP durch die Männchen beginnt *in vivo* nach 3 - 5 d der Blutaufnahme (Apps *et al.*, 1988). Von diesem Moment an nimmt die ausgesandte Pheromon-Menge mit der Länge der Blutmahlzeit zu. Diehl *et al.* (1991) fanden bei ONP Emissionsraten von bis zu 280 ng / h / Männchen. Wahrscheinlich werden noch andere, als Sexpheromone dienende Substanzen wie z. B. 2,6-DCP und weitere, die Kopulation einleitende, weniger flüchtige Stoffe von beiden Geschlechtern gebildet (Sonenshine, 1985). Es fragt sich, inwieweit diese Pheromone zur ordnungsgemäßen Kopulation und zum optimalen Abschluß der Blutmahlzeit der *A. hebraeum* Weibchen beitragen. Möglicherweise war die Menge und Qualität der Pheromone *in vitro* reduziert.

Pappas & Oliver (1971) studierten Männchen und Weibchen von *Dermacentor variabilis*, die gleichzeitig und in nächster Nähe (ca. 4 mm Abstand) auf Kaninchen Blut aufnahmen. Durch ein Gitter wurden die Zecken aber am gegenseitigen Berühren gehindert. Keines der Weibchen saugte sich voll. Die Autoren schlossen daraus, daß dazu mehr als die Wahrnehmung von Pheromonen oder der eventuelle Austausch von Substanzen über das Wirtsblut nötig seien. Als diese Autoren (1972) daraufhin mit strahlensterilisierten Männchen (*D. variabilis*) experimentierten zeigte sich, daß bei der Übergabe der Spermatophore beteiligte männliche Sekrete, die Spermatophore selbst oder ihr Inhalt, aber nicht die eigentliche Befruchtung der Eizellen für das Vollsaugen weiblicher Zecken verantwortlich war. Eier wurden in gewohnter Menge gelegt, waren aber unfruchtbar. Oliver *et al.* (1975) testeten dann an *Amblyomma americanum* zerkleinerte männliche Genital-Anhangsdrüsen, Agar, Gummi, Draht oder Sandkörner, die sie in die weibliche Geschlechtsöffnung einführten, um auf diese Weise die Sekrete, die Spermatophore bzw. die Mundwerkzeuge von Männchen bei der Paarung zu simulieren. Während unbehandelte, männerlose Kontrollweibchen und die mit Genitaldrüsenmaterial Injizierten praktisch kein Blut aufnahmen, erreichten die wie oben geschildert behandelten Weibchen maximal ein Viertel (Agar, Sandkörner) der Körpermasse normal begatteter Artgenossinnen, legten jedoch keine Eier. Weder Substanzen aus den männlichen Genitaldrüsen, noch mechanische Reizung alleine war der rechte Stimulus für die Weibchen, sich vollzusaugen.

Diese Aufstellung unterstreicht die Bedeutung einer komplikationslosen, normalen Kopulation für das Vollaugen, die Eientwicklung und Fruchtbarkeit der Weibchen. Die Paarung bei Schildzecken mit seinem räumlich und zeitlichem Zusammenspiel flüchtiger und nicht-flüchtiger Substanzen, mechanischen Reizen und fein abgestimmten Verhaltensweisen bietet eine Vielzahl von Punkten, an denen eine suboptimale *in vitro* Diät unerwünschten Einfluß nehmen könnte. Einige davon wurden angesprochen.

4.3.6.4. Infestierung von Rindern mit künstlichen Adulten

Nach der Blutmahlzeit auf dem Rind erreichte die Körpermasse von Weibchen aus rein künstlichen und F₁-*in vitro* Paaren 90 % bzw. 80 % des Wertes rein natürlicher Paare. Der Eier-Konversionsfaktor war > 0.55 und entsprach der Kontrolle (bei natürlichen Paaren *in vitro*: 0.27, Behandlung [17G]). Auch die anderen gemessenen, biologischen Größen der Weibchen lagen meist nur wenig unter den Kontrollwerten. Besonders deutlich wird die Wichtigkeit einer optimalen Fütterung beim Vergleich rein künstlicher Paare *in vitro* (Behandlung [17F]) mit solchen auf dem Rind [I]. Der Hauptmangel künstlicher Weibchen *in vitro*, nämlich die sehr geringe Zahl larvenproduzierender Weibchen, konnte durch Vollaugen auf dem Rind wieder wettgemacht werden.

Bei der Fütterung natürlicher Männchen mit künstlichen Weibchen trat bei der Hälfte der vollgesogen abgefallenen Weibchen ein Phänomen auf, was sonst nur vereinzelt zu beobachten war: normale Körpermasse, aber kugelige, pralle Gestalt und keine Eiablage. Beim Sezieren fielen die unter Druck stehende Hämolymphe und der nur spärlich mit Blut gefüllte Darm auf. Möglicherweise lag eine Funktionsstörung der Speicheldrüsen vor, welche normalerweise in dieser Phase des Saugaktes aus dem Darm in die Hämolymphe eingeströmtes Wasser und Ionen (Na⁺; Cl⁻) zurück in den Wirt transportieren. Das, wie in diesem Falle, gehäufte Auftreten solcher Weibchen könnte zufallsbedingt sein und müßte erst durch Wiederholungen bestätigt werden, bevor ein Zusammenhang mit der speziellen Geschlechterkombination diskutiert werden kann.

Künstliche Zecken und selbst solche, die bereits aus einem *in vitro* Generationswechsel hervorgegangen waren und *in vitro* zwei weitere Entwicklungsstadien durchlaufen haben, erlangten bei optimaler Ernäh-

rung auf dem Rind praktisch ihre normale Fortpflanzungsfähigkeit zurück.

Die Rückführung künstlicher Zecken auf den Wirt hat gezeigt, daß diese nicht bei der *in vitro* Fütterung durch Mangel an Nährstoffen, Mikrobizide oder Mikrobentoxine irreversibel geschädigt worden waren. Sie würde sich zum "Auffrischen" eines künstlich gezüchteten Zeckenstammes anbieten, solange die *in vitro* Diät für Adulte noch nicht optimales ist.

4.4. Zu beiden *in vitro* Fütterungssystemen

Versuche, unter Beibehaltung aller anderen Faktoren nur den Einfluß des benutzten Fütterungssystems (Durchfluß-Fütterungskammer bzw. Fütterungsglas) auf die Entwicklungsparameter der Zecken zu testen, wurden nicht unternommen. Zu groß blieben die praktischen Probleme mit dem zu Beginn der Arbeit eingesetzten Durchfluß-System, zu offensichtlich waren die Vorteile der später konzipierten, einfachen Fütterungsgläser. Die folgende Liste schildert die wichtigsten Vor- und Nachteile beider Systeme. Die negative Bewertung der DFK wurde teilweise durch die Probleme mit Pilzmyzelien bewirkt.

Die Durchfluß-Fütterungskammer

- + Die Beobachtung und Manipulation der Zecken waren sehr gut möglich.
- Alle geplanten, mutmaßlichen Vorteile des Systems wie a) die ständige Zufuhr unbenutzten Blutes, b) die Flexibilität beim kurzfristigen und genau dosierbaren Zusatz von Substanzen, c) die automatische Aufrechterhaltung der anfänglichen Versuchsbedingungen bei minimalem Arbeitsaufwand blieben jedoch in der Praxis unerreicht. Grund dafür waren häufige Verstopfungen durch Blutgerinnsel und Pilzmyzel mit der Folge von Totalausfall der ganzen Versuchseinheit (in diesem Falle: der gesamten Behandlung) oder zumindest unreproduzierbaren Versuchsbedingungen. Systematische Vergleiche zwischen Behandlungen wurden so praktisch unmöglich. Bei Vermeidung solcher Blockierungen durch feinere Filterung des gesammelten, defibrinierten Blutes und bei Kontrolle von Pilzwachstum durch mehr Sauber-

keit und wirksame Fungizide könnten künftig die o. g. potentiellen Vorteile des Systems zur Geltung kommen.

- Die Zahl der selbst bei einwandfreiem Versuchsablauf zu erntenden Zecken stand in keinem vernünftigen Verhältnis zum Arbeits- und Materialaufwand.
- Der Aufbau und die Betreuung waren kompliziert.
- Die Benutzung sensibler Membranen war aufgrund wechselnder Druckverhältnisse im Blut nicht möglich.
- Die Reinigung des Systems während des Versuchs war nur unvollkommen.
- Maximal waren 2 Behandlungen mit je 1 Versuchseinheit durchführbar.

Die Fütterungsgläser

- + Der Umgang mit den Ressourcen war deutlich effizienter: Es ergab sich eine 20- 50fach größere Versuchskapazität gegenüber dem Durchfluß-System bei gleichem Zeitaufwand und Verbrauch an Blut und Substanzen.
- + Aufbau und Betreuung waren sehr einfach.
- + Die Kontrolle über Kontaminanten war besser möglich.
- + Die Benutzung delikater Membranen wurde erleichtert, da gleichbleibende Druckverhältnisse im Fütterungsglas herrschten.
- + Die Reinigung des Systems während des Versuchs verlief zufriedenstellend.
- + Maximal 9 Behandlungen mit je 5 Versuchseinheiten waren parallel durchführbar.
- Die Beobachtung und insbesondere Manipulation der Zecken war nur schlecht möglich.

4.5. Akarizid-Test *in vitro* mit *A. hebraeum* Nymphen

Ivermectin (IVM) wurde anfangs gegen Nematoden eingesetzt. Es ist von Substanzen abgeleitet, die ursprünglich aus Mikroorganismen, den myzelartig wachsenden Bakterien der Gattung *Streptomyces*, isoliert worden waren. Die bekannte akarizide Wirkung von IVM (Kaufman *et al.*, 1986; Überblick in Campbell, 1989) konnte auch *in vitro* dosisabhängig (1 ppm und 10 ppm) bestätigt werden. Bereits bei 1 ppm saugte keine der Nymphen mehr genügend Blut, um sich weiterentwickeln zu können und die Hälfte der Zecken war spätestens am d 10 n. l. tot. Offensichtlich reichte dazu schon die Aufnahme einer geringen Menge IVM-behandelten Blutes.

Wie bereits diskutiert, ergab die Nymphen-Fütterung auf Rindern je nach Wirtstier stark schwankende Resultate. Der vorgestellte *in vitro*-Test erlaubt, die Kontrolle, Plazebo, Standard-Akarizid sowie die zu prüfenden Substanzen in verschiedenen Dosen gleichzeitig mit dem Blut ein und desselben Spender-Tieres durchzuführen. Daraus resultiert eine erhöhte Sicherheit bei der Beurteilung der Testergebnisse.

4.6. Ausblick

Mit der vorliegenden Arbeit ist versucht worden, einen vertieften Einblick in die für eine erfolgreiche *in vitro* Zucht wichtigen Faktoren zu geben. Daraus resultierten einige Verbesserungsvorschläge für zukünftige Projekte dieser Art.

Wenn keimarme Bedingungen vorliegen, sollte zur Vermeidung der mühsamen manuellen Blutwechsel das Durchfluß-Fütterungssystem noch einmal in abgeänderter, einfacherer Form aufgegriffen werden. Denkbar wäre z. B. eine langgestreckte, 2 mm tiefe Fütterungskammer aus poliertem oder mit Teflon beschichtetem Metall (1 cm breit, 20 cm lang). Durch den einfachen, glatten inneren Aufbau wäre sie leichter sauberzuhalten und so die Gefahr des Verstopfens geringer. Eine dauerhafte Befestigung der Membran auf dem Rand der Fütterungskammer mit Silikon-Klebstoff sollte einer Klammervorrichtung gegenüber bevorzugt werden. Nach dem Versuch ist das Silikon problemlos mit entsprechenden Mitteln (z. B. Panasolve® 215, Panacol/Elosol AG, CH-

8034 Zürich) ablösbar. Zur Senkung des Blutverbrauchs könnte z.B. eine Zeitzuhr-gesteuerte Pumpe den Blutwechsel $8x / d$ jeweils binnen einiger Minuten vornehmen.

Mit den Fütterungsgläsern sollte für Larven und Nymphen ein einmaliger, für Adulte ein zweimaliger Blutwechsel probiert werden. Die Suche nach einer völlig synthetischen, sehr dünnen Membran für *B. microplus* Larven sollte fortgesetzt werden. Für adulte *Amblyomma* drängen sich Tests mit dünneren, weicheren und größeren Membranen auf. Heparinisiertes Blut wäre defibriniertem vorzuziehen und der Zusatz von ATP und GSH im allgemeinen verzichtbar. Der Einsatz anderer potentieller Saugstimuli, z. B. 2,3-DPG, könnte sich, trotz des hohen Preises, zumindest versuchsweise lohnen. Es bestünde die Möglichkeit, die Fungizid-Dosis zu verringern und die Fütterungsgläser in größeren Zeitabständen langsam zu schütteln. Zur besseren Konservierung des gelagerten Futterblutes wären eventuell Antioxidantien (z. B. Vitamin C, E; Mannitol etc.) von Nutzen. Zur Erhöhung der Blutqualität während der Fütterung könnten z. B. Vitamine des B - Komplexes, Phospholipide oder essentielle Fettsäuren hinzugefügt werden. Angeregt werden soll auch die Entwicklung einer synthetischen Diät für Zecken, aufbauend auf den Erfahrungen mit Tsetsefliegen (Kabayo *et al.*, 1985).

