

**UNTERSUCHUNGEN ZUR PYRETHROID-RESISTENZ
BEI DER BETTWANZE *CIMEX LECTULARIUS*
IN BERLIN, DEUTSCHLAND**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

ARLETTE VANDER PAN

aus Berlin

Juni 2015

Die Arbeit wurde von Juni 2010 bis Juni 2015 unter der Anleitung von PD Dr. Erik Schmolz im Fachgebiet IV 1.4 Gesundheitsschädlinge und ihre Bekämpfung des Umweltbundesamts in Berlin-Dahlem durchgeführt.

1. Gutachter: PD Dr. Erik Schmolz,
Umweltbundesamt Berlin,
Fachgebiet IV 1.4 Gesundheitsschädlinge und ihre Bekämpfung

2. Gutachter: Prof. Dr. Jens Rolff
Freie Universität Berlin,
Institut für Biologie

Tag der Disputation: 18.09.2015

Für meine Familie
En hommage à mon père

Danksagung

Bei **PD Dr. Erik Schmolz** bedanke ich mich herzlich für die Vergabe des hochinteressanten Promotionsthemas und für die Möglichkeit, diese Arbeit im FG IV 1.4 des Umweltbundesamtes durchführen zu können. Zudem gebührt ihm Dank für seine anregenden Diskussionen, praktischen und pragmatischen Tipps sowie für seine Geduld und sein Verständnis.

Prof. Dr. Georg von Samson-Himmelstjerna danke ich dafür, dass ich sämtliche molekularbiologischen Untersuchungen im Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin im Fachbereich Veterinärmedizin an der FU Berlin durchführen konnte.

Prof. Dr. Jens Rolff danke ich, dass er freundlicherweise spontan die Mühen eines Zweitgutachtens auf sich genommen hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt **Dr. Carola Kuhn** für ihre engagierte Betreuung und stete Hilfsbereitschaft mit vielseitigen Denkanstößen und wertvollen Diskussionen. Carola, ich danke dir von Herzen für die produktive Zusammenarbeit in stets angenehmer Atmosphäre.

Ganz herzlich danke ich **PD Dr. Jürgen Krücken, Sabrina Ramünke** und dem restlichen **Team der Parasitologie** für die freundschaftliche Aufnahme an ihrem Institut. Danke Jürgen, für die angenehme Zusammenarbeit und die hilfreichen Ratschläge bei den statistischen Auswertungen. Sabrina, herzlichen Dank für deine Geduld bei der Einführung in die unendlichen molekularbiologischen Weiten.

Dem gesamten **Team des FG IV 1.4** möchte ich für die stets kollegiale Atmosphäre danken und dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für meine zahlreichen Fragen und Wünsche hatten. Besonders bedanke ich mich bei **Dr. Jutta Klasen**, dass sie mir ermöglicht hat meine Promotion im FG IV 1.4 des Umweltbundesamtes durchzuführen und mir alle Räumlichkeiten und Hilfsmittel, welche für die Verwirklichung der Arbeit nötig waren, zur Verfügung gestellt hat.

Für die Vermittlung der Bettwanzen-Befallsorte bedanke ich mich bei allen **Schädlingsbekämpfern**, dem **Bettwanzenspürhundeteam** und den **Berliner Gesundheitsämtern**.

Allen meinen lieben **Freunden** danke ich von Herzen für die Ausdauer, Ruhe und Geduld, womit sie mir stets zur Seite standen und mich immer wieder aufgemuntert haben.

Meiner **Familie** danke ich von ganzem Herzen, dass sie mir durch ihre fortwährende und uneingeschränkte Unterstützung diese Arbeit ermöglichten und sie mit Anteilnahme, Geduld und Verständnis verfolgt haben. Danke Mama.

Meinem Mann **Ricky Vander Pan** kann ich nicht genug danken für seine unermüdliche Unterstützung, seine Freundschaft, seine Liebe und Motivation.

Inhaltsverzeichnis

I	Tabellenverzeichnis.....	VI
II	Abbildungsverzeichnis	VIII
III	Abkürzungsverzeichnis	XII
1	Einleitung	1
1.1	Die Biologie der Bettwanze <i>Cimex lectularius</i>	2
1.2	Medizinische Bedeutung von <i>C. lectularius</i>	4
1.3	Gründe für das massive Wiederauftreten von <i>C. lectularius</i>	5
1.4	Insektizide Wirkstoffklassen zur Bettwanzenbekämpfung	6
1.5	Insektizid-Resistenzen bei <i>C. lectularius</i>	9
1.5.1	Wirkort-Resistenz bei <i>C. lectularius</i>	11
1.5.1.1	Pyrosequenzierung zum Nachweis der Mutationen V419L und L925I.....	11
1.5.2	Metabolische Resistenz bei <i>C. lectularius</i>	12
1.5.2.1	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion zum Nachweis erhöhter mRNA-Transkriptlevel der vier CYP-Gene <i>cyp397a1</i> , <i>cyp398a1</i> , <i>cyp4cm1</i> , <i>cyp6dn114</i>	
1.6	Testsysteme für die Überprüfung der Wirksamkeit von Wirkstoffen und Kontaktinsektiziden gegen <i>C. lectularius</i>	15
1.6.1	Wirksamkeit von Wirkstoffen gegen <i>C. lectularius</i> -Feldstämme.....	15
1.6.2	Wirksamkeitsprüfung von Kontaktinsektiziden gegen <i>C. lectularius</i>	16
1.7	Ziele dieser Arbeit	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Material.....	18
2.1.1	Prüftiere	18
2.1.1.1	Wirkstoffsensibler <i>C. lectularius</i> -Stamm	18
2.1.1.2	<i>C. lectularius</i> -Feldstämme und Feldpopulationen	19
2.1.1.3	Bettwanzen für molekularbiologische Untersuchungen	27
2.1.2	Primer	27
2.1.3	Versuchsmaterialien, Chemikalien, Kits und Rezepte	29
2.1.3.1	Geräte	29
2.1.3.2	Mehrwegmaterialien	32
2.1.3.3	Verbrauchsmaterialien	32
2.1.3.4	Chemikalien und Reagenzien	34
	Natriumhydroxid ≥ 99 %, p.a., ISO (NaOH)	34
2.1.3.5	Molekularbiologische Kits.....	35
2.1.3.6	Rezepte für Medien, Lösungen und Puffer	35
2.1.3.7	Sonstiges	36
2.2	Methoden	37

2.2.1	Filterkontakt-Biotest zum Nachweis von Pyrethroid-Resistenzen.....	37
2.2.2	Nachweis der <i>kdr</i> -Mutationen V419L und L925I mittels Pyrosequenzierung ..	39
2.2.2.1	DNA-Isolierung	40
2.2.2.2	Photometrische Messung der DNA-Proben.....	41
2.2.2.3	Amplifikation der Fragmente mit den potentiellen Polymorphismen	41
2.2.2.4	Agarosegel-Elektrophorese.....	42
2.2.2.5	DNA-Aufreinigung	42
2.2.2.6	Klonierung der PCR-Produkte.....	43
2.2.2.7	Probenvorbereitungen für die Pyrosequenzierung.....	44
2.2.2.8	Analyselaut	45
2.2.3	mRNA-Expressionsanalyse der CYP-Gene <i>cyp397a1</i> , <i>cyp398a1</i> , <i>cyp4cm1</i> und <i>cyp6dn1</i>	45
2.2.3.1	RNA-Isolation mit der Guanidinisothiocyanat-Phenol-Methode	46
2.2.3.2	Photometrische Messung der RNA-Proben	46
2.2.3.3	Bestimmung der RNA-Integrität.....	47
2.2.3.4	DNase I-Behandlung der RNA	47
2.2.3.5	Reverse Transkription.....	47
2.2.3.6	Herstellung der Plasmid-Standards und des Kalibrators.....	48
2.2.3.7	Protokoll der qRT-PCR.....	49
2.2.4	Testsystem für die Überprüfung der Wirksamkeit von Kontaktinsektiziden gegen <i>C. lectularius</i>	50
2.2.4.1	Versuchsaufbau	51
2.2.4.2	Wanzentasche.....	54
2.2.4.3	Prüfoberflächen.....	55
2.2.4.4	Behandlung der Prüfoberflächen	56
2.2.4.5	Durchführung des Wahlversuchs	56
2.2.5	Wahlversuch zur Untersuchung der Wirksamkeit von Insektizid A auf den AS-Feldstamm	59
2.2.6	UBA-Zwangsversuch zur Untersuchung der Wirksamkeit von Insektizid A gegen den AS-Feldstamm	59
2.2.7	Erprobung einer Blutfütterungsanlage für die Massenzucht von <i>C. lectularius</i>	61
2.2.7.1	Versuchsaufbau	61
2.2.7.2	Artifizielle Fütterung an der Blutfütterungsanlage	61
2.2.7.3	Bestimmung der Saugraten bei Fütterung am Kaninchen	62
2.2.7.4	Attraktivität verschiedener Blutsorten	63
2.2.7.5	Zuchtversuch mittels artifizieller Fütterung.....	65
2.2.8	Deutschlandweite Umfrage zur Erfassung der aktuellen Bettwanzensituation..	65
2.2.9	Statistische Auswertung	65

2.2.9.1	24-Well-Filterkontakt-Biotest.....	66
2.2.9.2	Pyrosequenzierung.....	66
2.2.9.3	Echtzeit-PCR.....	67
2.2.9.4	Wahlversuche und UBA-Zwangversuche.....	67
2.2.9.5	Blutfütterung.....	68
3	Ergebnisse.....	69
3.1	Suszeptibilität von <i>C. lectularius</i> gegenüber Deltamethrin.....	69
3.2	PCR-Amplifikate mit den gesuchten Punktmutationen.....	76
3.3	Detektion von Messabweichungen bei der Pyrosequenzierung.....	77
3.4	Allelfrequenzen der Mutationen L925I und V419L.....	81
3.4.1	Allelfrequenzen der Bettwanzenfeldstämme mit erfolgreicher Aufzucht.....	81
3.4.2	Allelfrequenzen der Bettwanzenfeldstämme ohne Zuchterfolg.....	83
3.4.3	Allelfrequenzen der Bettwanzenfeldpopulationen ohne Zuchtmöglichkeit.....	85
3.4.4	Vergleich der Allelfrequenzen von Proben des SK-Stamms aus 2009 und 2013..	86
3.5	Genotypisierung einzelner <i>C. lectularius</i>	87
3.6	Bestimmung der RNA-Integrität: Detektion eines Hidden-Break in der 28S rRNA von <i>C. lectularius</i>	90
3.7	RT-PCR Amplifikate der Referenz- und CYP-Gene.....	92
3.8	Tauglichkeit der Referenzgene.....	94
3.9	Effizienz der qRT-PCR.....	96
3.10	Expression der mRNAs für die Cytochrom P450-Gene <i>cyp397a1</i> , <i>cyp398a1</i> , <i>cyp4cm1</i> und <i>cyp6dn1</i>	99
3.11	Wirksamkeit von Kontaktinsektiziden gegen <i>C. lectularius</i>	101
3.11.1	Wirksamkeit von Insektizid A und B auf den sensiblen UBA-Stamm im Wahlversuch.....	101
3.11.1.1	Berechnung mittels mid-p-Variante des Exakten Vierfeldertafeltests nach Fisher.....	102
3.11.1.2	Berechnung mittels binärer logistischer Regression.....	108
3.11.2	Wirksamkeit von Insektizid A auf den AS-Feldstamm im Wahlversuch.....	112
3.11.2.1	Berechnung mittels mid-p-Variante des Exakten Vierfeldertafeltests nach Fisher.....	112
3.11.2.2	Berechnung mittels binärer logistischer Regression.....	114
3.11.3	Wirksamkeit von Insektizid A gegen den AS-Feldstamm im UBA- Zwangversuch.....	115
3.11.3.1	Berechnung mittels mid-p-Variante des Exakten Vierfeldertafeltests nach Fisher.....	116
3.11.3.2	Berechnung mittels binärer logistischer Regression.....	117
3.12	Blutfütterung.....	119

3.12.1	Vergleich der Fütterung am Kaninchen und der artifiziellen Fütterung mit Kaninchenblut	119
3.12.2	Vergleich der Attraktivität verschiedener Blutsorten gegenüber der Fütterung am Kaninchen.....	121
3.12.3	Parallele Aufzucht von Bettwanzen des UBA-Stamms am Kaninchen und mittels artifizieller Fütterung mit defibriniertem Rinderblut	124
3.12.4	Aufzucht von Bettwanzen des UBA-Stamms mittels artifizieller Fütterung mit defibriniertem Schweine- und Schafsblut	127
3.13	Ergebnisse der deutschlandweiten Umfrage zur Erfassung der aktuellen Bettwanzensituation	131
4	Diskussion	134
4.1	Aufzucht von Bettwanzenfeldpopulationen	134
4.2	Beurteilung des 24-Well-Filterkontakt-Biotests.....	135
4.3	Nachweis von Pyrethroid-Resistenzen bei der Bettwanze <i>C. lectularius</i> in Deutschland.....	137
4.3.1	Detektion von Toleranzen in den Feldstämmen gegen den Wirkstoff Deltamethrin.....	137
4.3.2	Nachweis potentieller Resistenzmechanismen auf molekularer Ebene	140
4.4	Detektion des Hidden-Break in der 28S rRNA von <i>C. lectularius</i>	147
4.5	Beurteilung des erweiterten Wahlversuchsdesigns	147
4.5.1	Nachweis einer physiologischen Resistenz beim AS-Stamm	151
4.6	Artifizielle Blutfütterung von <i>C. lectularius</i>	152
4.6.1	Beurteilung des Versuchsaufbaus der Blutfütterungsanlage.....	152
4.6.2	Unterschiede in der Attraktivität verschiedener Blutsorten	153
4.6.3	Versuch der Aufzucht von Bettwanzen des UBA-Stamms mit den defibrinierten Blutsorten Rinderblut, Schweineblut und Schafsblut	155
4.7	Erfassung der aktuellen Bettwanzensituation in Deutschland.....	158
4.8	Ausblick.....	159
4.8.1	Pyrethroid-Resistenz bei <i>C. lectularius</i> in Deutschland.....	159
4.8.2	Wahlversuch.....	160
4.8.3	Artifizielle Blutfütterung.....	161
5	Zusammenfassung	162
6	Summary	164
7	Literatur	166
8	Anhang	176
8.1	Hardy Weinberg-Gleichgewicht.....	176
8.2	Elektropherogramme der in der Transkriptionsanalyse verwendeten RNA-Proben.....	177
8.3	mRNA-Expressionsanalyse der CYP- und Referenzgene.....	183
8.4	Ergebnisse der Wirksamkeitsprüfung der Insektizide A und B im Wahlversuch ...	197
8.4.1	p-Werte aus der Berechnung mittels mid-p-Variante	197

8.4.2	Berechnung mittels binärer logistischer Regression	199
8.5	Wirksamkeitsprüfung des Insektizids A im UBA-Zwangsversuch.....	202
8.5.1	p-Werte aus der Berechnung mittels mid-p-Variante	202
8.5.2	Berechnung mittels binärer logistischer Regression	204
8.6	Vergleich der Schädigungsrate von männlichen und weiblichen <i>C. lectularius</i> des AS-Stamms im Wahl- und Zwangsversuch	205
8.7	Vergleich der Schädigungsrate männlicher und weiblicher <i>C. lectularius</i> des UBA-Stamms im Wahlversuch.....	207
8.8	Gesamtanzahl aus der Aufzucht von <i>C. lectularius</i> mittels artifizieller Blutfütterung	209
8.9	Fragenkatalog zur aktuellen Bettwanzensituation in Deutschland.....	211

I Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Daten der Einkreuzung von <i>Cimex lectularius</i> aus anderen Zuchten und Befallsobjekten in den wirkstoffsensiblen Zuchtstamm des UBA.....	19
Tab. 2: Hintergründe zu den jeweiligen Befällen der <i>Cimex lectularius</i> -Feldstämme SK, AS, OB, HO und LB	21
Tab. 3: Hintergründe zu den jeweiligen Befällen der <i>Cimex lectularius</i> -Feldstämme T, GW, RS, LB2 und LB3.....	23
Tab. 4: Hintergründe zu den jeweiligen Befällen der <i>Cimex lectularius</i> -Feldpopulationen B1-10.....	26
Tab. 5: Primer für die Resistenzuntersuchungen an der Bettwanze <i>Cimex lectularius</i>	28
Tab. 6: Beurteilungskriterien des Schädigungsgrads von <i>Cimex lectularius</i> in der Wirksamkeitskontrolle des Wahl- und Zwangsversuchs (UBA).	59
Tab. 7: Vergleich der mittleren effektiven Konzentrationen und der Hill-Steigungen der Regressionskurven aus den 24-Well-Filterkontakt-Biotests (n = 90 Männchen) zwischen dem sensiblen UBA-Stamm und den fünf Feldstämmen mit Zuchterfolg.....	70
Tab. 8: Verschiedene Genotypen der kdr-Mutationen L925I und V419L	88
Tab. 9: Deskriptive Statistik der drei Referenzgene <i>rps16</i> , <i>rpl8</i> und <i>rpl11</i>	94
Tab. 10: Wiederholte paarweise Korrelationsanalyse der drei Referenzgene <i>rps16</i> , <i>rpl8</i> und <i>rpl11</i>	95
Tab. 11: Von den Schädlingsbekämpfern verwendete Wirkstoffe und Methoden zu Bettwanzenbekämpfung.....	132
Tab. 12: Potentielle Resistenzmechanismen die in den jeweils zehn <i>Cimex lectularius</i> -Feldstämmen und -populationen sowie im CC-Laborstamm detektiert wurden.....	141
Tab. 13: Ergebnisse aus der Berechnung des Hardy Weinberg-Gleichgewichts (Package „Hardy-Weinberg“ für die Statistiksoftware R) für die in den Feldstämmen LB, HO; SK, OB und AS (A) sowie im CC-Stamm (B) nachgewiesene Mutation L925I und die im CC-Stamm nachgewiesene Mutation V419L (B)	176
Tab. 14: mRNA-Expressionsanalyse von <i>cyp397a1</i>	183
Tab. 15: mRNA-Expressionsanalyse von <i>cyp398a1</i>	185
Tab. 16: mRNA-Expressionsanalyse von <i>cyp4cm1</i>	187
Tab. 17: mRNA-Expressionsanalyse von <i>cyp6dn1</i>	189
Tab. 18: mRNA-Expressionsanalyse von <i>rpl11</i>	191
Tab. 19: mRNA-Expressionsanalyse von <i>rpl8</i>	193
Tab. 20: mRNA-Expressionsanalyse von <i>rps16</i>	195
Tab. 21: Statistische Unterschiede innerhalb der Wahlversuche zwischen den Prüfoberflächen und den Belagsalterungen	197
Tab. 22: Statistische Unterschiede innerhalb der Wahlversuche zwischen den Wirksamkeitskontrollen zu den Zeitpunkten 24 h p.a. und 7 d p.a.....	198
Tab. 23: Statistische Unterschiede zwischen dem sensiblen UBA-Stamm und dem AS-Feldstamm innerhalb der Wahlversuche mit Insektizid A auf der Prüfoberfläche Tapete	198

Tab. 24: Berechnung eines Generalisierten Logistischen Modells (GLM) mit Interaktionen im Wahlversuch.....	199
Tab. 25: Vergleich von verschiedenen logistischen Regressionsmodellen mit Interaktionen zur Berechnung der Einflüsse der erklärenden Variablen auf die Zielvariable in den Wahlversuchen mit dem „likelihood ratio“ Test durch Deletion einzelner Variablen (single term deletion)	200
Tab. 26: Berechnung eines Generalisierten Logistischen Modells (GLM) ohne Interaktionen im Wahlversuch.....	200
Tab. 27: Vergleich von verschiedenen logistischen Regressionsmodellen ohne Interaktionen zur Berechnung der Einflüsse der erklärenden Variablen auf die Zielvariable in den Wahlversuchen mit dem „likelihood ratio“ Test durch Deletion einzelner Variablen (single term deletion)	201
Tab. 28: Berechnung eines Generalisierten Logistischen Modells (GLM) ohne Interaktionen mit allen Variablen im Wahlversuch.....	201
Tab. 29: Berechnung eines Generalisierten Logistischen Modells (GLM) ohne Interaktionen im Wahlversuch, ohne die Variable 7 Tage post Applikation	202
Tab. 30: Statistische Unterschiede zwischen dem sensiblen UBA-Stamm und dem AS-Feldstamm innerhalb der UBA-Zwangsversuche mit Insektizid A auf Tapete	202
Tab. 31: Statistische Unterschiede zwischen der Wirksamkeit von Insektizid A im UBA-Zwangsversuch gegen den sensiblen UBA-Stamm und den AS-Feldstamm nach den verschiedenen Einwirkzeiten und Belagsalterungen.....	203
Tab. 32: Statistische Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen <i>Cimex lectularius</i> sowie zwischen der Wirksamkeitskontrolle zu den Zeitpunkten 24 h p.a. und 7 d p.a. innerhalb der UBA-Zwangsversuche mit Insektizid A auf Tapete.....	203
Tab. 33: Berechnung eines Generalisierten Logistischen Modells (GLM) ohne Interaktionen im Zwangsversuch.....	204
Tab. 34: Vergleich von verschiedenen logistischen Regressionsmodellen ohne Interaktionen zur Berechnung der Einflüsse der erklärenden Variablen auf die Zielvariable in den UBA-Zwangsversuchen mit dem „likelihood ratio“ Test, durch Deletion einzelner Variablen (single term deletion)	204

II Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Habitus von <i>Cimex lectularius</i>	2
Abb. 2: Hautreaktionen nach dem Stich von <i>Cimex lectularius</i>	5
Abb. 3: Übersichtskarte (Maßstab: 1:84243) der Berliner Befallsorte, aus denen Bettwanzen gesammelt werden konnten.....	20
Abb. 4: Fundorte der Stämme SK (A-D), AS (E-G) und HO (H-J).....	22
Abb. 5: Massiver Befall am Fundort des T-Stamms.....	24
Abb. 6: Fundorte der Stämme GW (A, B), RS (C, D) und LB3 (E, F).....	25
Abb. 7: Fundorte der Stämme B2 (A, B) und B6 (C, D).....	27
Abb. 8: 24-Well-Filterkontakt-Biotest.....	38
Abb. 9: Aufbau der Wahlversuchsanlage.....	51
Abb. 10: Innenansicht des Stahlbehälters der Wahlversuchsanlage.....	52
Abb. 11: Plexiglaskästen der Wahlversuchsanlage.....	53
Abb. 12: Wanzentasche, Bettwanzenversteck im Wahlversuch.....	55
Abb. 13: Schematische Darstellung der Wahlversuchsanlage.....	58
Abb. 14: Versuchsaufbau des UBA-Zwangversuchs.....	60
Abb. 15: Aufbau der Blutfütterungsanlage.....	62
Abb. 16: Schematische Darstellung der Blutfütterungsanlage.....	64
Abb. 17: Konzentrations-Wirkungs-Kurve des Effekts von Deltamethrin ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) auf die letale Schädigung (%) von <i>Cimex lectularius</i> des sensiblen UBA-Stamms aus den 24-Well-Filterkontakt-Biotests.....	69
Abb. 18: Konzentrations-Wirkungs-Kurven des Effekts von Deltamethrin ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) auf die Anzahl letal geschädigter <i>Cimex lectularius</i> (%) des sensiblen UBA-Stamms im Vergleich zu den fünf Feldstämmen (mit erfolgreicher Aufzucht) aus den 24-Well-Filterkontakt-Biotests.....	71
Abb. 19: Vergleich der maximalen prozentualen Anteile letal geschädigter <i>Cimex lectularius</i> des UBA-Stamms und der fünf Feldstämme mit erfolgreicher Aufzucht bei der höchsten Konzentration von $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ im 24-Well-Filterkontakt-Biotest.....	72
Abb. 20: Konzentrations-Wirkungs-Kurven des Effekts von Deltamethrin ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) auf die Anzahl letal geschädigter männlicher <i>Cimex lectularius</i> (%) des wirkstoffsensiblen UBA-Stamms (UBA) und des SK-Feldstamms aus dem 24-Well-Filterkontakt-Biotests (SK) im Vergleich zu Männchen (M) und Weibchen (W) aus den Petrischalen-Biotests.....	75
Abb. 21: Ausschnitte des <i>Clvssc</i> Gens von <i>Cimex lectularius</i>	76
Abb. 22: PCR-Produkte der durch die Primerpaare Clkdr1 und Clkdr2 amplifizierten Sequenzen zur Detektion der Mutationen V419L bzw. L925I.....	77
Abb. 23: Lineare Regressionen für die Mutationen A V419L und B L925I der in der Pyrosequenzierung gemessenen und erwarteten Werte in %.....	78
Abb. 24: Beispiel-Pyrogramme (PyroMark [®] Q24 System) des SNPs V419L.....	79
Abb. 25: Beispiel-Pyrogramme (PyroMark [®] Q24 System) des SNP's L925I.....	80

Abb. 26: Allelfrequenzen der Mutation L925I (CTT → ATT) von <i>Cimex lectularius</i> des sensiblen UBA-Stamms und der fünf Feldstämme mit erfolgreicher Aufzucht	82
Abb. 27: Allelfrequenzen der Mutation V419L (GTC → CTC) von <i>Cimex lectularius</i> des sensiblen UBA-Stamms und der fünf Feldstämme mit erfolgreicher Aufzucht	83
Abb. 28: Allelfrequenzen der Mutation L925I (CTT → ATT) von <i>Cimex lectularius</i> des sensiblen UBA-Stamms und der sechs Feldstämme ohne Zuchterfolg	84
Abb. 29: Allelfrequenzen der Mutation V419L (GTC → CTC) von <i>Cimex lectularius</i> des sensiblen UBA-Stamms und der sechs Feldstämme ohne Zuchterfolg	85
Abb. 30: Allelfrequenzen der Mutation L925I (CTT → ATT) von <i>Cimex lectularius</i> des sensiblen UBA-Stamms und von sieben Feldpopulationen (Einzeltiere nicht dargestellt) ohne Zuchtmöglichkeit	86
Abb. 31: Vergleich der Allelfrequenzen der Mutationen L925I (CTT → ATT) und V419L (GTC → CTC) von männlichen (M) und weiblichen (W) <i>Cimex lectularius</i> des SK-Stamms aus 2009 (SKA) und der Nachkommen dieses Stamms aus 2013 (SK).....	87
Abb. 32: Elektropherogramm-Beispiele zur Auswahl nicht degradiertes RNA.....	90
Abb. 33: Elektropherogramm-Beispiele verworfener RNA-Proben	91
Abb. 34: PCR-Produkte der CYP- und Referenz-Gene.....	92
Abb. 35: qRT-PCR Amplifikationskurven der CYP-cDNA <i>cyp4cm1</i> , <i>cyp6dn1</i> , <i>cyp397a1</i> , <i>cyp398a1</i> und der Referenz-cDNA <i>rpl8</i> , <i>rpl11</i> , <i>rps16</i> am Beispiel des UBA-Stamms	93
Abb. 36: Peaks der Schmelzkurven der CYP-cDNA <i>cyp4cm1</i> , <i>cyp6dn1</i> , <i>cyp397a1</i> , <i>cyp398a1</i> und der Referenz-cDNA <i>rpl8</i> , <i>rpl11</i> , <i>rps16</i> am Beispiel des UBA-Stamms aus repräsentativen qRT-PCRs	93
Abb. 37: Amplifikationskurven des Plasmid-Standards (4×10 ⁶ bis 4 Kopien), und der negativen Reagenzienkontrolle (NTC) am Beispiel der CYP-cDNA <i>cyp397a1</i> des wirkstoffsensiblen UBA-Stamms.....	97
Abb. 38: Regressionsgeraden der Plasmid-Standards der Referenzgene <i>rpl8</i> , <i>rpl11</i> und <i>rps16</i> sowie der CYP-Gene <i>cyp397a1</i> , <i>cyp398a1</i> , <i>cyp6dn1</i> und <i>cyp4cm1</i>	98
Abb. 39: mRNA-Expression der CYP-Gene <i>cyp397a1</i> , <i>cyp398a1</i> , <i>cyp6dn1</i> und <i>cyp4cm1</i> relativ zu den Referenzgenen <i>rpl8</i> , <i>rpl11</i> und <i>rps16</i>	100
Abb. 40: Vergleich der Wirksamkeit der Insektizide A und B auf den Oberflächen Tapete, Teppich, Hornitex [®] und Sperrholz gegen <i>Cimex lectularius</i> des sensiblen UBA-Stamms im Wahlversuch zum Zeitpunkt 7 d p.a.....	103
Abb. 41: Vergleich der Anzahl schwer geschädigter weiblicher und männlicher <i>Cimex lectularius</i> im Wahlversuch zum Zeitpunkt 7 d p.a	107
Abb. 42: Binäre logistische Regressionen der Ergebnisse aus den Wahlversuchen mit den Insektiziden A und B auf den Prüfoberflächen Tapete, Teppich, Sperrholz und Hornitex [®] gegen <i>Cimex lectularius</i> des wirkstoffsensiblen UBA-Stamms	109
Abb. 43: Binäre logistische Regression der Ergebnisse aus den Wahlversuchen mit den Insektiziden A und B auf den Prüfoberflächen Tapete, Teppich, Hornitex [®] und Sperrholz gegen <i>Cimex lectularius</i> des wirkstoffsensiblen UBA-Stamm	111
Abb. 44: Vergleich der Wirksamkeit des Insektizids A auf der Oberfläche Tapete gegen <i>Cimex lectularius</i> des sensiblen UBA-Stamms und des AS-Feldstamms im Wahlversuch zum Zeitpunkt 7 d p.a.....	113

Abb. 45: Binäre logistische Regression der Ergebnisse aus den Wahlversuchen mit Insektizid A auf der Prüfoberfläche Tapete gegen <i>Cimex lectularius</i> des AS-Feldstamms im Vergleich zum wirkstoffsensiblen UBA-Stamm	115
Abb. 46: Vergleich der Wirksamkeit des Insektizids A auf der Oberfläche Tapete gegen <i>Cimex lectularius</i> des sensiblen UBA-Stamms und des AS-Feldstamms im UBA-Zwangsversuch zum Zeitpunkt 7 d p.a.....	116
Abb. 47: Binäre logistische Regression der Ergebnisse aus den UBA-Zwangsversuchen mit Insektizid A auf der Prüfoberfläche Tapete gegen <i>Cimex lectularius</i> des AS-Feldstamms im Vergleich zum wirkstoffsensiblen UBA-Stamm.....	118
Abb. 48: Anzahl (%) der einzelnen gesogenen <i>Cimex lectularius</i> -Stadien bei der konventionellen Fütterung am Kaninchen und der artifiziellen Kaninchenblutfütterung.....	119
Abb. 49: Vergleich der von je 100 <i>Cimex lectularius</i> aufgenommenen Blutmenge (g) bei der konventionellen Fütterung am Kaninchen und der artifiziellen Kaninchenblutfütterung.....	120
Abb. 50: Vergleich der Anzahl (%) gesogener adulter <i>Cimex lectularius</i> zwischen der 7. Fütterung am Kaninchen und der ersten (zuvor 6 Fütterungen am Kaninchen) artifiziellen Fütterung mit konserviertem Kaninchenblut, defibriniertem frischen Schweineblut, Rinderblut, Schafsblut und offensichtlich verdorbenem Schweineblut (violett)	122
Abb. 51: Vergleich der aufgenommenen Blutmenge (g) von je 100 adulten <i>Cimex lectularius</i> zwischen der 7. Fütterung am Kaninchen und der ersten (zuvor 6 Fütterungen am Kaninchen) artifiziellen Fütterung mit konserviertem Kaninchenblut, defibriniertem frischen Schweineblut, Rinderblut, Schafsblut und offensichtlich verdorbenem Schweineblut (violett)	123
Abb. 52: Vergleich der Anzahl der zu den jeweiligen Fütterungszeitpunkten vorhandenen <i>Cimex lectularius</i> bei der Fütterung am Kaninchen (7 Replikate) und der artifiziellen Fütterung mit defibriniertem Rinderblut (8 Replikate)	125
Abb. 53: Vergleich der Anzahl der zur ersten und letzten Fütterung vorhandenen <i>Cimex lectularius</i> bei der Fütterung am Kaninchen (7 Replikate) und der artifiziellen Fütterung mit defibriniertem Rinderblut (8 Replikate)	126
Abb. 54: Vergleich der Anzahl vorhandener männlicher und weiblicher <i>Cimex lectularius</i> , Juvenilstadien und Eier bei der Fütterung am Kaninchen (7 Replikate) und der artifiziellen Fütterung mit defibriniertem Rinderblut (8 Replikate) zum Zeitpunkt der letzten Fütterung	127
Abb. 55: Zuchtversuche von <i>Cimex lectularius</i> mittels artifizieller Fütterung unter der Verwendung von Schweineblut bei den Teilpopulationen A und B und unter der Verwendung von Schafsblut, mit jeweils verschiedenen Generationen (G) aus ein bis zwei Eiablagen (E1+E2)	130
Abb. 56: Vergleich der Tierzahlen [%] der zu den jeweiligen Fütterungszeitpunkten vorhandenen <i>Cimex lectularius</i> der jeweils ersten Generation bei der Fütterung am Kaninchen (7 Replikate) und den artifiziellen Fütterungen mit defibriniertem Schweineblut (6 Replikate), Rinderblut (8 Replikate) und Schafsblut (3 Replikate).....	131
Abb. 57: Anzahl der Bettwanzenbekämpfungen pro Schädlingbekämpfer (SB) pro Jahr in privaten Haushalten, öffentlichen Einrichtungen und medizinischen Einrichtungen	133
Abb. 58: Elektropherogramme der RNA von männlichen <i>Cimex lectularius</i> des CC-Stamms für die mRNA-Expressionsanalyse ohne vorherige Hitzedenaturierung	177
Abb. 59: Elektropherogramme der RNA von männlichen <i>Cimex lectularius</i> des UBA- und LB-Stamms für die mRNA-Expressionsanalyse ohne vorherige Hitzedenaturierung	178

Abb. 60: Elektropherogramme der RNA von männlichen <i>Cimex lectularius</i> des LB-, HO- und SK-Stamms für die mRNA-Expressionsanalyse ohne vorherige Hitzedenaturierung	179
Abb. 61: Elektropherogramme der RNA von männlichen <i>Cimex lectularius</i> des SK- und OB-Stamms für die mRNA-Expressionsanalyse ohne vorherige Hitzedenaturierung	180
Abb. 62: Elektropherogramme der RNA von männlichen <i>Cimex lectularius</i> des OB-, AS-, und GW-Stamms für die mRNA-Expressionsanalyse ohne vorherige Hitzedenaturierung ..	181
Abb. 63: Elektropherogramme der RNA von männlichen <i>Cimex lectularius</i> des GW- und T-Stamms für die mRNA-Expressionsanalyse ohne vorherige Hitzedenaturierung	182
Abb. 64: Vergleich der Schädigungsrate männlicher und weiblicher <i>Cimex lectularius</i> des AS-Stamms im Wahlversuch unter der Verwendung von Insektizid A auf Tapete.....	205
Abb. 65: Vergleich der Schädigungsrate männlicher und weiblicher <i>Cimex lectularius</i> des AS-Stamms im UBA-Zwangsversuch, unter der Verwendung von Insektizid A auf Tapete	206
Abb. 66: Vergleich der Schädigungsrate männlicher und weiblicher <i>Cimex lectularius</i> im Wahlversuch unter der Verwendung von Insektizid A auf A Teppich, B Hornitex [®] , C Sperrholz	207
Abb. 67: Vergleich der Schädigungsrate männlicher und weiblicher <i>Cimex lectularius</i> im Wahlversuch unter der Verwendung von Insektizid B auf A Teppich und B Hornitex [®] und C Sperrholz	208
Abb. 68: Gesamttierzahl aus der Aufzucht von <i>Cimex lectularius</i> A <i>in vivo</i> am Kaninchen sowie mittels artifizieller Fütterung mit B Rinderblut und C Schafsblut	209
Abb. 69: Gesamttierzahl aus der Aufzucht von <i>Cimex lectularius</i> mittels artifizieller Fütterung mit Schweineblut, Ansätze A (A) und B (B).....	210
Abb. 70: Fragenkatalog zur aktuellen Bettwanzensituation in Deutschland	211

III Abkürzungsverzeichnis

1WB	1 Woche Belagsalterung
2WB	2 Wochen Belagsalterung
24B	24-Well-Filterkontakt-Biotest
α	Signifikanzniveau, Irrtumswahrscheinlichkeit
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
AIC	Akaike Information Criterion; Kriterium zur Auswahl eines Modells
Aqua Bidest	Zweifach destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
C	Cytosin
cDNA	Komplementäre DNA
cds	Kodierende DNA-Sequenzen
<i>Clvssc</i>	<i>Cimex lectularius</i> spannungsabhängiger Natriumkanal
Cq	Quantifikationszyklus
CYP	Cytochrom P450
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DEPC	Diethyldicarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsDNA	Doppelstrang DNA
EC ₅₀	Mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EWZ	Einwirkzeit
FG	Fachgebiet
G	Guanin
gDNA	Genomische DNA
H	Heterozygot
HM	Homozygot mutiert
HNM	Homozygot nicht mutiert
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HS	Hill-Steigung
I	Isoleucin
IfSG	Infektionsschutzgesetz

J1-5	Juvenilstadien der Bettwanzen 1-5
kB	Keine Belagsalterung
kDa	Kilodalton
<i>kdr</i>	Knockdown-Resistenz
KI	Konfidenzintervalle
L	Leucin
M	Molare Masse
mRNA	Messenger RNA
n.a.	nicht verfügbar, nicht anwendbar, unzutreffend
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NTC	Negative Reagenzienkontrolle
OR	Odds ratio, Effektkoeffizient
p	Signifikanzwert
p.a.	Post Applikation
PB	Petrischalen-Filterkontakt-Biotest
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-PCR
r	Korrelationskoeffizient
r ²	Bestimmtheitsmaß, Determinationskoeffizient
rcf	Relative Zentrifugalkraft
RFU	Relative Fluoreszenzeinheit
RH	Relative Luftfeuchtigkeit
R _i	Resistenzindex
RIN	RNA Integritäts Nummer
RNA	Ribonukleinsäure
RP	ribosomale Proteine
rpm	Umdrehung pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkriptase
SBK	Schädlingsbekämpferunternehmen
SD	Standardabweichung
SE	Standardfehler
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SNP	Einzelbasenmutation
ssDNA	Einzelstrang-DNA
T	Thymin

Tab.	Tabelle
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Elektrophoresepuffer
T _m	Schmelztemperatur
T _R	Raumtemperatur
UBA	Umweltbundesamt
U	Unit
V	Valin
V _{ssc}	Spannungsabhängiger Natriumkanal

1 Einleitung

Infestationen mit dem hämatophagen Ektoparasiten *Cimex lectularius* werden neben dem Einsatz von Wärme- und Kälteverfahren vor allem mit Insektiziden bekämpft. Eine Bekämpfung ist aufgrund der versteckten Lebensweise der Tiere sehr schwierig und dadurch oft langwierig und teuer. Zudem wurden durch die Biozid-Verordnung (BPR, EU Nr. 528/2012) in den letzten Jahren einige Wirkstoffe (Organochlorverbindungen, Organophosphate) und damit auch Produkte, die diese Wirkstoffe enthalten, vom Markt genommen, da sie aufgrund ihrer intrinsischen Eigenschaften eine Gefahr für Menschen, Tiere und Umwelt darstellen (persistent, bioakkumulierend, giftig). Im Rahmen der Biozidzulassung wurden bis zum jetzigen Zeitpunkt (Frühjahr 2015) lediglich drei insektizide Wirkstoffe (aus den Wirkstoffgruppen Pyrethroide, Carbamate und Pyrrole) in Produkten zur Bettwanzenbekämpfung in Europa zugelassen. Ungeachtet dessen, dass sowohl in der Zulassung befindliche Produkte als auch Produkte mit Wirkstoffen die momentan von der EU im Wirkstoffzulassungsverfahren sind, legal erworben und verwendet werden können, ist die Auswahl an derzeit verfügbaren Produkten zur Bettwanzenbekämpfung gering. Die meisten der verfügbaren Produkte enthalten die Wirkstoffe der Klasse der Pyrethroide, die eine relativ geringe Toxizität für Säuger und Vögel sowie eine relativ geringe Umweltpersistenz aufweisen und in der EU zugelassen wurden. Aufgrund einer schnellen Paralyse der Zielorganismen durch Pyrethroide und vergleichsweise geringen Anschaffungskosten werden sie weltweit bevorzugt eingesetzt und auch bei Bettwanzenbekämpfungen hauptsächlich verwendet (DANG et al. 2014a; DANG et al. 2014b; DAVIES et al. 2012; DONG et al. 2014; HARDSTONE et al. 2014; KILPINEN et al. 2011; SEONG et al. 2010). Seit einigen Jahren mehren sich weltweit die Berichte, dass Bettwanzen Resistenzen gegen Pyrethroide entwickelt haben (ADELMAN et al. 2011; BOASE 2008; BUSVINE 1958; DANG et al. 2014b; DAVIES et al. 2012; KILPINEN et al. 2008; KILPINEN et al. 2011; LILLY et al. 2009; MAMIDALA et al. 2011a; ROMERO et al. 2007; SEONG et al. 2010; TAWATSIN et al. 2011; YOON et al. 2008; ZHU et al. 2010b). Auch in Deutschland berichten Schädlingsbekämpfer über Probleme bei der Bettwanzenbekämpfung unter der Verwendung von Pyrethroiden. Allerdings liegen aus Deutschland derzeit keine wissenschaftlichen Daten zum Auftreten von Wirkstoffresistenzen bei Bettwanzen und den zugrunde liegenden Mechanismen vor.