Bei dem beschriebenen *in vitro* Akarizid-Tests mit Nymphen würde eine Reduzierung der Membranfläche und Blutmenge je Fütterungsgläser und der Gebrauch sterilisierter, vorgefertigter Einmal-Fütterungsgläser die Effizienz und Sicherheit steigern können. Außerdem bieten sich weitere Anwendungen der *in vitro* Fütterung an, wie z. B. biochemische Studien mit radioaktiv markierten Substanzen, Untersuchungen mit von Zecken übertragenen Pathogenen, Einsatz zur Entwicklung von Zeckenimpfstoffen oder Tests von abstoßenden und fraßhemmenden Substanzen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

- Versuche mit einer ständig von neuem Blut durchströmten Fütterungskammer waren zu anfällig gegenüber Pilzkontaminationen und zum Füttern größerer Mengen von Zecken zu ineffizient. Einfache Fütterungsgläser mit einem Glasrohreinsatz (Außendurchmesser 42 mm) waren erheblich praktischer. Über das untere Ende des Glasrohres waren matrixgestützte Silikon-Membranen oder klebstoffimpregnierete Baudruche-Membranen gespannt. Das verfütterte Rinderblut wurde wöchentlich unsteril am Schlachthof gesammelt und 1 - 3 x pro Tag gewechselt. Die Fütterungsgläser standen bis zur Höhe des Blutes in einem 38°C-Wasserbad bei Umgebungsbedingungen von 23 - 33°C / 80% r.F. und normaler CO₂-Konzentration. Das Blut enthielt Gentamicin und Nystatin als Mikrobizide und zusätzlich Glukose, ATP und Glutathion.
- Das Festsetzen der Zecken auf den Membranen wurde durch Kombinationen von Wirtstierhaaren, Kot der jeweiligen Zeckenart, Salzlösung, Rinderhaar-Extrakt und einem synthetischen Aggregations-Fixierungs-Pheromongemisch (*Amblyomma*) angeregt. Larven und Männchen von *Amblyomma hebraeum* fixierten sich zu etwa einem Drittel, Weibchen zur Hälfte, vorgefütterte Männchen zu fast 90 % und Nymphen zu mehr als 90 %. Bei Nymphen und Adulten von *Amblyomma variegatum* waren es 40 - 70 %. Adulte *Boophilus microplus* fixierten sich etwa zur Hälfte auf klebstoffbeschichteten PTFE (Teflon)- oder dünnen Silikon-Membranen mit Rinderhaar-Extrakt und Rinderhaaren als Stimuli. Alle *in vitro* gefütterten Arten und Stadien (außer *Ixodes ricinus*) entwickelten wie auf dem Wirt Zementscheiden um ihre Mundwerkzeuge herum.
- Hämolyisiertes oder mit ATP / Glutathion versetztes, defibriertes Blut verringerte, heparinisiertes Vollblut erhöhte die von saugenden *A. hebraeum* Nymphen erreichte Körpermasse. Für Weibchen dieser Art war das Schüttein der Fütterungsgläser von Vorteil. Bei diesen war es möglich, das Fungizid im Futterblut durch tägliche UV-C-Bestrahlung der Membran-Unterseite zu ersetzen.

- Larven der einwirtigen Rinderzecke *B. microplus* entwickelten sich über das Nymphen-Stadium zu ungesogenen Adulten auf klebstoffbeschichteten Membranen aus Tierdarm. Weibchen erreichten die halbe natürliche Körpermasse und legten Eier ab.
- Der Lebenszyklus von *A. hebraeum* wurde *in vitro* durch aufeinanderfolgendes Füttern aller Entwicklungsstadien (Larven, Nymphen, Adulte) auf Silikon-Membranen geschlossen.
- Die Männchen beider *Amblyomma* Arten zeigten das typische Klammerverhalten ('claspig') nach mehreren Tagen der Blutaufnahme *in vitro*, aber nicht spontan und weniger intensiv als auf dem Wirt. Dies wird als Ausdruck geringerer sexueller Reife infolge eines Mangels im Futterblut angesehen.
- Die Ergebnisse legen nahe, bei der *in vitro* Fütterung von Adulten künftig dem sexuellen Entwicklungszustand der Männchen mehr Bedeutung zuzumessen.
- Eine suboptimale *in vitro* Ernährung hatte größere Konsequenzen für die Produktion von Nachkommen als für die Häutung der Zecken, wie das gute Abschneiden der Larven und Nymphen besonders von *A. hebraeum* zeigt.
- Bei adulten *B. microplus*, *A. variegatum* und *A. hebraeum* nahm die Fortpflanzungsfähigkeit nach der *in vitro* Fütterung stark ab, vermutlich wegen verminderter Blutqualität. Diese Beeinträchtigung war größtenteils reversibel, wie an F₁-*in vitro* Zecken (*A. hebraeum*) nach Fütterung auf dem Rind gezeigt werden konnte.
- Die Toxizität des systemischen Akarizids Ivermectin für Nymphen von *A. hebraeum* wurde durch Einsatz der *in vitro* Fütterungsmethode bestätigt.
- Die vorgestellte Methode bietet neue *in vitro* Möglichkeiten sowohl für die Zeckenzucht, als auch u. a. für Tests systemischer Akarizide, Fraßhemmer und Repellenzien. Sie erlaubt aufgrund standardisierter Fütterung eine sichere Interpretation der Testergebnisse.

6. SUMMARY

- A feeding chamber, continuously supplied with new blood, proved too susceptible to fungal contamination and not efficient enough for feeding large numbers of ticks *in vitro*. Simple feeding units made of honey jars with an inner glass tube (9 cm long, o. d. 42 mm), were far more practical. Reinforced silicone membranes or baudruche membranes impregnated with glue were stretched across the bottom end of the tube. Weekly open-collected bovine blood from the slaughter house served as nutrient and was changed 1-3 times a day. The feeding jars were held, up to the level of the blood, in a waterbath (38° C). Conditions on the climatized workbench where the feeding was carried out, were 23 - 33° C / 80 % r.h. at ambient CO₂ levels. The blood contained the microbicides gentamicin and nystatin and additionally glucose, ATP and glutathion.
- Attachment of ticks on the membranes was induced with combinations of host hair, conspecific tick faeces, saline, bovine pelage extract and a synthetic aggregation attachment pheromone mixture (*Amblyomma*). Larvae and males of *Amblyomma hebraeum* had attachment rates around 30 %, females around 50 %, pre-fed males of nearly 90 % and nymphs of more than 90 %. Nymphs and adults of *Amblyomma variegatum* attached at 40 - 70 %. Almost half of adult *Boophilus microplus* attached on thin membranes of silicone or PTFE (Teflon) sealed with glue, both covered with bovine pelage extract and bovine hair. All instars of the species fed *in vitro*, with the exception of *Ixodes ricinus*, developed cement cones around their mouthparts as they do it on the host.
- Hemolyzed or ATP / glutathion supplemented defibrinated blood decreased the body mass gain of feeding *A. hebraeum* nymphs, heparinized whole blood increased it. Females of this species profited by the permanent shaking of the feeding jars. Here, it was also possible to replace the fungicide in the nutrient with daily exposure of the underside of the membrane to UV-C rays.

- Larvae of the one-host cattle tick *B. microplus* were bred through the nymphal to the unfed adult stage on baudruche membranes impregnated with glue. Females gained half of the natural body mass and laid eggs.
- The life-cycle of *A. hebraeum* was completed *in vitro* by consecutive feeding of all life-stages (larvae, nymphs, adults) on silicone membranes.
- Males of both *Amblyomma* species showed the typical 'clasping' behaviour after feeding for several days *in vitro*, albeit less spontaneous and intense than on the host. This is presumably due to a lower sexual maturity owing to a lack in the blood.
- The results suggest a greater importance be placed on the level of male sexual maturity in future *in vitro* feeding experiments.
- A suboptimal *in vitro* nutrition was more fatal for the production of offspring than for the moult of ticks, as demonstrated by the good results for larvae and nymphs, particularly those of *A. hebraeum*.
- in adult *B. microplus*, *A. variegatum* and *A. hebraeum* the reproductive capacity was strongly impaired, presumably in consequence of the low quality of the blood. This deterioration was reversible for the most part, as it could be shown by feeding the first generation of *in vitro* fed ticks (*A. hebraeum*) on cattle.
- The toxicity of the systemic acaricide Ivermectin for nymphs of *A. hebraeum* was confirmed using the *in vitro* feeding method.
- The method presented offers new *in vitro* possibilities for tick rearing as well as for tests with systemic acaricides, antifeedants and repellents. The results obtained in experiments with systemic agents are easier to interpret due to the standardised nutrient.

7. RÉSUMÉ

- Des expériences faites avec une chambre de nutrition traversée constamment par du sang neuf se sont montrées trop sensibles aux contaminations de champignons et pas assez efficaces pour nourrir un grand nombre de tiques *in vitro*. Des unités de nutrition très simples, basées sur des bocaux à miel et complétées à l'intérieur par un tube en verre (longueur 9 cm, d. e. 42 mm) ont été nettement plus pratiques. Des membranes en silicone renforcé et d'autres en baudruche imprégnées avec de la colle ont été tendues sur le fond du tube. Le sang de bovin, prélevé non-stérilement une fois par semaine à l'abattoir, a servi comme liquide nutritif et a été changé 1 - 3 fois par jour. Ces bocaux de nutrition se trouvaient jusqu'au niveau du sang dans un bain-marie (38° C). Les conditions de la chambre climatisée où les expériences se déroulaient, étaient de 23 - 33° C / 80 % h.r. au taux normal de CO₂. Le sang a été complété avec des microbicides (gentamicin et nystatin) et avec du glucose, de l'ATP et du glutathion.
- Les tiques se sont attachées sur les membranes grâce à différentes combinaisons de poils de bovin, d'excréments de tiques conspécifiques, d'une solution de sel, d'un extrait de poil de bovin et d'un mélange synthétique des phéromones "d'agrégation et de fixation" (*Amblyomma*). Les larves et les mâles de *Amblyomma hebraeum* se sont fixés à un tiers, les femelles à la moitié, les mâles préalablement nourris presque à 90 % et les nymphes à plus de 90 %. Nymphes et adultes de *Amblyomma variegatum* se sont attachés à 40 - 70 %. Presque la moitié des adultes de *Boophilus microplus* se sont fixés sur des membranes fines en silicone ou PTFE (Teflon), rendues étanches avec de la colle et toutes les deux couvertes de poils de bovin et d'un extrait de celui-ci. Tous les stades et espèces nourris *in vitro*, à part *Ixodes ricinus*, ont développé du ciment autour de leurs pièces buccales comme sur un hôte.
- Du sang défibriné soit hémolysé ou suppléé d'ATP et glutathion a réduit l'accroissement de poids d'engorgement des nymphes de *A. hebraeum in vitro*, tandis que le sang entier héparinisé l'a augmenté. Des femelles de cette espèce se sont mieux développées, quand les bocaux de nutrition étaient agités en permanence. Dans ce cas, il était

possible de remplacer le fongicide dans le liquide nutritif par une exposition journalière de la face inférieure de la membrane aux rayons UV-C.

- Des larves de la tique à hôte-unique *B. microplus* ont été élevées du stade de nymphe au stade d'adulte sur des membranes en baudruche imprégnées avec de la colle. Des femelles ont atteint la moitié du poids naturel et ont pondu des oeufs.
- Le cycle de vie de *A. hebraeum* a été formé *in vitro* en nourrissant consécutivement tous les stades de développement (larve, nymphe, adulte) sur des membranes en silicone.
- Des mâles des deux espèce de *Amblyomma* ont montré le comportement typique de 'clasping' après avoir pris un repas sanguin pendant plusieurs jours *in vitro*, cependant moins spontané et moins intense que sur l'hôte à cause d'une maturité sexuelle réduite due à un manque dans le sang.
- Les résultats suggèrent d'attribuer plus d'importance à l'état sexuel des mâles lors des futures expériences de nutrition *in vitro*.
- Un repas sanguin *in vitro* sous-optimal est plus fatal en ce qui concerne la production de la descendance qu'il ne l'est pour la mue des tiques, ce qui est démontré clairement par les bons résultats des larves et des nymphes, en particulier de *A. hebraeum*.
- Chez les adultes de *B. microplus*, *A. variegatum* et *A. hebraeum* la fertilité a diminué fortement après la nutrition *in vitro* vraisemblablement à cause de la qualité réduite du sang. Cette détérioration est réversible pour la plupart, comme montrée par la nutrition de la F₁-*in vitro* génération sur des bovins.
- La toxicité de l'acaricide systémique Ivermectin pour les nymphes de *A. hebraeum* a été confirmé en utilisant la méthode de nutrition *in vitro*.
- La méthode présentée offre de nouvelles possibilités *in vitro* pour l'élevage de tiques ainsi que pour des tests des acaricides systémiques, des 'anti-feedants' et 'repellents'. Les résultats obtenus *in vitro* avec des produits systémiques sont plus facilement interprétables du fait d'un repas sanguin standardisé.

8. DANK

Mein Dank gilt Prof. P.A.Diehl und Dr. P.M.Guerin für die Initiierung und Betreuung des *in vitro* Projektes und der Schweizer Stiftung Forschung 3R (Refine, Reduce, Replace), CH-3110 Münsingen, für dessen Finanzierung.

Ich bedanke mich bei Marcel Rohrer und Dr. J.Jonczy (Ciba, Landwirtschaftliche Versuchsstation, CH-1566 St.Aubin), die mir freundlicherweise die Zecken zur Verfügung stellten, sowie bei Dr. J.F.Graf (Ciba) für seine Zusammenarbeit.

Ferner danke ich PD Dr. O.Petrini (Mikrobiologisches Institut, ETH-Zürich) für die Bestimmung von Pilzmyzelien, Dr. E.Luger und Dr. U.Feldmann (IAEA Sektion Entomologie, Seibersdorf, A-Wien) für die Terylene®-verstärkten Silikon-Membranen, Martin Gerber (Janssen Pharmaceutica AG, CH-6340 Baar) für Fungizid-Proben und Jacqueline Moret (Universität Neuchâtel) für Rat in statistischen Fragen.

Ich danke Thomas Kröber und Michèle Vlimant für ihre technische Unterstützung, Albin Collaud für den Bau der Fütterungseinheiten, Josiane Pont für ihre Hilfe in der Bibliothek und Frank Schröder für sein Interesse und Engagement. Merci.

9. TABELLENVERZEICHNIS

Nummer / Titel.....	Seite
Tab. 1-1 -- Systematische Stellung der verwendeten Zeckenarten --	2
Tab. 1-2 -- Literaturüberblick zur <i>in vitro</i> Fütterung von Schildzecken --	13
<hr/>	
Tab. 2-1 -- Verwendete Substanzen --	19
Tab. 2-2 -- Zusätzliche Substanzen im Putterblut --	23
Tab. 2-3 -- Alle untersuchten Membranen im Überblick --	38
Tab. 2-4 -- Membranen für Fixierungs- und Fütterungsversuche --	41
Tab. 2-5 -- Membran-Typen, sortiert nach Zeckenart und -stadium --	43
Tab. 2-6 -- Verzeichnis einzelner Fixierungsstimuli --	46
Tab. 2-7 -- Benutzte Kombinationen von Fixierungsstimuli --	47
Tab. 2-8 -- Behandlungsübersicht <i>Amblyomma hebraeum</i> Nymphen --	50
Tab. 2-9 -- Behandlungsübersicht <i>A. hebraeum</i> Adulte --	51
<hr/>	
Tab. 3-1 -- <i>In vitro</i> Fixierung von <i>Boophilus microplus</i> --	63
Tab. 3-2 -- <i>In vitro</i> Fixierung von <i>Amblyomma variegatum</i> --	65
Tab. 3-3 -- <i>In vitro</i> Fixierung von <i>A. hebraeum</i> Nymphen: Einfluß der Versuchsböcke (3 Blutwechsel / d) --	66
Tab. 3-4 -- <i>In vitro</i> Fixierung von <i>A. hebraeum</i> Nymphen: Einfluß von zusätzlichem ATP / GSH --	67
Tab. 3-5 -- <i>In vitro</i> Fixierung von <i>A. hebraeum</i> Nymphen: Einfluß ständigen Schüttelns --	67
Tab. 3-6 -- <i>In vitro</i> Fixierung von <i>A. hebraeum</i> Nymphen: Einfluß verschiede- ner Pheromon-Herkunft --	68
Tab. 3-7 -- <i>In vitro</i> Fixierung von <i>A. hebraeum</i> Nymphen: Einfluß der Versuchsböcke (2 Blutwechsel / d) --	69
Tab. 3-8 -- <i>In vitro</i> Fixierung von <i>A. hebraeum</i> Nymphen verschiedenen Ursprungs --	70
Tab. 3-9 -- <i>In vitro</i> Fixierung ungesogener <i>A. hebraeum</i> Männchen --	71
Tab. 3-10 -- <i>In vitro</i> Fixierung adulter <i>A. hebraeum</i> --	72
Tab. 3-11 -- Pilzmyzel in unterschiedlichen Blutzubereitungen --	75
Tab. 3-12 -- Blut-Pilzkulturen unter verschiedenen Mikrobixid-Gaben --	76

Nummer / Titel	Seite
Tab. 3-13 -- Einfluß verschiedener Mikrobizid-Gaben auf H ₂ S-Geruch im Futterblut --	81
Tab. 3-14 -- Entwicklung von <i>A. hebraeum</i> Larven <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> --	87
Tab. 3-15 -- Entwicklung natürlicher und künstlicher <i>A. hebraeum</i> Nymphen <i>in vitro</i> --	95
Tab. 3-16 -- Entwicklung natürlicher und künstlicher <i>A. hebraeum</i> Weibchen <i>in vitro</i> --	101
Tab. 3-17 -- Entwicklung von <i>A. hebraeum</i> Nymphen <i>in vitro</i> auf Ivermectin-behandeltem Blut --	107
Tab. 3-18 -- Der Effekt von Ivermectin auf die <i>in vitro</i> Entwicklung von <i>A. hebraeum</i> Nymphen --	108
<hr/>	
Tab. 12-1 -- <i>In vitro</i> Fixierung von <i>Amblyomma hebraeum</i> Nymphen: Einfluß von Mikrobiziden und UV-C Strahlen --	178
Tab. 12-2 -- <i>In vitro</i> Fixierung von <i>A. hebraeum</i> Nymphen: Einfluß verschiedener Behandlungen --	178
Tab. 12-3 -- Entwicklung von <i>A. hebraeum</i> Nymphen <i>in vitro</i> (Versuchsblock 1) --	179
Tab. 12-4 -- Entwicklung von <i>A. hebraeum</i> Nymphen <i>in vitro</i> (Versuchsblock 2) --	180
Tab. 12-5 -- Entwicklung von <i>A. hebraeum</i> Nymphen <i>in vitro</i> (Versuchsblock 3) --	181
Tab. 12-6 -- Entwicklung von <i>A. hebraeum</i> Nymphen <i>in vitro</i> (Versuchsblock 4) --	182
Tab. 12-7 -- Entwicklung von <i>A. hebraeum</i> Weibchen <i>in vitro</i> (Versuchsblock II) --	183
Tab. 12-8 -- Entwicklung von <i>A. hebraeum</i> Weibchen <i>in vitro</i> (Versuchsblock III) --	184
Tab. 12-9 -- Entwicklung von <i>A. hebraeum</i> Weibchen <i>in vitro</i> (Versuchsblock IV) --	185
Tab. 12-10 -- Entwicklung von <i>A. hebraeum</i> Weibchen <i>in vitro</i> (Versuchsblock V) --	186
Tab. 12-11 -- Abhängigkeit dreier gemessener biologischer Größen vom 'Tag des Abfallens' <i>in vitro</i> bei <i>A. hebraeum</i> Weibchen --	187
Tab. 12-12 -- Zusammenhang zwischen drei gemessenen biologischen Größen und dem 'Tag des Abfallens' von <i>A. hebraeum</i> Weibchen auf pilzinfiziertem Blut <i>in vitro</i> --	188
Tab. 12-13 -- Entwicklung künstlicher <i>A. hebraeum</i> Weibchen auf dem Rind	189

10. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Nummer / Titel.....	Seite
Abb. 2-1 – Temperatur und relative Feuchte an der Rinderhaut –	15
Abb. 2-2 – Aufbau des Durchfluß-Fütterungssystems –	32
Abb. 2-3 – Aufbau der Durchfluß-Fütterungskammer –	33
Abb. 2-4 – Prinzip der Fütterungsgläser –	36
<hr/>	
Abb. 3-1 – <i>In vitro</i> Fixierung von <i>Amblyomma hebraeum</i> Nymphen: Einfluß der Besatzdichte –	68
Abb. 3-2 A-F – Pilzmyzel <i>in vitro</i> in verschiedenen Behandlungen –	78
Abb. 3-3 A / B – Körpermasse vollgesogener <i>A. hebraeum</i> Nymphen nach Abfallen vom Rind (A) bzw. von der Membran (B) –	89
Abb. 3-4 A-F – % Körpermasse <i>in vitro</i> vollgesogener <i>A. hebraeum</i> Nymphen bezogen auf <i>in vitro</i> Kontrolle (100 %) –	92
Abb. 3-5 – <i>In vitro</i> Körpermasse vollgesogener <i>A. hebraeum</i> Nymphen: Einfluß der Besatzdichte –	93
Abb. 3-6 A / B – Typische Häufigkeitsverteilung der Körpermasse <i>in vitro</i> vollgesogener <i>A. hebraeum</i> Nymphen –	94
Abb. 3-7 – Körpermasse vollgesogener Weibchen von <i>A. hebraeum</i> auf Rindern –	97
Abb. 3-8 A / B – Typischer Zeitraum des Abfallens von der Membran bei vollgesogenen <i>A. hebraeum</i> Weibchen –	102
Abb. 3-9 – Die Vollendung des Lebenszyklus von <i>A. hebraeum in vitro</i> – ..	104
Abb. 3-10 – <i>In vitro</i> Körpermasse aller gesogenen Entwicklungsstadien von <i>A. hebraeum</i> relativ zu Werten auf dem Rind –	106
<hr/>	
Abb. 12-1 – Vorrichtung zur UV-C-Bestrahlung der Membran-Unterseite von Fütterungsgläsern –	177

11. LITERATUR

- AESCHLIMANN A. 1972. *Ixodes ricinus*, Linné, 1758 (Ixodoidea; Ixodidae): Essai préliminaire de synthèse sur la biologie de cette espèce en Suisse. *Acta Tropica (Basel)* 29: 321-340.
- ALLAN S.A., PHILLIPS J.S., DEMAR TAYLOR & DANIEL E. SONENSHINE 1988. Genital sex pheromones of ixodid ticks: evidence for the role of fatty acids from the anterior reproductive tract in mating of *Dermacentor variabilis* and *Dermacentor andersoni*. *Journal of Insect Physiology* 34: 315-323.
- ALLAN S.A., PHILLIPS J.S. & SONENSHINE D.E. 1991. Role of genital sex pheromones in *Amblyomma americanum* and *A. maculotum* (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology* 11: 9-21.
- ALTMAN P.L. & DITTMER D.S. (Editor) 1974. *Biological Data Book. Second Edition, Vol. III*. pp. 1493-1494. Federation of American Societies for Experimental Biology, Bethesda, Maryland.
- ANONYMUS 1979. *Wissenschaftliche Tabellen Geigy*. (Herausgegeben von Ciba-Geigy AG) Basel.
- APPS P.J., VILJOEN H.W. & PRETORIUS V. 1988. Aggregation pheromones of the bont tick *Amblyomma hebraeum*: identification of candidates for bioassay. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 55: 135-137.
- ARLIAN L.G. & VYSZENSKI-MOHER D.L. 1995. Response of *Sarcoptes scabiei* var. *canis* (Acari: Sarcoptidae) to Lipids of Mammalian Skin. *Journal of Medical Entomology* 32: 34-41.
- BALASHOV Y.S. 1964. The amount of blood taken up by ixodid ticks (Acarina, Ixodidae) during feeding. *Zoologicheskii zhurnal* 43: 418-423. (englische Zusammenfassung des russischen Artikels)
- BALASHOV Y.S. 1972. Bloodsucking ticks (Ixodoidea) - Vectors of diseases of man and animals. *Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America* 8: 161-376. (NAMRU-Übersetzung des russischen Originals von 1968)
- BARRÉ N. 1989. *Biologie et écologie de la tique Amblyomma variegatum (Acarina: Ixodina) en Guadeloupe (Antilles Françaises)*. Dissertation, Université Paris-Sud Centre Orsay.
- BAUER B. & WETZEL H. 1976. A new membrane for feeding *Glossina morsitans* Westw. (Diptera, Glossinidae). *Bulletin of Entomological Research* 65: 563-567.
- BENZON G.L. & APPERSON C.S. 1987. An electrically heated membrane blood-feeding device for mosquito colony maintenance. *Journal of the American Mosquito Control Association* 3: 2: 322-323.

- BERGER R.S. 1972. 2,6-Dichlorophenol, sex pheromone of the lone star tick. *Science* 177: 704-705.
- BURG J.G., KNAPP F.W. & SILAPANUNTAKUL S. 1993. Replacement Times, Storage, and Vertebrate Host Source of Blood for *In Vitro* Feeding of *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) Adults. *Journal of Medical Entomology* 30: 753-757.
- BUTLER L.I. & McDONOUGH L.M. 1979. Insect sex pheromones: Evaporation rates of acetates from natural rubber septa. *Journal of Chemical Ecology* 5: 825-837.
- CAMINO-LAVIN M. 1980. *The development of an integrated pest management system for the cattle tick, Boophilus microplus (Canestrini, 1887) in Morelos State, Mexico.* Dissertation, University of Florida (zitiert nach BARRÉ, 1989).
- CAMPBELL W.C. (Editor) 1989. *Ivermectin and abamectin.*, Springer-Verlag, New York.
- CENTURIER C. & KLIMA R. 1979. Ein Beitrag zur Kenntnis der Biologie von *Amblyomma variegatum* (Fabricius, 1794). *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* 87: 131-142.
- CHABAUD A.-G. 1950. Sur la nutrition artificielle des tiques. *Annales de parasitologie humaine et comparée* 25: 42-47.
- DE BRUYNE M. & GUERIN P.M. 1994. Isolation of 2,6-dichlorophenol from the cattle tick *Boophilus microplus*: Receptor cell responses but no evidence for a behavioural response. *Journal of Insect Physiology* 40: 143-154.
- DE KRUIJFF B., GERRITSEN W.J., OERLEMANS A., DEMEL R.A. & VAN DEENEN L.L.M. 1974. Polyene Antibiotic-Sterol Interactions in Membranes of *Acholeplasma laidlawii* Cells and Lecithin Liposomes. I. Specificity of the Membrane Permeability Changes Induced by the Polyene Antibiotics. *Biochimica et Biophysica Acta* 339: 30-43.
- DENNEMANN H. 1961. Enzymatische Bestimmung von Adenosin-triphosphat im Vollblut. *Zeitschrift der Gesellschaft für experimentelle Medizin* 134: 335-340 (zitiert nach FELDMANN, 1988).
- DIEHL P.A., AESCHLIMANN A. & OBENCHAIN F.D. 1982. Tick reproduction: oogenesis and oviposition. In: *Physiology of ticks*, (Edited by OBENCHAIN F.D. & GALUN R.), pp. 278-350. Pergamon Press, Oxford.
- DIEHL P.A., GUERIN P.M., VLIMANT M. & STEULLET P. 1991. Biosynthesis, production site, and emission rates of aggregation-attachment pheromone in males of two *Amblyomma* ticks. *Journal of Chemical Ecology* 17: 833-847.
- DONZÉ G. & GUERIN P.M. 1994. Behavioral attributes and parental care of *Varroa* mites parasitizing honeybee brood. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 34: 305-319.