1.1 Die Biologie der Bettwanze *Cimex lectularius*

Die Bettwanze *C. lectularius* L. (Hemiptera: Cimicidae) ist ein obligatorisch hämatophager, temporärer Ektoparasit, welcher ganzjährig und weltweit auftritt (PINTO et al. 2007). Hauptwirte sind Menschen, aber auch Fledermäuse, Vögel und manchmal Haustiere können parasitiert werden (JOHNSON 1941; LUCIUS und LOOS-FRANK 2008; REINHARDT und SIVA-JOTHY 2007). Bettwanzen können unter geeigneten Bedingungen und je nach Stadium mehr als sechs Monate lang ohne Nahrung auskommen, eine Eiproduktion und damit auch eine Vermehrung sind in dieser Zeit jedoch nicht möglich (HARLAN 2006; KEMPER 1930; POLANCO et al. 2011c).



Abb. 1: Habitus von *Cimex lectularius*. **A** Dorsalansicht von einem Männchen (links) und einem Weibchen (rechts); Die Skala gibt mm an; **B** Aufbewahrung von *C. lectularius*: Petrischale mit Exuvien (hellbraun) und adulten Tieren (dunkelbraun) auf zwei Rundfiltern, die mit abgesetzten Kottropfen (schwarz) der Tiere bedeckt sind.

Die Imagines haben eine rötlich-braune, durchsichtige Kutikula, die mit einer Vielzahl von Borsten bedeckt ist. Die Tiere sind breit-oval und dorsoventral abgeflacht. Die Körperlänge der rundlicher geformten Weibchen schwankt zwischen 4,5 mm - 8,5 mm und bei den schmalen, spitz zulaufenden Männchen zwischen 4 mm - 6,5 mm (JOHNSON 1941; LUCIUS und LOOS-FRANK 2008; REINHARDT und SIVA-JOTHY 2007) (Abb. 1). An ihrem schmalen Kopf tragen Bettwanzen seitlich stark hervorstehende, rote Augen, ein Paar schlanke, viergliedrige Antennen und einen Stechrüssel, der in Ruhelage ventral eingeklappt ist. Der Kopf sitzt in der konkaven Einbuchtung des Thorax, welcher nur noch verkümmerte Vorderflügel trägt, Hinterflügel fehlen ganz. Das Abdomen ist mit breiten Tergiten und Sterniten besetzt. Im ersten bis vierten Sternit und auf der Ventralseite befindet sich die Hungerfalte, ein schwach sklerotierter Teil, der bei der Blutaufnahme eine Körperdehnung zulässt (LUCIUS und LOOS-FRANK 2008).

Die Befruchtung der Weibchen erfolgt extragenital durch die sogenannte traumatische Insemination. Dabei penetriert das Männchen mit seinem stachelartigen Aedeagus die Kutikula des Weibchens an einer dafür vorgesehenen ventralen Einbuchtung, der Ektospermalege. Das Sperma wird in die darunter befindliche Spermalege, eine Art Zellkissen, injiziert und dort bis zur Befruchtung der Eizellen gespeichert. Das Sperma des Vorgängers wieder zu entfernen ist für ein anderes Männchen dadurch unmöglich (BENOIT et al. 2012; REINHARDT und SIVA-JOTHY 2007). Für weibliche Bettwanzen birgt diese Fortpflanzungsart keine offensichtlichen Vorteile, da ihre Lebensspanne drastisch reduziert werden kann, und zu häufige Kopulationen nachweislich zu einer verminderten Eiablage führen (POLANCO et al. 2011a; SIVA-JOTHY 2006; STUTT und SIVA-JOTHY 2001). Es gibt Theorien, nach denen Weibchen Sperma zur Nahrungsergänzung verwenden oder ihr favorisiertes Männchen auswählen, indem sie unerwünschtes Sperma von einem anderen Männchen durch Phagozytose entfernen (REINHARDT und SIVA-JOTHY 2007). Bei einer durchschnittlichen Lebenserwartung von sechs Monaten und einer Eiablagereate von fünf bis sieben Eiern pro Woche, legt ein Weibchen unter geeigneten Bedingungen im Laufe ihres Lebens 150-200 Eier ab (POLANCO et al. 2011a). Diese sind milchig-weiß, länglich, leicht gebogen und werden auf ein Substrat direkt im Versteck oder dessen Nähe geklebt (PINTO et al. 2007). Jedes der insgesamt fünf Juvenilstadien muss jeweils einmal eine Häutung induzierende Menge Blut saugen, um sich weiterzuentwickeln (KEMPER 1931; REINHARDT und SIVA-JOTHY 2007). Da Bettwanzen hemimetabole Insekten sind, unterscheiden sich die Juvenilen von den Adulten nur durch ihre Größe, die hellere, meist gelbliche Färbung und durch das Fehlen von Flügelansätzen (LUCIUS und LOOS-FRANK 2008).

Die verschiedenen Bettwanzenstadien leben zum Schutz vor dem Austrocknen und zur erleichterten Partnersuche aggregiert in Verstecken (MARX 1955; SILJANDER et al. 2008). Dort findet man auch die Eier und Exuvien der Tiere. Vor allem das Versteck selbst, aber auch dessen Eingang sind mit Kots Spuren übersät. Wanzen verstecken sich in jeglichen Ritzen, hinter losen Tapeten, Bildern, Fußleisten, Steckdosen und Möbeln, unter Teppichen, zwischen Buchseiten und CDs, etc. oder direkt im Bettgestell.

Adulte Bettwanzen können aus ihrer metathorakalen Wehrdrüse und Nymphen aus drei abdominalen Wehrdrüsen ein hauptsächlich aus Aldehyden bestehendes Alarmpheromon abgeben. Der wanzentypische, für einige Menschen intensive und unangenehme Duft sorgt für

eine fluchtartige Zerstreuung der aggregierten Wanzen (EOM et al. 2012; HARRACA et al. 2010; LEVINSON et al. 1974; REINHARDT und SIVA-JOTHY 2007).

Ihren Wirt finden Bettwanzen wie andere hämatophage Insekten auch (LEHANE 2005) vor allem über Chemo- und Thermorezeption. Reizquellen sind Körperwärme (ANDERSON et al. 2009; SINGH et al. 2012), CO₂ als Anteil der Ausatemluft und verschiedene Infochemikalien wie Wirtskairomone und Pheromone (AAK et al. 2014; ANDERSON et al. 2009; HARRACA et al. 2012; SILJANDER et al. 2008; SILJANDER 2006; SINGH et al. 2012; SINGH et al. 2013; SUCHY und LEWIS 2011; WANG et al. 2009; WEEKS et al. 2011). Nicht vollständig geklärt ist, über welche Entfernung Bettwanzen ihren Wirt wahrnehmen können. In verschiedenen Publikationen variieren die Angaben dazu zwischen 4 cm und 1,5 m (PINTO et al. 2007). Eigene vorangegangene Versuche haben gezeigt (Wahlversuch s. 2.2.4), dass Bettwanzen eine Reizquelle wie CO₂ in Kombination mit simulierter Körperwärme über eine Entfernung von mindestens 40 cm wahrnehmen können und ihr Versteck verlassen, um diese aufzusuchen.

1.2 Medizinische Bedeutung von *C. lectularius*

Nach dem Blutsaugen entstehen bei den meisten Menschen früher oder später an der Stichstelle kleine Quaddeln. Einige Menschen hingegen zeigen gar keine oder erst nach wiederholter Exposition Stichreaktionen. Bettwanzenstiche unterscheiden sich häufig von anderen Insektenstichen durch mehrere Stiche an einer Stelle oder in einer Reihe (DOGGETT et al. 2012; GODDARD und DESHAZO 2009; LIEBOLD et al. 2003; PINTO et al. 2007). Zwei mögliche Gründe für diese Stichbilder werden derzeit noch kontrovers diskutiert: 1. Bettwanzen reagieren sehr sensitiv auf Bewegungen des Wirts und ziehen dadurch ihren Stechrüssel häufig heraus und stechen anschließend ein paar Zentimeter daneben zum Weitersaugen erneut. 2. Mehrere Bettwanzen saugen nebeneinander an einer Stelle Blut, wo der menschliche Körper z. B. auf einer Matratze aufliegt, wodurch eine charakteristische Reihe von Stichen erkennbar wird (DOGGETT et al. 2012). Neben den üblichen Quaddeln können Bettwanzenstiche komplexere Hautreaktionen auslösen. Bei einigen Patienten treten juckende Knötchen, blasiger Hautausschlag oder flächige Rötungen mit zum Teil starken Schwellungen auf (Abb. 2). Durch starken Juckreiz mit Kratzen kann es zu Folgeinfektionen und entzündlichen Ekzemen kommen, wodurch die Heilung verzögert wird (DOGGETT et al. 2012; GODDARD und DESHAZO 2009; LIEBOLD et al. 2003). Obwohl *C. lectularius* experimentell mit über 40 humanpathogenen Krankheitserregern infiziert werden kann, konnte der Bettwanze eine

Überträgerfunktion als natürlicher Vektor bisher nicht nachgewiesen werden (DAVIS et al. 2009; DOGGETT et al. 2012; GODDARD und DESHAZO 2009; KOLB et al. 2009; REINHARDT und SIVA-JOTHY 2007). Neben den negativen Auswirkungen auf die physische Gesundheit haben Bettwanzeninfestationen häufig einen negativen Einfluss auf die Psyche und führen bei betroffenen Personen zu Schlaflosigkeit bis hin zu Angstzuständen (DOGGETT et al. 2012; POTTER 2010).

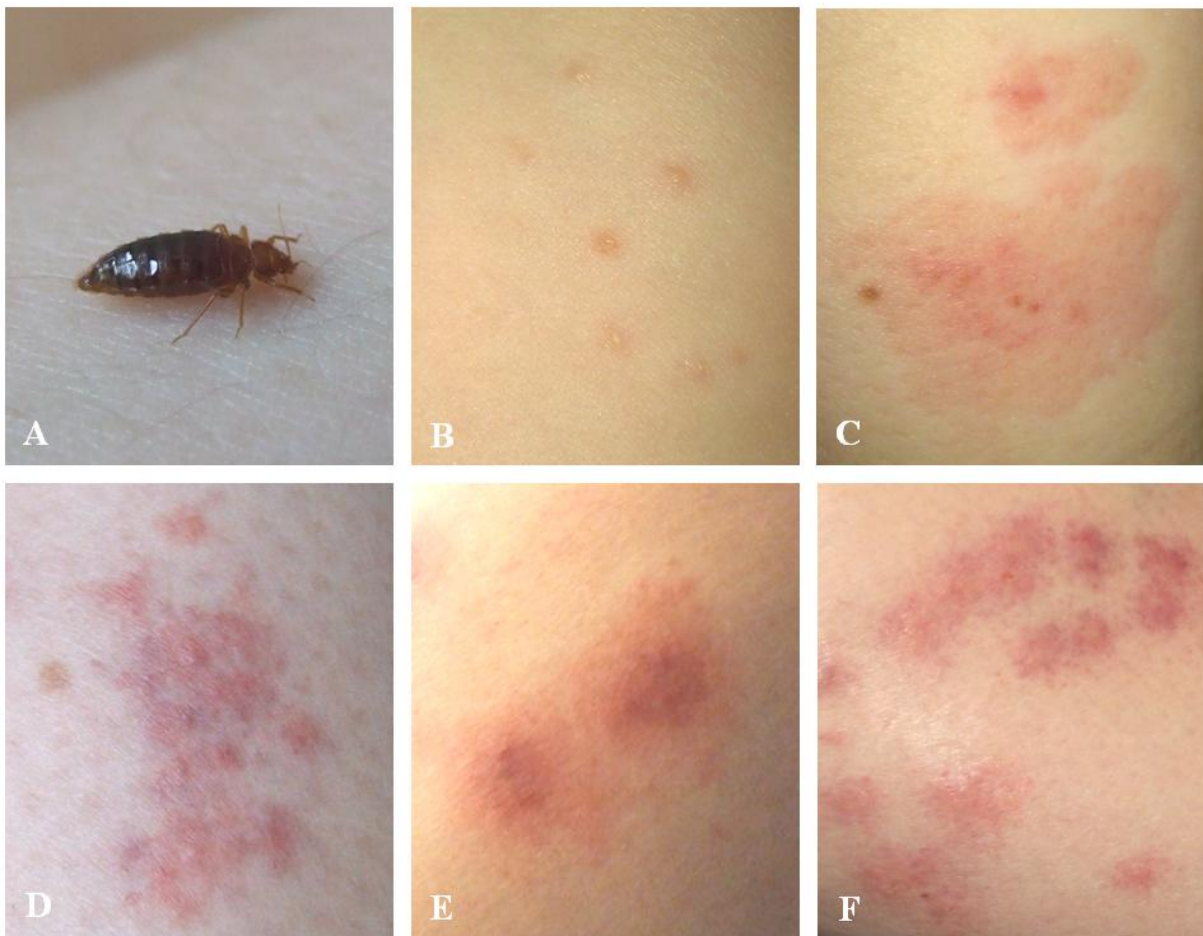


Abb. 2: Hautreaktionen nach dem Stich von *Cimex lectularius*. **A** *C. lectularius* Männchen bei der Blutaufnahme am Unterarm. **B-F** Verschiedene Hautreaktionen 7-10 Tage nach dem Stich. Personen ohne Stichreaktionen sind nicht dargestellt. Eine Person zeigte nach mehrmaligem Stechen in einem Zeitraum von einem Jahr zunächst keine Stichreaktionen. Weiteres Stechen ergab eine schwache Reaktion mit kleinen Pusteln (B) und ein erneutes Stechen mehrere Monate später eine großflächige Reaktion (C). Bilder: Umweltbundesamt.

1.3 Gründe für das massive Wiederauftreten von *C. lectularius*

Bettwanzen parasitieren den Menschen bereits seit hunderten von Jahren. Nach Ende des zweiten Weltkriegs wurden kaum noch Fälle von Bettwanzenbefall in Industrienationen wie Deutschland bekannt. Infestationen beschränkten sich überwiegend auf Entwicklungsländer.

Mögliche Ursachen für diesen Rückgang waren zum einen das in den 30er Jahren entwickelte Bewusstsein für das Problem von Bettwanzeninfestationen und deren Bekämpfung durch das Ausräuchern von Häusern und Wohnungen mit Schwefeldioxid und Cyanwasserstoff. Zum anderen war der ab 1945 erhebliche Einsatz von damals neuartigen, synthetischen Insektiziden wie z.B. Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) mit langer Residualwirkung dafür verantwortlich. (BOASE 2008; BUSVINE 1964; HARLAN 2006; MASETTI und BRUSCHI 2007; TER POORTEN und PROSE 2005; WANG und COOPER 2011).

Nach jahrzehntelanger Abwesenheit in den Industrieländern sind in den letzten 20 Jahren die Befallsraten von Bettwanzen in Häusern, Wohnungen und öffentlichen Einrichtungen zum Teil wieder sehr stark gestiegen (HARLAN 2006; LEE et al. 2008; MASETTI und BRUSCHI 2007; TER POORTEN und PROSE 2005). Als Ursachen werden die Globalisierung mit der vermehrten Reisetätigkeit der Menschen (DAVIS et al. 2009; KOLB et al. 2009), der nationale und internationale Handel mit Gebrauchsgütern und Verbote von einigen Wirkstoffen (ESKENAZI et al. 2009) diskutiert. Als Hauptgrund für die aktuelle Situation wird die Entstehung von Resistenzen gegen die zurzeit auf dem Markt befindlichen Wirkstoffe, vor allem gegen Pyrethroide genannt (DAVIES et al. 2012; ESKENAZI et al. 2009; MAMIDALA et al. 2011a; MAMIDALA et al. 2012; PINTO et al. 2007; ROMERO et al. 2007; SEONG et al. 2010; YOON et al. 2008; ZHU et al. 2010a; ZHU et al. 2010b).

1.4 Insektizide Wirkstoffklassen zur Bettwanzenbekämpfung

Insektizide sind Formulierungen, bestehend aus aktiven Wirkstoffen und verschiedenen inerten Inhaltsstoffen, die in der Kombination ein effektives und gleichzeitig im Gebrauch sicheres Produkt ergeben sollen (YU 2008). Die am häufigsten verwendeten Formulierungen der Insektizide, die gegen Bettwanzen eingesetzt werden, sind Puder und Konzentrate, die mit Leitungswasser gemischt als Spritzmittel eingesetzt werden. Die Aufnahme der Wirkstoffe erfolgt bei den Bettwanzen durch Berührung (Kontaktgifte). Hierbei dringen die Insektizide über die Atemöffnungen oder Gelenke in die Bettwanze ein und werden in der Hämolymphe gelöst (YU 2008).

Eine Klassifizierung der Wirkstoffe erfolgt aufgrund ihrer chemischen Struktur. Die Wirkmechanismen der einzelnen Wirkstoffgruppen können sehr unterschiedlich sein, allerdings können auch verschiedene Gruppen den gleichen Wirkmechanismus und -ort haben. Verfügbare Wirkstoffe zur Bekämpfung von Bettwanzen interagieren vor allem mit deren Nervensystem.

Eine Ausnahme bildet Chlorfenapyr aus der Gruppe der Pyrrole, das erst durch die oxidative Entfernung der N-Ethoxymethylgruppe durch Cytochrom P450 Monooxygenasen zu einem aktiven Insektizid wird. Die oxidative Phosphorylierung wird entkoppelt und die Synthese von ATP (Adenosintriphosphat) innerhalb der Atmungskette bleibt aus, wodurch der Zelltod und infolgedessen auch der Tod der Bettwanze eintreten (ROMERO et al. 2009; YU 2008).

Carbamate sind Esther der Carbamidsäuren und beeinflussen die synaptische Transmission zwischen zwei Nervenzellen. Acetylcholin (ACh) dient dabei als Transmitter zwischen den Synapsen des zentralen Nervensystems und wird nach erfolgter Reizübermittlung durch das Enzym Acetylcholinesterase (AChE) abgebaut. Carbamate inhibieren die AChE irreversibel, wodurch sich ACh im synaptischen Spalt sammelt und es zu einer andauernden Reizung der Postsynapse kommt. Bei den Bettwanzen kommt es zunächst zu einer Hyperaktivität, gefolgt von Zittern und Krämpfen und letztendlich zur Lähmung und dem Tod (YU 2008).

Pyrethroide sind synthetische Analoga der natürlich vorkommenden Pyrethrine, Hauptwirkstoffe des Pyrethrum, einem insektiziden Wirkstoff welcher von verschiedenen Chrysanthemenarten gebildet wird (YU 2008). Dabei handelt es sich um sehr wirksame lipophile Insektizide, die vor allem als Kontaktgifte angewendet werden und ebenso wie DDT mit den spannungsabhängigen Natriumkanälen der Nervenzellen interagieren (DONG et al. 2014; NARAHASHI 1992, 1996; SODERLUND 2012; VIJVERBERG und VAN DEN BERCKEN 1990; VIJVERBERG und VAN DEN BERCKEN 1982). Die Änderung der Leitfähigkeit von spannungsabhängigen Natriumkanälen und Kaliumkanälen in den Axonen der Nervenzellen ist entscheidend für die Reizübertragung innerhalb einer Zelle (CATTERALL 2000). Während des Ruhemembranpotentials sind beide Kanäle über ein sogenanntes Aktivierungstor geschlossen. Dabei sind die Konzentration der Natriumionen (Na^+) außerhalb der Zelle und die der Kaliumionen (K^+) im Zellinneren höher. Erreicht das Membranpotenzial durch einen Reiz das Schwellenpotenzial am Axonhügel, werden zuerst die Natriumkanäle aktiviert (MOYES und SCHULTE 2010). Das Hauptstrukturelement dieser Kanäle bildet eine große α -Untereinheit (~260 kDa) welche mit vier enthaltenen homologen Domänen (I-IV) in pseudotetramerer Anordnung die Ionenpore formt. Jede dieser Domänen enthält sechs hydrophobe transmembran-Helices und verschiedene weitere hydrophobe Segmente zur Formation und Funktion der Ionenpore. Dabei agieren die Helices eins bis vier als spannungsabhängige Module, wobei Helix vier nach erfolgter Depolarisation der Membran die Aktivierung des Kanals auslöst. Die Helices fünf und sechs formen hingegen die Pore eines Na^+ -Kanals. Die

Peptidschleife zwischen diesen Helices ist für die Ionenselektivität zuständig (CATTERALL 2003; GOLDIN 2003; NARAHASHI 1992).

Durch das Schwellenpotenzial werden mittels einer Konformationsänderung die Aktivierungstore der Kanäle geöffnet, und Na^+ -Ionen können in das Axon hineinströmen, wodurch die Zelle depolarisiert wird. Nach etwa einer Millisekunde erreicht das Membranpotenzial ein Gleichgewichtspotential für Na^+ , und die Na^+ -Kanäle werden wieder geschlossen. Dies geschieht durch das im Zytoplasma liegende Inaktivierungstor, das sich wie ein „Korken“ in den Kanal setzt und verschließt. Gleichzeitig öffnen sich die Aktivierungstore der spannungsabhängigen Kaliumkanäle und K^+ -Ionen strömen aus der Zelle heraus. Im Gegensatz zu den Natriumkanälen bestehen Kaliumkanäle aus einer Domäne mit vier einzelnen Untereinheiten, wovon jede mit einer Domäne der α -Untereinheit des Natriumkanals korrespondiert. Während dieser Phase der Repolarisation des Membranpotenzials kehren die Na^+ -Kanäle in ihre Ausgangskonformation mit geschlossenen Aktivierungstor und geöffnetem Inaktivierungstor zurück. Nach der Repolarisation schließen auch die Aktivierungstore (K^+ -Kanäle haben nur ein Tor) der K^+ -Kanäle wieder, und die Zelle kehrt zum Ruhepotential zurück (DONG et al. 2014; MOYES und SCHULTE 2010; NARAHASHI 1992, 1996; SODERLUND 2012; VIJVERBERG und VAN DEN BERCKEN 1990; VIJVERBERG und VAN DEN BERCKEN 1982; YU 2008).

Aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften wird vermutet, dass Pyrethroide, Pyrethrum und DDT in der Lipidschicht der Nervenmembranen an den Transmembranbereich der spannungsabhängigen Na^+ -Kanäle binden (DONG et al. 2014; NARAHASHI 1996; YU 2008). Die genauen Rezeptorstellen dieser Wirkstoffe an den Na^+ -Kanälen sind bis heute nicht gänzlich geklärt. Es gibt allerdings Hinweise auf zwei Bindungsstellen, mit denen Pyrethroide an multiplen Positionen mit den Helices der vier Domänen von geöffneten Na^+ -Kanälen sowie über deren Peptidverbindungen in Kontakt stehen (DONG et al. 2014). Dadurch wird das Schließen der Aktivierungstore während der Repolarisationsphase verhindert, was zu einem stetigen Na^+ -Strom in das Zellinnere führt. Dieser wird durch das Schließen der Inaktivierungstore zwar kurz gestoppt, aber nach der Rückkehr in ihre offene Ausgangskonformation wird der nur langsam abklingende Einwärtsstrom von Na^+ bis zum Schließen der Aktivierungstore fortgesetzt. Die Konsequenz dieses sogenannten Schwanzstroms ist ein auf das Aktionspotenzial folgendes depolarisierendes Nachpotenzial. Diese grundlegende Interaktion und Modifikation der α -Untereinheiten der spannungsabhängigen

Na⁺-Kanäle ist für alle Pyrethroide gleich. Allerdings ist die Abklingzeit des Schwanzstroms für Pyrethroide mit einer zusätzlichen Cyanogruppe aus Kohlenstoff und dreifach gebundenem Stickstoff (Typ II, Bsp. Deltamethrin) mit bis zu einer Sekunde deutlich länger als für Pyrethroide ohne Cyanogruppe (Typ I; Permethrin) oder DDT mit bis zu 10 ms. Aufgrund dieses unterschiedlichen physiologischen Effekts haben Typ I und II Pyrethroide auf Organismen eine unterschiedliche Wirkung. Typ I Pyrethroide bewirken ein repetitives Feuern in sensorischen Neuronen. Die Symptome von Insekten sind neuronale Übererregbarkeit, Krämpfe und Muskelzuckungen, bis hin zur Erschöpfung und dem Tod. Typ II Pyrethroide bewirken hingegen kein repetitives Feuern, sondern eine durch die längere Abklingzeit des Schwanzstroms bedingte schrittweise Depolarisation der Nervenmembran. Die Amplitude des Aktionspotenzials wird reduziert, was in Abhängigkeit von der Frequenz des Stimulus zu einer Suppression des Aktionspotentials bis hin zum Verlust der elektrischen Erregbarkeit führen kann. Pyrethroide des Typs II verursachen deshalb eine Störung der Bewegungskoordination und Haltungsinnervation was wiederum zur totalen Erschöpfung und letztendlich zum Tod führt. Die beschriebenen Intoxikationserscheinungen treten nach adäquat erfolgter Behandlung mit Pyrethroiden auch bei Bettwanzen bereits nach kurzer Zeit auf, man spricht vom sogenannten Knockdown-Effekt (DONG et al. 2014; LASKOWSKI 2002; NARAHASHI 1992, 1996; SODERLUND 2012; VIJVERBERG und VAN DEN BERCKEN 1990; VIJVERBERG und VAN DEN BERCKEN 1982; YU 2008).

1.5 Insektizid-Resistenzen bei *C. lectularius*

In den letzten Jahrzehnten wurden in diversen Insektenarten verschiedene Mechanismen detektiert, die einzeln oder in Kombination auftreten können und für Insektizidresistenzen verantwortlich sind. Neben der Resistenz durch ein verändertes Verhalten werden vier Resistenzmechanismen unterschieden: 1. ein erschwertes Eindringen der Insektizide, 2. eine verstärkte Sequestration und Exkretion der Insektizide, 3. eine erhöhte metabolische Detoxifikation und 4. eine verminderte Wirkung der Insektizide am Wirkort. Auch in verschiedenen Bettwanzenstämmen wurden diese vier Mechanismen entdeckt und für die Pyrethroidresistenz bei Bettwanzen verantwortlich gemacht (BAI et al. 2011; MAMIDALA et al. 2011a; RAYMOND et al. 2001; MAMIDALA et al. 2011a; PITTENDRIGH et al. 2014b; ZHU et al. 2013).

Fremdstoffmetabolisierende Enzyme wie Cytochrom P450-Monooxygenasen, Glutathion S-Transferasen und Carboxylesterasen können durch ständigen chemischen Stress wie

Insektizidkontakt induziert werden und ihre Aktivität erhöhen (MAMIDALA et al. 2011a; PITTENDRIGH et al. 2014b; YU 2008; ZHU et al. 2013). Durch diesen intensivierten Metabolismus wirken Insektizide auf den Organismus weniger toxisch. Solche Toleranzen gegenüber Insektiziden können innerhalb einer Generation entwickelt werden und gehen verloren, wenn die Insektizid-Exposition endet (YU 2008). Entstehen jedoch durch andauernden Selektionsdruck, z.B. durch den Einsatz von Insektiziden, innerhalb einer Population über mehrere Generationen hinweg genetisch vererbare Merkmale, die ebenfalls den Effekt der gegen sie verwendeten Insektizide entweder durch Änderungen im Verhalten, der Entwicklung oder biochemische Prozesse abschwächen, liegt eine Resistenz vor. Eine Resistenz gegen Insektizide ist demnach die mikroevolutionäre Anpassung auf das Vorhandensein von anthropogenen Wirkstoffen im Lebensraum von Insektenpopulationen (ONSTAD 2014; SAWICKI 1987; WHO 1957). Insektizid-Resistenzen sind weltweit ein wachsendes Problem. In Vektoren wie Stechmücken stellen sie seit Jahrzehnten in den betroffenen Ländern für die menschliche Gesundheit eine große Gefahr dar (HEMINGWAY und RANSON 2000; WHO 1998). Auch in der Land-, Forst- und Viehwirtschaft kommt es wegen resistenten Schädlingen zu Ernteaufällen, Rohstoffverlusten und Tiererkrankungen, was zu massiven wirtschaftlichen Einbußen führt. Aber auch bei der industriellen (z.B. in Lebensmittelbetrieben) und urbanen Schädlingsbekämpfung haben viele Schädlings- und Lästlingsarten wie Nager, Tauben, Schaben und auch Bettwanzen, Resistenzen gegen die gängigen Biozide entwickelt (ONSTAD 2014; YU 2008).

Bis zu seinem Verbot in den 1970er Jahren wurde DDT als Kontaktinsektizid gegen Bettwanzen eingesetzt. Erste Berichte von DDT-resistenten Bettwanzenstämmen lagen schon in den 1950er Jahren vor (BUSVINE 1958). Da Pyrethroide und DDT die α -Untereinheit des spannungsabhängigen Natriumkanals als Wirkort haben, existierten vermutlich bereits vor dem ersten Einsatz von Pyrethroiden in einigen Populationen geringe Häufigkeiten von Genen, die entsprechende Resistenzmechanismen kontrollierten (HEMINGWAY und RANSON 2000; YU 2008). In Folge dieser Präadaptation und der damit verbundenen Entwicklung von Kreuzresistenzen (NARAHASHI 1992) sowie des massiven, weltweiten Einsatzes dieser Wirkstoffe mehren sich vor allem in Amerika und Australien (DOGGETT et al. 2011; DOGGETT et al. 2012; POTTER 2006) aber auch in Kanada (SHUM et al. 2012), Asien (HOW und LEE 2010; SUWANNAYOD et al. 2010), Afrika (GBAKIMA et al. 2002; TEMU et al. 1999) und Europa (BAUER-DUBAU 2009; BOASE 2008; FUENTES et al. 2010; GIORDA et al. 2013; KILPINEN et al. 2008; KILPINEN et al. 2011; LEVY BENCHETON et al. 2011; MASETTI

und BRUSCHI 2007; PAUL und BATES 2000; RICHARDS et al. 2009; SAHIL et al. 2013) die Berichte über die Ausbreitung Pyrethroid-resistenter Bettwanzenstämme.

1.5.1 Wirkort-Resistenz bei *C. lectularius*

Mutationen im Gen der α -Untereinheit der spannungsabhängigen Natriumkanäle (*Vssc*-Voltage sensitive sodium Channel), dem Wirkort von Pyrethroiden, mindern nachweislich die Knockdown-Wirkung dieser Wirkstoffe. Die sogenannte Knockdown-Resistenz (*kdr*) wird durch *kdr*-Mutationen ausgelöst, welche den Effekt der Pyrethroide durch eine verminderte Bindung an die Na^+ -Kanäle und/oder durch eine Modifikation ihres Torsystems reduzieren. Durch eine verminderte oder verhinderte Bindung der Pyrethroide an die Na^+ -Kanäle wird der einwärts gerichtete Na^+ -Ionenstrom nur wenig oder gar nicht wie in Punkt 1.4 beschrieben beeinflusst, wodurch Insekten nur temporär oder gar nicht geschädigt werden. Zudem wurde nachgewiesen, dass eine durch *kdr*-Mutationen beeinflusste Torkinetik der Na^+ -Kanäle dem Effekt von Pyrethroiden entgegenwirken, und die Na^+ -Kanäle dadurch wieder früher schließen können (DONG et al. 2014).

Bei der Bettwanze *C. lectularius* werden ebenfalls Punktmutationen im Gen der α -Untereinheit des spannungsabhängigen Natriumkanals (*Clvssc*) mit Pyrethroidresistenzen in Verbindung gebracht. Durch eine Punktmutation an Position 1255 in Helix sechs der Domäne I, wird die Aminosäure Valin an Position 419 durch ein Leucin ersetzt. Eine Punktmutation an Position 2773 auf der Peptidschleife zwischen den Helices vier und fünf der Domäne II bewirkt den Ersatz der Aminosäure Leucin an Position 925 durch ein Isoleucin (DANG et al. 2014b; DONG et al. 2014; SEONG et al. 2010; YOON et al. 2008; YU 2008; ZLOTKIN 2001).

1.5.1.1 Pyrosequenzierung zum Nachweis der Mutationen V419L und L925I

Der Nachweis der *kdr*-Mutationen V419L und L925I kann mittels quantitativer Sequenzierung realisiert werden (DURAND et al. 2012; SEONG et al. 2010). Die Pyrosequenzierung wird als eine schnelle Methode der quantitativen DNA-Sequenzierung genutzt. Sie basiert wie die Sanger-Methode auf dem Prinzip der Sequenzierung durch Synthese. Allerdings ist es möglich, die Verlängerung der DNA-Stränge um einzelne Nukleotide durch eine biochemische Reaktion in Echtzeit zu visualisieren und dadurch vorhandene DNA-Sequenzen zu quantifizieren. Einer zuvor eingespeicherten Sequenz entsprechend werden komplementäre Nukleotide zu den einzelsträngigen DNA-Templates (ssDNA) einzeln gegeben. Bei Komplementa-

rität baut die im Enzymmix enthaltene DNA-Polymerase das Nukleotid in den synthetisierten Strang ein. Die dadurch freigesetzte Menge an Pyrophosphat (PPa)-Molekülen entspricht der Menge an eingebauten Nukleotiden. Das PPa setzt eine durch Luziferase katalysierte biochemische Reaktion in Gang, wodurch Lichtblitze (Lumineszenz) erzeugt werden. Diese Lichtsignale sind ebenfalls proportional zur Anzahl der eingebauten Nukleotide. Vor der Zugabe weiterer Nukleotide werden die nicht eingebauten Nukleotide von Nukleotid-degradierenden Enzymen entfernt. Mit fortschreitender DNA-Synthese werden die Lumineszenz-Signale von dem Gerät detektiert und als Peaks im sogenannten Pyrogramm visualisiert (AHMADIAN et al. 2000).

1.5.2 Metabolische Resistenz bei *C. lectularius*

Im Laufe der Evolution haben Insekten verschiedenste Mechanismen zur metabolischen Detoxifikation von Xenobiotika natürlichen (z.B. Allelochemikalien) und anthropogenen Ursprungs (z.B. Insektizide) entwickelt, was ihnen ermöglicht, eine Behandlung mit Insektiziden zu überleben (YU 2008). Eine geringe Menge an toxischen, lipophilen und nichtausscheidbaren Substanzen können Insekten über diesen Fremdstoffmetabolismus in hydrophile Substanzen umwandeln und exkretieren (LI et al. 2007; YU 2008). In der ersten Phase dieser Bio-transformation werden durch enzymatisch katalysierte Oxidations-, Reduktions- oder Hydrolysereaktionen die funktionellen Gruppen der toxischen Moleküle ausgetauscht oder verändert. In den letzten Jahren wurden in vielen verschiedenen pyrethroidresistenten Insektenarten und ebenso bei Bettwanzen vermehrte Genamplifikationen, Mutationen oder Überexpressionen der vorhandenen Enzyme des Fremdstoffmetabolismus detektiert (ADELMAN et al. 2011; KOMAGATA et al. 2010; LI et al. 2007; MAMIDALA et al. 2011a; ROMERO et al. 2007; SCOTT 1999, 2001; VONTAS et al. 2001; ZHU et al. 2010a; ZHU et al. 2012; ZHU et al. 2013).

Die Oxidation der Toxine erfolgt bei Insekten vor allem über Cytochrom P450-Enzyme. Diese Proteine kommen ubiquitär vor und sind genaugenommen keine Cytochrome, sondern Häm-Thiolat-Enzyme (FEYEREISEN 2005, 2012; SCOTT 2001; SODERLUND und BLOOMQUIST 1990; WERCK-REICHHART und FEYEREISEN 2000; YU 2008). Der Name Cytochrom P450 wurde ursprünglich einem in der Leber befindlichen Kohlenmonoxyd-bindenden Pigment gegeben, welches in reduzierter Form unter UV-Licht bei 450 nm ein Absorptionsmaximum zeigt und heute noch mit P450-Enzymen in Verbindung gebracht wird (ESTABROOK 1996; MANSUY 1998; OMURA und SATO 1964; OMURA 1993). Neben

mindestens 60 chemisch verschiedenen Reaktionen wirken P450-Enzyme vor allem als Monooxygenasen. Diese sogenannten mischfunktionellen Oxidasen katalysieren gleichzeitig die Übertragung eines Sauerstoffatoms auf Xenobiotika und die Reduktion eines Zweiten zu Wasser. Das Enzym NADPH-Cytochrom P450-Reduktase fungiert bei dieser Reaktion als Elektronendonator. Gemeinsam bilden sie bei Insekten in den Membranen der Mikrosomen des endoplasmatischen Retikulums einen Komplex, welcher die Oxidation bzw. Hydroxylierung der Toxine ermöglicht (BERGÉ et al. 1998; FEYEREISEN 2005, 2012). Da es eine Vielzahl an P450-Enzymen gibt, unterliegen sie einer Nomenklatur, basierend auf ihrer Sequenzhomologie. Jedes P450-Gen und Protein erhält das Gensymbol CYP, dahinter eine Zahl für die Familie (> 40 % Übereinstimmung zu anderen Proteinen der gleichen Familie), danach einen Buchstaben für die Unterfamilie (> 55 % Übereinstimmung mit anderen Proteinen dieser Unterfamilie) und am Ende eine Nummer, die das individuelle Gen kennzeichnet (NEBERT 1991; NEBERT et al. 1991). Ein Insektengenom kann zwischen zehn bis über einhundert CYP-Gene aufweisen. Die Insekten CYP-Gene werden vier verschiedenen Clans zugeordnet (FEYEREISEN 2005, 2012). Neben dem mitochondrialen CYP-Clan und dem CYP2-Clan wurden bisher die meisten Insekten-CYP-Gene dem CYP3- und CYP4-Clan zugeordnet. In den letzten Jahren wurden von BAI et al. (2011) und ZHU et al. (2013) eine Vielzahl von CYP-Genen der Bettwanze *C. lectularius* aus allen vier Clans untersucht, benannt, veröffentlicht und mit Pyrethroidresistenz in Verbindung gebracht. Insgesamt vier der 42 von ZHU et al. (2013) untersuchten CYP-Gene waren in Pyrethroid-toleranten Bettwanzenstämmen hochreguliert. Darunter drei aus dem CYP3-Clan mit Vertretern der CYP6-, CYP397- und CYP398-Familien sowie aus dem CYP4-Clan mit einem Vertreter der CYP4-Familie. Die CYP6-Familie umfasst bei den Insekten eine große Gruppe von P450-Enzymen. Einigen wenigen von ihnen konnte die metabolische Detoxifikation von Xenobiotika nachgewiesen werden. Zudem sollen die *cyp6* Gene auf umweltbedingte Veränderungen reagieren, hoch divers sein, sich durch Genduplikationen ausbreiten, eine hohe Evolutionsrate aufweisen, in Gen-Clustern auftreten und sowohl zeitlich als auch gewebespezifisch exprimiert werden (BERENBAUM 2002, FEYEREISEN 2005, 2012). Die CYP300-Familien wurden zunächst in die CYP6-Familie integriert und später heterogen über alle vier Clans verteilt. Die Funktionen der Gene *cyp397* und *cyp398* sind noch unklar (FEYEREISEN 2005, 2012). Die CYP4-Familie zeichnet sich ebenfalls durch ihre hohe Diversität in den Sequenzen aus. Ähnlich wie bei der CYP6-Familie wurde bereits nachgewiesen, dass einige *cyp4*-Gene durch Xenobiotika induziert werden können (BRADFIELD et al. 1991; SUTHERLAND et al. 1998). Die Funk-

tion der Einzelnen P450-Enzyme beschränkt sich allerdings nicht auf die Detoxifikation. P450-Enzyme sind außerdem an der Biosynthese langkettiger Kohlenwasserstoffe, z.B. zur Herstellung von Semiochemikalien, und am Metabolismus von Ecdysteroiden, Pheromonen und Fettsäuren sowie vom Juvenilhormon beteiligt. Die einzelnen physiologischen Funktionen der verschiedenen P450-Enzyme sind nicht auf einen CYP-Clan beschränkt und einzelne Enzyme innerhalb eines Organismus nicht auf eine Funktion (FEYEREISEN 2005, 2012; WERCK-REICHHART und FEYEREISEN 2000). Dadurch ist es nach wie vor nicht möglich, die genauen physiologischen Funktionen der in dieser Arbeit untersuchten CYP-Gene der Bettwanze *C. lectularius* zu benennen (BERGÉ et al. 1998; WERCK-REICHHART und FEYEREISEN 2000). Die Auswahl der vier CYP-Gene (*cyp397a1*, *cyp398a1*, *cyp4cm1*, *cyp6dn1*) wurde nach ZHU et al. (2013) getroffen. In amerikanischen Pyrethroid-toleranten Bettwanzenfeldstämmen waren die CYP-Gene im Vergleich zu einem sensiblen Laborstamm hochreguliert, weshalb eine Beteiligung der P450-Enzyme an der Detoxifikation von Pyrethroiden angenommen wurde.