- DOUBE B.M. & KEMP D.H. 1979. The influence of temperature, relative humidity and host factors on the attachment and survival of *Boophilus microplus* (Canestrini) larvae to skin slices. *International Journal for Parasitology* 9: 449-454.
- DOWNING D.T., STEWART M.E., WERTZ P.W., COLTON S.W., ABRAHAM W. & STRAUSS J.S. 1987. Skin lipids: an update. *Journal of Investigative Dermatology* 88: ?-?.
- DUSBÁBEK F., SIMEK P., JEGOROV A. & TRÍSKA J. 1991. Identification of xanthine and hypoxanthine as components of assembly pheromone in excreta of argasid ticks. *Experimental and Applied Acarology* 11: 307-316.
- FALK-VAIRANT J. 1991. *Phéromones sexuelles chez Boophilus microplus; biologie, comportement et électrophysiologie*. Travail de diplôme, Université de Neuchâtel.
- FALK-VAIRANT J., GUERIN P.M., DE BRUYNE M. & ROHRER M. 1994. Some observations on mating and fertilization in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Medical and Veterinary Entomology* 8: 101-103.
- FELDMAN-MUHSAM B., BORUT S. & SALITERNIK-GIVANT S. 1970. Salivary secretion of the male tick during copulation. *Journal of Insect Physiology* 16: 1945-1949.
- FELDMAN-MUHSAM B. & BORUT S. 1971. Copulation in Ixodid ticks. *Journal of Parasitology* 57: 630-634.
- FELDMAN-MUHSAM B. 1970. Yeast-like symbionts of the genital system of ticks. *Journal of Parasitology* 56: 421.
- FELDMAN-MUHSAM B. 1974. Extracellular symbionts of tick sperm. *Recherches Biologiques Contemporaines* 4. trim.: 47-55.
- FELDMAN-MUHSAM B. 1986. Observations on the mating behaviour of ticks. In: *Morphology, physiology, and behavioral biology of ticks*, (Edited by SAUER J.R. & HAIR J.A.), pp. 217-232. Ellis Horwood Ltd., Chichester.
- FELDMANN U. 1988. *Beiträge zur Verbesserung der Massenzucht von Glossina palpalis palpalis (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Glossinidae) für die Anwendung der Sterilen Insekten Technik*. Dissertation, Universität Bonn.
- FOURIE L.J. & KOK D.J. 1995. A quantitative study on pre- and post-feeding insemination in the Karoo paralysis tick *Ixodes rubicundus* (Acari: Ixodidae). *Medical and Veterinary Entomology* 9: 98-99.
- FRIEND W.G. & STOFFOLANO J.G. 1990. Feeding responses of the horsefly, *Tabanus nigrovittatus* (Diptera; Tabanidae) to purinergic phagostimulants. *Journal of Insect Physiology* 36: 805-812.
- GALUN R. & KINDLER S.H. 1965. Glutathione as an inducer of feeding in ticks. *Science* 147: 166-167.

- GALUN R. & KINDLER S.H. 1968. Chemical basis of feeding in the tick *Ornithodoros tholozani*. *Journal of Insect Physiology* 14: 1409-1421.
- GALUN R. & RICE M.J. 1971. Role of blood platelets in haematophagy. *Nature* 233: 110-111.
- GALUN R. 1987a. The evolution of purinergic receptors involved in recognition of a blood meal by hematophagous insects. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz Rio de Janeiro* 82, suppl. 3: 5-9.
- GALUN R. 1987b. Regulation of blood gorging. *Insect Science and its Applications* 8: 623-635.
- GALUN R., AVI-DOR Y. & BAAR-ZEEV M. 1963. Feeding response in *Aedes aegypti*: stimulation by adenosine triphosphate. *Science* 142: 1674-1675.
- GARDINER B.O.C. & MADDRELL S.H.P. 1972. Techniques for routine and large-scale rearing of *Rhodnius prolixus*. *Bulletin of Entomological Research* 61: 505-515.
- GARRIS G.I. 1984. Colonization and life cycle of *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae) in the laboratory in Puerto Rico. *Journal of Medical Entomology* 21: 86-90.
- GEORGOPAPADAKOU N.H. & WALSH J.W. 1994. Human Mycoses: Drugs and Targets for Emerging Pathogens. *Science* 264: 371-373.
- GIGON F. 1985. *Biologie d'Ixodes ricinus L. sur le Plateau Suisse - Une contribution à l'écologie de ce vecteur*. Dissertation, Université de Neuchâtel.
- GRAF J.-F. 1974. *Ecologie et éthologie d'Ixodus ricinus L. en Suisse (Ixodoidea: Ixodidae) Troisième note: Copulation, nutrition et ponte*. *Acarologia* 16: 636-642.
- GRAF J.-F. 1976. *Contribution à l'étude de la biologie d'Ixodes ricinus L. (Ixodoidea: Ixodidae): Copulation, nutrition et ponte*. Dissertation, Université de Neuchâtel.
- GRAF J.-F. 1978. *Copulation, nutrition et ponte chez Ixodes ricinus L. (Ixodoidea: Ixodidae) - 3e partie*. *Bulletin de la Société Entomologique Suisse* 51: 343-360.
- GREGSON J.D. 1935. A preliminary report of the lizard-tick relationship on the coast of British Columbia. *Proceedings of the Entomological Society of British Columbia* 31: 17-21 (zitiert nach KEMP ET AL., 1982).
- GREGSON J.D. 1947. Feeding periods prerequisite to the mating of *Dermacentor andersoni*: (Acarina). *Entomological Society of British Columbia* 43: 3-6.

- GUERIN P.M., STEULLET P., KROBER T., GRENACHER S., DIEHL P.A., VUIMANT M., DE BRUYNE M., CORDAS T., FALK-VAIRANT J., KUHNERT F. & LOSEL P.M. 1992. The chemical ecology of ticks at the host vector interface. In: *Proceedings of the 1st International Conference on Tick-borne Pathogens at the Host-Vector Interface: an Agenda for Research*, (Edited by MUNDERLOH U.G. & KURTIL T.J.), pp. 314-323. Minnesota University, Saint Paul, Minnesota.
- HABEDANK B. & HIEPE TH. 1993. In-vitro-Fütterung von Zecken, *Dermacentor nuttalli*, OLENEV 1928 (Acari: Ixodidae) über eine Silikonmembran. *Dermatologische Monatsschrift* 179: 292-295.
- HABEDANK B., HIEPE TH. & MONTAG C. 1994. Untersuchungen zur In-vitro-Fütterung von Zecken - Argasidae und Ixodidae. *Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie* 16: 107-114.
- HAGEN H.E. & GRUNEWALD J. 1990. Routine blood-feeding of *Aedes aegypti* via a new membrane. *Journal of the American Mosquito Control Association* 6: 535-536.
- HAMDY B.H. 1972. Biochemical and physiological studies of certain ticks (Ixodoidea). Nitrogenous excretory products of *Argas (Persicargas) arboreus* Kaiser, Hoogstraal & Kohls, and of other argasid and ixodid species. *Journal of Medical Entomology* 9: 346-350.
- HAMILTON J.G.C. & SONENSHINE D.E. 1988. Evidence for occurrence of mounting sex pheromone on body surface of female *Dermacentor variabilis* (Say) and *Dermacentor andersoni* (Stiles) (Acari: Ixodidae). *Journal of Chemical Ecology* 14: 401-410.
- HAMILTON J.G.C., PAPADOPOULOS E., HARRISON S.J., LLOYD C.M. & WALKER A.R. 1994. Evidence for a mounting sex pheromone in the brown ear tick *Rhipicephalus appendiculatus*, Neuman 1901 (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology* 18: 331-338.
- HAMILTON J.G.C., SONENSHINE D.E. & LUSBY W.R. 1989. Cholesteryl oleate: mounting sex pheromone of the hard tick *Dermacentor variabilis* (Say) (Acari: Ixodidae). *Journal of Insect Physiology* 35: 873-879.
- HESS E. & DE CASTRO 1986. Field tests of the response of female *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae) to the synthetic aggregation-attachment pheromone and its components. *Experimental and Applied Acarology* 2: 249-255.
- HINDLE E. & MERRIMAN G. 1912. The sensory perception of *Argas persicus* (Oken). *Parasitology* 5: 203-216.
- HOKAMA Y., LANE R.S. & HOWARTH J.A. 1987. Maintenance of Adult and Nymphal *Ornithodoros coriaceus* (Acari: Argasidae) by Artificial Feeding Through a Parafilm Membrane. *Journal of Medical Entomology* 24: 319-323.

- HOSOI T. 1958. Adenosine-5'-phosphates as the stimulating agent in blood for inducing gorging of the mosquito. *Nature* 181: 1664-1665 (zitiert nach GALUN & KINDLER, 1968).
- HOWARTH J.A. & HOKAMA Y. 1983. Artificial feeding of adult and nymphal *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) during studies on bovine anaplasmosis. *Journal of Medical Entomology* 20: 248-256.
- ISSMER A.E. & GRUNEWALD J. 1993. Künstliche Membranfütterung von Schildzecken. In: *Kurzfassung Poster, Tagung der Deutschen Gesellschaft für allgemeine und angewandte Entomologie*, 23.-27. März 1993, Jena.
- JONES L.D., DAVIES C.R., STEELE G.M. & NUTTALL P.A. 1988. The rearing and maintenance of ixodid and argasid ticks in the laboratory. *Animal Technology* 39: 99-106.
- JOYNER L.P. & PURNELL R.E. 1968. The feeding behaviour on rabbits and *in vitro* of the ixodid tick *Rhipicephalus appendiculatus* Neumann, 1901. *Parasitology* 58: 715-723.
- KABAYO J.P., TAHER M. & VAN DER VLOEDT A.M. 1985. Development of a synthetic diet for *Glossina* (Diptera: Glossinidae). *Bulletin of Entomological Research* 75: 635-640.
- KAUFMAN W.R. & PHILLIPS J.E. 1973. Ion and water balance in the ixodid tick *Dermacentor andersoni*. I. Routes of ion and water excretion. *Journal of Experimental Biology* 58: 523-536.
- KAUFMAN W.R. 1983. The Function of Tick Salivary Glands. In: *Current Topics in Vector Research*, (Edited by HARRIS K.F.), pp. 215-247. Praeger-Scientific, New York.
- KAUFMAN W.R., UNGARIAN S.G. & NOGA A.E. 1986. The effect of Avermectins on feeding, salivary fluid secretion, and fecundity in some ixodid ticks. *Experimental and Applied Acarology* 2: 1-18.
- KEMP D.H. 1978. *In vitro* culture of *Boophilus microplus* in relation to host resistance and tick feeding. In: *Tick-borne diseases and their vectors*, (Edited by WILDE J.K.H.), pp. 95-99. University of Edinburgh, Edinburgh.
- KEMP D.H. & BOURNE A.S. 1980. *Boophilus microplus*: the effect of histamine on the attachment of cattle tick-larvae - studies *in vivo* and *in vitro*. *Parasitology* 80: 487-496.
- KEMP D.H., AGBEDE R.I.S., JOHNSTON L.A.Y. & GOUGH J.M. 1986. Immunization of Cattle Against *Boophilus microplus* Using Extracts Derived from Adult Female Ticks: Feeding and Survival of the Parasite on Vaccinated Cattle. *International Journal for Parasitology* 16: 115-120.
- KEMP D.H., KOUDESTAAL D., ROBERTS J.A. & KERR J.D. 1975. Feeding of *Boophilus microplus* larvae on a partially defined medium through thin slices of cattle skin. *Parasitology* 70: 243-256.

- KEMP D.H., STONE B.F. & BINNINGTON K.C. 1982. Tick attachment and feeding: role of the mouthparts, feeding apparatus, salivary gland secretions, and the host response. In: *Physiology of ticks*, (Edited by OBENCHAIN P.D. & GALUN R.L.), pp. 119-168. Pergamon, Oxford.
- KINSKY S.C. 1970. *Annual Review of Pharmacology*. 10: 119-142 (zitiert nach DE KRUIJFF ET AL., 1974).
- KINSKY S.C. 1971. In: *Antibiotics*, (Edited by GOTTLIEB D. & SHAW P.D.), pp. 122-141. Springer Verlag, Berlin (zitiert nach DE KRUIJFF ET AL., 1974).
- KLUNKER R. 1979. Überblick über die in-vitro Fütterung blutsaugender Arthropoden. *Angewandte Parasitologie* 20: 88-108.
- KNIGHT J.A., SEARLES D.A. & BLAYLOCK R.C. 1993. Lipid Peroxidation Compared in Stored Whole Blood with Various Nutrient-anticoagulant Solutions. *Annals of Clinical and Laboratory Science* 23: 178-183.
- KOGAN P.H. 1990. Substitute blood meal for investigating and maintaining *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 27: 709-712.
- KUBERKA H. 1989. *Beeinflussung der Eigenschaften von Erythrocyten durch Oligoamine*. Dissertation, Freie Universität Berlin.
- LANGLEY P.A. & PIMLEY R.W. 1978. Rearing triatomine bugs in the absence of a live host and some effects of diet on reproduction in *Rhodnius prolixus*. *Bulletin of Entomological Research* 68: 243-250.
- LEAHY M.G., VANDEHEY R. & GALUN R. 1973. Assembly pheromone(s) in the soft tick *Argas persicus* (Oken). *Nature* 246: 515-517.
- LEAHY M.G., KARUHIZE G., MANGO C. & GALUN R. 1975. An assembly pheromone and its perception in the tick *Ornithodoros moubata* (Murray) (Acari: Argasidae). *Journal of Medical Entomology* 12: 284-287.
- LECONTE Y., ARNOLD G., TROUILLER J., MASSON C., CHAPPE B. & OURISSON, G. 1989. Attraction of the parasitic mite *Varroa* to the drone larvae of honeybees by simple aliphatic esters. *Science* 245: 638-639.
- LEES A.D. 1946. The water balance in *Ixodes ricinus* L. and certain other species of ticks. *Parasitology* 37: 1-20 (zitiert nach SNOW, 1970).
- LEES A.D. 1948. The sensory physiology of the sheep tick, *Ixodes ricinus*. *Journal of Experimental Biology* 25: 145-207.
- LOOMIS E.C. 1971. Rearing of *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae) on the laboratory rabbit. *Annals of the Entomological Society of America* 64: 598-603.

- LUSBY W.R., SONENSHINE D.E., YUNKER C.E., NORVAL R.A.I. & BURRIDGE M.J. 1991. Comparison of known and suspected pheromonal constituents in males of the African ticks, *Amblyomma hebraeum* Koch and *Amblyomma variegatum* (Fabricius). *Experimental and Applied Acarology* 13: 143-152.
- MANGO C.K.A. & GALUN R. 1977. *Ornithodoros moubata*: Breeding *In vitro*. *Experimental Parasitology* 42: 282-288.
- MEWS A.R., BAUMGARTNER H., LUGER D. & OFFORI E.D. 1976. Colonisation of *Glossina morsitans morsitans* in the laboratory using *in vitro* feeding techniques. *Bulletin of Entomological Research* 65: 631-642.
- MEWS A.R., LANGLEY P.A., PIMLEY R.W. & FLOOD P.F. 1977. Large scale rearing of tsetse flies in the absence of a living host. *Bulletin of Entomological Research* 67: 119-128.
- MOORHOUSE D.E. 1969. The attachment of some Ixodid ticks to their natural hosts. In: *Proceedings of the 2nd International Congress of Acarology*, (Edited by EVANS G.O.), pp. 319-327. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- MOORHOUSE D.E. & TATCHELL R.J. 1966. The feeding processes of the cattle-tick *Boophilus microplus* (Canestrini): A study in host-parasite relations. Part I. Attachment to the host. *Parasitology* 56: 623-632.
- MOSKALYK L.A. & FRIEND W.G. 1994. Feeding behaviour of female *Aedes aegypti*: effects of diet temperature, bicarbonate and feeding technique on the response to ATP. *Physiological Entomology* 19: 223-229.
- NORVAL R.A.I. 1974. The life cycle of *Amblyomma hebraeum* Koch, 1844 (Acarina: Ixodidae). *Journal of the Entomological Society of South Africa* 37: 357-367.
- NORVAL R.A.I., ANDREW H.R. & YUNKER C.E. 1989a. Pheromone-mediation of Host-Selection in Bont Ticks (*Amblyomma hebraeum* Koch). *Science* 243: 364-365.
- NORVAL R.A.I., BUTLER J.F. & YUNKER C.E. 1989b. Use of carbon dioxide and natural or synthetic aggregation-attachment pheromone of the bont tick, *Amblyomma hebraeum*, to attract and trap unfed adults in the field. *Experimental and Applied Acarology* 7: 171-180.
- NORVAL R.A.I., PETER T. & MELTZER M.I. 1992a. Comparison of the attachment rates of males of the ticks *Amblyomma hebraeum* and *A. variegatum* to cattle, sheep and rabbits in the absence of aggregation-attachment pheromone. *Experimental and Applied Acarology* 15: 145-152.
- NORVAL R.A.I., PETER T., MELTZER M.I., SONENSHINE D.E. & BURRIDGE M.J. 1992b. Responses of the ticks *Amblyomma hebraeum* and *A. variegatum* to known or potential components of the aggregation-attachment pheromone. IV. Attachment stimulation of nymphs. *Experimental and Applied Acarology* 16: 247-253.

- NORVAL R.A.I., PETER T., YUNKER C.E., SONENSHINE D.E. & BURRIDGE M.J. 1991. Responses of the ticks *Amblyomma hebraeum* and *A. variegatum* to known or potential components of the aggregation-attachment pheromone. II. Attachment stimulation. *Experimental and Applied Acarology* 13: 19-26.
- NUÑEZ J.A. & LAZZARI C.R. 1990. Rearing of *Triatoma infestans* Klug (Het., Reduviidae) in the absence of a living host. *Journal of Applied Entomology* 109: 87-92.
- NUÑEZ J.L., MUÑOZ-COBEÑAS M.E. & MOLTEDO H.L. 1985. *Boophilus microplus*, the common cattle tick. Springer, Berlin.
- OBENCHAIN F.D. 1984. Behavioural interactions between the sexes, and aspects of species specificity pheromone mediated aggregation and attachment in *Amblyomma*. In: *Acarology VI* Vol.1, (Edited by GRIFFITHS D.A. & BOWMAN C.E.), pp. 387-392. Ellis Horwood, Chichester.
- OKU H., NAKANISHI T., KUMAMOTO K. & CHINEN I. 1990. Distribution of branched-chain fatty acid in the skin surface lipid of laboratory animals. *Comparative Biochemistry and Physiology* 96B: 475-482.
- OLIVER J.H., JR., MURPHY R.W. & OBENCHAIN F.D. 1975. Reproduction in ticks (Acari: Ixodoidea). 4. Effects of mechanical and chemical stimulation on oocyte development in *Amblyomma americanum*. *Journal of Parasitology* 61: 782-784.
- OLIVER J.H., JR. 1982. Tick Reproduction: Sperm Development and Cytogenetics. In: *Physiology of ticks*, (Edited by OBENCHAIN F.D. & GALUN R.L.), pp. 245-271. Pergamon, Oxford.
- OLIVER J.H. JR. 1986. Induction of oogenesis and oviposition in ticks. In: *Morphology, physiology, and behavioral biology of ticks*, (Edited by SAUER J.R. & HAIR J.A.), pp. 233-247. Ellis Horwood Ltd., Chichester.
- OSBORNE R.W. & MELLOR P.S. 1985. Use of a silicone membrane feeding technique in the laboratory maintenance of a colony of *Ornithodoros moubata*. *Tropical Animal Health and Production* 17: 31-38.
- OTIENO D.A., HASSANALI A., OBENCHAIN F.D., STERNBERG A. & GALUN R. 1985. Identification of guanine as an assembly pheromone of ticks. *Insect Science and its Applications* 6: 667-670.
- PAPPAS P.J. & OLIVER J.H., JR. 1971. Mating necessary for complete feeding of female *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *Journal of the Georgia Entomological Society* 6: 122-124.
- PAPPAS P.J. & OLIVER J.H., JR. 1972. Reproduction in ticks (Acari: Ixodoidea). 2. Analysis of the stimulus for rapid and complete feeding of female *Dermacentor variabilis* (Say). *Journal of Medical Entomology* 9: 47-50.

- PHELAN P.L., SMITH A.W. & NEEDHAM G.R. 1991. Mediation of host selection by cuticular hydrocarbons in the honeybee tracheal mite *Acaris woodi* (Rennie). *Journal of Chemical Ecology* 17: 463-473.
- PIERCE A.E. & PIERCE M.H. 1956. A note on the cultivation of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Ixodidae: Acarina) on the embryonated hen egg. *Australian Veterinary Journal* 32: 144-146.
- PRICE J., T.L., SONENSHINE D.E., NORVAL R.A.J., YUNKER C.E. & BURRIDGE M.J. 1994. Pheromonal composition of two species of African *Amblyomma* ticks: similarities, differences and possible species specific components. *Experimental and Applied Acarology* 18: 37-50.
- PURNELL R.E. & JOYNER L.P. 1967. Artificial Feeding Technique for *Rhipicephalus appendiculatus* and the Transmission of *Theileria parva* from the Salivary Secretion. *Nature* 216: 484-485.
- RECHAV Y. 1978. Drop-off rhythms of engorged larvae and nymphs of the bont tick, *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae), and the factors that regulate them. *Journal of Medical Entomology* 14: 677-687.
- RECHAV Y., PAROLIS H., WHITEHEAD G.B. & KNIGHT M.M. 1977. Evidence for an assembly pheromone(s) produced by males of the bont tick *Amblyomma hebraeum* (Acarina, Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* 14: 71-78.
- RECHAV Y., STRYDOM W.J., CLARKE F.C., BURGER L.B., MACKIE A.J. & FIELDEN L.J. 1994. Isotopes as Host Blood Markers To Measure Blood Intake by Feeding Ticks (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* 31: 511-515.
- RECHAV Y., WHITEHEAD G.B. & KNIGHT M.M. 1976. Aggregation response of nymphs to pheromone(s) produced by males of the tick *Amblyomma hebraeum* (Koch). *Nature* 259: 563-564.
- RICKLI M., DIEHL P.A. & GUERIN P.M., 1994. Cuticle alkanes of honeybee larvae mediate arrestment of bee parasite *Varroa jacobsoni*. *Journal of Chemical Ecology* 20: 2437-2453.
- RICKLI M., GUERIN P.M. & DIEHL P.A., 1992. Palmitic acid released from honeybee worker larvae attracts the parasitic mite *Varroa jacobsoni* on a servosphere. *Naturwissenschaften* 79: 320-322.
- ROBERTS F.H.S. 1965. The taxonomic status of the species of the genera *Rhipicephalus* Koch and *Boophilus* Curtice (Acarina: Ixodidae) occurring in Australia. *Australian Journal of Zoology* 13: 491-523.
- ROBERTS J.A. 1968. Resistance of cattle to the tick *Boophilus microplus* (Canestrini). I. Development of ticks on *Bos taurus*. *Journal of Parasitology* 54: 663-666.
- SACHS L. 1984. *Angewandte Statistik*. Springer-Verlag, Berlin.

- SAUER J.R. & HAIR J.A. 1972. The quantity of blood ingested by the Lone star tick (Acarina: Ixodidae). *Annals of the Entomological Society of America* 65: 1065-1068.
- SAUER J.R., MCSWAIN J.L., BOWMAN A.S. & ESSENBERG R.C. 1995. Tick Salivary Gland Physiology. *Annual Review of Entomology* 40: 244-267 (zitiert nach KEMP ET AL., 1982).
- SCHERRER B. 1984. *Biostatistique*. ? pp. Gaëtan Morin.
- SCHÖNI R. 1987. *Das wirtsgebundene Aggregationspheromon der Tropischen Buntzecke Amblyomma variegatum Fabricius (Acari: Ixodidae)*. Dissertation, Université de Neuchâtel.
- SCHÖNI R., HESS E., BLUM W. & RAMSTEIN K. 1984. The aggregation-attachment pheromone of the tropical bont tick *Amblyomma variegatum* Fabricius (Acari:Ixodidae): isolation, identification and action of its components. *Journal of Insect Physiology* 30: 613-618.
- SCHRÖDER J. 1992. Chemical Control of Ticks on Cattle. In: *Tick Vector Biology - Medical and Veterinary Aspects*, (Edited by FIVAZ B., PETNEY T. & HORAK I.), pp. 175-184. Springer-Verlag, Berlin.
- SEIFERT G.W., SPRINGELL P.H. & TATCHELL R.J. 1968. Radioactive studies on the feeding of larvae, nymphs and adults of the cattle tick *Boophilus microplus* Canestrini. *Parasitology* 58: 415-430.
- SMITH J.J.B. & FRIEND W.G. 1982. Diphosphoglycerate and phytic acid as feeding stimulants for the blood-feeding bug *Rhodnius prolixus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 72A: 133-136.
- SMITH J.J.B. 1979. The feeding response of *Rhodnius prolixus* to blood fractions and the role of ATP. *Journal of Experimental Biology* 78: 225-232.
- SNOW K.R. 1970. The quantity of blood imbibed by *Hyalomma anatolicum anatolicum* Koch, 1844 (Ixodidae). *Parasitology* 60: 53-60.
- SOKAL R.R. & ROHLF F.J. 1981. *Biometry, the principles and practice of statistics in biological research*. Freeman and Co., New York.
- SONENSHINE D.E. 1985. Pheromones and other semiochemicals of the Acari. *Annual Review of Entomology* 30: 1-28.
- SONENSHINE D.E., HAMILTON J.G.C., PHILLIPS J.S. & LUSBY W.R. 1992. Mounting sex pheromone: its role in regulation of mate recognition in the Ixodidae. In: *Modern Acarology: Proc. VIIIth. Int. Congr. Acarol.*, (Edited by DUSÁBEK F. & BUKVA V.), pp. 69-78. Czechoslovak Academy of Science, Prague.
- STULLLET P. & GUERIN P.M. 1992a. Perception of breath components by the tropical bont tick, *Amblyomma variegatum* Fabricius (Ixodidae). I. CO₂-excited and CO₂-inhibited receptors. *Journal of Comparative Physiology A Sensory, Neural and Behavioural Physiology* 170: 665-676.

- STEUJLET P. & GUERIN P.M. 1992b. Perception of breath components by the tropical bont tick *Amblyomma variegatum* Fabricius (Ixodidae) II. Sulfide receptors. *Journal of Comparative Physiology A Sensory, Neural and Behavioural Physiology* 170: 677-685.
- STEUJLET P. & GUERIN P.M. 1994a. Identification of vertebrate volatiles stimulating olfactory receptors on tarsus I of the tick *Amblyomma variegatum* fabricius (Ixodidae). I. Receptors within the Haller's organ capsule. *Journal of Comparative Physiology A Sensory, Neural and Behavioural Physiology* 174: 27-38.
- STEUJLET P. & GUERIN P.M. 1994b. Identification of vertebrate volatiles stimulating olfactory receptors on tarsus I of the tick *Amblyomma variegatum* fabricius (Ixodidae). II. Receptors outside the Haller's organ capsule. *Journal of Comparative Physiology A Sensory, Neural and Behavioural Physiology* 174: 39-47.
- TACHELL R.J. & MOORHOUSE D.E. 1968. The feeding processes of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini). II. The sequence of host-tissue changes. *Parasitology* 58: 441-459.
- TACHELL R.J. & MOORHOUSE D.E. 1970. Neutrophils: their role in the formation of a tick feeding lesion. *Science* 167: 1002-1003.
- THOMAS J.A., BAILEY D.L. & DAME D.A. 1985. Maintenance of *Anopheles albimanus* on frozen blood. *Journal of the American Mosquito Control Association* 1: 538-540 (zitiert nach HAGEN & GRUNEWALD, 1990).
- TOTZE R. 1933. Beiträge zur Sinnesphysiologie der Zecken. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie* 19: 110-161.
- UILENBERG G. 1992. Veterinary Significance of Ticks and Tick-Borne Diseases. In: *Tick Vector Biology - Medical and Veterinary Aspects* (Edited by FIVAZ B., PETNEY T. & HORAK I.), pp. 23-33. Springer-Verlag, Berlin.
- VAN CUTSEM J. & JANSSEN P.A.J. 1988. In-Vitro and In-Vivo Models to Study The Activity of Antifungals Against *Aspergillus*. In: *Aspergillus and Aspergillosis*, (Edited by VANDEN BOESCHE H., MACKENZIE D.W.K., & CAUWENBERGH G.), pp. 215-227. Plenum Press, New York.
- VAN CUTSEM J., VAN GERVEN F., VAN DE VEN M.-A., BORGERS M. & JANSSEN P.A.J. 1984. Itraconazole, a New Triazole That Is Orally Active in Aspergillosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* Oct.: 527-534.
- VOIGT W.P., YOUNG A.S., MWAURA S.N., NYAGA S.G., NJIHIA G.M., MWAKIMA F.N. & MORZARIA S.P. 1993. *In vitro* feeding of instars of the ixodid tick *Amblyomma variegatum* on skin membranes and its application to the transmission of *Theileria mutans* and *Cowdria ruminantium*. *Parasitology* 107: 257-263.