1.5.2.1 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion zum Nachweis erhöhter mRNA-Transkriptlevel der vier CYP-Gene *cyp397a1*, *cyp398a1*, *cyp4cm1*, *cyp6dn1*

Die Untersuchungen zum Nachweis erhöhter mRNA-Transkriptlevel in Relation zu Referenzgenen kann mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (quantitative Real-Time-PCR = qRT-PCR) realisiert werden (ADELMAN et al. 2011). Die qRT-PCR funktioniert ähnlich wie die konventionelle PCR. Die doppelsträngige DNA wird durch Erhitzen denaturiert. Zur Eingrenzung der Sequenz werden zwei Oligonukleotide (Primer) mit den DNA-Einzelsträngen hybridisiert (Annealing) und durch eine thermostabile DNA-Polymerase (Phusion DNA Polymerase) verlängert. Die verschiedenen Temperaturen und die benötigte Zeit der einzelnen Schritte eines Zyklus werden in einem Thermozykler reguliert, wobei sich die DNA im Idealfall mit jedem Zyklus verdoppelt. Bei der qRT-PCR ist es zusätzlich möglich, nach jedem durchlaufenen Zyklus die Menge an PCR-Produkt durch die Messung eines Fluoreszenzfarbstoffes zu quantifizieren. Die verwendete Software generiert während eines Durchlaufs eine graphische Darstellung jeder Amplifikationskurve, dabei wird die registrierte Fluoreszenz über die Zyklenzahl aufgetragen. Der Fluoreszenzfarbstoff bindet zunächst an alle in einer Probe vorhandenen doppelsträngigen DNA-Moleküle, wodurch nur eine Hintergrundfluoreszenz emittiert wird. Während der qRT-PCR vervielfältigt die DNA-Polymerase die gewünschten Sequenzabschnitte, wobei der Fluoreszenzfarbstoff mit jedem neuen

Amplikon interkaliert. Nach einigen Zyklen werden ausreichend Produkte amplifiziert, dass die Fluoreszenz vor der Hintergrundfluoreszenz messbar wird. Der Zyklus, während dessen dies geschieht, ist der sogenannte Quantifikationszyklus und kann als C_q-Wert (Quantification Cycle) angegeben werden. Somit verstärkt sich die Fluoreszenz proportional zur Menge an PCR Produkten. Irgendwann sind die Reaktionskomponenten verbraucht, und es wird ein Plateau ohne messbaren Anstieg der Fluoreszenz erreicht, wodurch auch Änderungen in der DNA-Konzentration nicht mehr messbar sind.

Für eine zuverlässige Quantifizierung der Transkriptionslevel (im Weiteren auch mRNA-Expressionslevel) der einzelnen CYP-Gene ist eine Normalisierung der Ergebnisse mit den mRNA-Expressionslevel von Referenzgenen unerlässlich. Laut MIQE Guidelines (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*; BUSTIN et al. 2009) reicht die Verwendung eines einzigen Referenzgens nicht aus. Deshalb wurden zur Normalisierung der Expressionsergebnisse in der vorliegenden Arbeit drei Referenzgene mit amplifiziert (DERVEAUX et al. 2010; HELLEMANS et al. 2007; VANDESOMPELE et al. 2002). Die Auswahl valider Referenzgene ist dabei entscheidend, da sie ubiquitär und unveränderlich in jedem Gewebe der einzelnen getesteten Bettwanzenstämme auftreten müssen. Solche konstitutiv exprimierten Gene, die in allen Zellen unabhängig von Umwelteinflüssen ein annähernd gleiches Expressionslevel aufweisen, werden auch als Haushaltsgene bezeichnet, da sie für die Aufrechterhaltung der Grundfunktion einer Zelle verantwortlich sind. Dazu gehören unter anderem auch die Gene der ribosomalen Proteine (RP). In Wechselwirkung mit ribosomaler RNA (rRNA) bilden RP das Grundgerüst für funktionierende Ribosomen in einer Zelle und damit die Grundvoraussetzung der Translation (STELZL et al. 2001).

1.6 Testsysteme für die Überprüfung der Wirksamkeit von Wirkstoffen und Kontaktinsektiziden gegen *C. lectularius*

Hinweise, ob eine molekular detektierte Mutation am Wirkort oder ein erhöhtes Transkriptlevel von Genen potentiell detoxifizierender Enzyme für eine Resistenz bei *C. lectularius* verantwortlich sind, können *in vitro* Untersuchungen der tatsächlichen Wirkung eines Wirkstoffs oder Insektizids liefern.

1.6.1 Wirksamkeit von Wirkstoffen gegen *C. lectularius*-Feldstämme

Die Suszeptibilität verschiedener Bettwanzenfeldstämme gegenüber Wirkstoffen kann durch eine Konzentrations-Wirkungsanalyse mittels Filterkontakt-Biotest ermittelt werden

(BUSVINE und LIEN 1961; DANG et al. 2014a; DURAND et al. 2012; KHATTAT und BUSVINE 1965; SEONG et al. 2010). Dabei wird die letale Schädigung nach einem zeitlich definierten Zwangskontakt auf mit verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen behandelten Filterpapieren bestimmt. Die letale Schädigung der Feldstämme wird dazu mit der eines wirkstoffsensiblen Stamms verglichen. Aus dem Quotienten der mittleren effektiven Konzentrationen (EC_{50}) der Feldstämme und der EC_{50} eines wirkstoffsensiblen Laborstamms kann als Maßeinheit für Resistenz der sogenannte Resistenzindex (R_i) berechnet werden.

1.6.2 Wirksamkeitsprüfung von Kontaktinsektiziden gegen *C. lectularius*

Im Rahmen des Infektionsschutzgesetzes (§ 18 IfSG) wird im Fachgebiet (FG) IV 1.4 Gesundheitsschädlinge und ihre Bekämpfung des UBA die Wirksamkeit von Kontaktinsektiziden unter anderem gegen Bettwanzen in einem sogenannten Zwangsversuch (im Weiteren UBA-Zwangsversuch genannt) getestet. Die Exposition der Wanzen erfolgt durch das direkte Aufsetzen auf mit Insektizid behandelte Oberflächen, mit denen sie für eine definierte Einwirkzeit in Kontakt bleiben müssen.

Bei einer Bettwanzenbekämpfung werden Wanzenverstecke in einem infestierten Zimmer, soweit möglich, direkt mit Insektizid besprüht. Da dies aufgrund der versteckten Lebensweise der Tiere nicht immer möglich ist, und die derzeit verfügbaren Insektizide keine ovizide Wirkung aufweisen, werden sogenannte Insektizidbarrieren, ca. 30 cm breite Spritzmittelausbringungen, horizontal und vertikal an Boden und Wänden, häufig auch um Schlafstätten herum, gesprüht. Somit sind in der Praxis Expositionsbedingungen wie im UBA-Zwangsversuch nicht gegeben. Aus diesem Grund wurden im Rahmen der dieser Arbeit vorangegangenen Diplomarbeit Versuche zur Etablierung eines sogenannten Wahlversuchs zum Testen der Wirksamkeit von Kontaktinsektiziden unter Praxisbedingungen durchgeführt. In einem speziell angefertigten Versuchsaufbau werden dabei den Bettwanzen ein an ihrer Lebensweise orientiertes Versteck sowie eine Reizquelle aus Kohlenstoffdioxid (CO_2) und Wärme angeboten. Laufen die Bettwanzen in Richtung dieser Reizquelle, müssen sie eine mit Insektizid behandelte Oberfläche (Barriere) überqueren. Die Einwirkzeit der verwendeten Insektizide richtet sich, angenähert an die Bedingungen in einer Befallsstelle, nach dem natürlichen Laufverhalten der Tiere zur Detektion eines potentiellen Wirts. Die Wanzen haben somit die Wahl, im Versteck zu verbleiben oder es zur Futtersuche zu verlassen.

1.7 Ziele dieser Arbeit

Hauptziel dieser Arbeit war der Erhalt erster Daten zum Auftreten von Pyrethroid-Resistenzen bei Bettwanzen in Deutschland und den zugrunde liegenden Mechanismen. Dazu sollten die Resistenzindizes von Bettwanzenfeldstämmen aus Berlin mittels Filterkontakt-Biotest unter der Verwendung des Pyrethroids Deltamethrin bestimmt werden. Weiterhin sollten die Bettwanzenfeldstämme molekularbiologisch auf *kdr*-Punktmutationen (Wirkortresistenz) und ein erhöhtes Transkriptlevel verschiedener P450-Gene (metabolische Resistenz), die bereits bei *C. lectularius* mit Pyrethroid-Resistenz in Verbindung gebracht wurden, untersucht werden.

Das im Rahmen der dieser Arbeit vorangegangenen Diplomarbeit entwickelte Wahlversuchssystem für die praxisnahe Wirksamkeitsprüfung (*simulated use*-Test) von Insektiziden gegen *C. lectularius* sollte zum Testen von praxisrelevanten unflexiblen Oberflächen um ein neues Plexiglaskastensystem ergänzt werden. Zudem sollte mit diesem Test die Wirksamkeit eines pyrethroiden Kontaktinsektizids auf den Bettwanzenfeldstamm mit dem höchsten Resistenzindex bewertet werden.

Die Haltung der Bettwanze *C. lectularius* im Labor ist Voraussetzung zur Prüfung möglicher Bekämpfungsmittel oder Bekämpfungsstrategien. Die Aufnahme von Blut ist für Bettwanzen essentiell und muss daher auch im Labor möglich sein. In der Zucht des UBA werden Bettwanzen an Kaninchen (s. 2.1.1.1) gefüttert. Die durch das Tierschutzgesetz und der nachfolgenden gesetzlichen Regelungen vorgeschriebene Art der Haltung und Pflege sowie der regelmäßige Austausch der Tiere sind kosten- und platzintensiv. Um eine Labortierhaltung zu vermeiden und auf die für die Kaninchen sehr belastende Prozedur im Sinne des Tierschutzes zu verzichten, sollte im Rahmen dieser Arbeit eine Anlage zur artifiziellen Bettwanzenfütterung (Prototyp der Eurofins Agrosience Services EcoChem GmbH) mit verschiedenen Blutsorten erprobt werden.

Da nach derzeitigem Erkenntnisstand nur Daten aus Berlin (BAUER-DUBAU 2009; Persönliche Mitteilung Heising 2015), jedoch keine Daten zu der deutschlandweiten Verbreitung der Bettwanze vorliegen, sollte parallel zu den Untersuchungen eine deutschlandweite Befragung von Schädlingsbekämpfungsbetrieben zur aktuellen Verbreitungssituation durchgeführt werden. Der „Fragenkatalog zur aktuellen Bettwanzensituation in Deutschland“ sollte Daten sowohl zur Häufigkeit und Ausbreitung, zu angewandten Bekämpfungsmethoden und deren Erfolg, als auch zum Auftreten von möglichen Resistenzen liefern.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Prüftiere

2.1.1.1 Wirkstoffsensibler *C. lectularius*-Stamm

Sämtliche Feldstämme wurden wie auch der wirkstoffsensible *C. lectularius* Referenzstamm (im Weiteren als UBA-Stamm bezeichnet) ohne Selektionsdruck durch Wirkstoffe unter den gleichen Bedingungen in der Gliedertierzucht des UBA gehalten. Mit der Haltung des UBA-Stamms wurde bereits 1947 in der ehemaligen Biologischen Bundesanstalt in Berlin-Dahlem begonnen. Der Genpool dieses Stamms wurde über die Jahre durch das Einkreuzen von Tieren aus verschiedenen anderen Zuchten und Wildfängen aus Befallsorten möglichst groß gehalten (Tab. 1). Als Zuchtgefäße dienten Glaspetrischalen (\varnothing 9 cm), in welche zwei Papier-Rundfilter (\varnothing 7 cm) als Versteck und Substrat zur Eiablage gelegt wurden (Abb. 1). Jede Petrischale enthielt ca. 150-250 Tiere. Die einzelnen Schalen wurden wiederum in Fotoschalen mit Bodenrippen gestellt und ohne Beleuchtung bei einer Temperatur von 25 ± 3 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit (RH) von $45 \% \pm 10 \%$ in einem Brutschrank aufbewahrt.

Die Wanzen wurden wöchentlich an geschlechtsreifen männlichen und weiblichen, klinisch gesunden, therapeutisch und durch Futterzusätze unbeeinflusste Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus* f. dom) gefüttert. Es handelte sich dabei um Chinchilla-Bastard-Kaninchen, die eine Kreuzung der Kaninchenrassen *Weißer Neuseeländer* und *Chinchilla* sind und aus einer endo- und ektoparasitenfreien Aufzucht des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) stammten. Für die Fütterung am Kaninchen wurden die Bettwanzen in spezialangefertigten, mit Gaze und Gummi verschlossenen Erlenmeyerkolben (Wanzengläser) direkt auf die Kaninchen gesetzt. Dafür wurden die Kaninchen in Dorsallage auf einem Kleintieroperationstisch fixiert und ventral mit einer Haarschneidemaschine rasiert. Danach wurden die Wanzengläser mit Gummibändern mit der Öffnung nach unten auf dem rasierten Kaninchenbauch befestigt. Die Fütterung dauerte zwischen 15 min und 30 min. Durch eine visuelle Kontrolle konnte festgestellt werden, ob der größte Teil der Wanzen die Blutaufnahme beendet hatte. Nach maximal 30 min Fütterung wurden die Gläser herunter genommen, die Gaze entfernt und die Bettwanzen wieder in Petrischalen überführt.

Die Eiablagen auf den Filterpapieren wurden wöchentlich, jeweils eine Woche nach Fütterung der Adulten, herausgenommen und bis zum Schlupf (sieben Tage) in einem Brutschrank bei 32,5 °C (RH 45 % ± 10 %) inkubiert. Jede Eiablage wurde als separater Ansatz nach Datum sortiert aufbewahrt. Dadurch konnte während der Aufzucht eine genaue Bestimmung des Alters sowie des Zeitpunkts der letzten Blutmahlzeit und Häutung gewährleistet werden. Nach sechs Fütterungen (sechs Wochen) waren die meisten Wanzen eines Ansatzes adult. Durch eine zusätzliche siebte Fütterung wurde die Anzahl adulter Bettwanzen einer Schale maximiert. Die adulten Prüftiere wiesen einen Altersunterschied von höchstens sieben Tagen auf.

Tab. 1: Daten der Einkreuzung von *Cimex lectularius* aus anderen Zuchten und Befallsobjekten in den wirkstoffsensiblen Zuchtstamm des UBA.

Jahr der Einkreuzung	Herkunft der Tiere
1970	aus einem Befallsobjekt in Berlin
1984	aus einem Befallsobjekt in Berlin
1988	aus der Zucht der Firma Bayer AG, Leverkusen / Monheim
1991	aus dem ehemaligen Referenzlaboratorium für Arthropoden in Kleinmachnow
1993	aus der Zucht der Firma Bayer AG, Leverkusen / Monheim
1994	aus der Zucht der Tierärztlichen Hochschule Hannover
1994	aus einem Befallsobjekt in Berlin
1996	aus einem Befallsobjekt in Berlin
2009	aus der Zucht der Firma Bayer CropScience AG

2.1.1.2 *C. lectularius*-Feldstämme und Feldpopulationen

Es wurden Bettwanzen aus insgesamt 20 Berliner Befallsorten eingesammelt, zusätzlich wurde ein amerikanischer Stamm von der Bayer CropScience Deutschland GmbH für die Versuche zur Verfügung gestellt. Bei einer Mindesttierzahl von 30 gesammelten Bettwanzen je Fundort wurden diese als ein Zuchtansatz für einen Feldstamm genutzt. In dieser Arbeit werden als *Feldstamm* oder *Stamm* jene Bettwanzen eines Befallsortes definiert, die in eine Laboraufzucht genommen wurden. Dabei ist es für die Bezeichnung unerheblich, ob die Aufzucht großer Tierzahlen erfolgreich war. Entscheidend ist das Kriterium, dass nicht die eingesammelten Tiere für die Untersuchungen verwendet wurden, sondern deren Nachkommen. Im Gegensatz dazu definiert sich eine *Feldpopulation* durch die direkte Verwendung der Bettwanzen ohne Aufzucht im Labor. Bei geringeren Tierzahlen, mit denen eine Aufzucht eines

neuen Stammes nicht möglich war, wurden die Bettwanzen bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ zwecks späterer DNA-Präparation eingefroren. Auch Tiere aus Stämmen, bei denen trotz hoher Tierzahlen als Ausgangsmaterial kein Zuchterfolg erzielt werden konnte, wurden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Vor der Aufzucht bzw. vor dem Einfrieren, wurde eine Artbestimmung vorgenommen (USINGER 1966). Nach etwa einem Jahr Aufzucht standen ausreichend Individuen der jeweiligen Feldstämme für die Durchführung der Resistenzuntersuchungen zur Verfügung.

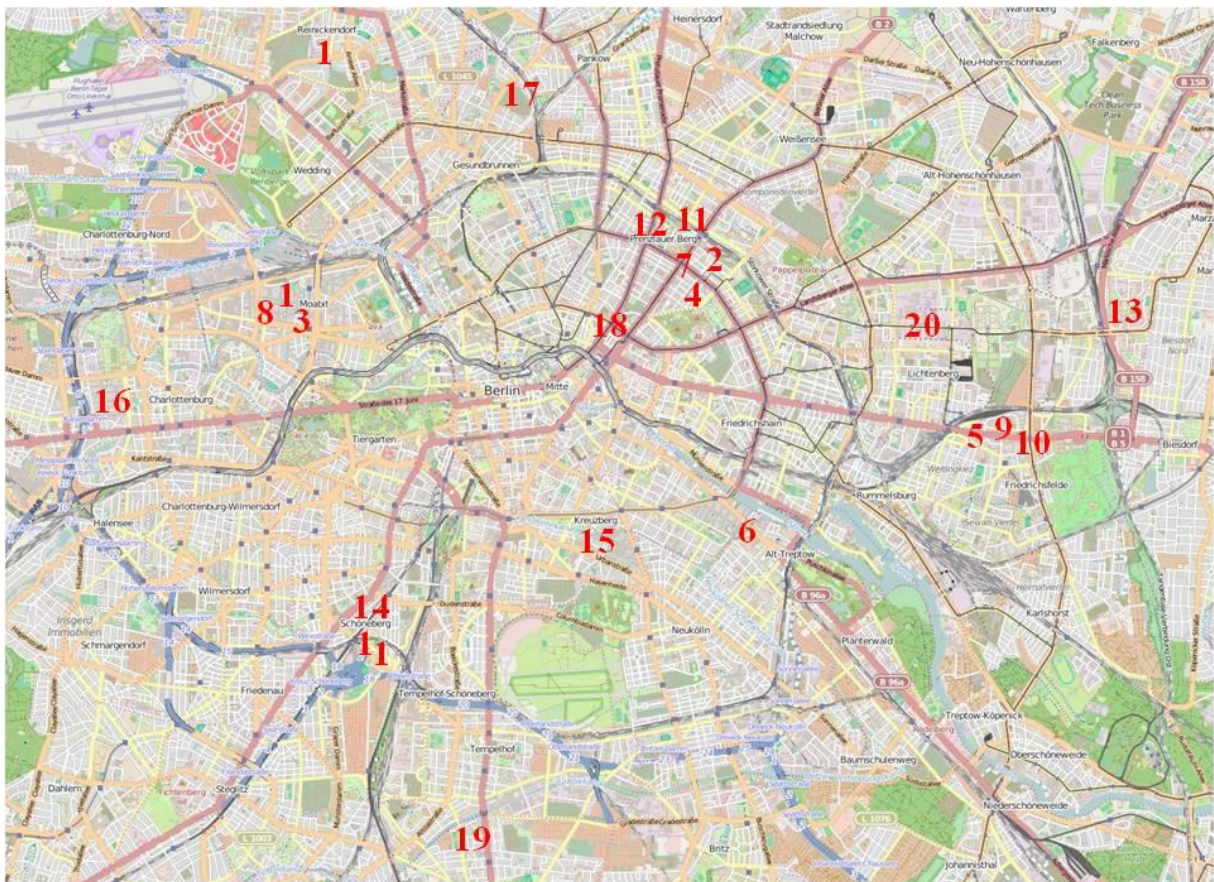


Abb. 3: Übersichtskarte (Maßstab: 1:84243) der Berliner Befallsorte, aus denen Bettwanzen gesammelt werden konnten. © OpenStreetMap-Mitwirkende.

Die Fundorte waren über ganz Berlin verteilt (Abb. 3). Infestationen wurden dem UBA entweder direkt von Betroffenen genannt oder durch Schädlingsbekämpfungsunternehmen, Gesundheitsämter und Unternehmen mit Bettwanzenspürhunden vermittelt. In den folgenden Tabellen (2-4) sind alle Feldstämme, benannt nach den jeweiligen Abkürzungen der Straßennamen der infestierten Fundorte, das Jahr der Sammlung sowie die Hintergründe zu den jeweiligen Befällen aufgelistet. Fundorte waren Wohnungen, Wohngemeinschaften, Ferienwohnungen und ein Hotel. Falls bekannt, wurde angegeben, ob die Bettwanzen in einem Alt-

oder Neubau gefunden wurden, und in welchem Zustand sich der Fundort befand. Die als ungepflegt bewerteten Fundorte waren schmutzig und unaufgeräumt, lose Tapeten, Teppiche, Hartholzböden, Fußleisten und alte Möbel boten viele Versteckmöglichkeiten für Bettwanzen, und die Zimmer waren eng möbliert. Zudem waren die Wohnungen mit Gegenständen wie Stofftieren, Sammelfiguren und vielen Bildern an den Wänden übersät. Als gepflegt eingestufte Fundorte boten ein gegenteiliges Bild. Falls möglich wurde die Einschleppungsursache ermittelt und das Befallsalter bestimmt. Im Falle einer bereits durchgeführten Bekämpfung wurde, wenn möglich, das eingesetzte Insektizid angegeben.

A mit Zuchterfolg

Die im Folgenden aufgezählten Feldstämme wurden erfolgreich in der Gliedertierzucht des UBA gehalten (Tab. 2).

Tab. 2: Hintergründe zu den jeweiligen Befällen der *Cimex lectularius*-Feldstämme SK, AS, OB, HO und LB. Die Benennung erfolgte nach den jeweiligen Abkürzungen der Straßennamen der infestierten Fundorte. Der SK-Feldstamm wurde als einziger Stamm aus vier Berliner Befallsorten zusammengesetzt.

Feldstamm [Datum der Sammlung]	Ort	Bau	Zustand	Einschleppung	Befallsalter in Jahren	Insektizid	Zuchtzeit in Jahren	Abb.
SK [2008]	WG	alt	ungepflegt	Reise	~1	-		
	W	alt	ungepflegt	Second-Hand Möbel	~3	k. A.	1	4
	W	alt	ungepflegt	Second-Hand Möbel	~1	-		
	W	alt	gepflegt	Befall vor Umzug vorhanden	k. A.	-		
AS [Mai 2011]	W	neu	ungepflegt	Gast	~2	-	1,8	4
OB [Juni 2011]	WG	alt	ungepflegt	Flohmarktartikel	~2	-	1	
HO [Juli 2011]	W	neu	ungepflegt	Übernachtungen in Obdachlosen- unterkünften	~5	-	1,3	4
LB [Jan. 2010]	W	neu	ungepflegt	Häuserblock befallen	k. A.	-	2,8	

Erläuterungen: **Feldstamm:** eingesammelte Feldstämme, benannt nach den jeweiligen Abkürzungen der Straßennamen der infestierten Fundorte; **Ort:** es werden die verschiedenen Fundorte Wohnung (W) und Wohngemeinschaft (WG) unterschieden; **Bau:** bei den jeweiligen Fundorten wurde zwischen Alt- und Neubauten unterschieden; **Zustand:** Zustand der Fundorte (s. 2.1.1.2); -: keine Insektizid-Behandlung; **k. A.:** keine Angaben.



Abb. 4: Fundorte der Stämme SK (A-D), AS (E-G) und HO (H-J). **A** Couch mit verschiedenen Stadien von *Cimex lectularius* sowie Eier und Exuvien; **B** Unterseite der Couch mit daran festgeklebten Eiern, Kot und Exuvien; **C** Lichtschalter als Wanzenversteck; **D** Wanzenversteck hinter dem Fernseher mit verschiedenen Juvenilstadien, Exuvien, Kot und Eiern; **E** Lattenrost übersät mit Wanzenkot; **F** Auflage einer Polsterliege mit Wanzenkot, Eiern und mobilen Stadien; **G** Wanzenkot hinter dem Spiegel am Kopfende der Polsterliege; **H** Couch mit Wanzenkot mit Zugang für die Tiere durch den Bezug; **I** Wanzenkot um einen Anstecker (ca. 2 cm groß) herum an Wand; **J** Wanzenkot, Eier, Exuvien und lebende Stadien hinter einer Fußleiste aus Teppich hinter der Couch.

B ohne Zuchterfolg

Die Bettwanzen der folgenden Feldstämme wurden bei -20 °C eingefroren, da trotz großer Starttierzahlen kein Zuchterfolg erzielt werden konnte (Tab. 3).

Tab. 3: Hintergründe zu den jeweiligen Befällen der *Cimex lectularius*-Feldstämme T, GW, RS, LB2 und LB3. Sie konnten trotz großer Tierzahlen nicht erfolgreich in der Gliedertierzucht des UBA gehalten werden. Die Benennung erfolgte nach den jeweiligen Abkürzungen der Straßennamen der infestierten Fundorte.

Feldstamm [Datum der Sammlung]	Ort	Bau	Zustand	Einschleppung	Befalls- alter in Jahren	Insektizid	Abb.
T [Aug. 2010]	W	alt	ungepflegt	k. A.	~12	Insekten- Spray Pyrethroid	5
GW [Aug. 2012]	H	neu	gepflegt	Gast	~0,5	-	6
RS [Juni 2013]	FW	neu	gepflegt	Gast	~0,5	Pyrethroid	6
LB2 [Mai 2013]	W	neu	k. A.	Häuserblock befallen	k. A.	Pyrethroid	
LB3 [Juli 2013]	W	neu	ungepflegt	Häuserblock befallen	~4	Pyrethroid	6

Erläuterungen: **Feldstamm:** eingesammelte Feldstämme, benannt nach den jeweiligen Abkürzungen der Straßennamen der infestierten Fundorte; **Ort:** es werden die verschiedenen Fundorte Wohnung (W), Ferienwohnung (FW) und Hotel (H) unterschieden; **Bau:** bei den jeweiligen Fundorten wurde zwischen Alt- und Neubauten unterschieden; **Zustand:** Zustand der Fundorte (s. 2.1.1.2); -: keine Insektizid-Behandlung; **k. A.:** keine Angaben.

CC-Laborstamm

Dem Umweltbundesamt wurden ca. 100 Bettwanzen des als resistent ausgewiesenen Cincinnati-Laborstamms (der ursprüngliche CIN1-Stamm wurde 2006 in Cincinnati (Ohio) gesammelt (ROMERO et al. 2007)) von der Bayer CropScience Deutschland GmbH zur Verfügung gestellt. Die Zucht erfolgte dort anders als im UBA nicht in Petrischalen, sondern in mit feiner Gaze verschlossenen Plexiglasröhren (H: 20 cm, ø: 8 cm). Gefaltete Filterpapierstücke dienten als Versteck und als Substrat zur Eiablage. In einer Plexiglasröhre befanden sich ca. 200-300 Tiere aller Entwicklungsstadien. Die Bettwanzen wurden an narkotisierten Meerschweinchen (Mischspritze mit 0,03 ml Ketavet 50 und 0,01 ml Rompun pro 100 g Körpergewicht) alle zwei Wochen gefüttert. Resistenzmechanismen waren nicht bekannt. Der Stamm sollte

zur Methodenüberprüfung als positiv resistenter Stamm im UBA gezüchtet werden, eine Vermehrung der Tiere wurde jedoch nicht erreicht.



Abb. 5: Massiver Befall am Fundort des T-Stamms. **A** Wand mit Kotspuren und Couch mit hunderten Eiern von *Cimex lectularius*; **B** Exuvien und lebende Bettwanzen ringsum den hinteren Teil der Couch; **C** Bettwanzenaggregationen und tote Bettwanzen in Spinnennetzen an der Decke über der Couch; **D** mehrschichtiger Bettwanzenkot und verschiedene Bettwanzenstadien versteckt hinter einem Kissen an der Wand auf der Lehne der Couch; **E** ein zweites Kissen von der Couch mit verschiedenen Bettwanzenstadien sowie hunderten von Bettwanzeneiern und Eihüllen auf der Unterseite befestigt; **F** Kissen mit Exuvien und verschiedenen Bettwanzenstadien.



Abb. 6: Fundorte der Stämme GW (A, B), RS (C, D) und LB3 (E, F). **A** *Cimex lectularius*-Männchen nach der Häutung versteckt in der Kerbe eines herausgesplitterten Stücks Holz im Kleiderschrank; **B** Wanzenkot, Eier, Exuvien und lebende Stadien an der getackerten Naht am Kopfende des Bettes; **C** Lattenrost mit Kotspuren und Kreuzschlitzschrauben als Bettwanzenversteck; **D** Bilderrahmen von hinten mit Wanzenkot, verschiedenen Bettwanzenstadien und Eiern; **E** Couch mit Kotspuren, Eiern, Exuvien und verschiedenen Bettwanzenstadien; **F** Wanzenkot und zerdrückte Tiere auf der Tapete.

C ohne Zuchtmöglichkeit

Die Aufzucht der hier aufgezählten Feldpopulationen konnte aufgrund von zu geringen Tierzahlen (< 20 Bettwanzen) in der Gliedertiermittelprüfung des UBA nicht realisiert werden. Die einzelnen Bettwanzenproben wurden deshalb bei -20 °C aufbewahrt. Da bei einigen zugesandten Tierproben von Schädlingsbekämpfern die Herkunft nicht genauer definiert werden

konnte oder durfte, wurden die Tiere nach dem Fundort Berlin benannt und nummeriert (Tab. 4).

Tab. 4: Hintergründe zu den jeweiligen Befällen der *Cimex lectularius*-Feldpopulationen B1-10. Aufgrund von zu geringen Tierzahlen war die Aufzucht nicht möglich. Die Benennung erfolgte bei diesen Stämmen nach der Stadt Berlin, in welcher sie gesammelt wurden, da einige Adressen von abgegebenen Proben nicht bekannt waren.

Feldpopulation [Datum der Sammlung]	Ort	Bau	Zustand	Einschleppung	Befalls- alter in Jahren	Insektizid	Abb.
B1 [2011]	W	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	
B2 [Aug. 2011]	W	neu	ungepflegt	Second-Hand Möbel	~0,5	k. A.	7
B3 [Juli 2011]	W	alt	gepflegt	Gast	~2	Pyrethroid	
B4 [2012]	W	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	
B5 [Sept. 2012]	W	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	
B6 [Juli 2012]	W	alt	ungepflegt	Second-Hand Möbel	~1	Pyrethroid	7
B7 [Jan. 2013]	FW	neu	gepflegt	Gast	~1	Pyrethroid Pyrrol	
B8 [März 2013]	W	neu	gepflegt	Gast	~0,25	k. A.	
B9 [2013]	W	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	
B10 [2013]	W	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	

Erläuterungen: **Feldpopulation:** eingesammelte Bettwanzenpopulationen ohne weitere Aufzucht, benannt nach Berlin (B); **Ort:** es werden die verschiedenen Fundorte Wohnung (W) und Ferienwohnung (FW) unterschieden; **Bau:** bei den jeweiligen Fundorten wurde zwischen Alt- und Neubauten unterschieden; **Zustand:** Zustand der Fundorte (s. 2.1.1.2) -: keine Insektizid-Behandlung; **k. A.:** keine Angaben.

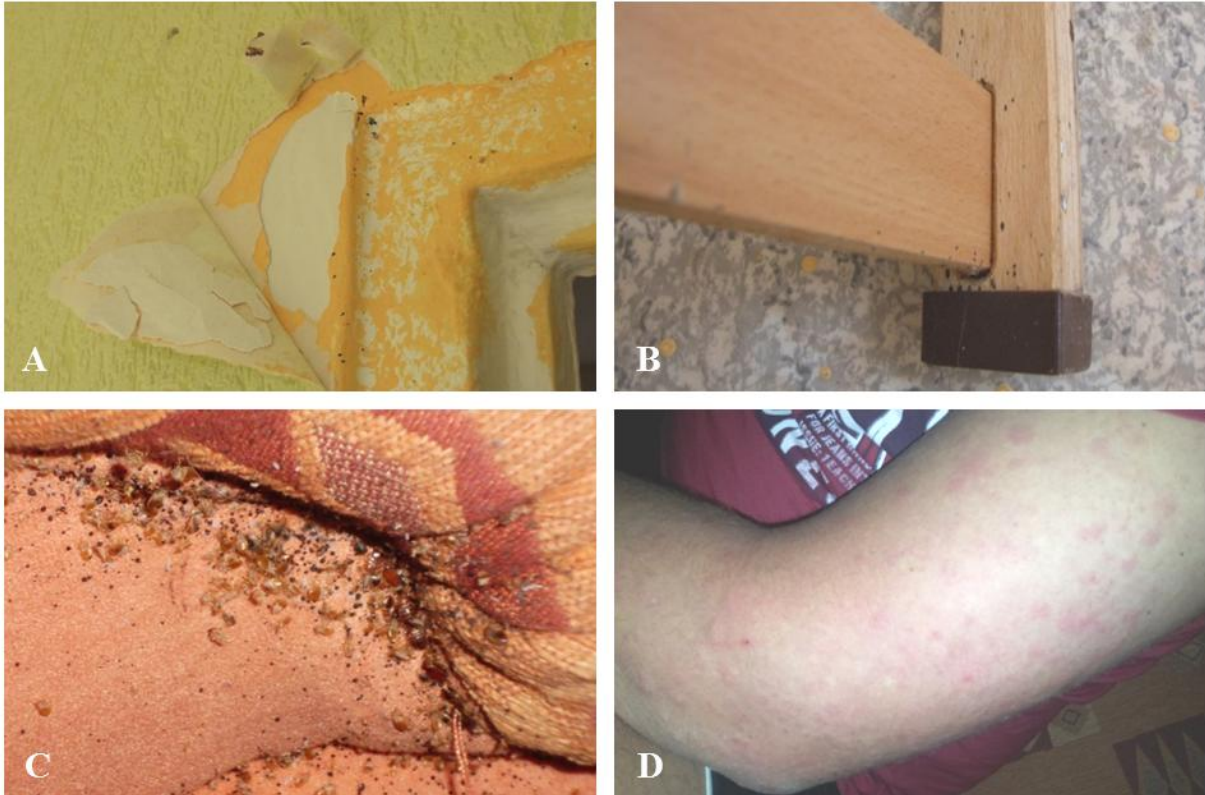


Abb. 7: Fundorte der Stämme B2 (A, B) und B6 (C, D). **A** Bettwanzenkot und Exuvien an der Türzarge und unter der Tapete im Kinderzimmer; **B** Wanzenkot und Eier am Gestell des Kinderbetts; **C** Bettwanzenversteck in der Schlafcouch der Mieter; **D** zahlreiche Bettwanzenstiche am Arm des Mieters.

2.1.1.3 Bettwanzen für molekularbiologische Untersuchungen

Da das von der Bettwanze aufgenommene Blut einen potentiellen PCR-Inhibitor darstellte, wurden für alle molekularbiologischen Untersuchungen ausschließlich nichtgesogene Bettwanzen verwendet. Von diesen wurden je 150 - 200 adulte Bettwanzen sieben Tage nach der siebten Blutmahlzeit in jeweils sechs Plastikpetrischalen umgesetzt. Diese, sowie die restlichen Tiere der Feldstämme deren Aufzucht erfolglos war, wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ für weitere Untersuchungen (RNA) aufbewahrt. Davon ausgenommen waren extern zugesandte Bettwanzenproben und Stämme ohne Zuchtmöglichkeit, welche direkt nach dem Erhalt bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren wurden.

2.1.2 Primer

Die Sequenz der Primer für die PCR mit anschließender Pyrosequenzierung zur Detektion der *kdr*-Mutationen V419L und L925I wurden unter Verwendung der freien Online-Software Primer3 (Version 0.4.0) designt (Tab. 5).

Tab. 5: Primer für die Resistenzuntersuchungen an der Bettwanze *Cimex lectularius*. Die Namen der Vorwärts- (up) und Rückwärtsprimer (lo, mit HPLC-Reinheit) für die PCR zur Detektion der *kdr*-Mutationen sind eine Abkürzung aus *C. lectularius kdr* mit einer 1 für die Mutation V419L und einer 2 für die Mutation L925I. Für die Pyrosequenzierung wurden die zusätzliche Rückwärtsprimer biotinyliert. Die Sequenzierprimer tragen zusätzlich die Abkürzung seq im Namen. Die Vorwärts- (F, forward) und Rückwärtsprimer (R, reverse) für die quantitative Echtzeit-PCR sind nach dem jeweiligen Referenz- und CYP-Genen benannt.

Name	Sequenz (5' zu 3')	Mutation/Gen
PCR - Primer		
Clkdr1up	GTG GCA CAT GTT GTT CTT CAT AGT	
Clkdr1lo (HPLC)	CGC CTT CTT TTG CAG TTC A	<i>kdr</i> V419L
Clkdr1lo-biotin (HPLC)	Biotin-CGC CTT CTT TTG CAG TTC A	
Clkdr2up	CCC ATC ACA GCA AAG ATG AAA AT	
Clkdr2lo (HPLC)	ATT ATG GGC AGA ACA GTG GGT	<i>kdr</i> L925I
Clkdr2lo-biotin (HPLC)	Biotin-ATT ATG GGC AGA ACA GTG GGT	
Sequenzierprimer – Pyrosequenzierung		
Clkdr1-seq (HPLC)	CCT GGG ATC ATT CTA CC	<i>kdr</i> V419L
Clkdr2-seq (HPLC)	ACA CAA AAG TTA AAT TAC CA	<i>kdr</i> L925I
Primer Referenzgene - quantitative Echtzeit-PCR		
CIRp18F	AAA GGC ACG GTT ACA TCA AAG GTG	<i>rpl8</i>
CIRp18R	TAG TCT TGA ACC TAT AGG GGT CCC	
CIRp111F	GAA GAA TGT CAT GCG AGA TGT CAG G	<i>rpl11</i>
CIRp111R	CCT TCG AGA AGA CTG GCT GCT G	
CIRps16F	ACA GCA GTC GCC TAC TGC AAA C	<i>rps16</i>
CIRps16R	TCC TGG AGT TTG TAC TGG AGG ACC	
Primer CYP-Gene - quantitative Echtzeit-PCR		
cyp4cm1forward	AGG AGA ATG TCA GAA AGC GTC ACC	<i>cyp4cm1</i>
cyp4cm1reverse	GCA TTA ATT TTT CCC AAC TTT CTT	
cyp6dn1forward	AGC CCA CAG CTC GGA AAC AG	<i>cyp6dn1</i>
cyp6dn1reverse	CTT ATG CCT TGG TGG GAG AGT	
cyp397a1forward	CTC GGG CTC ACC ACT CTC AAC A	<i>cyp397a1</i>
cyp397a1reverse	ACC GTC ATG GCT CCC GTC AG	
cyp398a1forward	AAT CGC CCA CAG GAA AAA CAA CAA	<i>cyp398a1</i>
cyp398a1reverse	CCG GGT GGG AAG CGA GTA GG	

Als Grundlage dienten die kodierenden DNA-Sequenzen (cds) der Alpha-Untereinheit des spannungsabhängigen Natriumkanals in der Genbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI; Zugangsnummern: cds ohne Mutation, FJ031996.1 und cds mit beiden Punktmutationen, FJ031997.1). Alle Rückwärtsprimer wurden mittels der HPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) gereinigt. Außerdem wurden die jeweiligen Rückwärtsprimer ohne (klassische PCR mit anschließender Klonierung) und mit Biotin (klassische PCR mit anschließender Pyrosequenzierung) am 5'-Ende konzipiert.

Für die quantitative Echtzeit-PCR wurden passende Primerpaare für die Referenzgene *rpl8*, *rpl11* und *rps16* aus einer Publikation von ZHU et al. (2012) entnommen. Passende Primer zur Detektion der vier untersuchten CYP-Gene *cyp397a1*, *cyp398a1*, *cyp4cm1* und *cyp6dn1* wurden der Veröffentlichung ADELMAN et al. (2011) entnommen.

Alle Primerpaare wurden von der Firma Life Technologies der Marke Invitrogen™ bezogen. Durch Zugabe von DEPC behandeltem Wasser wurde eine 100 µM Stammlösung hergestellt und bei -20 °C aufbewahrt. Für die jeweiligen Versuche wurden die Primer auf eine 10 µM Arbeitslösung verdünnt.

2.1.3 Versuchsmaterialien, Chemikalien, Kits und Rezepte

Für die Durchführung der Versuche zur Detektion von Pyrethroidresistenzen bei der Bettwanze *C. lectularius* wurden verschiedene Geräte, Mehrwegmaterialien, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Reagenzien, sowie diverse molekularbiologische Kits verwendet.