- WADE S.E. & GEORGI J.R. 1988. Survival and reproduction of artificially fed cat fleas, *Ctenocephalides felis* Bouché (Siphonaptera: Pulicidae). *Journal of Medical Entomology* 25: 186-190.
- WALADDE S.M. & RICE M.J. 1977. The sensory nervous system of the adult cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini). Part III. Ultrastructure and electrophysiology of the cheliceral receptors. *Journal of the Australian Entomological Society* 16: 441-453.
- WALADDE S.M. & RICE M.J. 1982. The sensory basis of tick feeding behaviour. In: *Physiology of ticks*, (Edited by OBENCHAIN P.D. & GALUN R.), pp. 71-118. Pergamon Press, Oxford.
- WALADDE S.M., KEMP D.H. & RICE M.J. 1979. Feeding electrograms and fluid uptake measurements of cattle tick *Boophilus microplus* attached on artificial membranes. *International Journal for Parasitology* 9: 89-95.
- WALADDE S.M., OCHIENG' S.A. & GICHUHI P.M. 1991. Artificial-feeding of the ixodid tick, *Rhipicephalus appendiculatus*, to repletion. *Experimental and Applied Acarology* 11: 297-306.
- WALADDE S.M., YOUNG A.S., OCHIENG' S.A., MWAURA S.N. & MWAKIMA F.N. 1993. Transmission of *Theileria parva* to cattle by *Rhipicephalus appendiculatus* adults fed as nymphae *in vitro* on infected blood through an artificial membrane. *Parasitology* 107: 249-256.
- WALKER A.R. & FLETCHER J.D. 1986. Histological study of the attachment sites of adult *Rhipicephalus appendiculatus* on rabbits and cattle. *International Journal for Parasitology* 16: 399-413.
- WALKER J.B. & OLWAGE A. 1987. The tick vectors of *Cowdria ruminantium* (Ixodoidea, Ixodidae, genus *Amblyomma*) and their distribution. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 54: 353-379.
- WALLHÄUGER K.H. 1988. *Praxis der Sterilisation-Desinfektion-Konservierung*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York.
- WALPORT M.J. & LACHMANN P.J. 1993. Complement. In: *Clinical Aspects of Immunology*, (Edited by LACHMANN P.J. ET AL.), pp. 347-375. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- WEBER E. 1980. *Grundriss der biologischen Statistik*. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.
- WETZEL H. 1979. *Züchtung von TseTsefliegen mit Membranfütterung (Glossina spec., Diptera: Glossinidae)*. Habilitationsschrift, Tierärztliche Hochschule Hannover, GSF-Bericht, BT571, 191 pp. (zitiert nach FELDMANN, 1988).
- WHARTON R.H. & UTECH K.W.B. 1969. The engorgement and dropping of *Boophilus microplus* (Canestrini). In: *Proceedings of the 2nd International Congress of Acarology*, (Edited by EVANS G.O.), pp. 347-348. Akadémiai Kiadó, Budapest.

- WIDMANN F.K. (Editor) 1985. *Technical manual of the American Association of Blood Banks.*
- WIRTZ H.-P. & BARTHOLDE E. 1986. Simplified Membrane Feeding of *Ornithodoros moubata* (Acarina: Argasidae) and Quantitative Transmission of Microfilariae of *Dipetalonema viteae* (Nematoda: Filarioidea) to the Ticks. *Zeitschrift für Angewandte Zoologie* 1: 1-11.
- WOLFE L. 1985. *Clinical Hematology* 14: 259-276 (zitiert nach KUBERKA, 1989)
- WOOD W.P., LEAHY M.G., GALUN R., PRESTWICH G.D., MEINWALD J., PURNELL R.E. & PAYNE R.C. 1975. Phenols as pheromones of ixodid ticks: a general phenomenon? *Journal of Chemical Ecology* 1: 501-509.
- YANNAS I.V. & BURKE J.F. 1980. Design of an artificial skin. I. Basic design principles. *Journal of Biomedical Materials Research* 14: 65-81.
- YANNAS I.V., LEE E., ORGILL D.P., SKRABUT E.M. & MURPHY J.F. 1989. Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 933-937.
- ZEMAN P. 1988. Surface skin lipids of birds - a proper host kairomone and feeding inducer in the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. *Experimental and Applied Acarology* 5: 163-173.

12. ANHANG

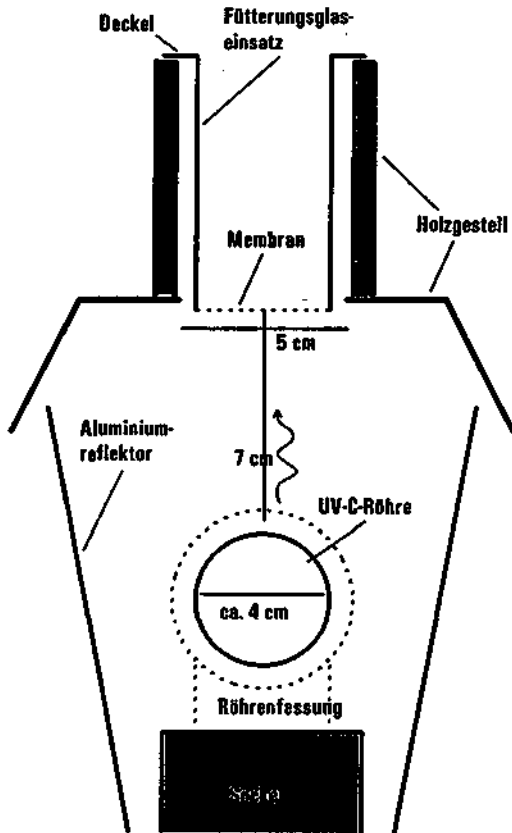


Abb. 12-1 - Vorrichtung zur UV-C-Bestrahlung der Membran-Unterseite von Fütterungsgläsern -

Tab. 12-1 -- *In vitro* Fixierung von *Amblyomma hebraeum* Nymphen; Einfluß von Mikrobläiden und UV-C Strahlen -- Gezeigt ist die Fixierungsrate mit dem 95 %-Vertrauensintervall des Verhältnisses 'fixierte Zecken / auf die Membran gebrachte Zecken' sowie *n* als Anzahl Nymphen oder Versuchseinheiten (VE). Alle Behandlungen stammten aus einem Versuchsblock mit der Stimulus-Kombination K und drei Blutwechselln täglich. Die Ergebnisse zeigten keinerlei signifikante Unterschiede ($P < 0.05$; Mann-Whitney U-Test). Die eckigen Klammern nennen die Behandlungsnummer entsprechend der Übersicht Tab. 2-8. d Tag; n. l. nach Infestierung.

	täglich 5 min UV-C Bestrahlung (Membran-Unterseite)			Nystatin 100 IE / ml		
	% Fixierung d 4 n. l.	<i>n</i> Nymphen aufgesetzt	<i>n</i> VE	% Fixierung d 4 n. l.	<i>n</i> Nymphen aufgesetzt	<i>n</i> VE
Gentamicin 5 µg / ml	89 (85 - 93) [12]	58 ± 18	4	90 (85 - 94) [17]	58 ± 22	4
Gentamicin 50 µg / ml	87 (83 - 91) [18]	71 ± 31	5	85 (79 - 89) [14]	43 ± 13	5
Penizillin 100 IE / ml und Streptomycin 100 µg / ml	88 (84 - 91) [19]	64 ± 18	5	86 (80 - 88) [15]	73 ± 30	5

Tab. 12-2 -- *In vitro* Fixierung von *A. hebraeum* Nymphen; Einfluß verschiedener Behandlungen -- Es ist die Fixierungsrate angegeben mit dem 95 %-Vertrauensintervall des Verhältnisses 'fixierte Zecken / auf die Membran gebrachte Zecken' sowie *n* als Anzahl Nymphen oder Versuchseinheiten (VE). Alle Behandlungen liefen mit der Stimulus-Kombination J und zwei Blutwechselln täglich. Sie stammten z. T. aus verschiedenen Versuchsblöcken. Die Ergebnisse zeigten keine signifikanten Unterschiede ($P < 0.05$; Mann-Whitney U-Test). Die eckigen Klammern nennen die Behandlungsnummer entsprechend der Übersicht Tab. 2-8. d Tag; n. l. nach Infestierung.

	% Fixierung d 4 n. l.	<i>n</i> Nymphen aufgesetzt	<i>n</i> VE
Blut mit 10 vol% Hühnereidotter [25]	96 (92 - 99)	33 ± 8	5
Blut durch Einfrieren / Auftauen hämolytisiert [27]	94 (89 - 98)	47 ± 2	3
Vollblut mit Na-Heparin 17 IE / ml [28]	90 (83 - 94)	48 ± 4	3
Blut mit 0.1 % Propylenglykol / Glyceroformal (1 : 1.5) [31]	95 (90 - 98)	31 ± 5	5
im Brutschrank 36°C, ca. 20 % rF [29]	70 (62 - 77)	48 ± 2	3
Standard-Behandlung [22D & 22G]	83 (90 - 96)	37 ± 13	5 + 3

Tab. 12-3 - Entwicklung von *A. hebraeum* Nymphen in vitro (Versuchsblock 1) - Die Behandlungsnummern in eckigen Klammern entsprechen denjenigen der Übersicht in Tab. 2-8. Angegeben sind die Mikrobizid-Kombinationen der jeweiligen Behandlungen sowie eine eventuelle UV-C-Bestrahlung oder Schüttler-Einsatz. Unter 'Parameter' finden sich der Tag des Abfallens (Modalwert und Bereich), die mittlere Körpermasse mit 95 %-Vertrauensbereich, die Häutungsrate mit dem 95 %-Vertrauensintervall des Verhältnisses 'vollgesogen abgefallene Nymphen / zu Adulten gehäutete Nymphen', der Anteil weiblicher Zecken an diesen Adulten sowie die Anzahl Nymphen (n) oder Versuchseinheiten (VE). Ergebnisse innerhalb Spalten ohne einen gemeinsamen Buchstaben waren signifikant unterschiedlich ($P < 0.00$; Mann-Whitney U-Test). Es wurden dünne Silikon-Membranen des Typs V2 und die Stimulus-Kombination K (Kaninohenhaare und pheromonimpregnirte Gummikappe) benutzt. Abkürzungen: GEN 5 bzw. 50: Gentamicin 5 bzw. 50 µg/ml; PS 100: Penicillin 100 IE/ml und Streptomycin 100 µg/ml; NYS 100: Nystatin 100 IE/ml; UV-C: Bestrahlung der Membran-Unterseite mit UV-C 5 min pro Tag; geschüttelt: im Schüttler (100 Richtungswechsel/min, horizontal in einer Ebene); d Tag nach Infestierung.

Nymphen Versuchsblock 1											
Behandlung							Parameter				
Nr.	GEN 5	GEN 50	PS 100	NYS 100	UV-C 5 min	geschüttelt	Spitzenlag des Abfallens §	Bereich des Abfallens §	Körpermasse Nymphen [mg]	% Häutungsrate (zu Adulten)	% Weibchen
[13]	X	.	.	.	X	X	d 6 a (236)	d 4 - d 10	50 a (48 - 52) (236)	96 a (93 - 98) (5 VE)	46
[12]	X	.	.	.	X	.	d 6 b (179)	d 6 - d 10	53 b (51 - 55) (179)	99 a (96 - 100) (4 VE)	54
[18]	.	X	.	.	X	.	d 6 b (291)	d 5 - d 10	54 b (53 - 55) (291)	99 a (96 - 100) (5 VE)	47
[19]	.	.	X	.	X	.	d 6 b (220)	d 5 - d 10	50 b (53 - 57) (220)	99 a (97 - 100) (5 VE)	52
[16]	.	.	X	.	X	X	d 6 b (229)	d 4 - d 10	53 ab (51 - 55) (229)	97 a (94 - 99) (5 VE)	38
[17]	X	.	.	X	.	.	d 9 c (169)	d 5 - d 10	66 c (64 - 68) (169)	99 a (96 - 100) (4 VE)	57
[14]	.	X	.	X	.	.	d 9 c (171)	d 6 - d 10	64 cd (62 - 66) (171)	99 a (97 - 100) (5 VE)	42
[15]	.	.	X	X	.	.	d 9 c (255)	d 5 - d 10	63 d (61 - 65) (255)	99 a (97 - 100) (5 VE)	50

§ Eventuell noch am Versuchsende (d 10) fixierte Nymphen wurden nicht gezählt.

Tab. 12-4 – Entwicklung von *A. hebraeum* Nymphen *in vitro* (Versuchsblock 2) – Die Behandlungsnummern in eckigen Klammern entsprechen denjenigen der Übersicht in Tab. 2-8. Unter 'Parameter' finden sich der Tag des Abfallens (Modahwert und Bereich), die mittlere Körpermasse mit 95 %-Vertrauensbereich, die Häutungsrate mit dem 95 %-Vertrauensintervall des Verhältnisses 'vollgesogen abgefallene Nymphen / zu Adulten gehäutete Nymphen', der Anteil weiblicher Zecken an diesen Adulten sowie die Anzahl Nymphen (*n*) oder Versuchseinheiten (VE). Ergebnisse innerhalb Spalten ohne einen gemeinsamen Buchstaben waren signifikant unterschiedlich ($P < 0.05$; Mann-Whitney U-Test). Es wurden dünne Silikon-Membranen des Typs V2 und die Stimulus-Kombination J (Kaninchenhaare und SPM-A.h.) benutzt. Abkürzungen: GEN 5: Gentamicin 5 µg / ml; NYS 100: Nystalin 100 IE / ml; UV-C: Bestrahlung der Membran-Unterseite mit UV-C 5 min pro Tag; ATP / GSH: zusätzliches Adenosintriphosphat bzw. Glutathion im Futterblut (beide 10^{-3} mol / l); d Tag nach Infestierung.

Nymphen Versuchsblock 2									
Behandlung					Parameter				
Nr.	GEN 5 & NYS 100	UV-C 5 min	kein ATP/ GSH	Blutwechsel pro Tag	Spitzentag des Abfallens §	Bereich des Abfallens §	Körpermasse Nymphen [mg]	% Häutungsrate (zu Adulten)	% Weibchen
[17B]	X	-	-	3x	d 9 a (109)	d 6 - d 10	50 a (47 - 53) (109)	99 a (94 - 100) (5 VE)	52
[20]	X	-	X	3x	d 9 a (81)	d 7 - d 10	55 b (53 - 57) (81)	99 a (96 - 100) (5 VE)	55
[21]	X	X	-	3x	d 10 a (100)	d 5 - d 10	40 c (37 - 43) (100)	95 a (89 - 98) (5 VE)	59
[22]	X	-	-	2x	d 9 a (75)	d 6 - d 10	56 bd (53 - 59) (75)	100 b (96 - 100) (5 VE)	65

§ Eventuell noch am Versuchsende (d 10) fixierte Nymphen wurden nicht gezählt.

Tab. 12-5 -- Entwicklung von *A. hebraeum* Nymphen *in vitro* (Versuchsblock 3) -- Die Behandlungsnummern in eckigen Klammern entsprechen denjenigen der Übersicht in Tab. 2-8. [22D] Die 'Standard-Behandlung' basiert auf zwei Blutwechsell pro Tag, Gentamicin 5 µg / ml und Nystatin 100 IE / ml sowie ATP und GSH (beide 10⁻³ mol / l). [22E] Die 'F₁-*in vitro* Nymphen' waren über das *in vitro* gesogene Larvenstadium aus den Eiern ebenfalls *in vitro* gefütterter Weibchen hervorgegangen. [25] Ein Teil des Blutes (10 vol%) wurde durch Dotter aus Hühnereiern ersetzt. [31] PRG / GLF im Futterblut ist 0.1 vol% eines als Vehikel für aktive Substanzen dienenden Gemisches aus Propylenglykol und Glycerolfomal. Unter 'Parameter' finden sich der Tag des Abfallens (Modalwert und Bereich), die mittlere Körpermasse mit 95 %-Vertrauensbereich, die Häutungsrate mit dem 95 %-Vertrauensintervall des Verhältnisses 'vollgesogen abgefallene Nymphen / zu Adulten gehäutete Nymphen', der Anteil weiblicher Zecken an diesen Adulten sowie die Anzahl abgefallener Nymphen (n) oder Versuchseinheiten (VE). Ergebnisse innerhalb Spalten ohne einen gemeinsamen Buchstaben waren signifikant unterschiedlich (P < 0.05; Mann-Whitney U-Test). d Tag nach Infestierung.

Nymphen Versuchsblock 3						
Behandlung		Parameter				
Nr.	Bemerkungen	Spitzen-tag des Abfallens	Bereich des Abfallens	Körpermasse Nymphen [mg]	% Häutungsrate (zu Adulten)	% Weibchen
[22D]	Standard-Behandlung	d 7 / 9 ‡ a (125)	d 5 - d 10 §	67 ad (64 - 70) (120)	96 a (91 - 99) (5 VE)	54
[22E]	F ₁ - <i>in vitro</i> Nymphen	d 8 a (214)	d 5 - d 10 §	63 b (61 - 65) (205)	96 a (94 - 99) (5 VE)	52
[25]	Blut mit 10 vol% Hühnereidotter	d 8 a (125)	d 5 - d 10 §	69 ac (67 - 71) (110)	96 a (91 - 99) (5 VE)	60
[31]	Blut mit 0.1% PRG/GLF (Vehikel)	d 7 b (130)	d 5 - d 10 §	64 bd (61 - 67) (122)	95 a (90 - 98) (5 VE)	56

§ Noch Nymphen am letzten Versuchstag (d 10) fixiert: [22D] 5; [22E] 9; [25] 15; [31] 8.

‡ An beiden Tagen die gleiche Anzahl abgefallener Nymphen

Tab. 12-6 – Entwicklung von *A. hebraeum* Nymphen *in vitro* (Versuchsblock 5) – Die Behandlungsnummern in eckigen Klammern entsprechen denjenigen der Übersicht in Tab. 2-8. [22G]: Die 'Standard-Behandlung' basierte auf zwei Blutwechsellern pro Tag, Gentamicin 5 µg / ml und Nystatin 100 IE / ml sowie ATP und GSH (beide 10^{-3} mol / l). [26]: zusätzliches Adenosintriphosphat bzw. Glutathion fehlte im Futterblut. [27]: Blut wurde vor dem Auftauen eine Woche lang bei -18 C aufbewahrt. [28]: Um die Gerinnung von Vollblut zu vermeiden, wurde Na-Heparin bei der Blutsammlung zugesetzt. [29]: Die Fütterungsgläser standen in einem Brutschrank bei 38°C und ca. 20 % rF. Unter 'Parameter' finden sich der Tag des Abfallens (Modalwert und Bereich), die Körpermasse (Mittelwert mit 95 %-Vertrauensbereich) sowie die Anzahl abgefallener Nymphen (n). Die Häutungsrate und der Anteil weiblicher Zecken nach der Häutung der Nymphen zu Adulten wurden nicht aufgezeichnet. Ergebnisse innerhalb Spalten ohne einen gemeinsamen Buchstaben waren signifikant unterschiedlich ($P < 0.05$; Mann-Whitney U-Test). d Tag nach Infestierung.

Nymphen Versuchsblock 5				
Behandlung		Parameter		
Nr.	Bemerkungen	Spizentag des Abfallens	Bereich des Abfallens	Körpermasse Nymphen [mg]
[22G]	Standard-Behandlung	d 7 a (135)	d 6 - d 9 §	51 a (48 - 54) (122)
[26]	kein ATP / GSH	d 7 b (118)	d 6 - d 10 §	55 b (53 - 57) (112)
[27]	durch Einfrieren / Auftauen hämolysiertes Blut	d 9 c (134)	d 6 - d 10 §	42 c (40 - 44) (109)
[28]	Vollblut mit Na-Heparin (17 IE / ml)	d 7 a (129)	d 6 - d 10 §	58 b (55 - 61) (115)
[29]	Fütterungsgläser im Brutschrank 38°C / ca. 20 % rF	d 10 d (100)	d 8 - d 10 §	57 b (54 - 60) (53)

§ Noch Nymphen am letzten Versuchstag (d 10) fixiert: [22G] 13; [26] 6; [27] 25; [28] 14; [29] 47.

183 *In vitro* Fütterung von Schildkröten

Tab. 12-7 - Entwicklung von *A. holbrooki* Weibchen *in vitro* (Versuchsblock II) - Die Weibchen nahmen ihr *in vitro* Baitmark gemessen mit den Männchen auf. Diese waren zuvor 5-7 Tage separat *in vivo* (für Behandlung [7] und [8]) bzw. *in vitro* für Behandlung [4-6]) vorgefüttert worden. Spätestens nach dem Weibchen und Männchen in früheren Fütterungsphasen zusammengebracht worden waren, erhielten beide Geschlechter dieselben Mikrodosen. Die Behandlungsummern in eckigen Klammern entsprechen denjenigen der Übersicht in Tab. 2-9. Anmerkungen: GEN 5 Gentamicin 5 µg/ml; NYS 10 Nystalin 10 IE/ml; PS 100 Penicillin 100 IE/ml und Streptomycin 100 µg/ml; ITR 0,1 Isoniazid 0,1 µg/ml; d Tag; VE Versuchsfehler. Unter Parameter finden sich die Ergebnisse als Mittelwerte (Spitzenabg), Bereiche („des Abtakens“) oder Mittelwerte mit Vertrauensintervall (95 %) bzw. mit Bereichsangabe (Fertile Eierproduktion). Eine schwachere Anzahl Weibchen [6] in einer Reihe ergab sich aus den bei Berechnung jedes Parameters zugrundegelegten und in Kapitel 2.11.2. erklärten Kriterien. Die % larvenproduzierende Weibchen und die fertile Eierproduktion bezogen sich dementsprechend auf die Anzahl aller an d 4 fütterten Weibchen. Ergebnisse innerhalb Spalten ohne einen gemeinsamen Buchstaben waren signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$; Mann-Whitney U-Test).

Weibchen Versuchsblock II

Behandlung

Parameter

Nr.	Kurzbeschreibung	Spitzenabg des Abtakens	Bereich des Abtakens §	Körpermasse Weibchen [g]	Pfz-Ovipo- säurus- dauer [d]	Eier- konversions- faktor	% Larven- schlüp- rate	% Larven- produzierende Weibchen	Fertile Eier- produktion [mg/Weibchen]
[4]	Männchen: GEN 5 / NYS 10 Paar: GEN 5 / NYS 10	d 8 ab (32)	d 7 - d 14	1,41 ac (1,20 - 1,67) (26)	nicht gemessen (n.g.)	0,29 ab (0,25 - 0,34) (24)	27 e (15 - 40) (24)	39 e (23 - 58) (10 VE)	124 a (0 - 582) (33)
[5]	Männchen: GEN 5 / NYS 10 Paar: PS 100 / ITR 0,1	d 8 a (19)	d 7 - d 14	1,49 ac (1,29 - 1,69) (17)	n.g.	0,34 ab (0,32 - 0,37) (16)	36 e (19 - 53) (16)	50 e (28 - 72) (5 VE)	151 a (0 - 587) (22)
[6]	Männchen: PS 100 / ITR 0,1 Paar: PS 100 / ITR 0,1	d 8 a (15)	d 8 - d 14	1,38 a (1,17 - 1,63) (14)	n.g.	0,27 c (0,21 - 0,33) (14)	25 a (7 - 43) (14)	33 a (15 - 57) (7 VE)	91 e (0 - 431) (21)
[7]	Männchen <i>in vivo</i> Paar: GEN 5 / NYS 10	d 11 a (31)	d 8 - d 14	1,78 b (1,61 - 1,94) (27)	n.g.	0,33 bc (0,30 - 0,36) (27)	36 e (23 - 49) (27)	52 a (34 - 69) (10 VE)	198 a (0 - 673) (33)
[8]	Männchen <i>in vivo</i> Paar: PS 100 / ITR 0,1	d 14 b ‡ (13)	d 9 - d 14	1,95 bc (1,42 - 2,48) (7)	n.g.	0,35 bc (0,29 - 0,41) (7)	43 a (25 - 60) (7)	41 e (18 - 67) (4 VE)	116 a (0 - 672) (17)

§ Nach früherer Weibchen am letzten Versuchstag [d 14]; [4] 6; [5] 2; [6] 1; [7] 4; [8] 6. ‡ Größe Anzahl Weibchen (n = 6) nicht am Versuchsende füttert.

Tab. 12-8 — Entwicklung von *A. hydrophum* Weibchen in vitro (Versuchsblock I I I) — Die Weibchen nahmen ihr in vitro Blutmahl gemeinsam mit den Männchen auf. Diese waren zuvor 5 - 7 Tage separat auf dem Karminchen vorgefüttert worden. Nachdem Weibchen und Männchen in frischen Fütterungsgläsern zusammengebracht worden waren, entließen beide Geschlechter dieselben Mikrozistide. (7B): Wiedermelung der Behandlung (7) aus Versuchsblock I I (9). Wie Behandlung (7B), jedoch geschlechts (10h/ min, horizontal in einer Ebene). (10): Keine Mikrozistide im Futterblut, aber leichtes Entlauchen (20 min) der Membran-Unterseite in Gentamicin 50 µg/ml (GEN 50; bakterizid) und Entomozin 1000 µg/ml (ENI 1000; fungizid). (11): Keine Mikrozistide im Blut, aber leichte Bestrahlung (3 min) der Membran-Unterseite mit UV-C (7 cm Abstand). Die Behandlungsumnummern in solchen Kämmern entsprechen denjenigen der Übersicht in Tab. 2-8. Unter 'Parameter' finden sich die Ergebnisse als Modalkwerte ('Spitzenwert') Bereiche oder Mittelwerte mit Varianzstreuweite (95 %). Eine schwankende Anzahl Weibchen (n) in einer Reihe ergab sich aus den bei Berechnungen jedes Parameters zugrundgelegten und in Kapitel 2, 11, 2, er-Männchen (Kolonien, Abkürzung: d Tag).

Behandlung		Weibchen Versuchsblock I I I							
		Parameter							
Nr.	Kurzbeschreibung	Spitzenang des Abtakens	Bereich des Abtakens	Körpermasse Weibchen (g)	Prüf-Ovipo-sitons-dauer [d]	Eier-konversions-faktor	% Larven-schlupf-räte	% Larven-produzierende Weibchen	Fertile Eier-produktion [mg/Weibchen]
(7B)	Männchen in vitro Paar: GEN 5 / NYS 10	d 8 & d 10 (2)	keine Angabe (2)	1,08 & 1,38 † (2)	keine Eiablage
(8)	dlu- aber geschlüpft (100h / min horizontal)	d 10 (22)	d 7 - d 14 § (19)	0,93 † (0,72 - 1,16) (19)	dlu.
(10)	Männchen in vitro, Membran mit Paar: lgl, 20 min in GEN 50 / ENI 1000 getaucht	d 8 & d 14 § (2)	keine Angabe (2)	0,79 † (1)	dlu.
(11)	Männchen in vitro, Membran mit Paar: UV-C bestirnt, Futterblut ohne Bakterid	d 10 & d 12 (2)	dlu.	0,67 & 0,82 † (2)	dlu.

§ Noch 3 Weibchen am letzten Versuchstag (d 14) fixiert.

† Ausgewöhnlich starker Balz des Futterblutes mit Pilzen.