2.1.3.1 Geräte

1-Kanal-Pipette Research® (fix) in 10 µl, 20 µl, 100 µ, 1000 µl und 5000 µl	Eppendorf AG
8-Kanal-Pipette, 10-100 µl	Eppendorf AG
Analysenwaage Acculab ALC-6100.1 Wägebereich: 6100 g Ablesbarkeit: 0,1 g	Sartorius AG
Analysenwaage, Discovery-Serie Wägebereich: von 120 g bis 320 g Ablesbarkeit: 0,0001 g (0,1 mg)	OHAUS Cooperation
Ansaugpumpe, WERIE W00849	Rietschle (jetzt Elmo Rietschle)
Binokular, Stemi SV11	Carl Zeiss AG

Bioanalyzer 2100 Instruments	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co.KG Life Sciences & Chemical Analysis
Blutfütterungsanlage (Prototyp)	Eurofins Agrosience Services EcoChem GmbH
Mikrozentrifuge, Biofuge 13 Microcentrifuge 13,000 Centrifuge, 18 ml x 2 ml, 13000 RPM, RCF 13.793 x g	Heraeus Instruments
Durchflussmesser, Cole Parmer® - klein: 0,1-1,0 LPM - groß: 1,0-10,0 LPM	Novodirect GmbH
Elektrophorese-Netzgerät, PowerPac™ Universal Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH
Gasmaske, Vollmaske Panorama Nova®	Drägerwerk AG & Co. KGaA
G:BOX Chemi 16 Imaging System	Syngene division of Synoptics Ltd
Heizplatte, RK 501	Rommelsbacher ElektroHausgeräte GmbH
Horizontale Flachbett-Gelelektrophorese-Apparaturen: Mini-Sub® Cell GT Cell (7 cm x 10 cm), Wide Mini-Sub Cell GT Cell (15 cm x 10 cm), Sub-Cell® GT Cell (15 cm x 25 cm)	Bio-Rad Laboratories GmbH
Inkubationsschüttler MaxQ™ 6000, stapelbar, 15 to 300 rpm ±1 (befüllt); 15 to 500 rpm ±1 (leer), Schüttelhub: 1,9 cm	Thermo Fisher Scientific Inc.
Kleintieroperationstisch	Spezialanfertigung für das UBA, Firma unbekannt
Kombi-Großraum-Mikrowellengerät R-939 IN	Sharp Electronics GmbH
Kompressor, Model 4	JUN-AIR
Magnetrührer mit Heizung, MR Hei-Standard	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank Klasse II, Scanlaf MARS	LaboGene™
Mikroplatten-Spektral-Photometer Epoch	BioTek Instruments GmbH

Mikro-Volumenplatte Take3 , BioCell™	BioTek Instruments GmbH
Mikrozentrifuge Eppendorf 5430 mit dem Eppendorf 022637100 Aerosol-Tight Fixed-Angle Rotor, 30x2 ml, 14.000 RPM, RCF 20.800 x g Max. Geschwindigkeit: 30.130 x g (17.500 rpm)	Eppendorf AG
Minizentrifuge MCF-2360 Beschleunigung: 2200 x g	LMS Consult
Mini-Membran-Vakuumpumpe N 811; Laboport	KNF Neuberger GmbH
Nasensprüngerät	Firma unbekannt; Laborgerätebestand UBA
NucleoVac 96 Vakuumarbeitsstation für das NucleoSpin® 8 Tissue Kit	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Plattenschüttler mit PCR-Platten Aufsatz IKA® MS1, 0 - 3000 rpm, Schüttelhub: 4,5 mm	IKA-Werke GmbH & Co. KG
PyroMark® Q24 24-Well-Plattenhalter	QIAGEN GmbH
PyroMark® Q24 System; Instrument und Software für die Pyrosequenzierung	QIAGEN GmbH
PyroMark® Q24 Vakuumarbeitsstation	QIAGEN GmbH
Quecksilberthermometer	Laborgerätebestand UBA
Schermaschine für Kleintiere, Aeskulab® Akkurata	B. Braun Melsungen AG
Schüttler IKA® VORTEX GENIUS 3, 0 - 2500 rpm, Schüttelhub: 4 mm	IKA-Werke GmbH & Co. KG
Temperguss Schraubzwingen, TPN25B8BE-S 250 mm x 80 mm	BESSEY Tool GmbH & Co. KG
Thermalzykler (PCR) C1000 und S1000	Bio-Rad Laboratories GmbH
Thermalzykler (Echtzeit-PCR) Bio-Rad CFX96 real-time PCR detection system	Bio-Rad Laboratories GmbH
Thermohygrograph, Typ 252	Wilh. Lambrecht KG
Thermomixer, TMix - 220 V,	Analytik Jena Aktiengesellschaft

300 rpm - 1500 rpm, Rotorradius: 3 mm

Wärmethermostat zum Einhängen mit
Pumpfunktion, im Transparentbad,
LAUDA ECO Silver

LAUDA DR. R. WOBSEER GmbH & Co.
KG

Wasserbad Modell WNE 7

Memmert GmbH & Co. KG

Wasserbad Modell WNE 45

Memmert GmbH & Co. KG

Zentrifuge, Biofuge, pico
24 ml x 2 ml, 13000 rpm, RCF 16.060 x g

Heraeus Instruments

2.1.3.2 Mehrwegmaterialien

Drigalskispatel

Carl Roth GmbH & Co. KG

Erlenmeyerkolben, 300 ml

SCHOTT Duran[®]

Federstahlpinzette (kniegebogen, stumpf)

Carl Roth GmbH & Co. KG

Glasbecken aus Sodaglas, Rand geschlif-
fen, 1,5 l

HAVAG GmbH

Glaspetrischalen, DUROPLAN[®], ø 9 cm,
14 cm

Carl Roth GmbH & Co. KG

Glasringe, ø 8 cm,

Glasbläser GtW H. Naskowski

Glasschälchen, ø 5 cm , Höhe 3 cm

Carl Roth GmbH & Co. KG

Melaminschalen:

- groß: 35 cm x 25 cm x 4 cm

- klein: 29 cm x 16 cm x 5,5 cm

Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG

Plastikbox, CLIP & CLOSE, 1,6 l

EMSA

Wanzengläschen, 50 ml

Sonderanfertigung aus einem SCHOTT Du-
ran[®] 50 ml Erlenmeyerkolben

2.1.3.3 Verbrauchsmaterialien

24-Well-Zellkulturplatten, Standard Serie

VWR Collection; VWR International
GmbH

96-Well-Klebefolie für qRT-PCR, BZO

Biozym Scientific GmbH

Filterpapier, Standard Laborfilterpapier,
58 cm x 58 cm, 65 g/m²

Munktell & Filter GmbH

Hornitex [®] (Laminat); Stärke: 3 mm	Possling GmbH & Co. KG
Klebeband, doppelseitig, 4 cm	Fix-o-moll, Wilhelm Ritterath GmbH
Klebwachs	Hans Stockmar GmbH & Co. KG
Kreppband: - schmal: 2 cm - breit: 5 cm	Kip, Bocholt
PARAFILM [®] M Verschlussfolie	BRAND GmbH & Co. KG
PCR 96-Well TW-MT-Platte, weiß, low Profile; Unskirted, Eckschnitt A1	Biozym Scientific GmbH
PCR SingleCap 8er-SoftStrips 0.2 ml, farblos, Domed Cap, High Profile, Cutable	Biozym Scientific GmbH
Plastikpetrischalen, 9 mm ø	Carl Roth GmbH & Co. KG
PyroMark [®] Q24 Kartuschen	QIAGEN GmbH
PyroMark [®] Q24 24-Well-PCR-Platten	QIAGEN GmbH
PyroMark [®] Vakuumfilter-Hohlnadeln	QIAGEN GmbH
PyroMark [®] Q24 Plastikwannen für die Vakuumarbeitsstation (50 ml)	QIAGEN GmbH
Raufasertapete, mittlere Körnung	Standardmarke aus dem Bauhaus
Reaktionsgefäße: 0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml	Sarstedt AG & Co. KG
Rollrand-Gläser, mit PE-Schnappdeckel, 40 mm x 19 mm, 5 ml, klar	Max Resch Laborbedarf aus Glas
Rundfilter, ø 70 mm, 87 g/m ² , 180 µm und ø 16 cm	Whatman [®]
SafeSeal-Tips Professional 10 µl, 100 µl, 1000 µl steril, Micro Extent	Biozym Scientific GmbH
Schraubfilter AXP3, für die Gasmaske	Racal Health & Safety Ltd
Schraubröhre 15 ml, Spitzboden, PP	Sarstedt AG & Co. KG
Schraubröhre 50 ml, Spitzboden, PP	Sarstedt AG & Co. KG
Sperrholz; Stärke: 3,5 mm	OBI GmbH & Co. Deutschland KG
Spritze 10 ml, Discardit [™]	Becton, Dickinson and Company

Teppich, MODENA, Farbe 628C

Vorwerk & Co. KG

Venenkatheter, peripher, Safety-
Multyfly[®] Set

Sarstedt AG & Co. KG

2.1.3.4 Chemikalien und Reagenzien

10X Puffer *Eco*RI

Thermo Fisher Scientific Inc.

Bromphenolblau

Carl Roth GmbH & Co. KG

Chloroform / Trichlormethan, ≥ 99 %,
DAB, BP, reinst

Carl Roth GmbH & Co. KG

DEPC behandeltes Wasser (DEPC H₂O)

Carl Roth GmbH & Co. KG

*Eco*RI, Restriktionsenzym

Thermo Fisher Scientific Inc.

EDTA, 50 mM

Thermo Fisher Scientific Inc.

Ethanol 96 %

Berkel AHK, Ludwigshafen

Ethanol $\geq 99,5$ %, Ph. Eur., reinst

Carl Roth GmbH & Co. KG

Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄)

Carl Roth GmbH & Co. KG

GeneRuler[™] 100 bp DNA-Leiter

Thermo Fisher Scientific Inc.

Glycerin wasserfrei, rein $\geq 98,0$ %,

Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Isopropanol /2-Propanol, $\geq 99,5$ %,
Ph.Eur., reinst

Carl Roth GmbH und Co. KG

Kaliumchlorid (KCl)

Carl Roth GmbH & Co. KG

Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄)

Carl Roth GmbH & Co. KG

Kanamycin

Carl Roth GmbH & Co. KG

LB-Medium (Luria/Miller) für die
Molekularbiologie

Carl Roth GmbH & Co. KG

LE Agarose

Biozym Scientific GmbH

Natriumchlorid (NaCl)

Carl Roth GmbH & Co. KG

Natriumhydroxid ≥ 99 %, p.a., ISO (NaOH)

Carl Roth GmbH & Co. KG

Nukleinsäurefarbstoff GRGreen 10,000X
in Wasser

LABGENE Scientific

PeqGOLD TriFast™	PEQLAB Biotechnologie GmbH,
PyroMark® Annealingpuffer	QIAGEN GmbH
PyroMark® Bindungspuffer	QIAGEN GmbH
PyroMark® Waschpuffer	QIAGEN GmbH
Streptavidin Sepharose High Performance	GE Healthcare Europe GmbH
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth GmbH & Co. KG

2.1.3.5 Molekularbiologische Kits

DNase I, RNase-free	Thermo Fisher Scientific Inc.
DyNAmo cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific Inc.
EasyPrep Pro Plasmid Miniprep Kit	Biozym Scientific GmbH
GOTaq® qPCR Master Mix	Promega GmbH
NucleoSpin® Tissue	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
NucleoSpin® 8 Tissue	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific Inc.
PyroMark® Gold Q24 Reagents	QIAGEN GmbH
One Shot® TOP10 Chemically Competent <i>E. coli</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.
RNA 6000 Nano Reagents, Agilent	Agilent Technologies
Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific Inc.
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research Europe

2.1.3.6 Rezepte für Medien, Lösungen und Puffer

6X DNA Ladepuffer (LD)	60 ml Glycerol, 1 ml 3 % Bromphenolblau, 10 ml Tris-Puffer (100 mM), auf 100 ml mit Aqua Bidest auffüllen, Lagerung bei -20 °C
1 kb Leiter	1 µl GeneRuler™ 1 kb DNA-Leiter (0,5 µg), 2 µl 6X LD, 9 µl Aqua Bidest;

	Lagerung bei 4 °C
100 bp Leiter	1 µl GeneRuler™ 100 bp DNA-Leiter (0,5 µg), 2 µl 6X LD, 9 µl Aqua Bidest; Lagerung bei 4 °C
Agarosegellösung 1 %	5 g LE Agarose, 500 ml 1X TAE-Puffer, Agarose-Suspension aufkochen; Lagerung im Wasserbad bei 65 °C
LB Medium	pH 7,0; 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, auf 1 l mit Aqua Bidest auffüllen, autoklavieren; Lagerung bei RT
LB Agar	LB Medium, 15 g/L LB Agar, autoklavieren; Lagerung bei RT
Phosphatgepufferte Salzlösung 1X (PBS)	pH 7,4 (durch Zugabe von HCl); 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,42 g Na ₂ HPO ₄ , 0,27 g KH ₂ PO ₄ , auf 1 l mit Aqua Bidest auffüllen; Lagerung bei Raumtemperatur
TRIS-Acetat-EDTA-Elektrophoresepuffer 50X (TAE)	pH 8,0 (durch Zugabe von Essigsäure); 2 M Tris-Base, 1 M Essigsäure, 50 mM EDTA
2.1.3.7 Sonstiges	
Bacillol® AF	Bode Chemie Hamburg
CO ₂ -Flasche, 30 kg	AIR LIQUIDE Deutschland GmbH
Filterschlauch, 5 mm ø	Laborgerätebestand UBA
Fliegenzuchtkasten, 50 cm ³	Spezialanfertigung für die Fliegenzucht im FG IV 1.4 des UBA

Kaninchenblut, steril; konserviert mit Formalin; Citrat als Antikoagulans	Fiebig – Nährstofftechnik
Paraffinöl (Ph Eur, BP, USP)	Merck KGaA
Polytetrafluorethylen	Whitford GmbH
Rinderblut, defibriniert, steril	Fiebig – Nährstofftechnik
Schafblut, defibriniert, steril und Schafblut in Na-Heparin 10 i.U./ml, steril	Fiebig – Nährstofftechnik
Schweineblut, defibriniert, steril	elocin-lab GmbH
Silikonschlauch mit Edelstahlgewebe verstärkt, 8 mm ø	Laborgerätebestand UBA
Spezialtisch aus PVC, 130 cm x 90 cm x 90 cm	Spezialanfertigung für den FG IV 1.4 des UBA
Stativ-Schraubzwinde	Laborgerätebestand UBA

2.2 Methoden

2.2.1 Filterkontakt-Biotest zum Nachweis von Pyrethroid-Resistenzen

Zur Ermittlung von Resistenzen bei Feldstämmen wurde zunächst ein Filterkontakt-Biotest in Petrischalen in der Gliedertiermittelprüfung des UBA etabliert. In eine 9 cm ø Glaspetrischale wurden zwei 8,5 cm ø große Filterpapiere gelegt und mittels einer Pipette je 1 ml Wirkstoff, gelöst in Aceton, in verschiedenen Konzentrationen aufgetragen. Parallel angesetzte Kontrollen wurden nur mit Aceton behandelt. Von jeder Konzentration sowie den Kontrollen wurden drei Replikate mit je sieben männlichen und weiblichen Bettwanzen in einer Petrischale getestet. Die große Bewegungsfreiheit der Tiere, die Möglichkeit der Aggregation und Paarung (Verletzung der Weibchen durch traumatische Insemination) innerhalb des Versuchs führten zu starken Schwankungen in den Ergebnissen der Replikate. Daher wurde nach Erprobung verschiedener Methoden der von ROMERO et al. (2007) vorgestellte 24-Well-Filterkontakt-Biotest übernommen und modifiziert. In diesem Testsystem sitzen die Wanzen einzeln in einer kleinen Testkammer auf dem Filterpapier. Damit konnten die EC₅₀ von verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen des Wirkstoffs Deltamethrin, als Stellvertreter der Pyrethroide, gegen männliche *C. lectularius* in 24-Well-Zellkulturplatten unter Zwang ohne weitere Versteckmöglichkeiten und ohne die Möglichkeit zur Aggregation oder Paarung getestet werden.

Zur Ermittlung des optimalen Konzentrationsbereichs von Deltamethrin wurde die letale Schädigung des wirkstoffsensiblen UBA-Stamms und des SK-Feldstamms (zum damaligen Zeitpunkt der einzige in der Gliedertierzucht des UBA vorhandene Feldstamm) im 24-Well-Filterkontakt-Biotest bei verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen untersucht. Der endgültige Konzentrationsbereich wurde so gewählt, dass bei der niedrigsten Konzentration die letale Schädigung des UBA-Stamms, der als Referenzstamm diente, theoretisch bei 0 % lag und bei der höchsten Konzentration eine letale Schädigungsrate von 100 % erreicht wurde. Zum anderen musste bei zunehmender Konzentration auch die letale Schädigung des SK-Feldstamms messbar steigen, andernfalls wäre eine statistische Auswertung mittels Konzentrations-Wirkungsanalyse nicht möglich gewesen. Alle Biotests wurden mit männlichen Bettwanzen aus den fünf erfolgreich in der Gliedertierzucht des UBA angezogenen Feldstämmen durchgeführt. Als Referenzstamm diente der wirkstoffsensible UBA-Stamm. Es wurden pro 24-Well-Zellkulturplatte 24 Tiere mit insgesamt sieben Blutmahlzeiten, acht Tage nach der letzten Blutmahlzeit verwendet. Pro Stamm wurden fünf Replikate der jeweils fünf Konzentrationen 0,0005 µg/µl, 0,001 µg/µl, 0,005 µg/µl, 0,01 µg/µl, 0,1 µg/µl des Wirkstoffs Deltamethrin technischer Qualität gelöst in Aceton eingesetzt.

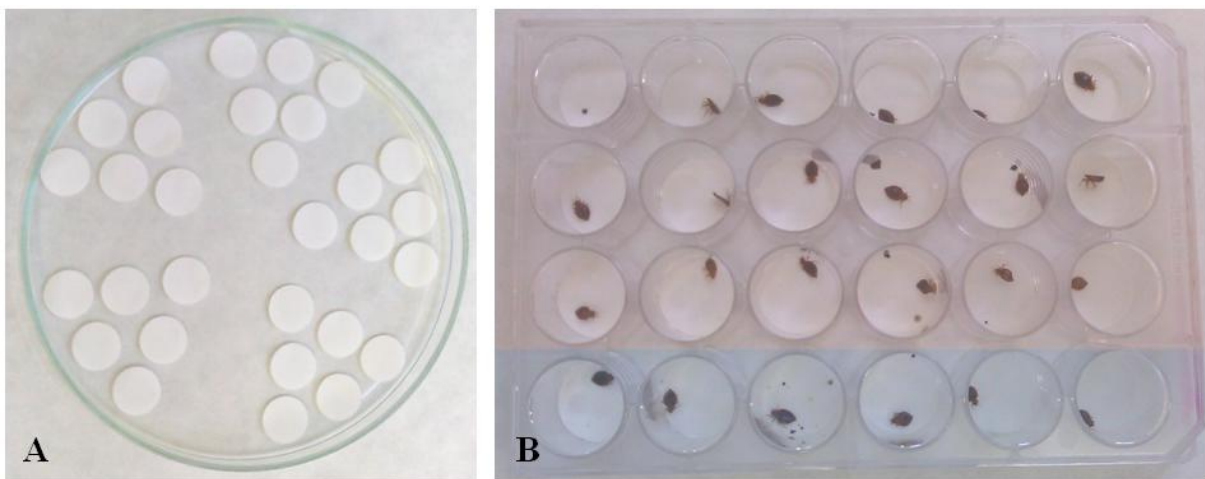


Abb. 8: 24-Well-Filterkontakt-Biotest. **A** Glaspetrischale (Ø 120 mm) mit den ausgestanzten Rundfiltern (Ø 16 mm) zum Behandeln und Trocknen; **B** 24-Well-Zellkulturplatte mit Deltamethrin behandelten Rundfiltern (rot) und mit Aceton behandelten Rundfiltern als Kontrolle (blau).

Zur Durchführung der 24-Well-Filterkontakt-Biotests wurden zunächst mit einem Hammer und einem 16 mm Ø Lochstanzer aus 120 mm Ø Filterpapier einzelne kleinere Filterpapiere mit 0,64 cm² ausgestanzt, welche plan und fest in die Böden der verwendeten 24-Well-Zellkulturplatten passten. Von den 24 Filterpapieren wurden 18 mit je 50 µl der jeweiligen

Deltamethrin-Konzentration behandelt und sechs ausschließlich mit je 50 µl Aceton. Zur Behandlung und Trocknung wurden die Filterpapiere in eine 120 mm ø Petrischale gelegt und aus dieser mit einer Federstahlpinzette in die 24-Well-Zellkulturplatten überführt (Abb. 8). Da die Bettwanzen möglichst zeitgleich auf die behandelten Oberflächen aufgesetzt werden sollten, wurden diese einzeln in Rollrand-Gläser eingesetzt und danach zügig in je eine Kammer gekippt und diese anschließend mit dem Deckel verschlossen. Alle Versuche fanden bei T_R im Dunkeln statt.

Insgesamt wurden pro Konzentrationsansatz 90 Bettwanzen auf Deltamethrin-behandelten Filterpapieren und 30 Tiere als Kontrolle auf Aceton-behandelten Filterpapieren verwendet. Der Zustand der Tiere wurde mittels Pinzettenreiz 24 h p.a. beurteilt. Dabei wurden die Tiere in die dorsale Position gebracht und als vital gewertet, wenn sich die Bettwanze sofort wieder zurück in die ventrale Position brachte. Wenn die Wanze es nicht schaffte sich aus eigener Kraft zu drehen bzw. nach der Drehung kein oder nur ein langsames, unkoordiniertes Laufverhalten zeigte, wurde sie als letal geschädigt bewertet. Bei einer Kontrollmortalität von über 5 % wurden die Ergebnisse mittels der Abbott-Formel korrigiert (ABBOTT 1925).

2.2.2 Nachweis der *kdr*-Mutationen V419L und L925I mittels Pyrosequenzierung

Zur Detektion der *kdr*-Mutationen in den Feldstämmen wurde die DNA mit den möglichen Mutationen V419L und L925I innerhalb des *Cvssc*-Gens sämtlicher Stämme mittels Pyrosequenzierung untersucht. Durch die Sequenzierung der bereits bekannten Sequenzen wurden die gesuchten *kdr*-Einzelbasenmutationen (SNPs) sequenzbasiert detektiert und in Echtzeit quantifiziert. Die zu analysierenden Sequenzen für die Mutationen V419L und L925I lauten: 5'-TCG/CTCAACTTGATTTTAG-3' bzw. 5'-AG/TGGCACCCACTGTTCTGCC-3'. Um mögliche Verunreinigungen der Proben zu detektieren, wurde am Anfang der Sequenz ein nicht komplementäres Nukleotid angegeben, welches nicht detektiert werden sollte. Auf diese Weise konnten die Allelfrequenzen der beiden Polymorphismen sowie der Genotyp einzelner Bettwanzen innerhalb der Stämme bestimmt werden.

Zur Bestimmung der Allelfrequenzen der beiden Polymorphismen wurde die DNA von je 100 männlichen und 100 weiblichen *C. lectularius* der Stämme UBA, SK, SKA (Proben des SK-Stamms die 2009 bei -20 °C eingefroren wurden) OB, LB, AS, HO und CC gepoolt sequenziert. Dazu wurde die gDNA von je fünf Bettwanzen gleichen Geschlechts im Pool isoliert, auf eine Menge von 5 ng/µl verdünnt und je 20 dieser Proben zu gleichen Volumina

gemischt. Aufgrund der geringen Menge an Tiermaterial konnte vom GW-Stamm nur die DNA von je 75 männlichen und 75 weiblichen Bettwanzen in Fünfer-Gruppen isoliert werden. Bei der Untersuchung der Allelfrequenzen des T-Stamms wurde, ebenfalls wegen geringer Tierzahlen, die DNA von 200 Bettwanzen verschiedener Stadien gepoolt isoliert: 1 x 5 Weibchen, 2 x 5 Männchen, 1 x 3 Weibchen und 2 J5, 1 x 5 J5, 4 x 5 J4, 8 x 5 J3, 1 x 2 J4 und 3 J3, 3 x 10 J2, 8 x 10 J1. Von den Stämmen: RS, B9 und B10 (je 5 Männchen und 5 Weibchen), LB II und LB III (je 5 Männchen), B2 (4 Männchen und 4 Weibchen), B3 (2 Männchen und 2 Weibchen), B4 (4 Männchen und 3 Weibchen), B5 (3 Männchen), B7 (2 J3), B8 (2 J5) wurden die Proben nach Geschlecht oder Stadium gepoolt untersucht.

Zur Bestimmung des Genotyps einzelner Bettwanzen der Stämme UBA, SK, OB, LB, AS, HO und CC wurde die DNA von 10 Männchen und 10 Weibchen einzeln isoliert und ebenfalls mittels Pyrosequenzierung separat sequenziert. Von den Stämmen B1 (Männchen), B5 (1 Weibchen), B6 (Männchen und J4) und B8 (Weibchen) waren nur einzelne Bettwanzen vorhanden, weshalb nur der Genotyp bestimmt wurde.

Um die Messabweichungen des Geräts bei der Sequenzierung der Sequenzen mit den beiden potentiellen SNPs zu bestimmen, wurden verschiedene Mischungsverhältnisse (Anteil mutierter Plasmid-DNA: 0 % = 0 ng, 5 % = 1,25 ng, 10 % = 2,5 ng, 20 % = 5 ng, 30 % = 7,5 ng, 40 % = 10 ng, 50 % = 12,5 ng, 60 % = 15 ng, 70 % = 17,5 ng, 80 % = 20 ng, 90 % = 22,5 ng, 95 % = 23,75, 100 % = 25 ng) in einem Endvolumen von 50 µl von Plasmid-DNA mutierter und nicht mutierter Stämme untersucht. Die Messabweichungen des Geräts bei der Sequenzierung der Sequenzen mit den Mutationen V419L und L925I wurden mit der Plasmid-DNA (s. Punkt 2.2.2.6) des UBA- und RS-Stamms bzw. UBA- und OB-Stamms überprüft. Für jedes Mischungsverhältnis wurden mindestens fünf und maximal zehn unabhängige Werte gemessen.

Von sämtlichen Proben wurden fünf technische Replikate sequenziert. Versuche, in denen die Ergebnisse eine Abweichung von mehr als 5 % innerhalb dieser Replikate aufwiesen, wurden wiederholt.

2.2.2.1 DNA-Isolierung

Die gDNA sämtlicher Proben wurde mittels der Silica-Membran-Methode isoliert. Das Prinzip dieser Methode basiert darauf, dass die DNA bei hohen Konzentrationen chaotroper Salze fest an eine Silikat-Membran in einem Kunststoffsäulchen gebunden wird und über mehrere

Waschvorgänge Verunreinigungen herausgefiltert werden. Bei niedrigen Salzkonzentrationen löst sich die DNA, weshalb sie mit einem Puffer von geringer Salzkonzentration oder Wasser eluiert werden kann.

Mit dem NucleoSpin[®] 8 Tissue-Kit und der korrespondierenden NucleoVac 96 Vakuumarbeitsstation konnte parallel die DNA aus 48 Proben isoliert werden. Als erstes wurden nicht-gesogene Bettwanzen für 10 min bei -80 °C eingefroren und anschließend in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit einem Pistill gemörsert. Zur besseren Homogenisierung wurden 50 µl 1X PBS (s. 2.1.3.6) hinzugegeben und erneut vorsichtig ein paar Mal mit dem Pistill gedrückt. Um die Wanzenzellen zu lysieren wurden der Mischung 180 µl Lysepuffer (T1) sowie 25 µl Proteinase K hinzugefügt und alles über Nacht bei 56 °C und 27 x g im Thermoblock inkubiert. Die anschließende DNA-Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Danach konnte die DNA bei -20 °C aufbewahrt werden.

2.2.2.2 Photometrische Messung der DNA-Proben

Die Bestimmung der Reinheit und Konzentration der isolierten gDNA erfolgte mit einem Mikroplatten-Spektralphotometer nach dem Prinzip der monochromatorbasierten UV-VIS-Spektrometrie und der Gen5[™] Software zur Datenanalyse von Mikroplatten.

Für die photometrische Messung wurden je 2 µl der gDNA Proben auf die Mikrovolumenplatte im Doppelansatz aufgetragen. Der Quotient aus dem Absorptionsmaximum von DNA (260 nm) und dem von Proteinen (280 nm) sollte im Idealfall bei 1,8 liegen. Der Wert wurde kleiner, wenn die gDNA mit Proteinen kontaminiert war und größer durch Verunreinigungen mit Substanzen, die wie DNA bei 260 nm absorbieren konnten. Proben, bei denen das Verhältnis 260/280 unter 1,5 oder über 2,2 lag oder in denen die DNA-Konzentrationen zu gering waren, wurden verworfen und neue gDNA isoliert. Proben mit schlechteren Werten aus Stämmen ohne Zuchterfolg oder Zuchtmöglichkeit wurden auf einem Agarosegel (2.2.2.4) überprüft und konnten nach Auftreten einer sichtbaren Bande weiterverwendet werden.

2.2.2.3 Amplifikation der Fragmente mit den potentiellen Polymorphismen

Nach der photometrischen Quantifizierung wurden die gDNA Proben für die weiteren Versuche auf 5 ng/µl mit Aqua Bidest verdünnt und die gewünschten Fragmente mittels konventioneller Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und des Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase-Kits amplifiziert.

Für die Amplifikation wurden 12,5 ng genomische DNA mit 1 X Phusion HF Puffer, 10 mM dNTP-Mix, 12,5 µmol Vorwärts- und Rückwärtsprimer (für die Pyrosequenzierung Rück-

wärtsprimer mit Biotin) sowie 1 U Phusion Hot Start II DNA-Polymerase gemischt und mit DEPC-H₂O auf 50 µl Endvolumen aufgefüllt. Alle Reaktionen wurden in den C1000 und S1000 Thermozyklern von Biorad durchgeführt. In vorangegangenen Gradienten PCRs wurde die optimale Hybridisierungstemperatur der Primer ermittelt. Die initiale Denaturierung erfolgte bei einer Temperatur von 98 °C für 30 s. Darauf folgten 45 gleichartige Temperaturzyklen aus Denaturierung (98 °C für 10 s), Primerhybridisierung (55 °C für 30 s) und Elongation (72 °C für 30 s). Nach Abschluss der 45 Zyklen folgte für 5 min bei 72 °C die finale Polymerisierung und Abkühlung der Proben auf 4 °C. Die Amplifikate wurden bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.2.2.4 Agarosegel-Elektrophorese

Die Erfolgskontrolle der PCR geschah mittels einer Agarosegel-Elektrophorese. In eine Flachbett-Gelelektrophorese-Apparatur wurde je nach Gelgröße ein Gemisch aus 40 ml, 100 ml bzw. 250 ml 1 %iger Agarosegellösung (s. 2.1.3.6) mit 4 µl, 10 µl bzw. 25 µl GR-Green Nukleinsäurefarbstoff blasenfrei gegossen. Nach Einsetzen der Taschenschablone konnte das Gel bei T_R für 15 min – 30 min erstarren. Anschließend konnte das erstarrte Gel in die Gelkammer überführt und mit 1 X TAE-Puffer (s. 2.1.3.6) überschichtet und die Proben hinein pipettiert werden. In einem Probenansatz waren 1 µl PCR-Produkt, 1 X Ladepuffer (s. 2.1.3.6) sowie Aqua Bidest ad 12 µl enthalten. Als Größenstandard wurde eine 100 bp Leiter (s. 2.1.3.6) verwendet. Nach dem Probenauftrag wurde eine Spannung von 100 V angelegt. Direkt nach dem Lauf wurden die Banden mit dem vollautomatisierten Gel Dokumentations-system G:Box unter UV-Licht visualisiert und digital fotografiert.

2.2.2.5 DNA-Aufreinigung

Für die Klonierung und die Sequenzierung mussten die PCR-Amplifikate von allen Nebenprodukten wie einzelnen Nukleotiden, Primern, Enzymen und Puffern, gereinigt werden. Die Aufreinigung erfolgte mit dem Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit. Es basiert ebenfalls auf der bereits in Punkt 2.2.2.1 beschriebenen Silica-Membranmethode, mit dem Unterschied, dass die DNA-Bindung, -Waschung, und -Elution über die Säulchen durch Zentrifugation erfolgt. Dazu wurden die Amplifikate erneut wie in Punkt 2.2.2.4 beschrieben auf ein Gel aufgetragen. Die einzelnen Banden wurden auf dem UV-Tisch der G:Box mit einem Skalpell ausgeschnitten, die PCR-Produkte nach Herstellerangaben aufgereinigt und bei -20 °C für weitere Untersuchungen aufbewahrt.

2.2.2.6 Klonierung der PCR-Produkte

Die Genauigkeit der Pyrosequenzierung wurde durch das Erstellen einer Standardkurve für den jeweiligen SNP überprüft (s. 2.2.2). Für die Plasmidgewinnung wurden PCR-Produkte mit und ohne Mutationen als Referenzproben mit dem Zero Blunt[®] TOPO[®] PCR Cloning Kit kloniert. Mit der TOPO[®] Cloning-Methode werden PCR-Produkte mit glatten Enden (Phusion Hot Start II DNA Polymerase erzeugt PCR-Produkte mit glatten Enden) direkt in einen Plasmid-Vektor inseriert. Die Referenzproben der nicht mutierten Allele wurden aus der DNA einer männlichen Bettwanze des wirkstoffsensiblen UBA-Stamms gewonnen. Die Referenzproben für V419L und L925I wurden aus der DNA je eines Bettwanzenmännchens der Feldstämme RS bzw. OB hergestellt.

Sowohl die Ligation mit dem pCR[™] 4Blunt-TOPO[®] Vektor als auch die chemische Transformation mit den One Shot[®] TOP10 Chemically Competent *E. coli*-Zellen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Während der Inkubationszeit wurden für jeden Ansatz zwei Agarplatten gegossen. Dazu wurde der LB-Agar (s. 2.1.3.6) in der Mikrowelle aufgekocht, auf ca. 50 °C - 60 °C abgekühlt und auf einer sterilen Werkbank pro Platte 20 ml mit 1 mg des Antibiotikums Kanamycin gemischt. Um klar abgegrenzte Kolonien zu erhalten, wurden auf die erstarrten Agar-Platten einmal 10 % und einmal 90 % des Transformationsansatzes mit einem Drigalskispatel aufgetragen und die Platten umgedreht bei 37 °C über Nacht inkubiert. Bei Transformationserfolg, d. h. Koloniewachstum, wurden die Bakterien weiter vermehrt. Dazu wurden auf einer sterilen Werkbank je drei Kolonien Kanamycin-resistenter Transformanten mit einer 10 µl-Pipettenspitze in ein Kulturröhrchen mit 5 ml LB-Medium (s. 2.1.3.6) und 250 µg Kanamycin überführt und erneut über Nacht bei 37 °C und 150 rpm in den Inkubationsschüttler gestellt.

Um den Transformationserfolg zu kontrollieren wurde mit dem EasyPrep[®] Pro Plasmid Miniprep Kit (Silica-Membran-Methode, s. 2.2.2.1) die Plasmid-DNA aus 2 ml *E. coli*-Bakterienkultur nach Herstellerangaben isoliert. Um die Inserts der gewonnenen Plasmide zu analysieren wurde ein Restriktionsverdau mit *EcoRI* durchgeführt. Dazu wurden 4 µl Plasmid mit 1 X Puffer-*EcoRI* und 10 U *EcoRI* gemischt, mit Aqua Bidest auf 10 µl aufgefüllt und für 1 h im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA wie in Punkt 2.2.2.4 beschrieben über eine Agarosegel-Elektrophorese visualisiert. Als Größenstandards wurden eine 100 bp und eine 1 kb Leiter (s. 2.1.3.6) verwendet. Konnten Banden mit der entsprechenden Größe der Inserts detektiert werden, wurde die Plasmidmenge wie unter Punkt 2.2.2.2 beschrieben durch eine photometrische Messung bestimmt und ein Aliquot jeder Pro-

be bei LGC Genomics sequenziert. Zur Sequenzierung wurden die M13 Primer (Forward: 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3', Reverse: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') verwendet. Die Sequenzen wurden mit dem Programm Clone Manager Professional Version 9.2 (Scientific & Educational Software) durch einen Sequenzvergleich mit den nicht mutierten und mutierten cds der Alpha-Untereinheit des spannungsabhängigen Natriumkanals (s. 2.1.2) verglichen. Die Plasmid-DNA-Proben mit den korrekten Inserts wurden bei -20 °C aufbewahrt. Zudem wurden mehrere Aliquots von je 1000 µl Flüssigkultur der korrekten Klone mit 1000 µl Glycerol gemischt und bei -80 °C eingefroren.

2.2.2.7 Probenvorbereitungen für die Pyrosequenzierung

Vor Beginn eines Analyselaufs mussten zum einen die übrig gebliebenen Nukleotide, Primer und Salze der vorangegangenen PCR-Reaktion aus den Ansätzen entfernt werden, um Hintergrundsignale und Störungen im Enzymsystem der Pyrosequenzierung zu vermeiden. Zum anderen mussten die DNA-Stränge voneinander getrennt und die Sequenzierprimer hybridisiert werden. Zu diesem Zweck wurden zunächst die biotinylierten PCR-Produkte (Volumen 40 µl), wie im PyroMark[®] Q24 MDx Handbuch beschrieben, an streptavidinbeschichteten Sepharose-Beads immobilisiert, indem in einer 24-Well-PCR-Platte PCR-Produkte mit 40 µl Bindungspuffer und 2 µl gemischt und bei T_R für 10 min bei 1400 rpm auf einem Plattenschüttler geschüttelt wurden. Parallel wurden die verwendeten Sequenzierprimer auf 0,5 µM mit Annealing Puffer verdünnt und je 25 µl in jedes Well einer PyroMark[®] Q24 Sequenzierplatte pipettiert. Damit sich die Platte beim späteren Erhitzen nicht deformierte, wurden leere Wells mit 25 µl Wasser gefüllt. Direkt nach der Immobilisierung wurden sowohl die PCR-Platte, als auch die Sequenzierplatte auf die Arbeitsplattform der PyroMark[®] Q24 MDx Vakuumarbeitsstation gestellt. Über den Vakuum-Saugkopf mit 24 Filter-Hohlnadeln wurde die Flüssigkeit aus den PCR-Platten gesaugt und dadurch die an den Sepharose-Beads immobilisierten PCR-Produkte angesaugt. Danach wurden die Filter-Hohlnadeln hintereinander mit den Proben für je 30 s mit je 50 ml 70 % Ethanol, 0,2 M Denaturierungslösung sowie für 1 min mit 1 X Waschpuffer in den Plastikwannen der Vakuumarbeitsstation gespült. Nachdem die Flüssigkeit vollständig aus den Filter-Hohlnadeln abgelaufen war, wurde der Saugkopf über die Sequenzierplatte gehalten, das Vakuum abgeschaltet und die Beads zusammen mit dem PCR-Produkt durch sanftes Hin- und Herbewegen in die Platte entlassen. Für die Hybridisierung der Sequenzierprimer an die DNA-Proben wurde die Sequenzierplatte für exakt 2 min bei 80 °C im PyroMark[®] Q24 Sequenzierplattenhalter auf dem Heizblock

eines Thermalzyklers erhitzt. Nachdem die Platte für 5 min – 10 min auf T_R abkühlen konnte, wurde sie in die Prozesskammer des PyroMark[®] Q24 MDx zur Analyse eingesetzt.

2.2.2.8 Analyselauf

Ein Analyselauf sowie die dazu benötigten Vorbereitungen, wie das Befüllen der PyroMark Q24 Kartusche mit den PyroMark Gold Q24 Reagenzien und das Konfigurieren eines Assays, wurden wie im Benutzerhandbuch von Qiagen beschrieben durchgeführt. Als Analysemethode wurde ein AQ-Assay (Allele Quantification) gewählt.

2.2.3 mRNA-Expressionsanalyse der CYP-Gene *cyp397a1*, *cyp398a1*, *cyp4cm1* und *cyp6dn1*

Zur Detektion erhöhter Transkriptlevel in sieben der 20 gesammelten Bettwanzenfeldstämme sowie des CC-Laborstamms und des sensiblenUBA-Stamms wurde die RNA einzelner männlicher Bettwanzen in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben und mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qRT-PCR = quantitative Real-Time PCR) untersucht. Um Kontaminationen mit unspezifischen Nebenprodukten wie gDNA oder Primerdimeren zu detektieren, wurden interne Plattenkontrollen jedes Mal mit untersucht. Zudem wurde im Anschluss an jede PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Durch eine kontinuierliche Temperaturerhöhung werden die doppelsträngigen Amplifikate langsam voneinander getrennt, wodurch der interkalierende Farbstoff wieder frei gesetzt wird. Die Abnahme der gemessenen Fluoreszenz über die Temperatur wird als Schmelzkurve graphisch dargestellt. Die Schmelztemperatur (T_m = melting Temperature) des jeweiligen Fragments kann an dem Punkt des Graphen, an dem der Fluoreszenzwert durch eine Krümmung abfällt abgelesen werden. Zur einfacheren Analyse der Schmelzkurve wird ein zweiter Graph von der Software generiert, welcher die erste negative Ableitung der Fluoreszenz in Abhängigkeit zur Temperatur anzeigt. Die Schmelztemperatur wird in der Ableitung als Peak dargestellt. Weitere Peaks mit abweichenden Schmelztemperaturen zeigen mögliche Kontaminationen an.

Für die Quantifizierung der mRNA-Expressionslevel der einzelnen CYP-Gene wurde eine Normalisierung der Ergebnisse mit den mRNA-Expressionsleveln von drei Referenzgenen durchgeführt. Dafür wurden die zwei Gene *rpl8* und *rpl11* aus der großen ribosomalen Untereinheit (l für large subunit) und das Gen *rps16* aus der kleinen ribosomalen Untereinheit (s für small subunit) verwendet. Diese wurden bereits in der Arbeit von ZHU et al. (2012) auf ihre Tauglichkeit als Referenzgene getestet und die mRNA-Expressionslevel zwischen unter-

schiedlichen Entwicklungsstadien und Bettwanzenpopulationen sind für stabil befunden worden. Zur Überprüfung wurde eine eigene Untersuchung mit dem Excel-basierten Tool Best-Keeper durchgeführt (BUSTIN et al. 2009; MAMIDALA et al. 2011b; PFAFFL et al. 2004).

2.2.3.1 RNA-Isolation mit der Guanidinisothiocyanat-Phenol-Methode

Aufgrund von zu geringen Tierzahlen und den zunächst ungenügenden Lagermöglichkeiten der Bettwanzenproben bei -20 °C im UBA, war eine RNA-Isolation nicht von allen Stämmen möglich. Von den neun Stämmen UBA, SK, AS, OB, LB, HO, GW, T und CC wurden je 10 männliche Bettwanzen separat im Doppelansatz untersucht.

Die RNA-Extraktionen des UBA-Stamms und der acht Feldstämme erfolgten mit der Guanidinisothiocyanat-Phenol-Methode. Sie basiert darauf, dass Guanidinisothiocyanat-Phenol (TRI-Reagenz) in einem Schritt die Zellen lysiert, Enzyme wie RNasen inaktiviert und die RNA löst. Dazu wurden einzelne Bettwanzen direkt aus der Lagerung bei -80 °C unter dem Abzug zügig mit einer Pinzette in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und in 1 ml peqGOLD Trifast[™] mit einem Pistill zerdrückt. Innerhalb von 5 min Wartezeit erfolgte die Dissoziation der Nukleotidkomplexe. Der Mischung wurden 200 μl Chloroform hinzugefügt und der Ansatz auf maximaler Stufe mit dem Schüttler durchmischt. Nach einer Inkubation bei T_R wurden die Proben für 5 min bei $13.793 \times g$ zentrifugiert. Dadurch erfolgte eine Phasentrennung. Die obere farblose wässrige Phase mit der benötigten RNA wurde in ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß mit einer 1000 μl Pipette überführt, der Rest wurde verworfen. Für die RNA-Präzipitation wurden 500 μl Isopropanol hinzugefügt, die Proben ein paarmal invertiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation für 10 min bei $12.000 \times g$ und 4 °C klebte das RNA-Präzipitat als milchig weißer Fleck am unteren Teil des Reaktionsgefäßes. Nach Abkippen des Isopropanolüberstands wurden die Pellets zweimal mit 1 ml 75 % Ethanol durch kräftiges Schütteln auf dem Schüttler und Zentrifugieren (10 min, $12.000 \times g$, 4 °C) gewaschen. Die Pellets konnten unter dem Abzug trocknen und wurden anschließend in 50 μl DEPC behandeltem Wasser resuspendiert und bei -80 °C gelagert.

2.2.3.2 Photometrische Messung der RNA-Proben

Die photometrische Messung der RNA-Proben geschah analog zur DNA-Messung (s. 2.2.2.2). Für eine korrekte Datenanalyse erfolgte innerhalb der Gen5[™] Software eine Umstellung auf RNA.

2.2.3.3 Bestimmung der RNA-Integrität

Die Qualitätsprüfung der isolierten RNA erfolgte mit der automatisierten Kapillarelektrophorese mittels Lab-on-Chip-Technologie im 2100 Bioanalyzer. Die Proben und die im Kit (Agilent RNA 6000 Nano Kit) enthaltene RNA-Leiter (Standard) wurden in die Vertiefungen des RNA 6000 Nano Chips pipettiert. Über in das Glas eingesetzte Mikrokapillaren wurden sie in eine Trennkapillare geleitet, wo die einzelnen Fraktionen der RNA elektrophoretisch entsprechend ihrer Fragmentgröße separiert und über laserinduzierte Fluoreszenz detektiert wurden. Die Analyse sämtlicher RNA-Fragmente wurde mit dem Agilent RNA 6000 Nano Kit, wie im beigefügten Quick Start Guide beschrieben, durchgeführt. Eine nach dieser Anleitung optionale Hitze-Denaturierung der RNA-Proben erfolgte nicht.

Die Ergebnisse wurden in einem Elektropherogramm und einem Gel-ähnlichen Bild dargestellt. Zudem generierte die Bioanalyzer Software die sogenannten RNA-Integritäts-Nummern (RIN). Sie werden, anders als bei anderen Methoden, nicht nur über die prozentualen Verhältnisse der ribosomalen RNA (rRNA)-Moleküle 28S und 18S berechnet, sondern durch die Analyse der gesamten elektrophoretischen Spur der RNA. Die RIN wurde mit den Werten 1, für komplett degradierte und fragmentierte RNA, bis 10, für intakte RNA, charakterisiert. Die RIN kann, wenn ein sogenannter Hidden-Break auftritt, nicht berechnet werden. In diesem Fall muss die Qualität der RNA durch eine visuelle Inspektion der Elektropherogramme und der digitalen Gelbilder bestimmt werden.

2.2.3.4 DNase I-Behandlung der RNA

Um die erhaltene Gesamt-RNA von DNA-Kontaminationen zu befreien, wurden die Proben mit DNase I behandelt. In einem Reaktionsansatz waren enthalten: 1 µg der Gesamt-RNA, 1X Reaktions Puffer DNase I mit Magnesiumchlorid und 1 U RNase-freie DNase I sowie DEPC behandeltes Wasser ad 10 µl. Nach einer Inkubation bei 37 °C im Wasserbad für 30 min wurden 50 nmol EDTA hinzugegeben und erneut für 10 min bei 65 °C inkubiert. Die mit DNase I behandelte RNA wurde bei -80 °C gelagert.

2.2.3.5 Reverse Transkription

Um die Transkriptmenge der CYP-Gene mit Hilfe der quantifizierenden Echtzeit-PCR zu bestimmen, ist es nötig, aus der gereinigten RNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) cDNA zu synthetisieren. Dafür wurde das DyNAmo cDNA Synthesis Kit verwendet, welches die Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase RNase H⁺ (M-MLV RT, RNase H⁺) enthält. Für die Reaktion wurden je 50 ng RNA verwendet. Die Reakti-

onsvorbereitung sowie die Inkubation im Thermozykler wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Detektion möglicher Kontaminationen während der quantitativen PCR, wurden Minus RT Kontrollen (-RT-Kontrollen) in den Versuch integriert. Diese Kontrollproben enthielten die gleichen Reaktionskomponenten ohne Zugabe von Reverse Transkriptase. Um nach der reversen Transkription mögliche Kontaminationen durch gDNA zu detektieren, wurden die cDNA und die genomische DNA der einzelnen Amplifikate auf einem Gel verglichen (s. 2.2.2.4). Anschließend wurde die cDNA bis zur Quantifizierung per qRT-PCR bei -20 °C gelagert.

2.2.3.6 Herstellung der Plasmid-Standards und des Kalibrators

Zur Evaluation der genspezifischen PCR-Effizienzen wurden verschiedene Verdünnungen einer Probe mit bekannter Konzentration hergestellt und in jedem Lauf mit analysiert.

Zur Herstellung der Verdünnungen wurde die DNA einer männlichen Wanze des wirkstoffsensiblen UBA-Stamms mit dem NucleoSpin[®] Tissue Kit isoliert. Es wurde das gleiche Isolationsprotokoll wie in 2.2.2.1 beschrieben verwendet, mit dem Unterschied, dass die DNA auf einzelnen Silikat-Säulchen durch Zentrifugation (13.793 x g) isoliert wurde. Die Amplifikationen der vier CYP- und drei Referenz-Gene erfolgten wie unter Punkt 2.2.2.3 beschrieben mittels konventioneller PCR mit denselben Primern wie für die qRT-PCR. Die Annealingtemperatur der verschiedenen Primerpaare von 60 °C wurde zuvor durch eine konventionelle Gradienten-PCR ermittelt. Die PCR-Produkte wurden anschließend in einem Gel überprüft (s. 2.2.2.4), gereinigt (s. 2.2.2.5) und kloniert (s. 2.2.2.6). Nach dem Restriktionsverdau mit *EcoRI* und der Überprüfung der Proben auf dem Agarosegel (s. 2.2.2.4) wurden die Proben bei LGC sequenziert und mit dem Programm Clone Manager Professional Version 9.2 untersucht (Ablauf wie in 2.2.2.6 beschrieben). Die Sequenzen der Referenzgene und des CYP-Gens *cyp397a1* wurden mit den kodierenden DNA-Sequenzen aus der Genbank des NCBI verglichen. Die einzelnen Zugangsnummern der Referenzgene lauten: *rpl8* (EZ419796.1), *rpl11* (EZ419774.1), *rps16* (EZ419784.1), *cyp397a1* (JN624742.1). Als Referenzsequenzen für die übrigen drei CYP-Gene wurden die Konsensus-Sequenzen (Überlappende Sequenzen aus vielen einzelnen Sequenzierungen) von ZHU et al. (2013) verwendet. Die Konzentrationen der einzelnen Plasmid-Proben wurden mittels photometrischer Messung (s. 2.2.2.2) bestimmt. Für die Berechnung der Verdünnungsreihen war es nötig, das gemessene Gewicht pro Volumen in Kopienzahl pro Volumen umzurechnen (STAROSCIK 2004). Neben der Menge der Amplifikate wurde die Länge der Amplifikate, d.h. in diesem Fall die Länge des jeweiligen Templates addiert mit der Länge des eingesetzten Vektors

(pCR™ 4Blunt-TOPO®, 3956 bp), benötigt. Zur Berechnung wurde angenommen, dass das durchschnittliche Gewicht eines Basenpaares 650 g/mol beträgt. Mit Hilfe der Avogadro Konstante ($6,022 \times 10^{23}$ Moleküle/mol) konnten die Moleküle der PCR-Produkte pro Gramm berechnet werden. Unter der Berücksichtigung der Umrechnung von Gramm auf Nanogramm, lautet die endgültige Formel:

$$\text{Kopienzahl} = \frac{(\text{Menge des Amplifikats [ng]} * 6,022 \times 10^{23} [\text{Moleküle/mol}])}{(\text{Länge des Amplifikats [bp]} * 1 \times 10^9 [\text{g/mol}] * 650 [\text{bp}])}$$

Für alle Proben wurden zunächst Verdünnungen mit 4×10^8 Kopien, die bei -20 °C gelagert werden konnten (Lagerverdünnung), hergestellt. Daraus konnten die weiteren Verdünnungsstufen jedes Mal frisch gemischt werden. Dies war wichtig, da sich Nukleinsäuren in geringem Maße an die Wände der Reaktionsgefäße lagern können und somit in niedrigen Verdünnungen die Messungen verfälscht werden. Für alle Gene wurden aus der Lagerverdünnung sieben serielle Verdünnungen in Zehner-Schritten der Größenordnung 4×10^6 bis 40 Kopien hergestellt. In einer qRT-PCR wurde der größte dynamische Bereich, d.h. die kleinsten und größten Verdünnungen mit messbaren C_q-Werten, festgelegt und die Lagerverdünnungen und Verdünnungsstufen angepasst. Die finalen Verdünnungsstufen waren für *rpl8*, *rps16* und *cyp6dn1* 4×10^7 bis 40, für *rpl11*, *cyp398a1* und *cyp4cm1* 1×10^7 bis 10 sowie 4×10^6 bis 4 für *cyp397a1*.

Da nicht alle Proben gleichzeitig untersucht werden konnten, wurde in jedem Analyselauf ein Kalibrator mit amplifiziert. Die Software nutzt diesen automatisch als Bezugspunkt zwischen den einzelnen Analyseläufen. Dadurch werden die technischen Variationen von Lauf zu Lauf korrigiert und die Software kann für weitere Berechnungen annehmen, dass alle Proben in einem Analyselauf untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde die cDNA der zehn UBA-Proben zu gleichen Volumina gemischt und bei jedem Analyselauf mit amplifiziert.

2.2.3.7 Protokoll der qRT-PCR

Für die qRT-PCR wurde der bereits gemischte 2X GoTaq® qPCR Master Mix verwendet. Die Zusammensetzung ist im Benutzerhandbuch wegen laufender Patentverfahren eines neu entwickelten Fluoreszenzfarbstoffes nicht genau beschrieben. Für einen 50 µl Reaktionsansatz wurden 25 µl 2 X GoTaq® qPCR Master Mix, 19 µl DEPC behandeltes Wasser, je 1 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer sowie 4 µl cDNA hinzugegeben. Da die verwendete GoTaq® Hot Start Polymerase bei niedrigen Temperaturen inaktiv ist, konnte die Reaktionsmischung

bei T_R erfolgen. Alle Reaktionen wurden in weißen 96-Well-Platten mit dem Bio-Rad CFX96 real-time PCR detection system durchgeführt. Auf jeder Platte wurden neun biologische Replikate der jeweiligen Bettwanzenproben, der Kalibrator sowie sieben Verdünnungen des Plasmid-Standards eines Gens im Doppelansatz mit jeweils zwei komplementären -RT-Kontrollen untersucht. In den restlichen sechs Wells befand sich die negative Reagenzienkontrolle (NTC = No Template Control), ein Reaktionsansatz mit 4 μ l DEPC behandeltem Wasser anstelle der cDNA.

In vorangegangenen Gradienten-PCRs wurde die optimale Hybridisierungstemperatur der Primer ermittelt. Die initiale Denaturierung erfolgte für 2 min bei 95 °C. Darauf folgten 49 gleichartige Temperaturzyklen bestehend aus Denaturierung bei 95 °C für 15 s sowie Primerhybridisierung und Elongation bei 60 °C für 60 s. Nach Abschluss der Zyklen folgte die Dissoziation zur Erstellung einer Schmelzkurve. Dazu wurde die Temperatur von anfänglichen 60 °C alle 5 s um 0,5 °C auf ein Maximum von 95 °C erhöht.

Bei einer Abweichung der C_q -Werte von mehr als 0,5 innerhalb eines Doppelansatzes oder von mehr als 5 zwischen den Proben und der NTCs oder den -RT-Kontrollen wurden die Proben erneut mittels qRT-PCR untersucht.

2.2.4 Testsystem für die Überprüfung der Wirksamkeit von Kontaktinsektiziden gegen *C. lectularius*

In der dieser Arbeit vorangegangenen Diplomarbeit wurde ein Testsystem für die Überprüfung der Wirksamkeit von Kontaktinsektiziden gegen Bettwanzen entwickelt. Die Methode basiert darauf, dass die Prüftiere, angelockt durch einen spezifischen Reiz, gemäß ihres natürlichen Verhaltens über mit Insektizid behandelte Oberflächen laufen. Dieser Wahlversuch wurde entwickelt, um neben dem üblichen UBA-Zwangsversuch (s. 2.2.6) die Wirksamkeit von Kontaktinsektiziden unter möglichst praxisnahen Bedingungen zu testen. Ein solches Testdesign entspricht den für die Biozidproduktzulassung geforderten *simulated use*-Tests (EUROPEAN UNION 2012). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Wahlversuch um ein neues Kastensystem erweitert, da in den zuvor verwendeten Teströhren lediglich flexible Materialien wie Tapete und Teppich untersucht werden konnten. Das Kastensystem erlaubt durch seine Konstruktion auch die Prüfung unflexibler Prüfoberflächen wie Sperrholz und Hornitex[®] (Laminat).

2.2.4.1 Versuchsaufbau

Die Versuche wurden in zwei identischen Versuchsanlagen mit je einem individuellen Prüfkastensystem zum Einsetzen verschiedener Prüfoberflächen durchgeführt (schematische Gesamtdarstellung siehe Abb. 13). Eine Versuchsanlage (Abb. 9) bestand aus einem Plexiglaszylinder mit abnehmbarem Deckel auf einer Kunststoffröhre als Sockel. Auf dessen Rückseite war 10 cm über dem Behälterboden ein Plexiglasrohr eingelassen. Dort wurde ein Silikonschlauch durch einen Stopfen in das Innere des Behälters hineingeführt und am anderen Ende mit einer Ansaugpumpe verbunden. An der Pumpe war zudem ein zweiter Silikonschlauch befestigt, durch den die angesaugte Luft aus dem Prüfraum geleitet wurde. Auf der Vorderseite des Plexiglasbehälters befand sich, direkt mit dem Behälterboden verbunden, ein zweites Plexiglasrohr. Dieses Rohr war über eine Flanschverbindung mit dem jeweiligen Prüfkastensystem verbunden.



Abb. 9: Aufbau der Wahlversuchsanlage. 1 Sockel des Plexiglasbehälters, 2 Plexiglasbehälter mit Wanzentische, 3 Plexiglasrohr mit Stopfen und Absaugschlauch (\varnothing 1 cm), 4 Plexiglaskasten, verbunden mit dem Plexiglasbehälter, 5 Stahlbehälter mit Deckel, 6 Plastikschlauch zur CO₂ Zufuhr (\varnothing 0,5 cm) hinter dem Durchflussmesser, 7 Gasdurchflussmesser, 8 Plastikschlauch für die CO₂ Zufuhr (\varnothing 0,5 cm) vor dem Durchflussmesser, 9 Spezialtisch mit Paraffinöl in der Rinne am Rand.

An der gegenüberliegenden Seite des Kastens war ein weiteres Plexiglasrohr angeflanscht, welches wiederum über einen Flansch mit einem Stahlbehälter mit abnehmbarem Deckel

(Abb. 10) verbunden war und 10 cm in diesen hineinreichte. Unter dem Ende dieses Rohrs stand ein Glasbecken als Auffangbehälter der über die Prüfoberfläche gelaufenen Bettwanzen. Der Auffangbehälter enthielt zwei Rundfilter aus Papier als Versteck für die Prüftiere. Damit die Wanzen während eines Versuchs nicht herauslaufen konnten, wurde der obere Rand des Beckens mit Polytetrafluorethylen ausgegossen. Im Stahlbehälter befanden sich außerdem ein Quecksilberthermometer zur Temperaturüberwachung neben dem Glasbecken, ein Plastikschlauch für die CO₂-Zufuhr etwa 5 cm vor der Rohröffnung und ein mit 300 ml Leitungswasser gefüllter Erlenmeyerkolben auf einer Heizplatte direkt an der Rückwand des Stahlbehälters (Abb. 10).



Abb. 10: Innenansicht des Stahlbehälters der Wahlversuchsanlage. **1** Plexiglasrohr mit Öffnung in den Stahlbehälter, über Flanschschraubverbindungen mit dem Plexiglaskasten und dem Stahlbehälter verbunden, **2** Auffangbecken, **3** Plastikschlauch für die CO₂-Zufuhr (\varnothing 0,5 cm) hinter dem Durchflussmesser, mittels einer Schraubzwinge an der ehemaligen Trennwand des Stahlbehälters befestigt **4** Thermometer, **5** Heizplatte und mit Leitungswasser gefüllter Erlenmeyerkolben mit Petrischale als Abdeckung.

Die Wassertemperatur betrug 80 °C - 85 °C, wodurch eine Lufttemperatur von 30 °C - 37 °C im gesamten Stahlbehälter erzeugt wurde. Durch die Erhöhung der Lufttemperatur und des CO₂-Gehalts im Stahlbehälter wurde das Vorhandensein eines Wirtes simuliert, das die Bettwanzen zum Überqueren der Prüfoberflächen veranlassen sollte. Durch die Ansaugpumpe

wurde überschüssiges CO₂ aus dem System entfernt, was dazu führte, dass die Bettwanzen die Reizquelle schneller detektieren konnten (Vorversuche).

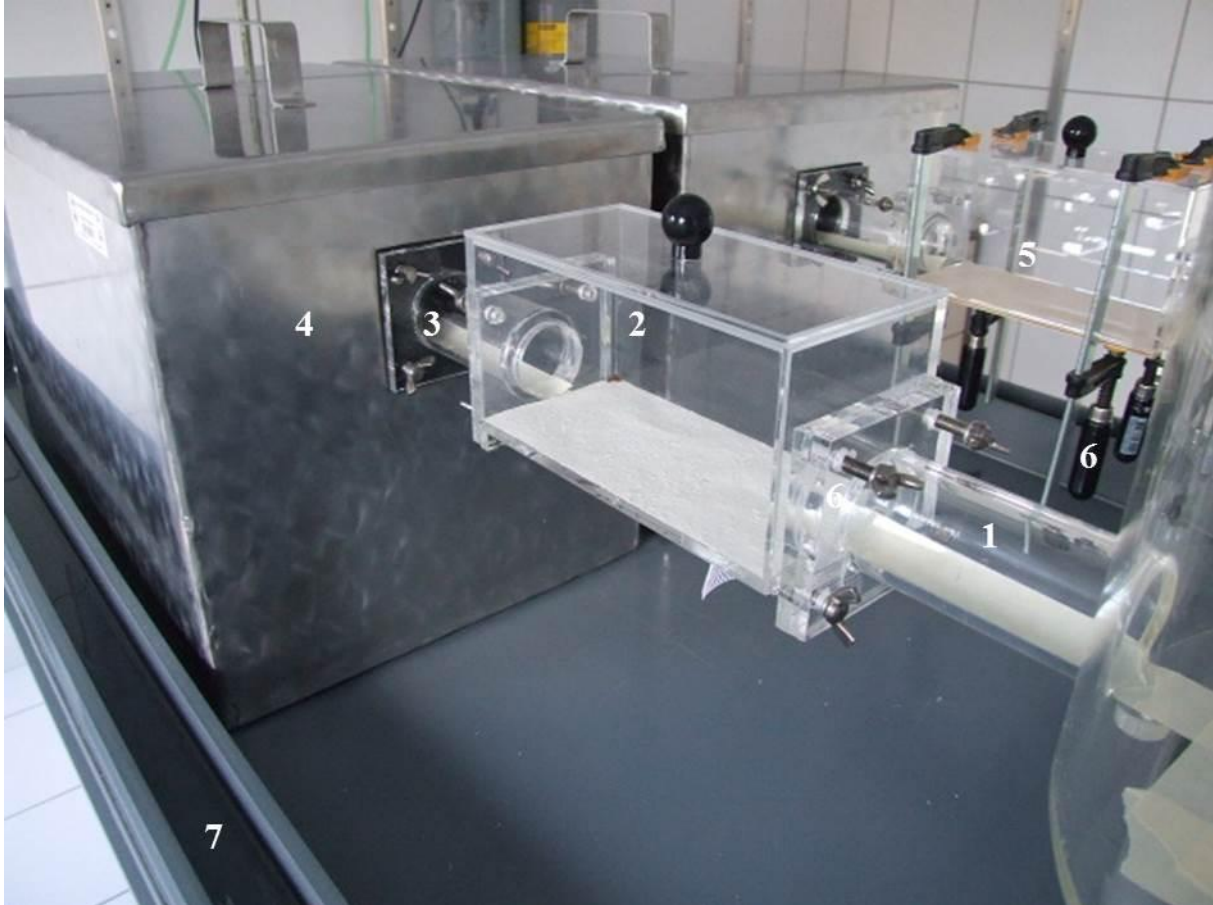


Abb. 11: Plexiglaskästen der Wahlversuchsanlage. **1** Plexiglasrohr (untere Seite mit Kreppband beklebt), fest mit dem Plexiglasbehälter und über Flanschschraubverbindungen mit dem Plexiglaskasten verbunden, **2** Plexiglaskasten mit Boden für flexible Oberflächen (hier: Tapete), über Flanschschraubverbindungen mit je einem Plexiglasrohr zum Plexiglasbehälter und Stahlbehälter verbunden, **3** Plexiglasrohr (untere Seite mit Kreppband ausgelegt) mit Öffnung in den Stahlbehälter, über Flanschschraubverbindungen mit dem Plexiglaskasten und dem Stahlbehälter verbunden, **4** Stahlbehälter mit Reizquellen und Auffangbecken, **5** Plexiglaskasten ohne Boden für unflexible Oberflächen (hier: Sperrholz), über Flanschschraubverbindungen mit je einem Plexiglasrohr zum Plexiglasbehälter und Stahlbehälter verbunden, **6** Schraubzwingen zum Befestigen der festen Prüfoberflächen als Boden des bodenlosen Plexiglaskastens, **7** Mit Paraffinöl gefüllte Rinne des Spezialtisches.

Während der Versuche wurden die Temperatur und die Luftfeuchtigkeit im Prüfraum mit einem Thermohygrographen überwacht. Für die Gewährleistung der stetigen CO₂-Zufuhr war ein Plastikschauch über einen Druckminderer an eine 30 kg CO₂-Flasche angeschlossen. Für die exakte Einstellung der Gasflussrate war der Schlauch mit einem Gasdurchflussmesser verbunden. Ein zweiter Schlauch am Ausgang des Durchflussmessers wurde an einem Stativ mittels Schraubzwingen befestigt und an dessen Ende ein T-Stück Verbinder mit je einem

weiteren Schlauch angebracht. Über Bohrungen in der Rückwand des Stahlbehälters wurden die Schläuche mittels einer Schraubzwinde an der ehemaligen Trennwand des Stahlbehälters ca. 5 cm vor dem Plexiglasrohr und dem Auffangbehälter befestigt. Somit konnte CO₂ aus einer Flasche in beide Anlagen gleichzeitig geleitet werden.

Als Weiterentwicklung des ursprünglichen Versuchsaufbaus wurden zwei unterschiedliche Plexiglaskästen mit abnehmbaren Deckeln integriert (Abb. 11). In den Plexiglaskästen mit Boden konnten flexible Prüfoberflächen wie Tapete oder Teppich mit doppelseitigem Klebeband befestigt werden. Der Boden war mit einer Bohrung (\varnothing 2 cm) versehen, über die die eingeklebten Oberflächen von unten abgelöst werden konnten. Während des Versuchs wurde die Öffnung durch einen Plexiglasring und Gaze verschlossen. Bei der Konstruktion des zweiten Plexiglaskastens wurde der Boden vollständig weggelassen. Dadurch konnten unflexible Prüfoberflächen wie Sperrholz oder Hornitex[®] mit Hilfe von vier Schraubzwingen direkt an der Unterseite des Kastens befestigt werden und den Boden ersetzen.

Um sicherzustellen, dass keine Versuchstiere aus dem Prüfsystem entkommen konnten, standen die Versuchsanlagen auf einem Spezialtisch, der durch eine mit Paraffinöl gefüllte Rinne begrenzt wurde (Abb. 9).

2.2.4.2 Wanzen tasche

Die Bettwanzen wurden gemäß ihres natürlichen Verhaltens in einem Versteck (Wanzen tasche) in der Versuchsanordnung positioniert. Diese Wanzen tasche bestand aus einem halben Blatt Küchenrolle, welches längs, knapp unter der Mitte einmal gefaltet wurde, wodurch die Hälften um ca. 1 cm versetzt aufeinander lagen. Anschließend wurden die Öffnungen links und rechts mit Kreppband von beiden Seiten zugeklebt, so dass eine Tasche entstand (Abb. 12A).

Über die obere Öffnung wurde eine definierte Anzahl Wanzen aus einem Rollrand-Glas hineingeschüttet. Durch die versetzte Faltung konnte die Wanzen tasche mit nur einem Klebestreifen zügig verschlossen werden. Damit sich die Bettwanzen nach dieser Prozedur beruhigen und aggregieren konnten, wurde die Wanzen tasche bereits eine Stunde vor Versuchsbeginn fest mit Kreppband in die Mitte des Plexiglasbehälters geklebt. Zu Beginn des Versuchs wurde die Oberseite sternförmig aufgeschnitten und die Tiere konnten herauslaufen (Abb. 12B).

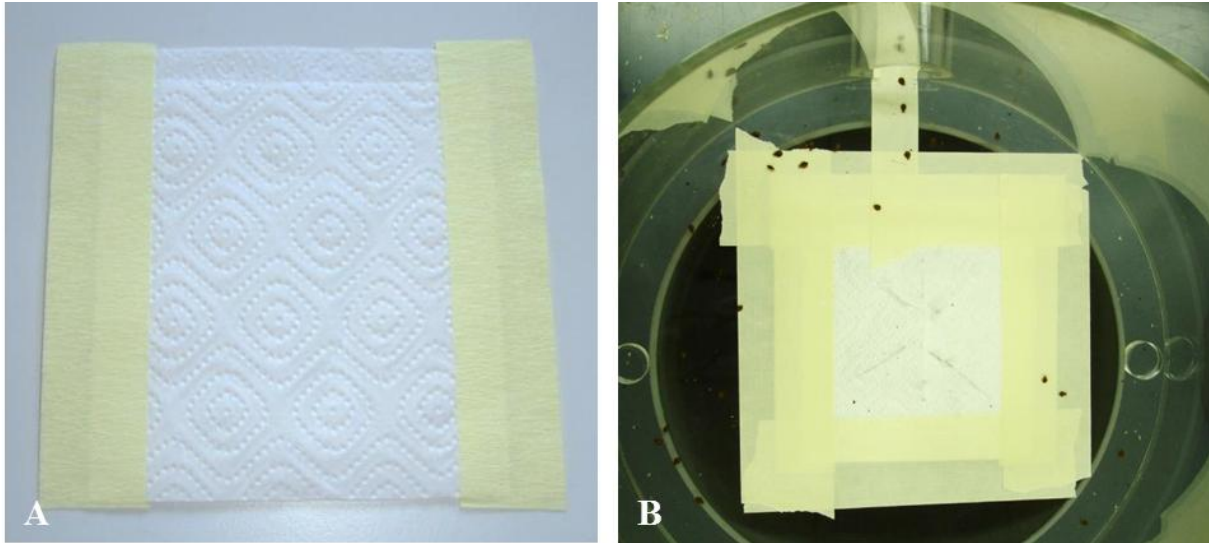


Abb. 12: Wanzentasche, Bettwanzenversteck im Wahlversuch. **A** geöffnet ohne Wanzen, **B** Behälter mit eingeklebter und sternförmig aufgeschnittener Wanzentasche sowie herausgelaufenen *Cimex lectularius*.

2.2.4.3 Prüfoberflächen

Für die Erprobung der neu integrierten Plexiglaskästen wurden Tapete und Teppich als flexible, sowie Sperrholz und laminiertes Holz (Hornitex[®]) als unflexible Materialien mit unterschiedlichen Sorptionseigenschaften und Oberflächenstrukturen verwendet. In einem UBA-internen Test mit Stubenfliegen wurden alle Materialien für Prüfoberflächen auf Insektizidfreiheit untersucht. Dafür wurden wirkstoff sensible *Musca domestica* unter Acrylglasgazingen (\varnothing 8 cm, Höhe: 2,7 cm) auf die zu prüfenden Oberflächen und als Kontrolle auf Glasplatten (je 13 cm x 13 cm) gekäfigt und die Mortalität 24 h p.a. bewertet. Lag der Mittelwert der Mortalität bei den Fliegen auf den zu prüfenden Oberflächen nicht mehr als 5 % über dem Mittelwert der Mortalität der Kontrolltiere, konnten die Oberflächen für die Versuche verwendet werden. In den Kästen mit Boden wurden mit Kontaktinsektizid behandelte Tapeten- und Teppichstreifen (19 cm x 9 cm) passgenau mit doppelseitigem Klebeband eingeklebt. Die unflexiblen Materialien Sperrholz und Hornitex[®] (19,5 cm x 10 cm) wurden hingegen mit vier Schraubzwingen als Boden unter dem Plexiglaskasten angebracht. Vorangegangene Versuche ergaben, dass die Versuchstiere in den Plexiglasröhren ausrutschten, umfielen und Schwierigkeiten hatten, sich wieder in die ventrale Position zu bringen. Aus diesem Grund wurde auf die jeweiligen Unterseiten der Verbindungsrohre Kreppband geklebt. Die letzten 1,5 cm vor dem Rohrende über dem Auffangbecken wurden absichtlich ausgespart, damit die Tiere leichter hineinfliegen.

2.2.4.4 Behandlung der Prüfoberflächen

Um die Funktion des neuen Kasten-Prüfsystems mit der des zuvor verwendeten Teströhren-Prüfsystems zu vergleichen, wurden die Prüfoberflächen jeweils mit den gleichen Insektiziden behandelt. Insektizid A enthielt Alphacypermethrin (Pyrethroid) und Insektizid B Bendiocarb (Carbamat) als Wirkstoff. Beide Mittel sind Kontaktinsektizide mit schneller Sofort- sowie einer länger anhaltenden Residualwirkung. Die Tauglichkeit der neuen Kästen der Wahlversuchsanlage sollte praxisnah getestet werden, zugleich sollten die Unterschiede in der Wirkung der Insektizide auf den verschiedenen Oberflächen klar erkennbar sein. Aus diesem Grund wurden die Insektizide nach Herstellerangaben für nicht sorptive Oberflächen mit Leitungswasser verdünnt. Normalerweise würde auf sorptiven Oberflächen die doppelte Menge ausgebracht werden. Die Insektizidlösungen wurden in ein Nasensprüngerät (Tröpfchengröße 50 µm bis 150 µm) gefüllt und mittels eines Kompressors (2 bar) gleichmäßig auf die Prüfoberflächen gebracht. Dafür wurden die Prüfoberflächen auf einer mit Filterpapier bespannten Spanplatte (50 cm x 50 cm) mit Klebwachs befestigt und in einem Abzug unter Einhaltung der Sicherheitsbestimmungen (Schutzkleidung und Gasmasken) eingesprüht. Die Prüfoberflächen wurden für eine Stunde an der Luft getrocknet und anschließend in die Versuchsanlagen eingesetzt. Pro Versuch wurden je drei Prüfoberflächen mit Insektizid behandelt, wovon eine direkt nach der Trocknung, und zwei weitere, zur Überprüfung der Residualwirkung der Insektizide, nach einer bzw. zwei Wochen Belagsalterung eingesetzt wurden. Bis zu ihrem Einsatz wurden diese Prüfoberflächen in Melaminschalen abgedeckt mit Filterpapier im Prüfraum gelagert. Jeder Versuch wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. So war der Zeitabstand zwischen Behandlung der Prüfoberflächen und Wirksamkeitsprüfung zur Überprüfung des Testsystems immer gleich.

2.2.4.5 Durchführung des Wahlversuchs

Zur Überprüfung des Testsystems unter Verwendung der neu entwickelten Prüfkästen wurden insgesamt acht Versuchskombinationen mit den Insektiziden A und B sowie den vier Prüfoberflächen (s. 2.2.4.3) getestet. Es konnten immer zwei Versuche gleichzeitig mit je einer flexiblen und unflexiblen Oberfläche, behandelt mit dem gleichen Insektizid, durchgeführt werden. Eine Stunde vor Versuchsbeginn wurden die Wanzentaschen eingeklebt und die Heizplatten eingeschaltet. Mussten für die Versuche Prüfoberflächen frisch mit Insektizid behandelt werden, erfolgte die Trocknung in dieser Stunde parallel. Anschließend wurden die Prüfoberflächen je nach Beschaffenheit mit der behandelten Seite nach oben entweder einge-

klebt oder mit den Schraubzwingen befestigt. Mit Hilfe des Gasdurchflussmessers wurde die für die maximale Laufrate der Bettwanzen optimale CO₂-Durchflussrate von 0,75 l/min eingestellt, welche aus den vorangegangenen Versuchen mit dem Teströhrensystem in Vorversuchen an das neue Kastensystem angepasst worden war. Zuletzt wurde die Ansaugpumpe eingeschaltet, der Raum abgedunkelt und die Wanzenaschen mit einer Schere sternförmig aufgeschnitten. Um die natürliche letale Schädigung der in den Versuch eingesetzten Tiere zu ermitteln, wurde parallel zum Wahlversuch eine Kontrolle mit Bettwanzen aus dem gleichen Zuchtansatz in eine Glaspetrischale (ø 9 cm) mit zwei Rundfiltern (ø 7 cm) als Versteck eingesetzt und in den Prüfraum gestellt. Sowohl in die Wanzenaschen der Versuchsanlagen als auch in die Petrischale wurden 100 Tiere im gleichen Geschlechterverhältnis eingesetzt. Nach 24 h wurden diejenigen Tiere, die sich außerhalb der Wanzenasche aufhielten als „gelaufen“ (mit Insektizid in Kontakt gekommen) gewertet.

Dazu wurden die Tiere, ihrem Aufenthaltsort in der Versuchsanlage entsprechend, in Petrischalen (ø 9 cm) mit zwei Rundfiltern (ø 7 cm) sortiert: Tiere in der Wanzenasche (nicht gelaufen), Wanzen im Behälter (gelaufen), Kasten und Becken (gelaufen). Zur Beurteilung des Prüfsystems wurden ausschließlich die gelaufenen Wanzen bis 7 d nach Expositionsbeginn, fünf bis sechs täglichen (samstags in einigen Fällen, sonntags nie) visuellen Wirksamkeitskontrollen unterzogen und die Eiablage dokumentiert. Dieser Nachbeobachtungszeitraum stützt sich auf die in den nach §18 Infektionsschutzgesetz (IfSG) durchgeführten UBA-Zwangsversuchen angewandten zeitlichen Kriterien. Der Schädigungsgrad der einzelnen Tiere wurde gemäß der in Tabelle 6 dargestellten Beurteilungskriterien festgelegt. Die Beurteilung der Tiere erfolgte durch Pinzettenreiz, visuell unter einem Binokular. Die jeweiligen Insektizide wurden im Sinne des § 18 IfSG mit der Zielsetzung der irreversiblen Schädigung (d. h. ausbleibende Wiedererholung bis zum Versuchsende) bei 100% der Tiere getestet. Bei einer Kontrollmortalität von über 5 % wurden die Ergebnisse mittels der Abbott-Formel korrigiert (ABBOTT 1925).

Um die Reproduzierbarkeit der verschiedenen Versuchskombinationen des neu entwickelten Prüfkastensystems des Wahlversuchs zu testen, wurde jeder Versuch an drei aufeinanderfolgenden Tagen wie oben beschrieben durchgeführt. Alle Versuchskombinationen wurden mit frisch eingesprühten, einer Woche gealterten und zwei Wochen gealterten, behandelten Oberflächen getestet. Ein kompletter Versuch lief dementsprechend über drei Wochen.

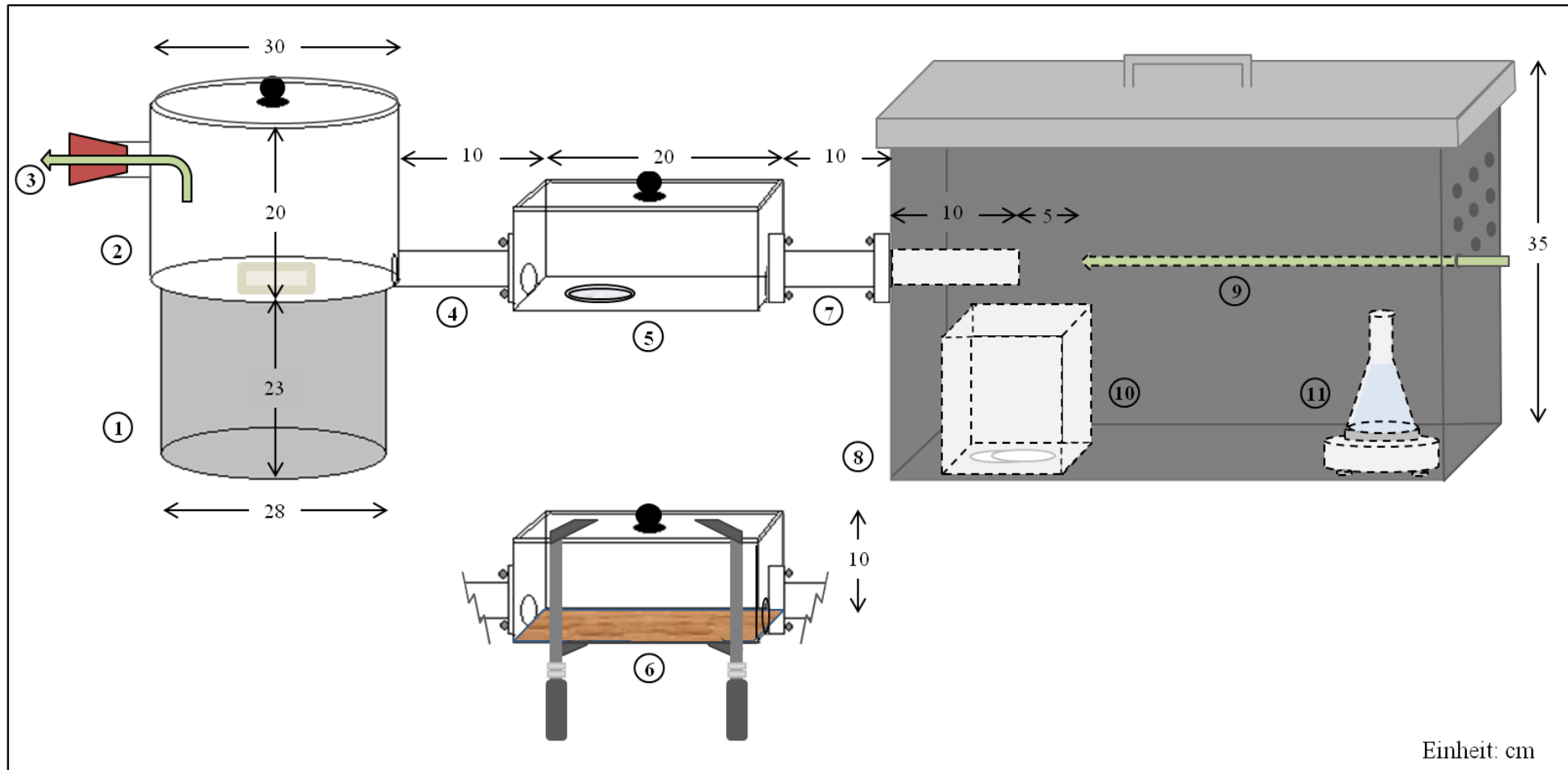


Abb. 13: Schematische Darstellung der Wahlversuchsanlage (Außenmaß; nicht maßstabsgetreu). **1** Sockel des Plexiglasbehälters, **2** Plexiglasbehälter mit Wanzen tasche, **3** Plexiglasrohr mit Stopfen und Absaugschlauch (ø 1 cm), **4** Plexiglasrohr ist fest mit dem Plexiglasbehälter und über Flanschverbindungen mit dem Plexiglaskasten verbunden, **5** Plexiglaskasten, Version mit Loch und Gaze für flexible Oberflächen (z.B. Tapete), durch Flanschschraubverbindungen mit dem Rohr des Plexiglasbehälters und dem Stahlbehälter verbunden, **6** Plexiglaskasten, Version ohne Boden mit Schraubzwingen für unflexible Oberflächen (Bsp. Holz), durch Flanschschraubverbindungen mit dem Rohr des Plexiglasbehälters und dem Stahlbehälter verbunden, **7** Plexiglasrohr, abnehmbar und durch eine Flanschschraubverbindung am Stahlbehälter befestigt, **8** Stahlbehälter mit Deckel und Belüftungsbohrungen (ø 0,1 cm), **9** Plastikschlauch für CO₂ Zufuhr (ø 0,5 cm), **10** Auffangbecken mit Rundfilterpapier, **11** Heizplatte mit Erlenmeyerkolben (500 ml).