‡ Ausgewöhnlich schwere bakterielle Kontamination des Blutes.

* Ohne Grundlage, da keine Eier abgelegt wurden.

Tab. 129 — Entwicklung von *A. hebraeum* Weibchen *in vitro* (Versuchsblock IV). — Die Weibchen nahmen für *in vitro* Blutmahl gemeinsam mit den Männchen auf. Diese waren zuvor 5 - 7 Tage separat *in vitro* vorgefüttert worden. Nachdem Weibchen und Männchen in frischen Fütterungsgläsern zusammengebracht worden waren, erhielten beide Geschlechter ("Paare") dieselben Mikrobrozida Ankratzungen: d Tag GEN 5 Gemisch 5 µg/ml, NYS 100 Myelin 100 IE/ml, d Tag [129]. Das Futterbild enthielt GEN 5, aber kein Fanggut. Die Membran-Untersalie wurde täglich 5 min mit UV-C bestrahlt (7 cm Abstand). Ferner wurden die Versuchseinheiten horizontal in einer Ebene (100x/1min) geschüttelt. [16]. Das Blut enthielt GEN 5 und NYS 100 und wurde ebenfalls permanent geschüttelt. Die Behandlungsnummern in eckigen Klammern entsprechen denjenigen der Übersicht in Tab. 28. Unter "Parameter" finden sich die Ergebnisse als Modalwerte ("Spitzenlag"). Bereiche oder Mittelwerte mit Varianzintervall (95 %). Eine schwachende Anzahl Weibchen (n) in einer Reihe ergab sich aus den bei Berechnungen jedes Parameters zugrundeliegenden und in Kapitel 2.11.2. erläuterten Klären. Ergebnisse innerhalb Spalten ohne einen gemeinsamen Buchstaben waren signifikant unterschiedlich ($P < 0.05$; Mann-Whitney U-Test).

Behandlung		Weibchen		Versuchsblock IV		Parameter		
------------	--	----------	--	------------------	--	-----------	--	--

Nr.	Kurzbeschreibung	Spitzenlag des Abtakens	Bereich des Abtakens	Körpermasse Weibchen [g]	Pfä-Ovipo- sitons- dauer [d]	Eier- konversions- faktor	% Larven- schlüp- rate	% Larven- produzierende Weibchen	Fortle Eier- produktion [mg/Weibchen]
(128)	Männchen <i>in vitro</i> , Membran mit Paaren; UV-C bestrahlt, Blut mit GEN 5, geschüttelt	d 9 a (41)	d 8 - d 14 S	1.39 a (1.26 - 1.52) (40)	nicht gemessen (n. g.)	0.34 a (0.31 - 0.37) (37)	n. g.	n. g.	n. g.
(18)	Männchen <i>in vivo</i> Paare; GEN 5 / NYS 100, geschüttelt (100x / min)	d 9 a (47)	d 8 - d 14 S	1.33 a (1.23 - 1.43) (46)	n. g.	0.34 a (0.31 - 0.37) (46)	n. g.	n. g.	n. g.

§ Nach 1 Weibchen am letzten Versuchstag (d 14) büert.

Tab. 12-10 — Entwicklung von *A. theaeorum* Weibchen *in vitro* (Versuchsblock V) — Die Weibchen nahmen für *in vitro* Blutmahl gemischsam mit den Männchen auf. Diese waren zuvor 5-7 Tage separat *in vitro* (für Behandlung [24]) bzw. *in vitro* (für die Behandlungen [17F], [22C] und [17F]) vorgefüttert worden. Spätestens nachden Weibchen und Männchen in frischen Fütterungsgefäßen zusammengebracht worden waren, erhielten beide Geschlechter ("Paar") Gentamicin 5 µg/ml (GEN 5) und Myristin 100 µg/ml (MYS 100). [17F], Andars als in [24] fand hier auch die Vorfütterung der Männchen *in vitro* statt. [22C]: Das Futterbild wurde, im Gegensatz als beim täglich dreimaligen Blutwechsel der anderen Behälterungen, nur zweimal pro Tag ausgetauscht. [17F]: Die Männchen und Weibchen hatten sich aus *in vitro* gezogenen Nymphen getäutelt. Die Behandlungsnummern in eckigen Klammern entsprechen denjenigen der Übersicht in Tab. 2-9. Unter "Parameter" finden sich die Ergebnisse als Modalwerte ("Spitzenlag"), Bereiche ("...des Abfalls") oder Mittelwerte mit Vertrauensintervall (95 %) bzw. mit Bereichsangaben ("Fertile Eierproduktion"). Eine schwankende Anzahl Weibchen (♀) in einer Reihe ergab sich aus den bei Berechnungen jedes Parameters zugrundeliegenden und in Kapitel 2.11.2. erläuterten Kriterien. Die % larvenproduzierende Weibchen und die fertile Eierproduktion bezogen sich dementsprechend auf die Anzahl aller an d 4 fidehen Weibchen. Ergebnisse innerhalb Spalten ohne einen gemischtsamen Buchstaben waren signifikant unterschiedlich ($P < 0.05$; Mann-Whitney U-Test). Abkürzung: d Tag; VE Versuchseinheit.

Behandlung	Weibchen Versuchsblock V									
	Parameter									
Nr.	Kurzbeschreibung	Spitzenlag des Abfalls	Bereich des Abfalls	Körpermasse Weibchen [g]	Prä-Ovipositions-dauer [d]	Eier-konversionsfaktor	% Larven-schluf-rate	% Larven-produzierende Weibchen	Fertile Eier-produktion [mg/Weibchen]	
[24]	Männchen: <i>in vitro</i> Paar: GEN 5 / MYS 100	d 8 a (28)	d 7 - d 14 §	1.15 a (0.87 - 1.33) (23)	15.3 a (14.1 - 16.6) (24)	0.30 a (0.25 - 0.34) (23)	52 a (45 - 59) (25)	80 a (44 - 75) (9 VE)	115 a (0 - 521) (43)	
[17G]	Männchen GEN 5 / MYS 100 Paar: GEN 5 / MYS 100	d 8 / 9 ab † (23)	d 7 - d 14	0.88 a (0.78 - 1.18) (22)	15.4 bc (13.9 - 16.8) (17)	0.27 ab (0.22 - 0.32) (17)	89 b (58 - 80) (17)	46 a (30 - 63) (9 VE)	109 a (0 - 588) (37)	
[22C]	ditu., aber nur 2x Blutwechsel pro Tag	d 8 ab (28)	d 8 - d 14 §	0.82 a (0.73 - 1.11) (24)	17.1 bc (16.1 - 18.2) (21)	0.24 b (0.20 - 0.28) (21)	56 ab (48 - 64) (21)	47 a (32 - 62) (10 VE)	69 a (0 - 497) (45)	
[17F]	künstliche Männchen und Paar: GEN 5 / MYS 100	d 14 b † (8)	d 8 - d 14 §	1.23 a (0.98 - 1.48) (4)	19.0 b (18.1 - 21.9) (7)	0.24 ab (0.17 - 0.30) (4)	39 a (13 - 66) (7)	10 b (3 - 22) (10 VE)	15 b (0 - 202) (50)	

† Absolute Zahl angefallener Weibchen an beiden Tagen gleich.

§ Nach Weibchen am letzten Versuchstag (d 14) färet. [24] §, [22C] †, [17F] †.

† größte Zahl an Weibchen (♀) noch am Versuchsende (d 14) färet.

Tab. 12.11 — Abhängigkeit dreier gemessener biologischer Größen vom 'Tag des Abfallens' *in vitro* bei *A. hebraeum* Weibchen — Die Weibchen nahmen ihr *in vitro* Blutmahl gemeinsam mit den Männchen auf. Diese waren zuvor 5 - 7 Tage separat auf Kaninchen bzw. *in vitro* oder 3 Tage lang auf dem gleichen Rind (Kontrollrinder) zur Erlangung sexueller Reife vorgefüttert worden. Die Behandlungsnummern in eckigen Klammern entsprechen denjenigen der Übersicht in Tab. 2-9. Abkürzungen: GEN 5 Gentamicin 5 µg / ml; NYS 10 bzw. 100 Nystafin 10 bzw. 100 IE / ml; PS 100 Penicillin 100 IE / ml und Streptomycin 100 µg / ml; ITR 0.1 Itraconazol 0.1 µg / ml; UV-C Membran-Unterseite wurde täglich 5 min mit UV-C bestrahlt (7 cm Abstand); VB Versuchsblock.

Behandlung			Korrelationskoeffizient <i>r</i>		
VB	Nr.	Kurzbeschreibung	Körpermasse	Eier-Konversionsfaktor	Larvenschlupfrate
II	[4]	Männchen: GEN 5 / NYS 10 Paare: GEN 5 / NYS 10	-0.66 *	-0.59	-0.49
II	[5]	Männchen: GEN 5 / NYS 10 Paare: PS 100 / ITR 0.1	-0.37	-0.35	-0.70 *
II	[6]	Männchen: PS 100 / ITR 0.1 Paare: PS 100 / ITR 0.1	-0.35	-0.52	-0.60 *
II	[7]	Männchen <i>in vivo</i> Paare: GEN 5 / NYS 10	-0.49 *	-0.30	-0.36
II	[8]	Männchen <i>in vivo</i> Paare: PS 100 / ITR 0.1	-0.23	0.27	-0.46
III	[8]	wie [7], aber geschüttelt (100x / min)	-0.37	nicht gemessen (n.g.)	n.g.
IV	[12B]	Männchen <i>in vivo</i> , Membran mit Paaren: UV-C bestrahlt, Blut mit GEN 5, geschüttelt	-0.55 *	-0.63 *	n.g.
IV	[18]	Männchen <i>in vivo</i> Paare: GEN 5 / NYS 100, geschüttelt (100x / min)	-0.48 *	-0.23	n.g.
V	[24]	Männchen: <i>in vivo</i> Paare: GEN 5 / NYS 100	-0.62 *	-0.60 *	-0.34
V	[17G]	Männchen GEN 5 / NYS 100 Paare: GEN 5 / NYS 100	-0.75 *	-0.39	-0.20
V	[22C]	dlo., aber nur 2x Blutwechsel pro Tag	-0.75 *	-0.47 *	0.15
-	[I]	Kontrolle auf Rind	-0.15	-0.30	0.19
-	[VI]	dlo.	0.48 *	n.g.	n.g.
-	[VII]	dlo.	0.09	n.g.	n.g.
-	[VIII]	dlo.	-0.01	n.g.	n.g.

* Signifikante Abhängigkeit der jeweiligen Variablen vom 'Tag des Abfallens' ($P < 0.05$) (Scherer, 1984).

Tab. 12-12 — Zusammenhang zwischen drei gemessenen biologischen Größen und dem 'Tag des Abfallens' von *A. hebraeum* Weibchen auf pilzinfiziertem Blut *in vitro* — Die Weibchen nahmen ihr *in vitro* Blutmahl gemeinsam mit den Männchen auf. Diese waren zuvor 5-7 Tage separat auf Kaninchen oder *in vitro* zur Erlangung sexueller Reife vorgefüttert worden. Die Behandlungsnummern in eckigen Klammern entsprechen denjenigen der Übersicht in Tab. 2-9. Abkürzungen: GEN 5 Gentamicin 5 µg/ml; NYS 10 bzw. 100 Nystalin 10 bzw. 100 IE/ml; PS 100 Penicillin 100 IE/ml und Streptomycin 100 µg/ml; ITR 0.1 Itraconazol 0.1 µg/ml; UV-C Membran-Unterseite wurde täglich 5 min mit UV-C bestrahlt (7 cm Abstand); VB Versuchsblock.

Behandlung			Korrelationskoeffizient <i>r</i>		
VB	Nr.	Kurzbeschreibung	Körpermasse	Eier-Konversionsfaktor	Larvenschlupfrate
II	[4]	Männchen: GEN 5 / NYS 10 Paare: GEN 5 / NYS 10	-0.32	-0.58 *	-0.27
II	[5]	Männchen: GEN 5 / NYS 10 Paare: PS 100 / ITR 0.1	-0.27	-0.26	-0.49
II	[6]	Männchen: PS 100 / ITR 0.1 Paare: PS 100 / ITR 0.1	-0.04	-0.27	-0.45
II	[7]	Männchen <i>in vivo</i> Paare: GEN 5 / NYS 10	0.04	0.06	0.13
II	[8]	Männchen <i>in vivo</i> Paare: PS 100 / ITR 0.1	-0.52	-0.14	0.24
III	[9]	wie [7], aber geschüttelt (100x/min)	-0.40	nicht gemessen (n.g.)	n.g.
IV	[12B]	Männchen <i>in vivo</i> , Membran mit Paaren: UV-C bestrahlt, Blut mit GEN 5, geschüttelt	-0.15	-0.31	n.g.
IV	[16]	Männchen <i>in vivo</i> Paare: GEN 5 / NYS 100, geschüttelt (100x/min)	-0.16	-0.31	n.g.
V	[17G]	Männchen GEN 5 / NYS 100 Paare: GEN 5 / NYS 100	-0.24	-0.20	0.13
V	[22C]	dit., aber nur 2x Blutwechsel pro Tag	-0.36	-0.39	-0.12

* Signifikante Abhängigkeit des 'Eier-Konversionsfaktors' vom 'Tag des Abfallens' ($P < 0.05$) (Scherrer, 1984).

Lebenslauf

Name: Frank Kuhnert
Geschlecht: männlich
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

30. März 1961	geboren in Düsseldorf, Bundesrepublik Deutschland
1967 - 1971	Grundschule, Düsseldorf
1971 - 1977	Realschule
1977 - 1980	Gymnasium
Mai 1980	Abitur
1980 - 1981	Grundwehrdienst
Oktober 1981 - 1989	Diplom-Biologiestudium Freie Universität Berlin
Oktober 1989 - 1995	Anfertigung der Doktorarbeit am Institut für Zoologie der Universität Neuchâtel, Schweiz
Tag der mündlichen Prüfung: 20. Juni 1995	



Unterschrift



eine KRONSTADT Produktion

ISBN 3-89588-286-0