Tab. 6: Beurteilungskriterien des Schädigungsgrads von *Cimex lectularius* in der Wirksamkeitskontrolle des Wahl- und Zwangsversuchs (UBA).

Schädigungsgrad	Abkürzung	Definition
vital	A	Völlig gesundes Erscheinungsbild, ohne motorische Beeinträchtigungen
leicht geschädigt	B	Unkoordinierte, taumelnde Bewegung, auch auf Pinzettenreiz
schwer geschädigt	C	Bewegung der Extremitäten, keine eigenständige Drehung von Rückenlage in Bauchlage
letale Schädigung	D	Keine äußeren Bewegungen, Darmperistaltik vorhanden
tot	E	Keine äußeren Bewegungen, keine Darmperistaltik vorhanden

2.2.5 Wahlversuch zur Untersuchung der Wirksamkeit von Insektizid A auf den AS-Feldstamm

In dem Wahlversuch sollte die Wirksamkeit eines Pyrethroids (Insektizid A) in der vom Hersteller empfohlenen Aufwandmenge unter praxisähnlichen Bedingungen an einem Pyrethroidtoleranten Bettwanzenstamm aus einer Befallsstelle getestet werden. Dazu wurde der AS-Feldstamm verwendet, da er im Filterkontaktbiotest den höchsten R_i aufwies.

Das Kontaktinsektizid A (s. 2.2.4.4) wurde auf der Prüfoberfläche Tapete ausgebracht. Die einzelnen Versuche wurden wie unter 2.2.4.5 beschrieben in der Versuchsanlage mit dem Prüfkastensystem für flexible Oberflächen durchgeführt.

2.2.6 UBA-Zwangsversuch zur Untersuchung der Wirksamkeit von Insektizid A gegen den AS-Feldstamm

Die praxisrelevante Prüfung auf Wirksamkeit von Kontaktinsektiziden gegen die Bettwanze *C. lectularius* wird im FG IV 1.4 des UBA üblicherweise in einem Zwangsversuch durchgeführt (UBA-Zwangsversuch). Bei dieser Methode haben Bettwanzen einen zeitlich definierten Zwangskontakt mit mit Insektizid behandelten Oberflächen. Im Vergleich zum Wahlversuch sollte auch die Aussagekraft des UBA-Zwangsversuchs im Hinblick auf die Wirkung des pyrethroiden Insektizids A auf den AS-Feldstamm auf Tapete getestet werden.

Anders als im Wahlversuch lag das Tapetenstück (10 cm x 10 cm) hier in Petrischalen (Ø 14 cm). Diese wurden auf zwei Einmal-Reagenzreservoirs aus Kunststoff gestellt, die sich in Melaminschalen (35 cm x 25 cm x 4 cm) befanden. Die Flucht der Wanzen aus dem Versuchssystem wurde dadurch verhindert, dass die Melaminschalen ca. 1 cm hoch mit einer Wasser-Spülmittel-Lösung gefüllt wurden. Damit die Tiere die Oberflächen nicht verlassen konnten, wurde pro Ansatz ein Glasring (Ø 8 cm x 2 cm) auf die Tapetenstücke gestellt (Abb.

14). Für die Versuche wurden je sechs männliche und sechs weibliche *C. lectularius* mit einer Federstahlpinzette in Rollrand-Gläser überführt und dann mittig auf die Tapete gekippt. Obwohl Bettwanzen an Glas nur selten hochklettern können, wurden die Glasringe mit Deckeln von Petrischalen (\varnothing 9 cm) verschlossen.

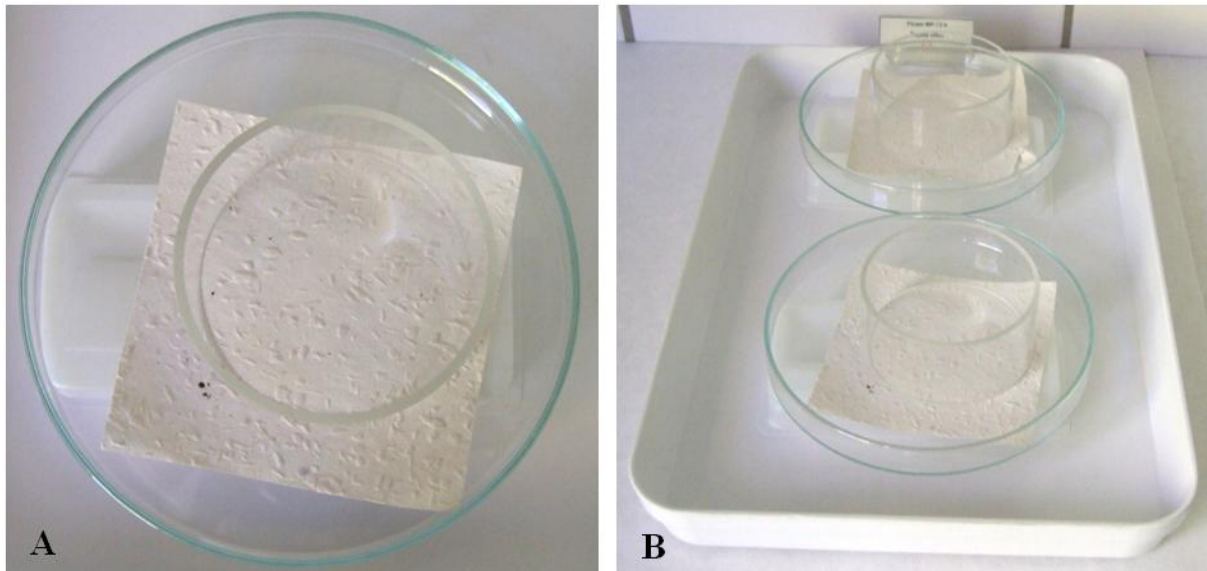


Abb. 14: Versuchsaufbau des UBA-Zwangversuchs. **A** In eine Petrischale (\varnothing 14 cm) hineingelegtes Tapetenstück (10 cm x 10 cm) als Prüfoberfläche. Die Petrischale wurde auf ein Einmal-Reagenzreservoir aus Kunststoff gestellt, welches sich in einer Melaminschale (35 cm x 25 cm x 4 cm) befand. Der Glasring (\varnothing 8 cm; hier ohne Petrischalendeckel) auf der Tapete verhinderte, dass die Wanzen die Oberfläche verließen. **B** Doppelansatz der in A beschrieben für den UBA-Zwangversuch vorbereitete Petrischalen.

Da es sich beim AS-Stamm um einen Feldstamm mit erhöhtem R_i handelte, wurden Einwirkzeiten von 2 h, 4 h und 24 h Dauerkontakt gewählt. Für die Reproduzierbarkeit wurden pro Einwirkzeit drei parallele Versuche durchgeführt. Als Kontrolle wurde die gleiche Anzahl Bettwanzen in drei Replikaten für 24 h auf mit Leitungswasser behandelte Tapetenstücke gesetzt.

Die Tapetenstücke wurden wie in Punkt 2.2.4.4 beschrieben behandelt und getrocknet. Äquivalent zum Wahlversuch wurde auch im UBA-Zwangversuch die Residualwirkung des Insektizids A auf den AS-Stamm überprüft. Die Bettwanzen wurden wie in Tabelle 6 beschrieben beurteilt und die Eiablage dokumentiert. Bei einer Kontrollmortalität von über 5 % wurden die Ergebnisse mittels der Abbott-Formel korrigiert (ABBOTT 1925).

2.2.7 Erprobung einer Blutfütterungsanlage für die Massenzucht von *C. lectularius*

Im Sinne des Tierschutzes wurde als potentielle Alternative zu der Fütterung der Bettwanzen am Kaninchen ein System zur artifiziellen Blutfütterung geprüft.

2.2.7.1 Versuchsaufbau

Alle Versuche zur artifiziellen Blutfütterung wurden mit einer von der Firma Eurofins entwickelten und im Rahmen dieser Doktorarbeit angepassten Fütterungsanlage durchgeführt (Abb. 15 und 16). Das Zentrum der Fütterungsanlage bildeten vier mundgeblasene, speziell für diesen Versuch angefertigte Glaszylinder, welche über Hochtemperatur-Rohrschellen mit Gummieinlage an einem spezialangefertigten Gestell befestigt wurden. Durch die Verlängerung der Seitenwände über den geschlossenen Zylinder hinaus befand sich am oberen Ende eine Vertiefung, in welche das Blut durch eine vom Wasser umgebene Röhre im Inneren des Zylinders von unten nach oben hineingepresst werden konnte. Das Blut wurde durch Spritzen (10 ml) über periphere Venenkatheter mit Schlauch in das System gefüllt. Dazu wurden die Kanülen des Venenkatheters mit kleinen Stopfen versehen und in die dafür vorgesehene untere Öffnung jeder Fütterungseinheit gesteckt.

Die Temperatur des Blutes wurde während der Fütterung auf 37 °C gehalten, indem erwärmtes Wasser (41 °C) durch das System geleitet wurde. Zu diesem Zweck hatten die Fütterungseinheiten einen unteren Zu- und auf der gegenüberliegenden Seite einen oberen Ablauf. Die vier Kolben waren darüber mit Naturkautschukschläuchen (ø 0,5 cm, innen) miteinander verbunden, durch das mit Hilfe eines Wärmethermostats mit Pumpfunktion das Wasser im System erwärmt und ständig umgewälzt wurde.

2.2.7.2 Artificielle Fütterung an der Blutfütterungsanlage

Vor Versuchsbeginn wurde in das Wasserreservoir des Wärmethermostats mit integrierter Pumpe destilliertes Wasser gefüllt und die Stopfen mit den Kanülen der peripheren Venenkatheter mit Schlauch in die unteren Öffnungen der Fütterungseinheiten gesteckt. Über dieses Spritzen-Katheter-Schlauch-System wurde die Vertiefung des Glaskolbens bis zum Rand mit Blut gefüllt. Das Blut in der Vertiefung wurde mit doppelt gedehntem Parafilm abgedeckt und mit einem breiten Gummiband verschlossen. Das Wärmethermostat wurde auf eine Temperatur von 41 °C eingestellt, wodurch eine Bluttemperatur von 37 °C – 38 °C gehalten werden konnte. Die Bettwanzen wurden in den gleichen mit Gaze und Gummi verschlossenen Wanzengläsern, wie bei der Fütterung am Kaninchen beschrieben (2.1.1.1), gefüttert.



Abb. 15: Aufbau der Blutfütterungsanlage. **A** Holzsockel mit Halterungen und Fütterungseinheiten (leer), daran angeschlossen das Wärmethermostat mit Pumpfunktion im Transparentbad, **B** Befüllen einer Fütterungseinheit mittels Spritzen-Katheter-Schlauch-System, **C** Abdeckung der befüllten Vertiefung mit doppelt gedehntem Parafilm und einem breiten Gummiband, **D** mit Gaze verschlossene Wanzengläser auf die Membranen gesetzt.

Dafür wurden die Wanzengläser beschriftet und mit einer Analysenwaage gewogen. Nach Einzählung der Tiere wurden die Gläser erneut gewogen. Danach wurden die Gläser ohne weitere Fixierung vorsichtig kopfüber auf die Membranen aufgesetzt. Die Fütterungsdauer betrug wenigstens 15 min und höchstens 30 min. Vorversuche hatten gezeigt, dass eine längere Fütterungszeit die Menge des aufgenommenen Blutes nicht erhöhte. Die aufgenommenen Blutmengen in Gramm, sowie der prozentuale Anteil an vollgesogenen Tieren wurden bei jeder Fütterung dokumentiert. Eine Bettwanze galt als vollgesogen, wenn sie augenscheinlich ihre maximale Körperdehnung erreicht hatte. Die Blutfütterungsanlage wurde ausschließlich mit dem wirkstoffsensiblen UBA-Stamm getestet. Die Bettwanzen wurden wie unter 2.1.1.1 beschrieben gehalten.

2.2.7.3 Bestimmung der Saugraten bei Fütterung am Kaninchen

Zur Evaluation der Attraktivität und Verträglichkeit verschiedener Blutsorten war es zunächst nötig, die Saugraten der am Kaninchen gefütterten Tiere zu ermitteln. Dafür wurden je 100

Tiere der Bettwanzenstadien Juvenile 1 bis 5, sowie Adulte am Kaninchen gefüttert. Adulte Tiere wurden im gleichen Geschlechterverhältnis eingesetzt. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde jeder Fütterungsversuch zehnmal wiederholt und somit eine Gesamtzahl von 1000 Wanzen pro Stadium gefüttert. Die Bettwanzen wurden, wie in der Zucht des UBA üblich, sieben Tage nach ihrer letzten Blutmahlzeit wie unter Punkt 2.1.1.1 beschrieben am Kaninchen gefüttert. Die Vorbereitung der Wanzengläschen sowie die Wägungen und die Dokumentation wurden entsprechend der artifiziellen Blutfütterung (s. 2.2.7.2) durchgeführt.

2.2.7.4 Attraktivität verschiedener Blutsorten

In wiederholten Versuchen wurde evaluiert, welche Blutsorte im Vergleich zur Blutfütterung am Kaninchen reproduzierbar ähnliche Saugraten hervorbringen würde. Dafür wurden pro Fütterung 100 adulte *C. lectularius* mit sechs Fütterungen im gleichen Geschlechterverhältnis artifiziell an defibriniertem Rinderblut ($n = 8$), Schweineblut ($n = 5$) und Schafsblut ($n = 9$) wie in Punkt 2.2.7.4 beschrieben gefüttert, und die Saugraten mit denen aus den Fütterungen am Kaninchen ($n = 10$) verglichen.

Ein großes Problem war, dass sich während des gesamten Untersuchungszeitraums die Lieferungen des defibrinierten Schweinebluts wiederholt um ein bis zwei Tage verzögerten. Dadurch war die Kühlung zu lange unterbrochen, und das Blut wurde aufgrund dieser unsachgemäßen Lagerung mit unterschiedlicher Qualität geliefert. Überwiegend konnte kein offensichtlicher Unterschied zwischen dem verzögert gelieferten und dem pünktlich gelieferten und somit ausreichend gekühltem Blut festgestellt werden. In Einzelfällen wurde jedoch stark faulig riechendes und violett-schwarz verfärbtes Schweineblut geliefert. Bei Letzterem waren Abweichungen in den Saugraten durch verminderte Attraktivität und Verträglichkeit des Blutes wahrscheinlich, was in $n = 6$ Ansätzen überprüft wurde.

Da das offensichtlich verdorbene Schweineblut die für Bettwanzen mit Abstand unattraktivste Blutsorte war, wurde es in den folgenden Zuchtversuchen (2.2.7.5) verworfen und die Fütterung ausgesetzt. In Ermangelung einer anderen Schweineblutquelle musste das unsachgemäß gelagerte Schweineblut, bei welchem kein offensichtlicher Qualitätsverlust festgestellt werden konnte verwendet werden.

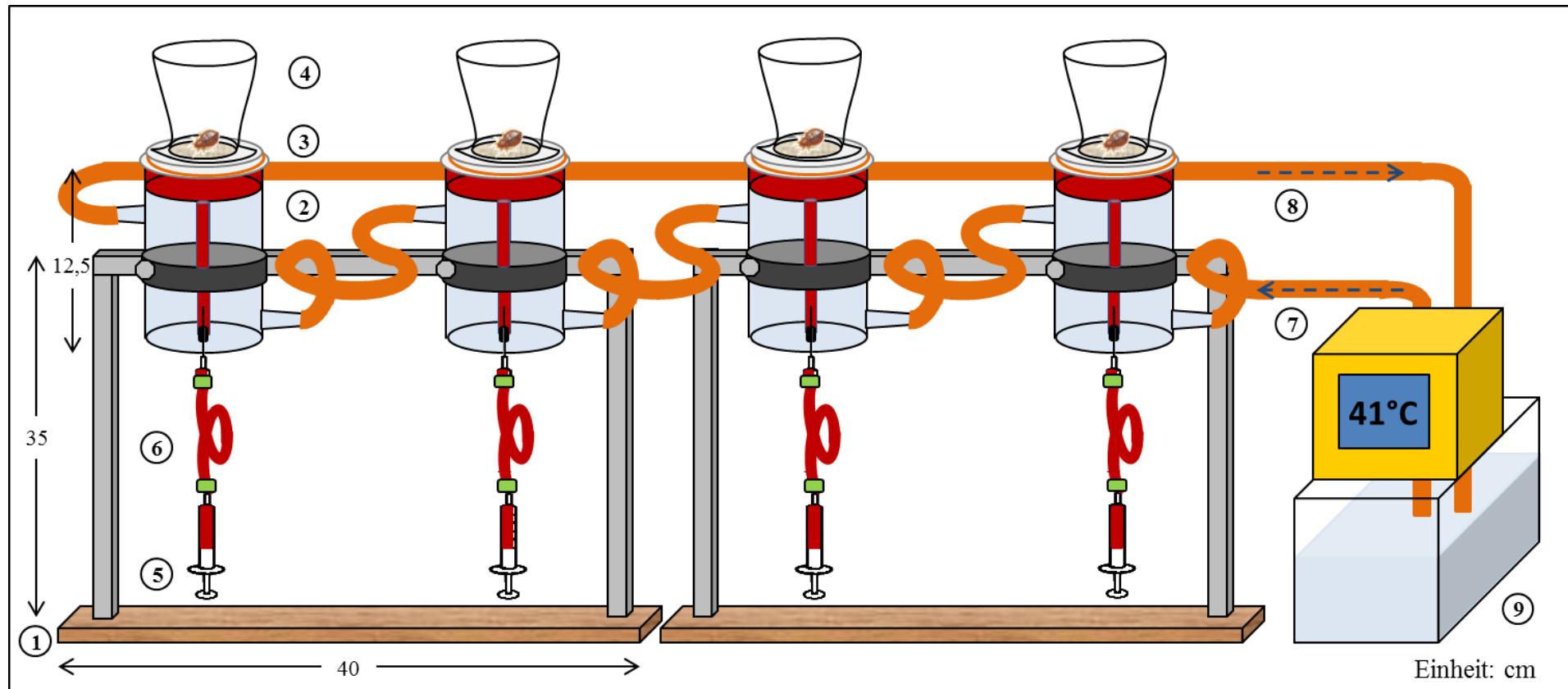


Abb. 16: Schematische Darstellung der Blutfütterungsanlage (nicht maßstabsgetreu) **1** Holzsockel mit Halterungen für die Fütterungseinheiten, **2** Fütterungseinheit (innen \varnothing 5,1 cm) aus Glas; abnehmbar, über einen Naturkautschukschlauch mit einer weiteren Fütterungseinheit verbunden, **3** Parafilm als Membran über der Fütterungseinheit, befestigt mit einem breiten Haushaltsgummi (\varnothing 5 cm), **4** Erlenmeyerkolben (Spezialanfertigung zur Wanzenfütterung), mit Gaze und einem dünnen Haushaltsgummi abgedeckt, **5** Spritze (10 ml), **6** Peripherer Venenkatheter mit Schlauch, über einen Stopfen mit der Fütterungseinheit verbunden, **7** Naturkautschukschlauch verbunden mit der Pumpe, Wasserzufluss (innen \varnothing 0,5 cm), **8** Naturkautschukschlauch verbunden mit dem Wassertank, Wasserabfluss (innen \varnothing 0,5 cm), **9** Wärmethermostat mit Pumpfunktion im Transparentbad, 41 °C Wassertemperatur.

2.2.7.5 Zuchtversuch mittels artifizieller Fütterung

Zum Vergleich der beiden Fütterungsmethoden wurden je eine Bettwanzengeneration artifiziell (s. 2.2.7.2) mit defibriniertem Rinderblut (acht Replikate) und eine Generation konventionell am Kaninchen (sieben Replikate, mit je 50 Männchen und 50 Weibchen) (s. 2.1.1.1) gefüttert. Anschließend wurden drei weitere Versuchsansätze ohne definierte Anfangstierzahlen ebenfalls artifiziell gefüttert (s. 2.2.7.2). In diesen Versuchsansätzen wurden die Adulten nicht ausgezählt, sondern eine komplette Zuchtpetrischale, wie normalerweise bei der Fütterung am Kaninchen üblich, eingesetzt. Von diesen Versuchsansätzen wurden zwei mit Schweineblut (je sechs Replikate) und eine mit Schafsblut (drei Replikate) gefüttert. Die Umstellung der *C. lectularius* dieser Versuchsansätze auf Membranfütterung erfolgte in allen Versuchsansätzen sieben Tage nach der sechsten Blutmahlzeit am Kaninchen.

2.2.8 Deutschlandweite Umfrage zur Erfassung der aktuellen Bettwanzensituation

Der „Fragenkatalog zur aktuellen Bettwanzensituation in Deutschland“ (s. Anhang 8.9, Abb. 70) wurde als bearbeitbare Worddatei 329 Schädlingsbekämpfungsunternehmen aus allen Bundesländern in den Jahren 2011 bis 2013 per e-Mail zugesendet. Im Jahr 2014 wurde er als Download auf der Internet Seite des Deutschen Schädlingsbekämpferverbands (DSV) angeboten. Die Antworten wurden per Mail oder als Fax zurückgesendet und dokumentiert. Im ersten Teil des Fragebogens sollten die Schädlingsbekämpfer die Anzahl der durchgeführten Bekämpfungen pro Jahr in privaten Haushalten, gewerblichen Einrichtungen (z.B. Hotels, Restaurants, öffentliche Verkehrsmittel) und medizinischen Einrichtungen (z.B. Krankenhäuser, Altersheime) angeben. Zudem wurde abgefragt, wie viele Behandlungen im Durchschnitt pro Bekämpfung durchgeführt werden mussten, damit der Befall als getilgt galt. Im zweiten Teil konnten Schädlingsbekämpfer angeben, welche Wirkstoffe, Insektizide oder Verfahren sie zur Bettwanzenbekämpfung üblicherweise verwendet haben und ob bei diesen Anwendungen ein Verdacht auf Resistenz bestand.

2.2.9 Statistische Auswertung

Sämtliche statistischen Auswertungen des 24-Well-Filterkontakt-Biotests, der Pyrosequenzierung, der Echtzeit-PCR sowie der Blutfütterung wurden mit dem Programm Graphpad Prism Version 6.05 durchgeführt. In den Grafiken wurden signifikante Unterschiede innerhalb der Ergebnisse durch einen Asterisken gekennzeichnet (*).

2.2.9.1 24-Well-Filterkontakt-Biotest

Bei der Konzentrations-Wirkungs-Analyse wurden mittels logistischer Regression (Logit-Analyse) die aus der normalisierten und logarithmierten prozentualen letalen Schädigung der Feldstämme sowie des sensiblen UBA-Stamms resultierenden EC_{50} und Hill-Steigungen der Regressionskurven (HS = Hill Slope) mit dem F-Test zum Vergleich von Modellen ausgewertet. Bei diesem Test wurden zwei Regressionsmodelle miteinander verglichen und geprüft, ob die Unterschiede zwischen einem restringierten (Test ohne die Variablen, die durch die Nullhypothese H_0 : EC_{50} bzw. HS sind für die jeweils miteinander verglichenen Datensätze gleich, restringiert wurden) und unrestringierten Modell (keine Restriktionen, Alternativhypothese H_1 : EC_{50} bzw. HS sind für die jeweils miteinander verglichenen Datensätze verschieden) signifikant waren (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$). Die p-Werte wurden mittels Bonferroni-Holm-Prozedur korrigiert. Mittels Division der EC_{50} der Feldstämme durch die EC_{50} des sensiblen Stamms, konnte der Resistenzindex (R_i) als Maßeinheit für Resistenz innerhalb eines Stamms berechnet werden. Die maximalen prozentualen Anteile letal geschädigter *C. lectularius* bei $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ wurden mit einer nicht-parametrischen, ungepaarten Kruskal-Wallis-Rangvarianzanalyse und dem Dunn-Post-hoc-Test auf signifikante Unterschiede ($\alpha = 0,05$) zum UBA-Referenzstamm geprüft.

2.2.9.2 Pyrosequenzierung

Zur Bestimmung der Messabweichungen des Geräts bei der Quantifizierung der Sequenzen mit den beiden potentiellen SNPs wurde die Korrelation der erwarteten und gemessenen Werte mittels linearer Regression bestimmt und der Determinationskoeffizient (r^2), sowie der Korrelationskoeffizient (r) berechnet.

Die Allelfrequenzen der Feldstämme und des UBA-Stamms wurden mit einer parametrischen einfraktionellen Varianzanalyse (One-Way ANOVA) auf signifikante Mittelwertunterschiede untersucht ($\alpha = 0,05$). Als post-hoc-Test wurde der Dunnett-Test verwendet und alle Mittelwerte der Allelfrequenzen der Feldstämme mit dem Mittelwert des UBA-Stamms verglichen.

Die Ergebnisse der Pyrosequenzierung der Proben SK und SKA wurden mit multiplen t-Tests auf signifikante Mittelwertunterschiede untersucht und die resultierenden p-Werte mittels Sidak-Bonferroni-Prozedur korrigiert.

Mittels Pyrosequenzierung wurden zudem Individuen der Stämme LB, HO, SK; OB; AS und CC genotypisiert und die Allelverteilung auf das Vorliegen eines Hardy-Weinberg-Gleichgewichts mit der freien Statistiksoftware R (Package „Hardy-Weinberg“; R Version

3.1.3) untersucht. Dabei wurde insbesondere der „likelihood ratio“ Test verwendet, wie von ENGELS (2009) empfohlen.

2.2.9.3 Echtzeit-PCR

Die Eignung der drei verwendeten Referenzgene *rpl8*, *rpl11* und *rps16* wurde mit dem Excel-basierten Datenerfassungstool BestKeeper mittels wiederholter paarweiser Korrelationen überprüft. Das Programm empfiehlt den Ausschluss eines Referenzgens, falls die Standardabweichung der C_q-Werte (SD [\pm C_q]) über dem Wert 1 liegt (PFAFFL et al. 2004). Die Ergebnisse der einzelnen Analyseläufe wurden zusammengefasst und konnten direkt mit der CFX Manager Software des CFX96™ Echtzeit-PCR Systems ausgewertet werden. Mit den gemessenen C_q-Werten der Zielgene, der Referenzgene und des Kalibrators war es möglich, die normalisierte relative Expression der mRNA von den untersuchten CYP-Genen zu berechnen. Diese sogenannte relative Quantifizierung geschah unter Berücksichtigung der genspezifischen PCR-Effizienzen sowie der Verwendung von drei Referenzgenen. Zudem normalisiert die Software die relativen Quantitäten der gesamten Zielgene mit der Quantität des Kalibrators (das Verhältnis der Expression der mRNA von Zielgenen zu Referenzgenen ist im Kalibrator gleich 1). Dadurch konnte das Transkriptverhältnis der mRNA der Zielgene zum geometrischen Mittel mehrerer Referenzgene bestimmt werden. Die resultierenden mRNA-Expressionslevel der vier CYP-Gene aus den einzelnen Feldstämmen und des UBA-Stamms wurden mit einer nicht-parametrischen ungepaarten Kruskal-Wallis-Rangvarianzanalyse und dem Dunn-Post-hoc-Test auf signifikante Unterschiede ($\alpha = 0,05$) relativ zum sensiblen UBA-Stamm untersucht.

2.2.9.4 Wahlversuche und UBA-Zwangversuche

Die Einflüsse der erklärenden (unabhängigen) Variablen Stamm, Geschlecht, Insektizid, Prüfoberfläche, Belagsalterung der Prüfoberflächen, Tag der Wirksamkeitskontrolle und Einwirkzeit auf die (abhängige) Zielvariable schwere Schädigung von *C. lectularius* wurden mittels binärer logistischer Regression mit der freien Statistiksoftware R (Version 3.1.3) untersucht. Die statistische Absicherung erfolgte über den Wald-Test, der bei Variablen mit nur zwei Ausprägungen dem t-Test äquivalent ist ($\alpha = 0,05$). Verschiedene logistische Regressionsmodelle wurden mit dem „likelihood ratio“ Test verglichen. Zur Auswahl eines passenden Modells wurde Akaikes Informationskriterium (AIC) verwendet, welches die Güte der Anpassung des Modells an die vorliegenden Daten beschreibt. Als Maß für die Stärke des Zusammenhangs der erklärenden Variablen und der Zielvariablen wurde der Effektkoeffizient

(„odds ratio“, OR) berechnet. Dabei erhöhen sich die Chancen auf schwere Schädigung der Bettwanzen für die getestete Variable, wenn das $OR > 1$ ist und verringern sich, wenn der $OR < 1$ ist. Bei $OR = 1$ sind die Chancen (odds) für beide Variablen gleich. Als Maß für die Genauigkeit der Schätzung innerhalb des Modells wurden die 95 % Konfidenzintervalle (KI) angegeben. Zusätzlich wurden mögliche Zusammenhänge innerhalb der Wahl- und Zwangsversuche mit der mid-p-Variante des Exakten Vierfeldertafeltests nach Fisher mit der freien Online-Statistiksoftware OpenEpi Version 3.03 berechnet ($\alpha = 0,05$). Die resultierenden mid-p-Werte wurden mittels Bonferroni-Holm-Prozedur korrigiert.

2.2.9.5 Blutfütterung

Die Anzahl gesogener *C. lectularius* sowie die aufgenommenen Blutmengen der einzelnen Bettwanzenstadien bei der konventionellen Fütterung am Kaninchen und der artifiziellen Kaninchenblutfütterung wurden mit multiplen t-Tests (ungepaart; $\alpha = 0,05$) auf signifikante Unterschiede untersucht und die Ergebnisse mittels Bonferroni-Holm-Prozedur korrigiert.

Zur Evaluation der Attraktivität verschiedener Blutsorten wurden die Mittelwerte aus der Anzahl gesogener Tiere und der aufgenommenen Blutmenge bei der artifiziellen Fütterung mit den entsprechenden Mittelwerten der Fütterung am Kaninchen mittels parametrischer einfraktioneller Varianzanalyse (One-Way ANOVA) und dem Dunnett Post-hoc-Test auf signifikante Unterschiede ($\alpha = 0,05$) untersucht.

Die Ergebnisse des Zuchtversuchs mittels artifizieller Blutfütterung mit definierten Anfangstierzahlen wurden mit derselben Methode untersucht. Die Tierzahlen bei der ersten und der letzten Fütterung innerhalb eines Stamms wurden mittels gepaarten t-Test auf signifikante Unterschiede überprüft und die p-Werte mittels Bonferroni-Holm-Prozedur korrigiert.

3 Ergebnisse

3.1 Suszeptibilität von *C. lectularius* gegenüber Deltamethrin

Mit dem 24-Well-Filterkontakt-Biotest wurde die Suszeptibilität der fünf Bettwanzenfeldstämme mit Zuchterfolg gegenüber dem pyrethroiden Wirkstoff Deltamethrin mit der des sensiblen UBA-Stamms verglichen. Die Kontrollmortalität lag in allen Versuchen unter 5 %, weshalb keine weiteren Korrekturen vorgenommen werden mussten. Die Ergebnisse dieser Biotests zeigten, dass von den fünf untersuchten Feldstämmen der AS-Stamm mit einem $R_i = 20,6$ die niedrigste Suszeptibilität gegenüber dem Wirkstoff Deltamethrin aufwies.

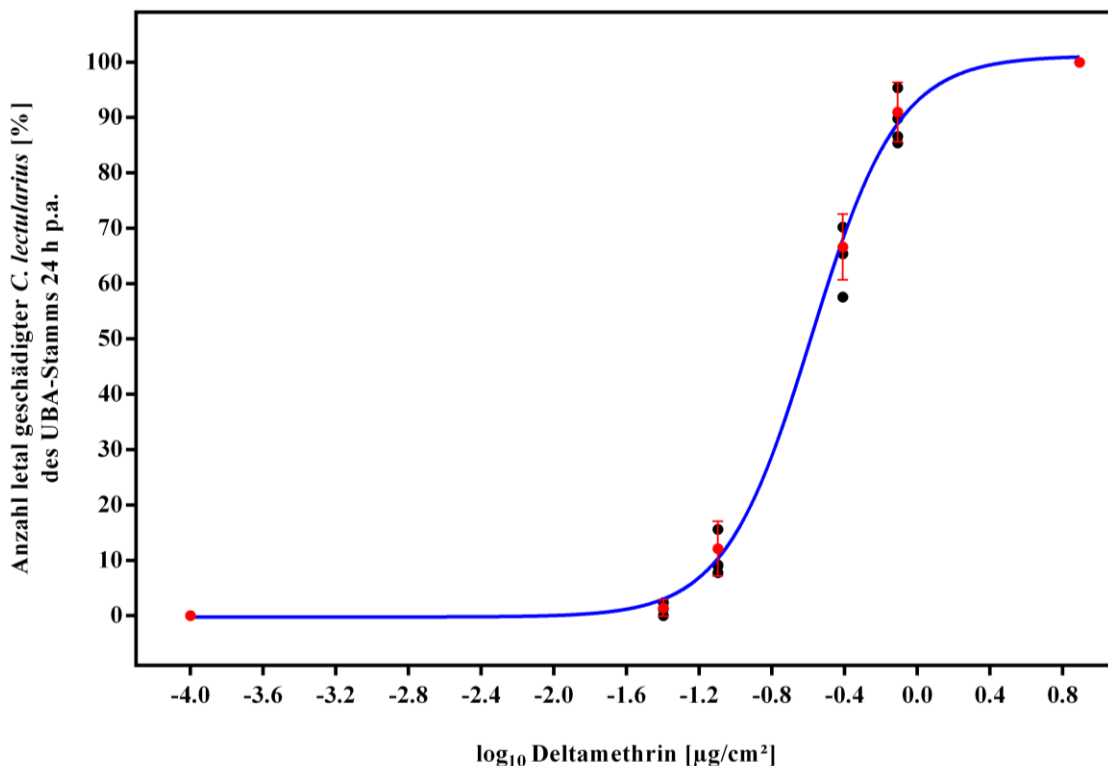


Abb. 17: Konzentrations-Wirkungs-Kurve des Effekts von Deltamethrin ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) auf die letale Schädigung (%) von *Cimex lectularius* des sensiblen UBA-Stamms aus den 24-Well-Filterkontakt-Biotests. Mittels logistischer Regression (Logit-Analyse; blau) wurden die aus der logarithmierten prozentualen letalen Schädigungen des sensiblen UBA-Stamms resultierenden EC_{50} , Hill-Steigungen und maximalen prozentualen Anteile der Regressionskurven mit dem F-Test zum Vergleich von Modellen ausgewertet. Die durch diesen F-Test geprüfte Hypothese H_0 : eine Regressionskurve für die einzelnen Datensätze wurde angenommen ($p = 0,4463$) und sämtliche Datensätze des UBA-Stamms ($n = 24$) konnten zusammengefasst werden. Die Mittelwerte mit Standardabweichung aus allen Biotests des UBA-Stamms als Referenzstamm gegenüber den fünf Feldstämmen mit erfolgreicher Aufzucht sind in rot dargestellt, die einzelnen Mittelwerte des UBA-Stamms aus den jeweiligen Versuchen gegen einen der fünf Feldstämme in schwarz.

Für die Berechnung der Resistenzindizes (R_i) wurde zunächst mit dem F-Test die Möglichkeit überprüft, alle als Referenzstamm erhaltenen Datensätze ($n=24$) in einer Kurve abzubilden, um diese bei der statistischen Auswertung der Suszeptibilität der Feldstämme zusammengefasst als Referenzwerte mit den Werten der Feldstämme vergleichen zu können. Die Regressionskurve zeigt (Abb. 17), dass H_0 angenommen wurde ($p = 0,4463$) und die Anzahl letal geschädigter *C. lectularius* (%) des UBA-Stamms aus allen 24-Well-Filterkontakt-Biotests über den einzelnen Deltamethrin-Konzentrationen ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) gemeinsam dargestellt werden konnten ($r^2 = 0,95$).

Bei der weiteren statistischen Auswertung des 24-Well-Filterkontakt-Biotests wurden sämtliche Datensätze der fünf Feldstämme (je $n = 5$) mit dem zusammengefassten Datensatz des UBA-Stamms ($n = 24$) verglichen.

Tab. 7: Vergleich der mittleren effektiven Konzentrationen und der Hill-Steigungen der Regressionskurven aus den 24-Well-Filterkontakt-Biotests ($n = 90$ Männchen) zwischen dem sensiblen UBA-Stamm und den fünf Feldstämmen mit Zuchterfolg.

Stamm	EC ₅₀ [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	EC ₅₀ 95% KI	R _i	HS	HS 95% KI	r ²
UBA	0,257	0,232 - 0,284	-	1,895	1,627 - 2,163	0,9499
SK	1,844	1,297 - 2,621	7,2	0,942	0,695 - 1,188	0,8799
OB	2,802	2,280 - 3,444	10,9	0,995	0,843 - 1,146	0,9500
HO	1,252	0,815 - 1,923	4,9	1,364	0,702 - 2,027	0,8475
LB	1,104	0,914 - 1,333	4,3	1,265	0,986 - 1,545	0,9634
AS	5,283	4,242 - 6,580	20,6	1,060	0,828 - 1,292	0,9156

Erläuterungen: EC₅₀: mittlere effektive Konzentration; EC₅₀ 95 % KI: Konfidenzintervall der mittleren effektiven Konzentration; R_i: Resistenzindex; HS: Hill-Steigung einer Regressionskurve; HS 95 % KI: Konfidenzintervall der Hill-Steigung einer Regressionskurve R²: Determinationskoeffizient.

Die Auswertung der Suszeptibilität der Feldstämme erfolgte ebenfalls mittels Logit-Analyse, bei welcher die aus der normalisierten und logarithmierten prozentualen letalen Schädigung der Feldstämme sowie des sensiblen UBA-Stamms resultierenden EC₅₀ und Hill-Steigungen (HS) der Regressionskurven mit dem F-Test zum Vergleich von Modellen ausgewertet wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 und Tabelle 7 dargestellt. Hierbei zeigt sich, dass der EC₅₀-Wert für Deltamethrin beim UBA-Stamm mit $0,257 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ am niedrigsten und beim AS-Stamm mit $5,283 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ am höchsten war. Die EC₅₀-Werte für Deltamethrin der Feldstämme LB, HO, OB und SK lagen mit jeweils $1,104 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $1,252 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $2,802 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ bzw. $1,844 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ dazwischen. Die jeweiligen Konfidenzintervalle (95 %)

können Tabelle 7 entnommen werden. Im F-Test mit H_0 : Die EC_{50} ist für alle Datensätze gleich und H_1 : Die EC_{50} ist für den jeweiligen Datensatz unterschiedlich zum UBA-Referenzstamm und anschließender Bonferroni-Holm-Korrektur der p-Werte ergab sich, dass H_0 abgelehnt wurde und somit die Unterschiede in den EC_{50} -Werten für Deltamethrin zwischen dem UBA-Stamm und den fünf Feldstämmen mit $p < 0,0005$ (für alle Feldstämme) statistisch hoch signifikant waren. Die R_i der fünf Feldstämme lagen zwischen $R_i = 4,3$ für den LB-Stamm und $R_i = 20,6$ für den AS-Stamm. Die R_i der Feldstämme lagen mit $R_i = 4,9$ für HO, $R_i = 7,2$ für SK und $R_i = 10,9$ für OB dazwischen.

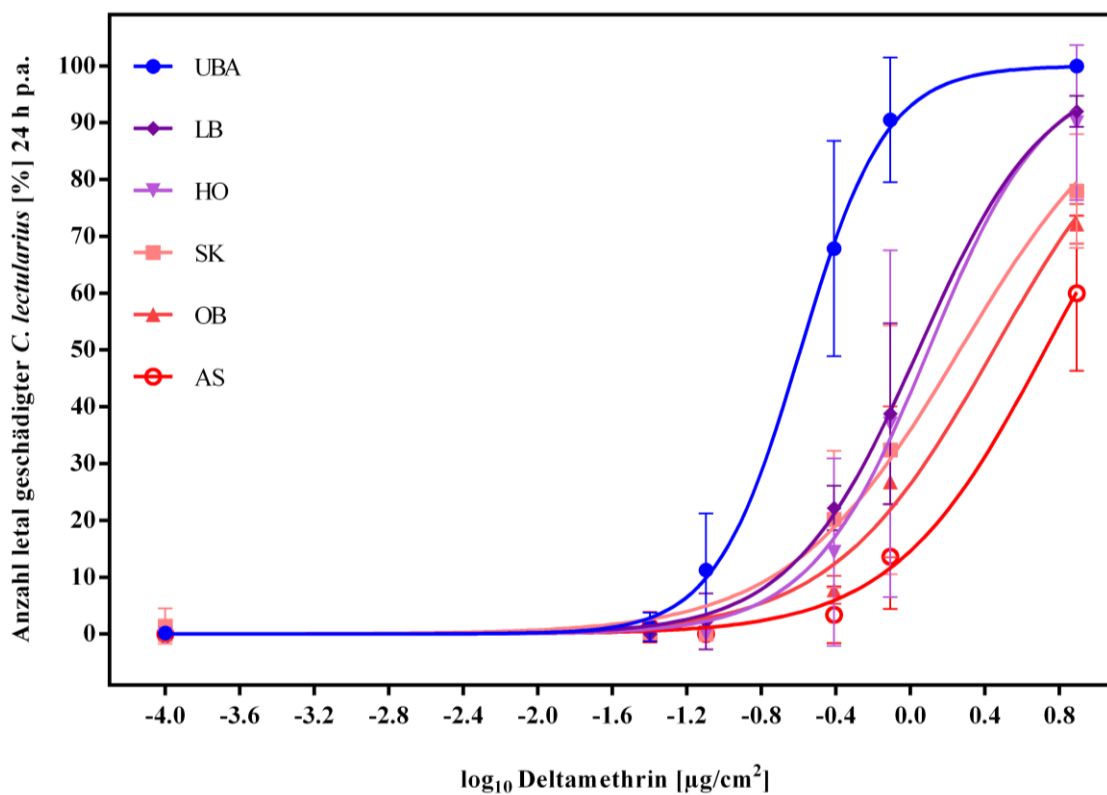


Abb. 18: Konzentrations-Wirkungs-Kurven des Effekts von Deltamethrin ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) auf die Anzahl letal geschädigter *Cimex lectularius* (%) des sensiblen UBA-Stamms im Vergleich zu den fünf Feldstämmen (mit erfolgreicher Aufzucht) aus den 24-Well-Filterkontakt-Biotests. Mittels logistischer Regression (Logit-Analyse) wurden die aus der normalisierten und logarithmierten prozentualen letalen Schädigung der Feldstämme sowie des sensiblen UBA-Stamms resultierenden EC_{50} und Hill-Steigungen (HS) der Regressionskurven mit dem F-Test zum Vergleich von Modellen ausgewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung aus der Anzahl letal geschädigter Bettwanzen bei den jeweiligen Deltamethrin-Konzentrationen. Die EC_{50} -Werte und die HS der Regressionskurven mit den jeweiligen Konfidenzintervallen (95 %) sowie der Resistenzindex (R_i) und die Determinationskoeffizienten (r^2) für alle Konzentrations-Wirkungs-Kurven sind in Tabelle 7 angegeben.

Die Regressionskurven hatten Hill-Steigungen von $HS = 1,895$ für den UBA-Stamm und für die Feldstämme von $HS = 0,942$ (SK), $HS = 0,995$ (OB), $HS = 1,364$ (HO), $HS = 1,265$ (LB) sowie $HS = 1,060$ (AS). Die jeweiligen Konfidenzintervalle (95 %) können Tabelle 7 ent-

nommen werden. Die Ergebnisse aus dem F-Test mit Bonferroni-Holm-Korrektur der p-Werte zeigen, dass die Unterschiede in den Hill-Steigungen der Regressionskurven zwischen dem UBA-Stamm und dem HO- ($p = 0,2129$) sowie dem LB-Feldstamm ($p = 0,0756$) nicht signifikant waren. Die Unterschiede zwischen den Hill-Steigungen der Regressionskurven der Feldstämme SK, OB, AS und dem UBA-Stamm hingegen waren mit $p = 0,0005$ für SK und OB und $p = 0,0189$ für AS signifikant.

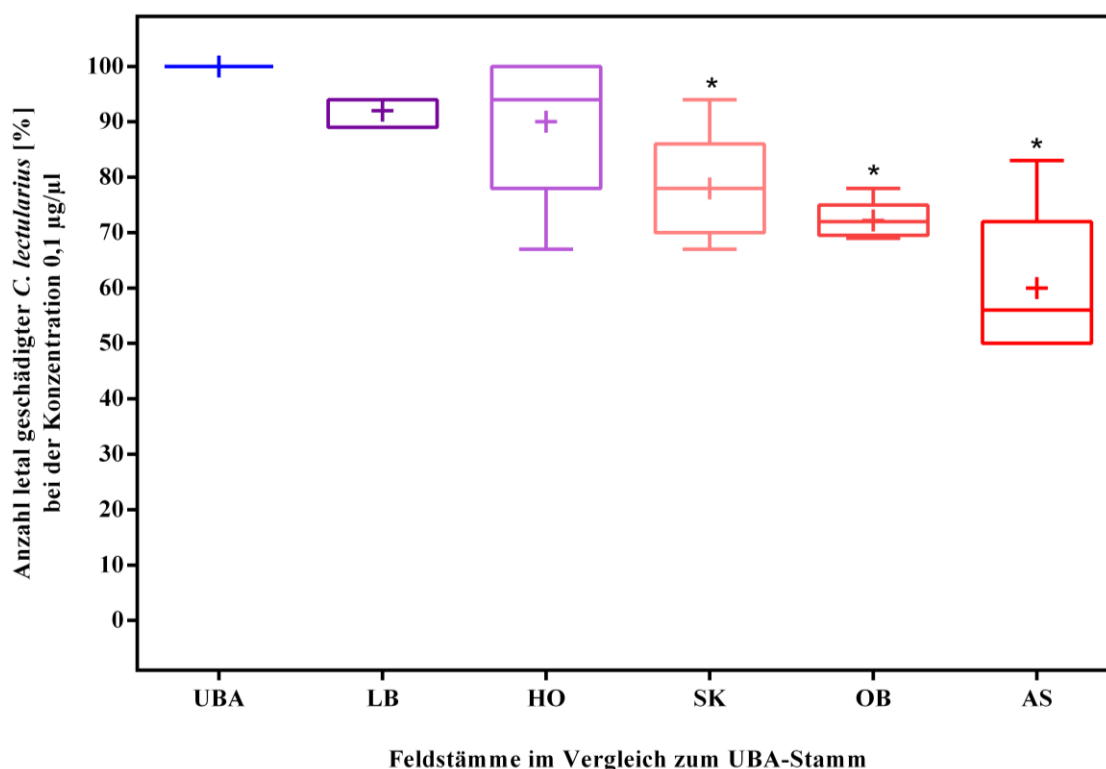


Abb. 19: Vergleich der maximalen prozentualen Anteile letal geschädigter *Cimex lectularius* des UBA-Stamms und der fünf Feldstämme mit erfolgreicher Aufzucht bei der höchsten Konzentration von $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ im 24-Well-Filterkontakt-Biotest. Signifikante Unterschiede wurden mittels Kruskal-Wallis-Rangvarianzanalyse und Dunn's Post-hoc-Test untersucht, bei welchem alle Feldstämme mit dem UBA-Stamm verglichen wurden. Das + gibt die Lage des Mittelwerts an, die Querlinie den Median, die Box das erste (25%) und dritte Quartil (75%) und die Whisker die minimalen und maximalen Werte. *, $p < 0,05$.

Der Vergleich der maximalen prozentualen Anteile letal geschädigter *C. lectularius* des UBA-Stamms und der fünf Feldstämme bei der höchsten Konzentration von $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (bzw. $7,81 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) ergab, dass bei den Feldstämmen LB, HO, SK, OB und AS durchschnittlich 8 %, 10 %, 22 %, 28 % bzw. 40 % weniger Tiere letal geschädigt waren (Abb. 19). Die Ergebnisse aus der Kruskal-Wallis-Rangvarianzanalyse mit anschließendem Dunn's Post-hoc-Test besagen, dass mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,0023$ für SK, $p = 0,0003$ für OB und $p < 0,0001$ für AS in allen drei Stämmen im Gegensatz zum sensiblen UBA-Stamm

signifikant weniger Tiere bei der höchsten Wirkstoffkonzentration letal geschädigt waren. Die Unterschiede in der maximalen prozentualen letalen Schädigung waren bei den beiden Stämmen LB ($p = 0,0824$) und HO ($p = 0,2732$) gegenüber dem UBA-Stamm nicht signifikant.

Bei der Auswertung der Ergebnisse des SK-Feldstamms aus dem 24-Well-Filterkontakt-Biotest (24B), dem Stamm der bereits 2009 mit dem Petrischalen-Filterkontakt-Biotest (PB) untersucht wurde (Methode siehe 2.2.1), fiel auf, dass der R_i für Deltamethrin von $R_i = 117$ auf $R_i = 7,2$ gesunken ist. Um herauszufinden, ob die Ursache dieser Diskrepanz in den Ergebnissen durch die Anwendung der verschiedenen Methoden oder durch den Einsatz beider Geschlechter entstand, wurden beide Methoden am SK-Feldstamm und dem UBA-Stamm direkt miteinander verglichen. Dazu wurden drei Replikate des PB mit jeweils 28 Männchen und Weibchen separat sowie parallele Kontrollen mit jeweils 14 Tieren wie unter 2.2.1 beschrieben untersucht. Der direkte Vergleich der beiden Biotestmethoden unter Verwendung von Deltamethrin hat gezeigt, dass die Methode keinen signifikanten Einfluss auf die letale Schädigung von männlichen Bettwanzen aus beiden Stämmen hatte. Im PB wurden beide Geschlechter getestet, und es konnten geschlechtsspezifische Unterschiede in den R_i beobachtet werden. Die Weibchen des UBA-Stamms waren im Vergleich zu den Männchen bereits bei einer geringeren Konzentration von Deltamethin letal geschädigt. Im PB mit dem SK-Stamm wurde das Gegenteil beobachtet.

Die Ergebnisse der Konzentrations-Wirkungsanalyse des SK-Feldstamms zeigen (Abb. 20), dass der EC_{50} -Wert für Deltamethrin von männlichen Tieren aus dem 24B bei $EC_{50} = 1,844 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (95 % KI: 1,297-2,621), von männlichen *C. lectularius* aus dem PB bei $EC_{50} = 2,042 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (95 % KI: 1,477-2,822) und von Weibchen aus dem PB bei $EC_{50} = 3,619 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (95 % KI: 3,051-4,292) lag.

Im F-Test zum Vergleich von Modellen mit H_0 : Die EC_{50} sind für die jeweils miteinander verglichenen Datensätze gleich und H_1 : Die EC_{50} und Hill-Steigung (HS) sind für die jeweils miteinander verglichenen Datensätze unterschiedlich und anschließender Bonferroni-Holm-Korrektur der p-Werte ergab sich, dass H_0 für den PB abgelehnt wurde, da die letale Schädigung der Weibchen mit $p = 0,0162$ bei einer signifikant höheren Deltamethrin-Konzentration eintrat als die der Männchen. Der Unterschied in den EC_{50} -Werten für Deltamethrin zwischen den Datensätzen der Männchen aus beiden Biotestmethoden war mit $p = 1,3294$ nicht signifikant. Zwischen den Datensätzen der Männchen des 24B und den Weibchen des PB war der Unterschied in den EC_{50} -Werten für Deltamethrin hingegen mit $p = 0,028$ signifikant. Die HS

der Regressionskurven lagen für Männchen aus dem 24B bei $HS = 0,9415$ (95 % KI: 0,6946-1,188) und für die männlichen und weiblichen *C. lectularius* innerhalb des PB bei $HS = 0,9486$ (95 % KI: 0,7233-1,174) bzw. $HS = 0,9488$ (95 % KI: 0,8263-1,071). Im F-Test ergab sich, dass H_0 bei allen Vergleichen der Hill-Steigungen beibehalten wurde. Die Unterschiede in der Hill-Steigung der Regressionskurven waren zwischen männlichen und weiblichen *C. lectularius* innerhalb des PB, zwischen Männchen aus beiden Biotestmethoden und zwischen den Männchen des 24B und den Weibchen des PB mit $p = 5,208$ (für alle Vergleiche) nicht signifikant.

Bei der höchsten Konzentration von $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (bzw. $7,81 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) waren bei Männchen aus beiden Biotestmethoden durchschnittlich 78 % und bei Weibchen des PB durchschnittlich 68 % letal geschädigt. Die Ergebnisse aus der Kruskal-Wallis-Rangvarianzanalyse mit anschließendem Dunn's Post-hoc-Test zeigen, dass die Unterschiede zwischen den maximalen prozentualen Anteilen letal geschädigter männlicher und weiblicher *C. lectularius* innerhalb des PB ($p > 0,9999$) nicht signifikant waren.

Die Ergebnisse der Konzentrations-Wirkungsanalyse des UBA-Stamms zeigen (Abb. 20), dass der EC_{50} -Wert für Deltamethrin von männlichen Tieren aus dem 24B bei $EC_{50} = 0,257 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (95 % KI: 0,2320-0,2842), von männlichen *C. lectularius* aus dem PB bei $EC_{50} = 0,241 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (95 % KI: 0,1954-0,2981) und von Weibchen aus dem PB bei $EC_{50} = 0,171 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (95 % KI: 0,1445-0,2032) lag. Im F-Test ergab sich, dass H_0 beim Vergleich der EC_{50} von männlichen und weiblichen *C. lectularius* innerhalb des PB beim UBA-Stamm ebenso wie beim SK-Feldstamm abgelehnt wurde. Allerdings waren hier die Männchen mit $p = 0,042$ bei einer signifikant höheren Deltamethrin-Konzentration letal geschädigt. Der Unterschied in den EC_{50} -Werten für Deltamethrin zwischen den Datensätzen der Männchen aus beiden Biotestmethoden bzw. den Datensätzen der Männchen des 24B und denen der Weibchen des PB waren wie beim SK-Stamm mit $p = 1,3294$ nicht signifikant bzw. mit $p = 0,02$ signifikant. Die Hill-Steigungen der Regressionskurven lagen für Männchen aus dem 24B bei $HS = 1,895$ (95 % KI: 1,627-2,163) und für männliche und weibliche *C. lectularius* innerhalb des PB bei $HS = 1,876$ (95 % KI: 1,361-2,391) und $HS = 1,925$ (95 % KI: 1,557-2,292). Im F-Test ergab sich, dass H_0 bei allen Vergleichen der Hill-Steigungen beibehalten wurde. Somit waren die Unterschiede in den Hill-Steigungen der Regressionskurven ebenso wie beim SK-Stamm auch beim UBA-Stamm zwischen männlichen und weiblichen *C. lectularius* innerhalb des PB, zwischen Männchen aus beiden Biotestmethoden und zwischen den Männchen des 24B und den Weibchen des PB mit $p = 5,208$ (für alle Vergleiche) nicht

signifikant. Bei der höchsten Konzentration von $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (bzw. $7,81 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), waren sowohl bei den Männchen und Weibchen des PB, als auch bei den Männchen des 24B Versuchs 100 % der Bettwanzen letal geschädigt.

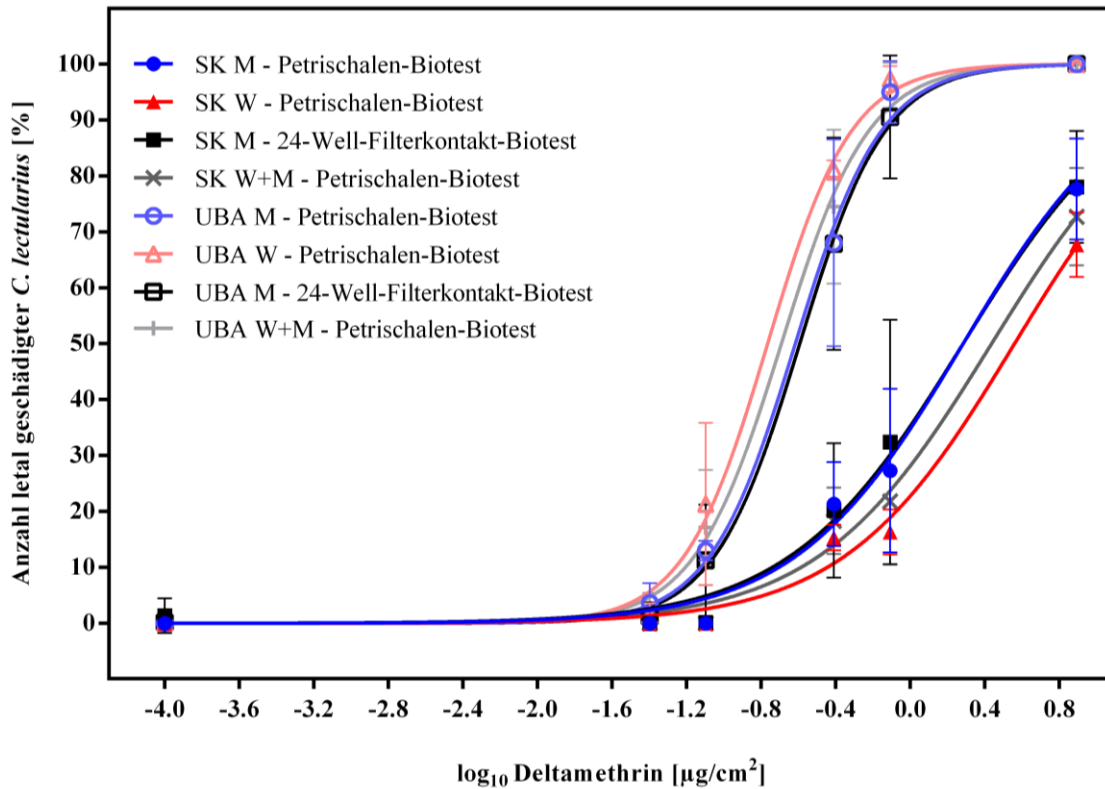


Abb. 20: Konzentrations-Wirkungs-Kurven des Effekts von Deltamethrin ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) auf die Anzahl letal geschädigter männlicher *Cimex lectularius* (%) des wirkstoffsensiblen UBA-Stamms (UBA) und des SK-Feldstamms aus dem 24-Well-Filterkontakt-Biotets (SK) im Vergleich zu Männchen (M) und Weibchen (W) aus den Petrischalen-Biotests. Mittels logistischer Regression (Logit-Analyse) wurden die aus der normalisierten und logarithmierten prozentualen letalen Schädigung des SK-Feldstamms resultierenden EC_{50} und Hill-Steigungen (HS) der Regressionskurven mit dem F-Test zum Vergleich von Modellen ausgewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung aus der Anzahl letal geschädigter Bettwanzen bei den jeweiligen Deltamethrin-Konzentrationen in den zwei verschiedenen Biotestmethoden.

Bei der Berechnung der R_i des SK-Feldstamms ergab sich für die Männchen im 24B ein $R_i = 7,2$, für die Männchen und Weibchen im PB ein $R_i = 8,46$ bzw. $R_i = 21,11$.

Aufgrund dieses deutlichen Unterschieds in den R_i von männlichen und weiblichen *C. lectularius* im PB wurden die Daten beider Geschlechter des PB im UBA- und SK-Stamm zusammengefasst. Sowohl im PB des SK-Stamms als auch des UBA-Stamms lagen die EC_{50} -Werte für Deltamethrin für beide Geschlechter zusammen mit $EC_{50} = 2,727 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (95 % KI: 2,227-3,338) bzw. $EC_{50} = 0,2032 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (95 % KI: 0,1766-0,2339) zwischen den Einzelwerten von Männchen und Weibchen. Der R_i des SK-Feldstamms von beiden Geschlechtern zu-

sammen lag mit $R_i = 13,4$ ebenfalls zwischen dem von weiblichen und männlichen Bettwanzen.

Bei der höchsten Konzentration von $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (bzw. $7,81 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), waren die Unterschiede in der Kruskal-Wallis-Rangvarianzanalyse mit anschließender Bonferroni-Holm-Korrektur der p-Werte zwischen den Stämmen im PB bei der gemeinsamen Betrachtung von Männchen und Weibchen, sowie den weiblichen *C. lectularius* beider Stämme in der prozentualen letalen Schädigung mit $p = 0,0018$ bzw. $p = 0,0243$ signifikant. Im Gegensatz zum 24B (siehe oben), war der Unterschied in der prozentualen letalen Schädigung der Männchen beider Stämme im PB nicht signifikant ($p = 0,1269$).

3.2 PCR-Amplifikate mit den gesuchten Punktmutationen

Zur Detektion der Mutation V419L wurde das Primerpaar Clkdr1 und für die Mutation L925I das Primerpaar Clkdr2 entsprechend der Positionen 1255 bzw. 2773 in der α -Untereinheit des spannungsabhängigen Natriumkanal Gens von *C. lectularius* (*Clvssc*) verwendet (Abb. 21).

V419L	<p>1201 <u>ccgtggcacatg</u><u>ttg</u><u>ttcttcatag</u><u>t</u>aattatatt<u>cctgggatcattctacc</u><u>tcg</u>/<u>ct</u>caac</p> <p>1261 ttgatttttagctattgtcgctatgtcatatga<u>tgaactgcaaaagaaggcg</u>gaagaagaa</p>
L925I	<p>2701 gtgtttaagctggctaagtcatggccaacactcaatcttctcatttcc<u>attatgggcaga</u></p> <p>2761 <u>acagtgggtgcc</u><u>c</u>/<u>at</u><u>tg</u><u>gtaatttaactttt</u><u>gtgt</u>tgtgcattatt<u>at</u><u>tttcatctttgct</u></p> <p>2821 <u>gtgatggg</u>aatgcagttggttggaaagaactatatcgataaatggatagattccctgat</p>

Abb. 21: Ausschnitte des *Clvssc* Gens von *Cimex lectularius*. Durch die PCR-Primer (blau) sequenzierte Teilstücke mit den gesuchten SNPs der *kdr*-Mutationen (NCBI: FJ031996.1) V419L und L925I (hellblau: nicht mutiert; rot: mutiert) und dem Rest des Basentriplets (gelb). Die Sequenzierprimer der Pyrosequenzierung sind orange markiert.

Clkdr1 und Clkdr2 amplifizierten ein 109 bp bzw. 80 bp langes Teilstück von Position 1203 bis 1311 bzw. 2749 bis 2828 (Abb. 22).

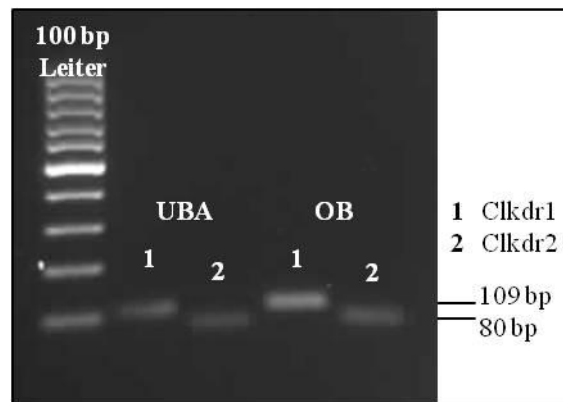


Abb. 22: PCR-Produkte der durch die Primerpaare Clkdr1 und Clkdr2 amplifizierten Sequenzen zur Detektion der Mutationen V419L bzw. L925I. Dargestellt sind die aus dem UBA- und dem OB-Stamm gewonnenen Amplifikate mit einer Länge von 109 bp bzw. 80 bp.

3.3 Detektion von Messabweichungen bei der Pyrosequenzierung

Die Messabweichungen des Pyrosequenzierers während der Pyrosequenzierung der PCR-Produkte mit den beiden potentiellen SNPs wurden mit verschiedenen Mischungsverhältnissen von Plasmid-DNA mutierter und nicht mutierter Stämme bestimmt (Abb. 23). Die Ergebnisse zeigen, dass für V419L (CTC) 96 % und für L925I (ATT) 97,39 % der Variationen durch das Modell erfasst wurden. Somit waren die Abweichungen der gemessenen Werte von den erwarteten Werten bei L925I mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,9869$ etwas geringer als bei V419L mit $r = 0,9798$.

Zur Bestimmung der Allelfrequenzen gepoolter Bettwanzenproben und des Genotyps einzelner *C. lectularius* der Allele V419L und L925I wurden die Messabweichungen der Pyrosequenzierung bei der Auswertung der Pyrogramme berücksichtigt. Beispiel-Pyrogramme für homozygot nicht mutierte, heterozygote und homozygot mutierte Bettwanzen der beiden Polymorphismen sind in den Abbildungen 24 und 25 dargestellt.

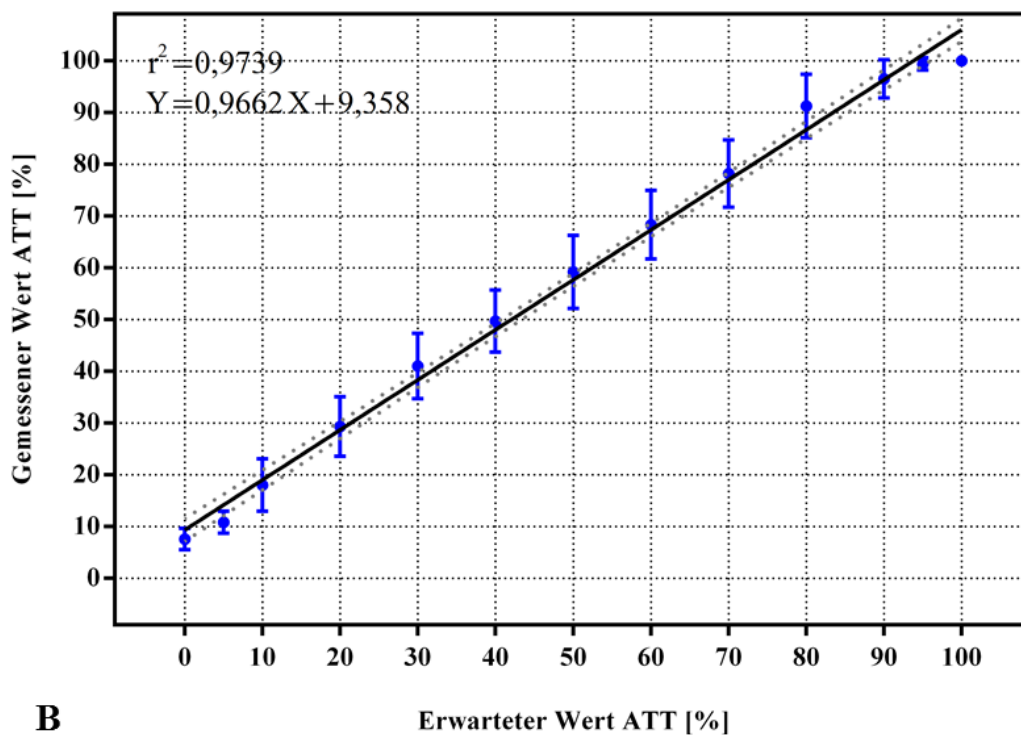
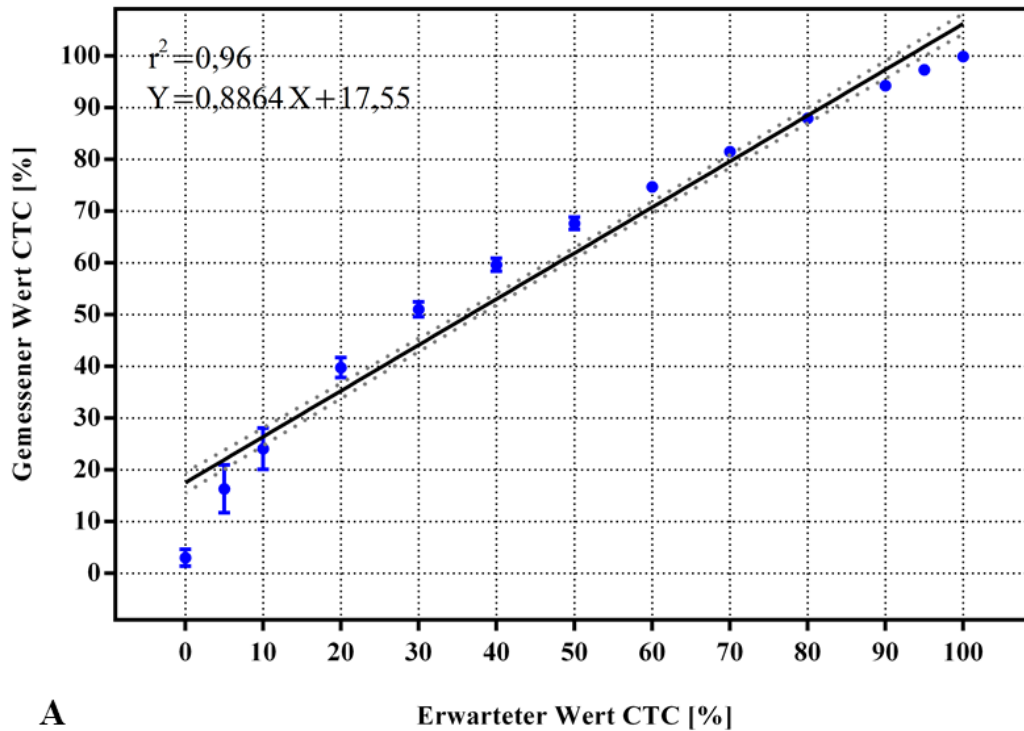


Abb. 23: Lineare Regressionen für die Mutationen **A** V419L und **B** L925I der in der Pyrosequenzierung gemessenen und erwarteten Werte in %. Zur Bestimmung der Messabweichungen des Geräts bei der Sequenzierung der DNA-Abschnitte mit den Mutationen V419L (GTC → CTC) bzw. L925I (CTT → ATT) wurden verschiedene Mischungsverhältnisse von Plasmid-DNA des mutierten RS-Stamms bzw. OB-Stamms und des nicht mutierten UBA-Stamms verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung des Mittelwertes der gemessenen Werte, die Regressionsgerade (durchgezogene Linie), die 95 % Konfidenzbänder (gepunktete Linien), der Determinationskoeffizient (r^2) und die Geradengleichung.

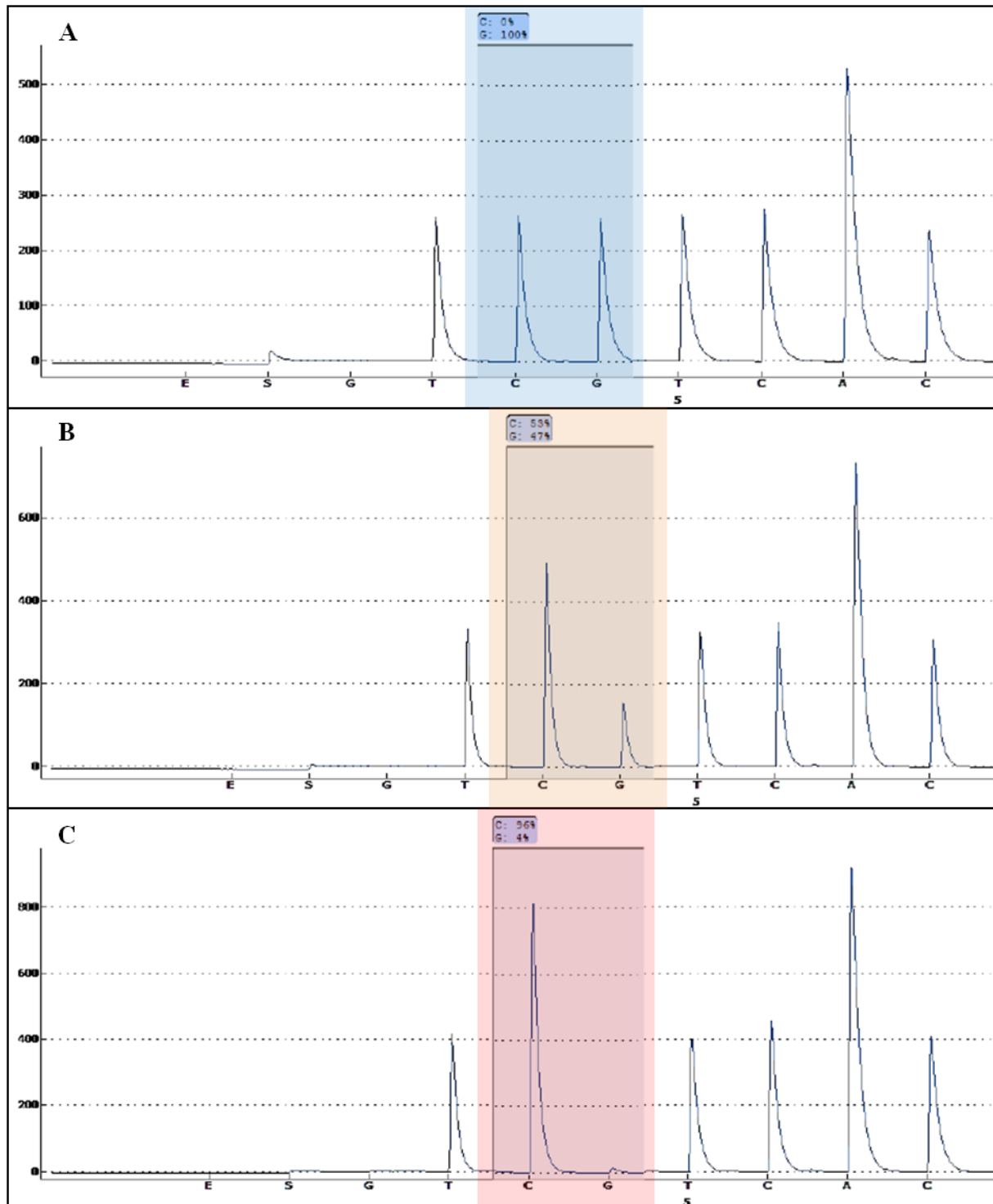


Abb. 24: Beispiel-Pyrogramme (PyroMark® Q24 System) des SNPs V419L. **A** Ein homozygotes nicht mutiertes Weibchen des UBA-Stamms (die Peaks der relevanten Basen wurden blau unterlegt), **B** Ein heterozygotes Weibchen des CC-Stamms (die Peaks der relevanten Basen wurden orange unterlegt), **C** Pool aus 5 homozygot mutierten Weibchen des RS-Stamms (die Peaks der relevanten Basen wurden rot unterlegt).

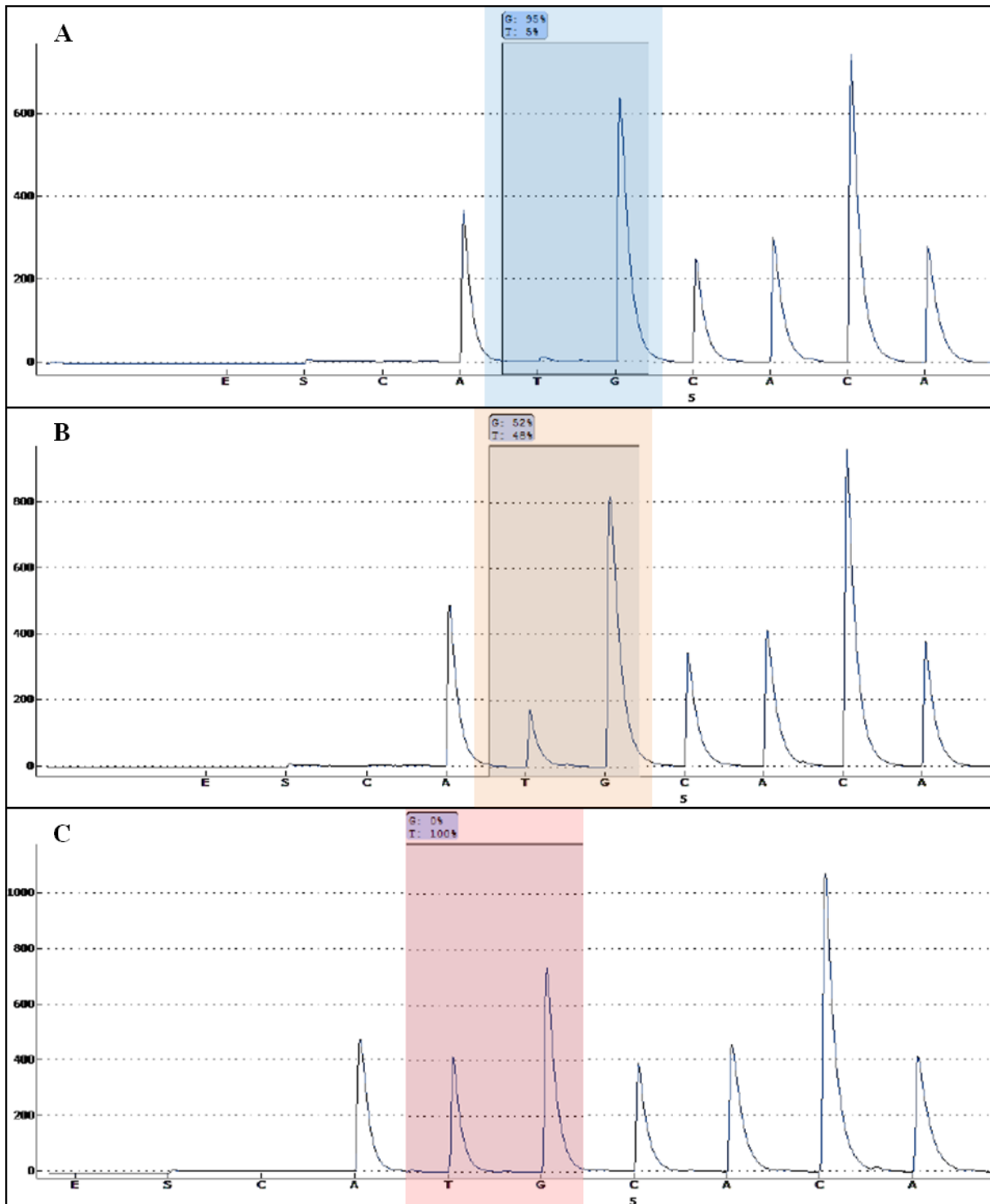


Abb. 25: Beispiel-Pyrogramme (PyroMark[®] Q24 System) des SNP's L925I. **A** Ein homozygoten nicht mutiertes Männchen des UBA-Stamms (die Peaks der relevanten Basen wurden blau unterlegt), **B** Ein heterozygoten Männchen des LB-Stamms (die Peaks der relevanten Basen wurden orange unterlegt), **C** Pool aus 5 homozygoten mutierten Weibchen des RS-Stamms (die Peaks der relevanten Basen wurden rot unterlegt).

3.4 Allelfrequenzen der Mutationen L925I und V419L

Zur Bestimmung der Allelfrequenzen der beiden SNPs wurde die DNA von je 100 männlichen und 100 weiblichen *C. lectularius* der Stämme UBA, SK, SKA (SKA: Proben des SK-Stamms, die 2009 bei -20 °C eingefroren worden waren), OB, LB, AS, HO und CC gepoolt sequenziert. Die Ergebnisse der Pyrosequenzierung von gepoolten Bettwanzenproben zeigen, dass weder männliche noch weibliche *C. lectularius* des sensiblen UBA-Stamms eine der beiden Punktmutationen in der α -Untereinheit des spannungsabhängigen Natriumkanals aufweisen (dies gilt auch für alle weiteren Pyrosequenzierungen). Die gemessenen durchschnittlichen Allelfrequenzen von 9 % bei den Weibchen und 11 % bei den Männchen für L925I (Abb. 26) und je 4 % in beiden Geschlechtern für V419L (Abb. 27) wurden den Messungenauigkeiten des Pyrosequenzers zugeschrieben (s. 3.3). Bei gemessenen Allelfrequenzen von unter 15 % in diesem und den folgenden Versuchen galt die jeweilige Punktmutation als nicht vorhanden.

Die Ergebnisse zeigen, dass Bettwanzen von 17 der 20 Stämme und Populationen nur die Mutation L925I aufwiesen, Bettwanzen des RS- und CC-Stamms dagegen beide Mutationen und dass keine der beiden Mutationen in Bettwanzen des T-Stamms und der Feldpopulation B10 nachweisbar waren.

3.4.1 Allelfrequenzen der Bettwanzenfeldstämme mit erfolgreicher Aufzucht

Bei den Bettwanzenfeldstämmen mit erfolgreicher Aufzucht wurde nur die Mutation L925I detektiert (Abb. 26). Im HO-Stamm wurden bei männlichen ($p = 0,0095$) und weiblichen Tieren ($p = 0,0429$) signifikant weniger mutierte Fragmente entdeckt als beim UBA-Stamm, weshalb die gemessenen Werte ebenfalls auf Messabweichungen des Geräts zurückgeführt wurden. Bei den anderen gezüchteten Feldstämmen waren die Allelfrequenzen bei den Weibchen und den Männchen des LB-Stamms mit durchschnittlich 31 % und 30 % mutierten Fragmenten am niedrigsten. Die höchste Frequenz mutierter Allele zeigten der AS-Stamm mit 67 % bei den Weibchen und der OB-Stamm mit 59 % bei den Männchen. Die Allelfrequenzen der männlichen Wanzen der Stämme SK und AS lagen mit 44 % und 51 % dazwischen, ebenso wie die Allelfrequenzen der weiblichen Wanzen der Stämme SK und OB mit 39 % und 60 %. Signifikante Unterschiede in den Allelfrequenzen wurden mit einer One-Way ANOVA und Dunnett's Post-hoc-Test untersucht. Die Unterschiede zwischen den Feldstämmen SK, OB, LB sowie AS und dem sensiblen UBA-Stamm waren bei männlichen und

weiblichen *C. lectularius* mit $p < 0,0001$ für alle Stämme signifikant. Die Mutation V419L trat bei den Bettwanzenfeldstämmen mit erfolgreicher Aufzucht nicht auf, alle gemessenen Werte wurden als Messabweichungen interpretiert (Abb. 27).

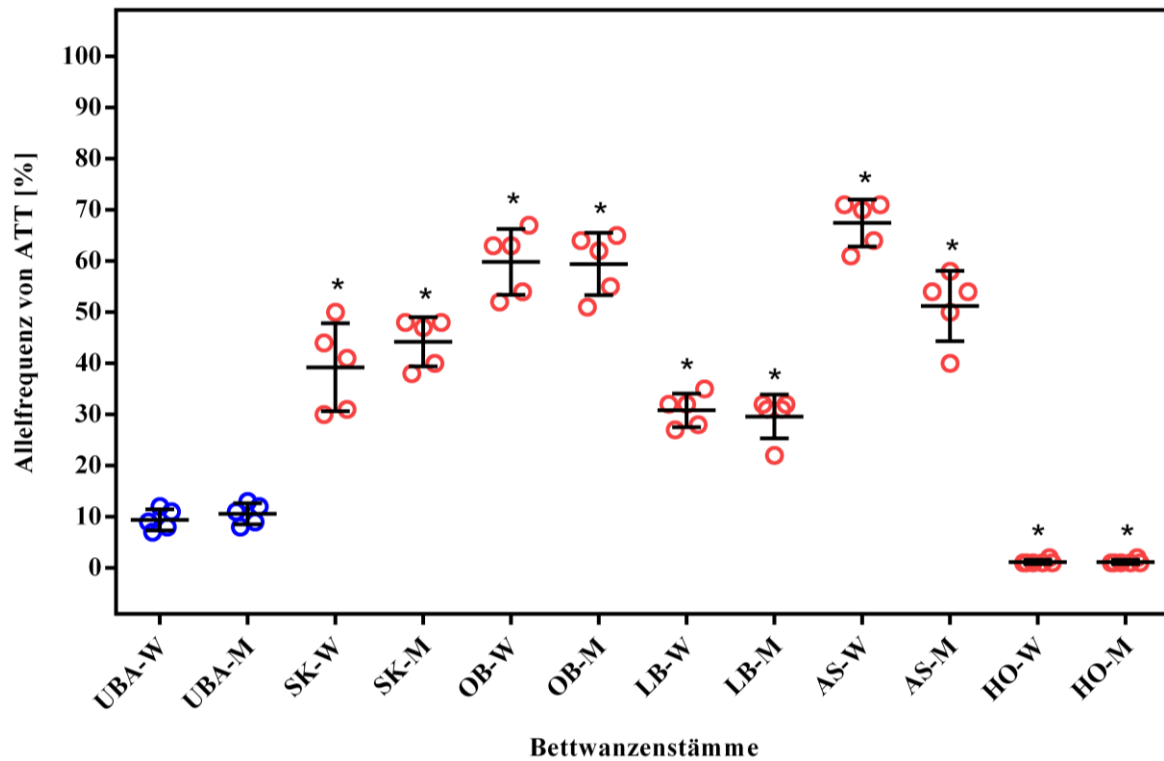


Abb. 26: Allelfrequenzen der Mutation L925I (CTT → ATT) von *Cimex lectularius* des sensiblen UBA-Stamms und der fünf Feldstämme mit erfolgreicher Aufzucht. Signifikante Unterschiede wurden mit einer One-Way ANOVA gefolgt von Dunnett's Post-hoc-Test untersucht. Die Ergebnisse von männlichen (M) und weiblichen (W) Bettwanzen der Feldstämme wurden dabei mit den jeweiligen Ergebnissen der männlichen und weiblichen Wanzen des UBA-Stamms verglichen. Die Punkte geben die technischen Replikate der Pyrosequenzierungen jedes Stamms an, die Querlinie den Mittelwert und die Whisker die Standardabweichung. * $p < 0,05$.

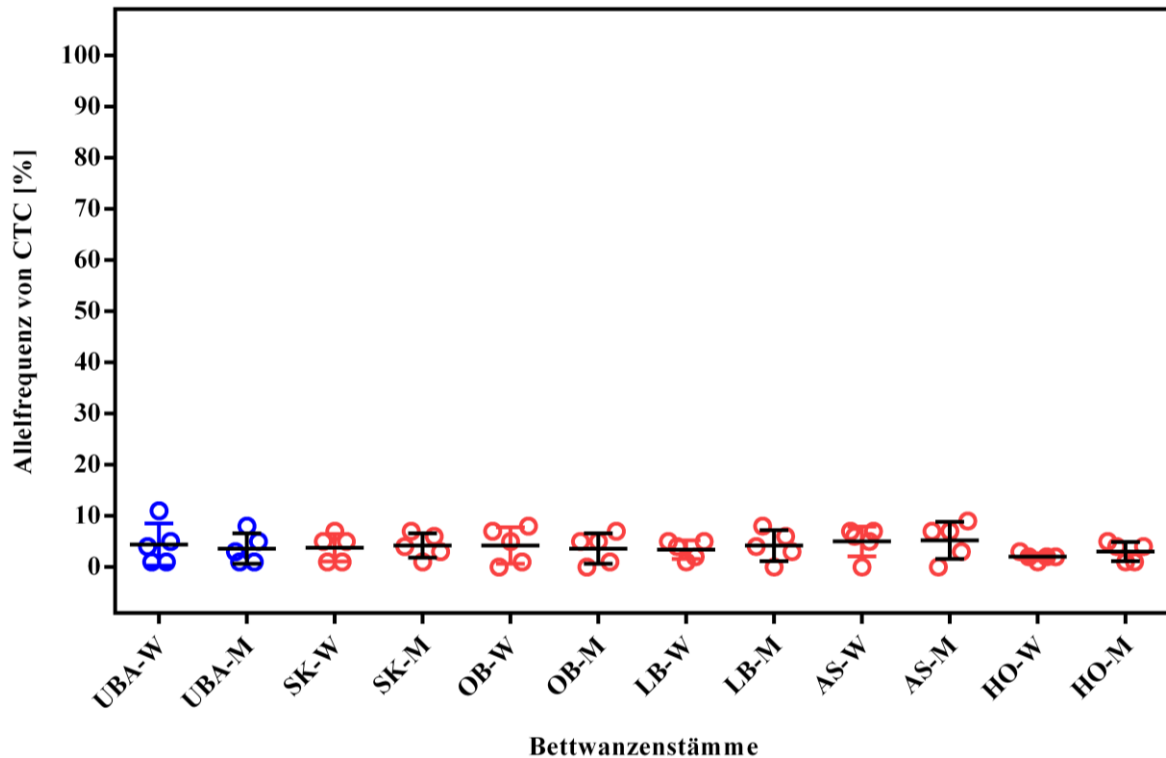


Abb. 27: Allelfrequenzen der Mutation V419L (GTC → CTC) von *Cimex lectularius* des sensiblen UBA-Stamms und der fünf Feldstämme mit erfolgreicher Aufzucht. Signifikante Unterschiede wurden mit einer One-Way ANOVA gefolgt von Dunnett's Post-hoc-Test untersucht. Die Ergebnisse von männlichen (M) und weiblichen (W) Bettwanzen der Feldstämme wurden dabei mit den jeweiligen Ergebnissen der männlichen und weiblichen Wanzen des UBA-Stamms verglichen. Die Punkte geben die technischen Replikate der Pyrosequenzierungen jedes Stamms an, die Querlinie den Mittelwert und die Whisker die Standardabweichung. * $p < 0,05$.

3.4.2 Allelfrequenzen der Bettwanzenfeldstämme ohne Zuchterfolg

Trotz großer Starttierzahlen konnte bei fünf der 20 Bettwanzenfeldstämme und dem Laborstamm CC von Bayer kein Zuchterfolg erzielt werden. Die gemessenen Werte des T-Stamms für die Häufigkeit des L925I Austausches wurden mit durchschnittlich 8 % auf Messabweichungen des Geräts zurückgeführt. Dabei wurde lediglich ein gemischter Pool aus männlichen und weiblichen Bettwanzen sowie verschiedenen Juvenilstadien untersucht, da nicht genug Tiere für getrennte Untersuchungen vorhanden waren. Bei den anderen Stämmen waren die Allelfrequenzen von L925I bei den Weibchen und den Männchen des CC-Stamms mit durchschnittlich 32 % und 76 % mutierten Fragmenten am niedrigsten. Die Frequenz mutierter Allele der Männchen des GW-Stamms lag bei 99 %. Alle Allele der anderen Wanzenproben der Stämme GW, RS, LBII und LBIII waren zu 100 % mutiert. Die Unterschiede in den Allelfrequenzen zwischen den Feldstämmen GW, CC, RS, LBII sowie LBIII und dem sensib-

len UBA-Stamm waren sowohl bei männlichen und weiblichen *C. lectularius*, mit $p < 0,0001$ für alle Stämme signifikant (Abb. 28).

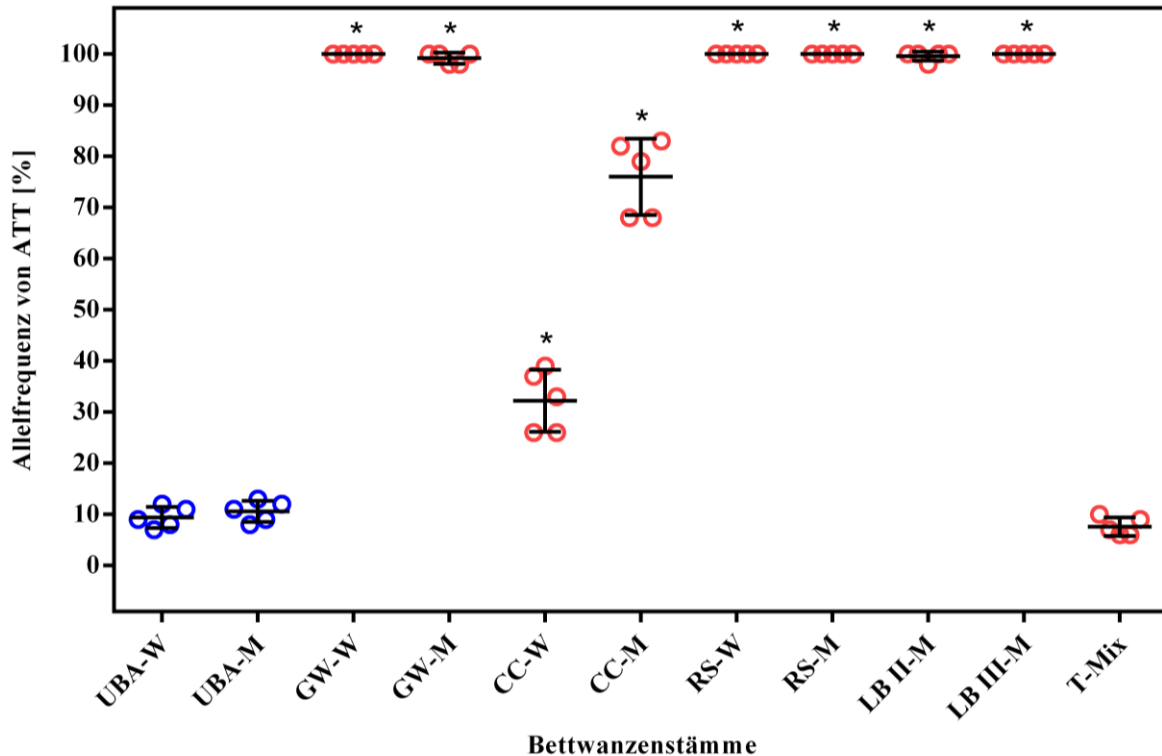


Abb. 28: Allelfrequenzen der Mutation L925I (CTT → ATT) von *Cimex lectularius* des sensiblen UBA-Stamms und der sechs Feldstämme ohne Zuchterfolg. Signifikante Unterschiede wurden mit einer One-Way ANOVA und Dunnett's Post-hoc-Test untersucht. Die Ergebnisse von männlichen und weiblichen Bettwanzen der Feldstämme wurden dabei mit den Ergebnissen der männlichen und weiblichen Wanzen des UBA-Stamms verglichen. Die Punkte geben die technischen Replikate der Pyrosequenzierungen jedes Stamms an, die Querlinie den Mittelwert und die Whisker die Standardabweichung. * $p < 0,05$.

Die Mutation V419L trat zu 96 % bei den weiblichen und zu 40 % bei den männlichen Tieren des RS-Stamms auf. Damit waren die Allelfrequenzen von V419L des RS-Stamms bei beiden Geschlechtern mit $p < 0,0001$ signifikant höher als beim UBA-Stamm. Bei den weiblichen Tieren des CC-Stamms konnte mit durchschnittlich 9 % für V419L ebenfalls eine signifikant höhere Allelfrequenz ($p = 0,0331$) als beim sensiblen UBA-Stamm gemessen werden. Der gemessene Wert lag trotzdem unter 15 % und die Punktmutation galt damit als nicht vorhanden. Bei den übrigen Bettwanzenfeldstämmen ohne Zuchterfolg konnte sie nicht nachgewiesen werden, alle gemessenen Werte wurden als Messabweichungen interpretiert (Abb. 29).

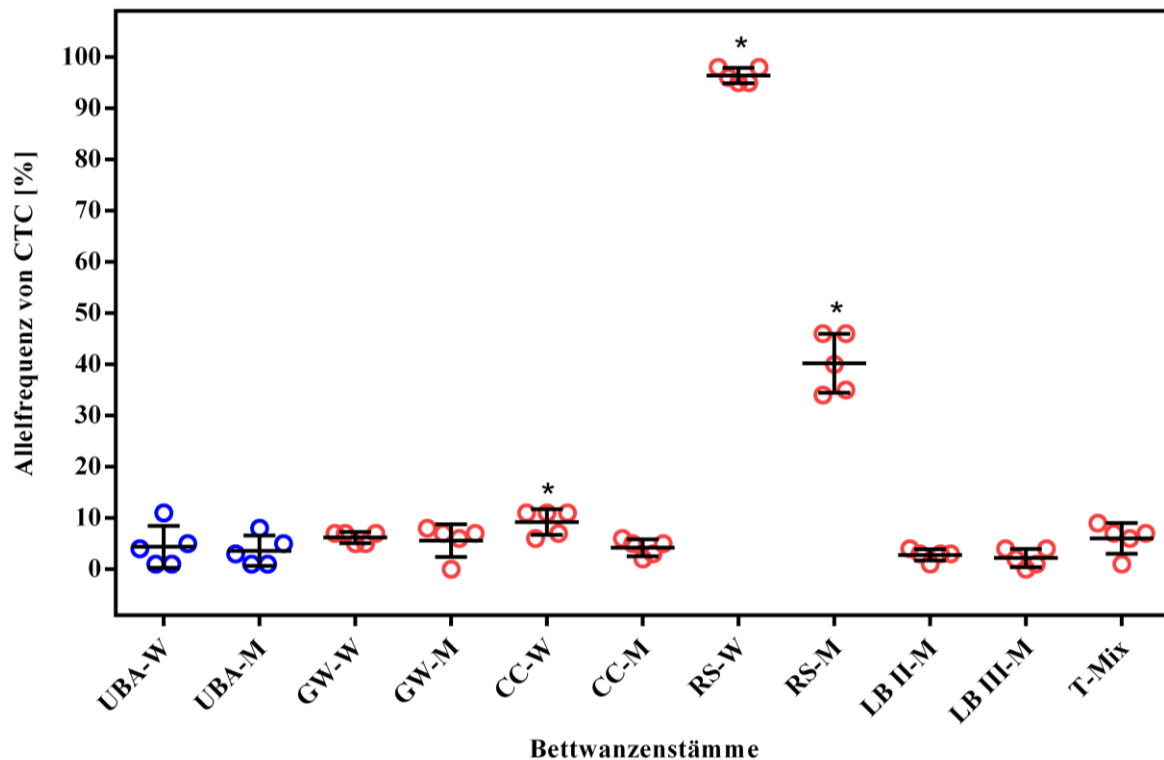


Abb. 29: Allelfrequenzen der Mutation V419L (GTC → CTC) von *Cimex lectularius* des sensiblen UBA-Stamms und der sechs Feldstämme ohne Zuchterfolg. Signifikante Unterschiede wurden mit einer One-Way ANOVA und Dunnett's Post-hoc-Test untersucht. Die Ergebnisse von männlichen und weiblichen Bettwanzen der Feldstämme wurden dabei mit den Ergebnissen der männlichen und weiblichen Wanzen des UBA-Stamms verglichen. Die Punkte geben die technischen Replikate der Pyrosequenzierungen jedes Stamms an, die Querlinie den Mittelwert und die Whisker die Standardabweichung. * $p < 0,05$.

3.4.3 Allelfrequenzen der Bettwanzenfeldpopulationen ohne Zuchtmöglichkeit

Im Gegensatz zu den anderen Feldstämmen wurden Bettwanzen aus den zehn Feldpopulationen B1-10 aufgrund von zu geringen Tierzahlen direkt nach dem Fund bei -20 °C eingefroren. Die Ergebnisse der Pyrosequenzierung des Austausches L925I (Abb. 30) indizieren, dass die gemessenen Werte der B10-Population mit durchschnittlich 6 % für weibliche und 11 % für männliche Bettwanzen auf Messabweichungen des Geräts zurückzuführen sind. Für die verbliebenen Populationen waren die Allelfrequenzen von L925I bei den Weibchen der B4-Population mit durchschnittlich 82 % mutierten Fragmenten am niedrigsten. Die Frequenz mutierter Allele der Männchen der B4-Population, der dritten Juvenilstadien der B7-Population und der Weibchen der B2-Population lagen bei 94 %, 96 % bzw. 99 %. Sämtliche Allele der anderen Wanzenproben der Populationen B2, B5, B8 und B9 waren zu 100 % mutiert.

Die Unterschiede in den Allelfrequenzen von L925I zwischen den Feldpopulationen B2, B4, B5, B7, B8 sowie B9 und dem sensiblen UBA-Stamm waren bei allen *C. lectularius* Stadien mit $p < 0,0001$ für alle Stämme signifikant (Abb. 30). Die Mutation V419L trat bei den Bettwanzenfeldpopulationen ohne Zuchtmöglichkeit nicht auf.

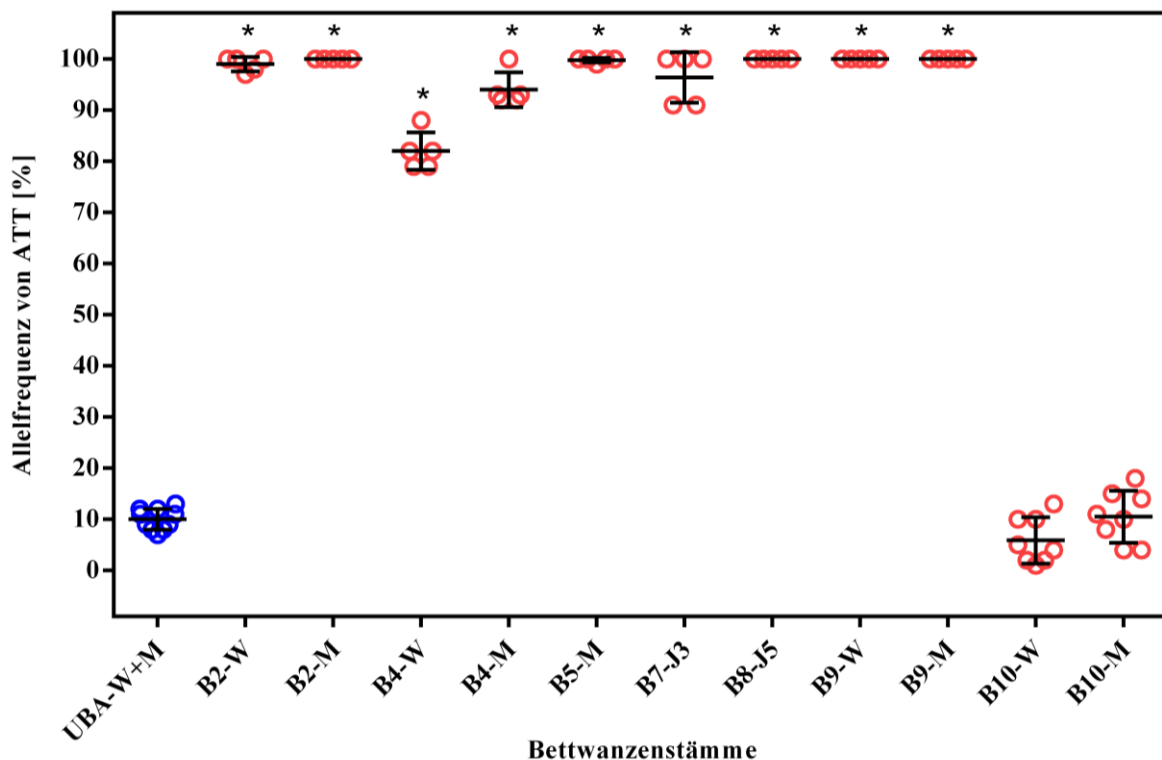


Abb. 30: Allelfrequenzen der Mutation L925I (CTT → ATT) von *Cimex lectularius* des sensiblen UBA-Stamms und von sieben Feldpopulationen (Einzeltiere nicht dargestellt) ohne Zuchtmöglichkeit. Signifikante Unterschiede wurden mit einer One-Way ANOVA und Dunnett's Post-hoc-Test untersucht. Die Ergebnisse der Feldpopulationen wurden mit den Ergebnissen des UBA-Stamms (Männchen und Weibchen zusammengefasst) verglichen. Die Punkte geben die technischen Replikate der Pyrosequenzierungen jedes Stamms an, die Querlinie den Mittelwert und die Whisker die Standardabweichung. * $p < 0,05$.

3.4.4 Vergleich der Allelfrequenzen von Proben des SK-Stamms aus 2009 und 2013

Der SK-Stamm war der erste Feldstamm dessen Aufzucht in der Gliedertierzucht des UBA gelang und erste Resistenzuntersuchungen im Petrischalen-Biotest durchgeführt wurden. Da einige Tiere aus Kontrollen dieser Untersuchungen in 2009 eingefroren wurden (SKA), konnten diese mit ihren Nachkommen, die fast vier Jahre ohne Selektionsdruck durch Wirkstoffe gezüchtet worden waren (SK, 2013) verglichen werden. Die Ergebnisse der Pyrosequenzierung zeigen (Abb. 31), dass die Allelfrequenzen von L925I bei männlichen und weiblichen *C. lectularius* des SK-Stamms mit 39 % bzw. 40 % mutierten Fragmenten niedriger sind als von

denen des SKA-Stamms mit 46 % für die Weibchen und 48 % für die Männchen. Der Unterschied in den Allelfrequenzen von L925I zwischen männlichen ($p = 0,1363$) und weiblichen ($p = 0,2013$) Bettwanzen des SK- und SKA-Stamms ist nicht signifikant. Die Mutation V419L trat beim SK-Stamm sowohl im Jahr 2009, als auch 2013 nicht auf (Abb. 31).

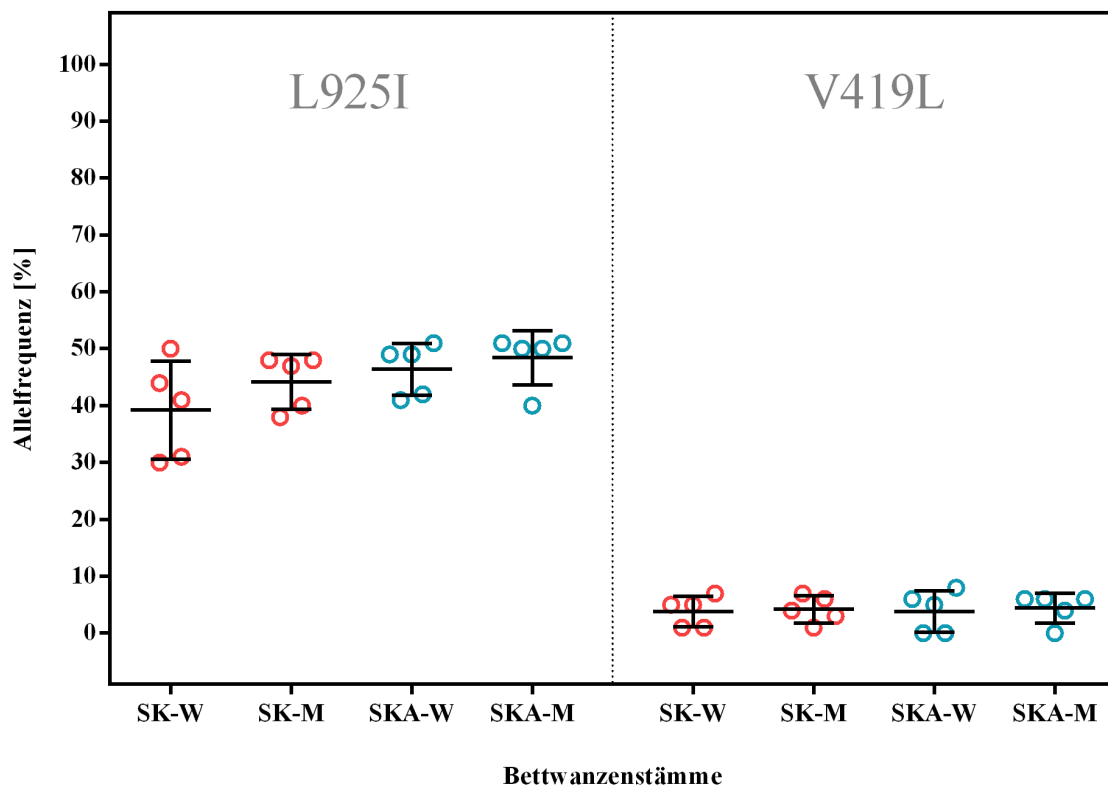


Abb. 31: Vergleich der Allelfrequenzen der Mutationen L925I (CTT → ATT) und V419L (GTC → CTC) von männlichen (M) und weiblichen (W) *Cimex lectularius* des SK-Stamms aus 2009 (SKA) und der Nachkommen dieses Stamms aus 2013 (SK). Multiple t-Tests mit anschließender Sidak-Holm-Korrektur konnten für beide Polymorphismen keine signifikanten Unterschiede nach über drei Jahren Zucht feststellen. Die Punkte geben die technischen Replikate der Pyrosequenzierungen jedes Stamms an, die Querlinie den Mittelwert und die Whisker die Standardabweichung. * $p < 0,05$.

3.5 Genotypisierung einzelner *C. lectularius*

Von den Stämmen UBA, SK, OB, LB, AS, HO und CC sowie von den Bettwanzenproben B1, B5, B6 und B8 wurde im Gegensatz zu den vorangegangenen Versuchen die DNA einzelner Bettwanzen isoliert, die Teilstücke mit den potenziellen SNPs des *Clvssc* Gens amplifiziert und mittels Pyrosequenzierung sequenziert (Tab. 8).

Die Ergebnisse zeigen, dass im sensiblen UBA-Stamm die Mutationen V419L und L925I der weiblichen (W) und männlichen (M) Bettwanzen nicht auftraten (homozygot nicht mutiert). Des Weiteren wurden für den Austausch L925I in allen Feldstämmen mit Zuchterfolg sowie

im CC-Stamm Bettwanzen mit homozygot nicht mutierten (HNM), homozygot mutierten (HM) und heterozygoten (H) Genotypen detektiert. Von den 20 untersuchten Tieren des LB-Stamms waren 16 HNM (7W/9M), 3 H (2W/1M) und ein Weibchen HM. Im HO-Stamm waren ein HNM Männchen, 17 H Bettwanzen (8W/9M) und 2 HM Weibchen. Der SK-Stamm hatte 4 HNM Männchen, 14 H Tiere (10W/4M) und 2 HM Männchen. Im OB-Stamm waren pro Geschlecht jeweils 4 Bettwanzen HNM, 5 H und eine HM. Von den 20 untersuchten Bettwanzen hatte der AS-Stamm je 9 HNM (4W/5M) und H (4W/5M) Tiere, sowie 2 HM Weibchen. Im CC-Stamm waren 3 Männchen HNM, 14 H (8W/6M) und 3 HM (2W/1M) Bettwanzen. Zudem war er von allen untersuchten Stämmen der einzige mit 3 heterozygoten (2W/1M) Bettwanzen für den Austausch V419L. Alle anderen Feldstämme wiesen keine Allele mit diesem Austausch auf und waren homozygot nicht mutiert. Von den Bettwanzenfeldpopulationen ohne Zuchtmöglichkeit (B1, B3, B5, B6 und B8) waren alle untersuchten Tiere für den Austausch L925I homozygot mutiert.

Tab. 8: Verschiedene Genotypen der *kdr*-Mutationen L925I und V419L. Mittels Pyrosequenzierung wurden die Teilstücke mit den möglichen SNPs des *Clyssc* Gens von weiblichen und männlichen *Cimex lectularius* verschiedener Feldstämme und des sensiblen UBA-Stamms sequenziert. Bei der Untersuchung der DNA einer einzelnen Bettwanze wurden in der Tabelle das Geschlecht oder das Juvenilstadium eingetragen.

Stamm/ Population	Homozygot nicht mutiert [W/M]		Heterozygot [W/M]		Homozygot mutiert [W/M]	
	V419L	L925I	V419L	L925I	V419L	L925I
UBA	10/10	10/10	0/0	0/0	0/0	0/0
LB	10/10	7/9	0/0	2/1	0/0	1/0
HO	10/10	0/1	0/0	8/9	0/0	2/0
SK	10/10	0/4	0/0	10/4	0/0	0/2
OB	10/10	4/4	0/0	5/5	0/0	1/1
AS	10/10	4/5	0/0	4/5	0/0	2/0
CC	8/9	0/3	2/1	8/6	0/0	2/1
B1	M	0	0	0	0	M
B3	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1
B5	W	0	0	0	0	W
B6	M/J4	0	0	0	0	M/J4
B8	W	0	0	0	0	W

Erläuterungen: W: Weibchen; M: Männchen; J: Juvenilstadium.

Die Ergebnisse zeigen, dass im sensiblen UBA-Stamm die Mutationen V419L und L925I der weiblichen (W) und männlichen (M) Bettwanzen nicht auftraten (homozygot nicht mutiert). Des Weiteren wurden für den Austausch L925I in allen Feldstämmen mit Zuchterfolg sowie im CC-Stamm Bettwanzen mit homozygot nicht mutierten (HNM), homozygot mutierten (HM) und heterozygoten (H) Genotypen detektiert. Von den 20 untersuchten Tieren des LB-Stamms waren 16 HNM (7W/9M), 3 H (2W/1M) und ein Weibchen HM. Im HO-Stamm waren ein HNM Männchen, 17 H Bettwanzen (8W/9M) und 2 HM Weibchen. Der SK-Stamm hatte 4 HNM Männchen, 14 H Tiere (10W/4M) und 2 HM Männchen. Im OB-Stamm waren pro Geschlecht jeweils 4 Bettwanzen HNM, 5 H und eine HM. Von den 20 untersuchten Bettwanzen hatte der AS-Stamm je 9 HNM (4W/5M) und H (4W/5M) Tiere, sowie 2 HM Weibchen. Im CC-Stamm waren 3 Männchen HNM, 14 H (8W/6M) und 3 HM (2W/1M) Bettwanzen. Zudem war er von allen untersuchten Stämmen der einzige mit 3 heterozygoten (2W/1M) Bettwanzen für den Austausch V419L. Alle anderen Feldstämme wiesen keine Allele mit diesem Austausch auf und waren homozygot nicht mutiert. Von den Bettwanzenfeldstämmen ohne Zuchtmöglichkeit waren alle untersuchten Tiere für den Austausch L925I homozygot mutiert.

Um zu überprüfen, ob die in den Feldstämmen LB, HO; SK, OB, AS sowie im Laborstamm CC nachgewiesene Mutation L925I und die im CC-Stamm nachgewiesene Mutation V419L ohne Selektion durch Pyrethroide in der Laborzucht nachteilig und somit signifikant unterrepräsentiert waren, wurde die Allelverteilung auf das Vorliegen eines Hardy-Weinberg-Gleichgewichts untersucht. Aus den im Hardy-Weinberg-Package in R vorhandenen Berechnungsmethoden wurde aufgrund des geringen Stichprobenumfangs der „likelihood ratio“ Test favorisiert. Zwar unterschieden sich die p-Werte zwischen den einzelnen Tests innerhalb eines Stamms, das eigentliche Ergebnis blieb aber unabhängig vom verwendeten Test gleich (s. Anhang Punkt 8.1, Tab. 13). Aufgrund der niedrigen Anzahl von Untersuchten Individuen ist jedoch zu beachten, dass die Teststärke der Analysen gering ist und nur eine Tendenz angezeigt wird.

Die Mutation L925I in den Stämmen LB ($p = 0,226$), SK ($p = 0,059$), OB ($p = 0,656$), AS ($p = 0,908$) und CC ($p = 0,070$) sowie die Mutation V419L im CC-Stamm ($p = 0,622$) würden ohne Pyrethroid-Selektion keinen signifikanten Nachteil darstellen. Beim HO-Stamm hingegen waren die in der Population vorhandenen Genotypen signifikant vom Hardy-Weinberg Gleichgewicht verschieden ($p = 0,001$). Dabei waren die homozygot mutierten Individuen deutlich unterrepräsentiert.

3.6 Bestimmung der RNA-Integrität: Detektion eines Hidden-Break in der 28S rRNA von *C. lectularius*

Bei einigen Insekten wurde bereits beschrieben, dass die 28S-Einheit der rRNA in zwei etwa gleichgroße Untereinheiten zerfallen kann (FUJIWARA und ISHIKAWA 1986; ISHIKAWA und NEWBURGH 1972; MACHARIA et al. 2015; WINNEBECK et al. 2010). Bei der Integritätsmessung isolierter RNA in der vorliegenden Arbeit konnte dieser sogenannte Hidden-Break in der 28S-Einheit der rRNA auch bei *C. lectularius* nachgewiesen werden (Abb. 32A).

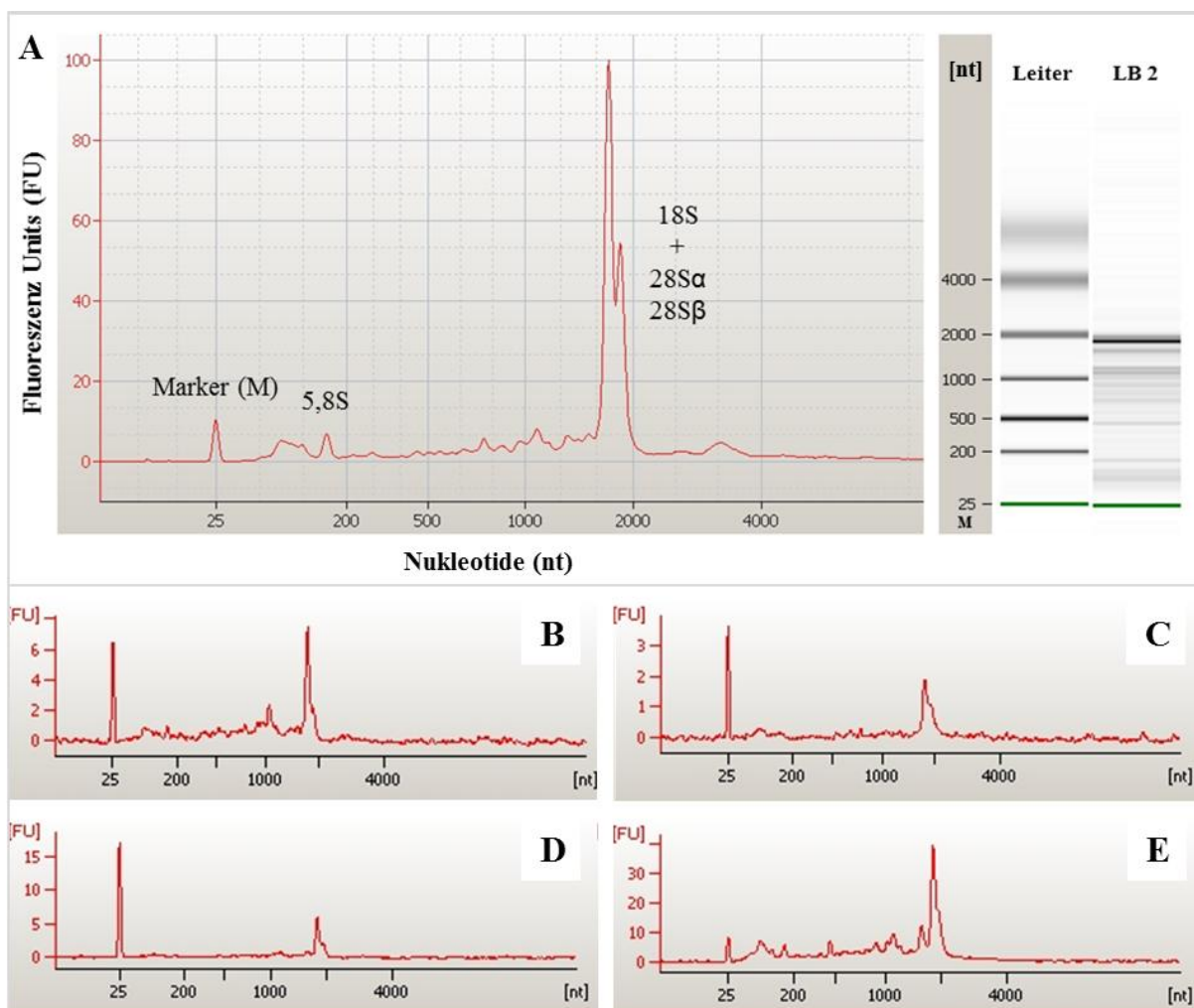


Abb. 32: Elektropherogramm-Beispiele zur Auswahl nicht degradierter RNA. **A** Elektropherogramm und digitale Gel-ähnliche Darstellung von isolierter *Cimex lectularius*-RNA ohne vorherige Hitzedenaturierung am Beispiel des LB-Stamms (1 Männchen). Durch einen sog. Hidden-Break in der 28S-Einheit der rRNA wurden die 18S-Einheit sowie die beiden Untereinheiten 28S α und 28S β aufgrund ähnlicher elektrophoretischer Mobilität bei ca. 1900 nt detektiert, was eine Berechnung der RIN unmöglich machte. Bei ca. 160 nt wurde das von der 28S getrennte 5,8S rRNA-Molekül detektiert. Die visuelle Inspektion zur Auswahl nicht degradierter RNA erfolgte nach Abbildung A und B-E. (T (B), GW (C), UBA (D) und SK (E)). **Marker:** Referenz zur Bestimmung der RNA-Fragmentgröße im Elektropherogramm; **Leiter:** Referenz zur Bestimmung der RNA-Fragmentgröße in der digitalen Gel-ähnlichen Darstellung.

Das Phänomen trat sowohl mit als auch ohne die im Protokoll des verwendeten Agilent RNA 6000 Nano Kits empfohlene Hitzedenaturierung bei 70 °C auf, weshalb diese im Folgenden bei keiner der Proben durchgeführt wurde. Aufgrund ihrer Größe zeigten die beiden Teilstücke 28S α und 28S β eine dem 18S rRNA-Molekül ähnliche elektrophoretische Mobilität. Dadurch konnten im Bioanalyzer nicht wie üblich zwei Peaks bei ca. 1900 nt für das 18S- und 4000 nt für 28S- rRNA-Molekül generiert werden, sondern nur ein gemeinsamer rRNA-Peak bei ca. 1900 nt (18S, 28S α und 28S β), wodurch die Berechnung der RIN unmöglich war. Aus diesem Grund musste die Qualität der RNA durch eine visuelle Inspektion der Elektropherogramme und der digitalen Gelbilder bestimmt werden. Beim Zerfall der 28S-Einheit wurde das an diese gebundene 5,8S-rRNA-Molekül ebenfalls abgelöst. Als weiterer, aber für die Berechnung nicht relevanter Peak, wurde deshalb bei ca. 160 nt das von der 28S getrennte 5,8S rRNA-Molekül detektiert. Abbildung 32 (B-E) zeigt Elektropherogramme isolierter RNA von vier Stämmen nach dessen Beispielen sich die visuelle Inspektion zur Auswahl nicht degradierter RNA richtete. Alle in der mRNA-Expressionsanalyse verwendeten RNA-Proben der neun untersuchten Bettwanzenstämme sind im Anhang unter Punkt 8.2 (Abb. 58-63) abgebildet. Beispiele von Elektropherogrammen, dessen Proben aufgrund von nicht nachweisbarer oder degradierter RNA aussortiert wurden, sind in Abbildung 33 zu sehen.

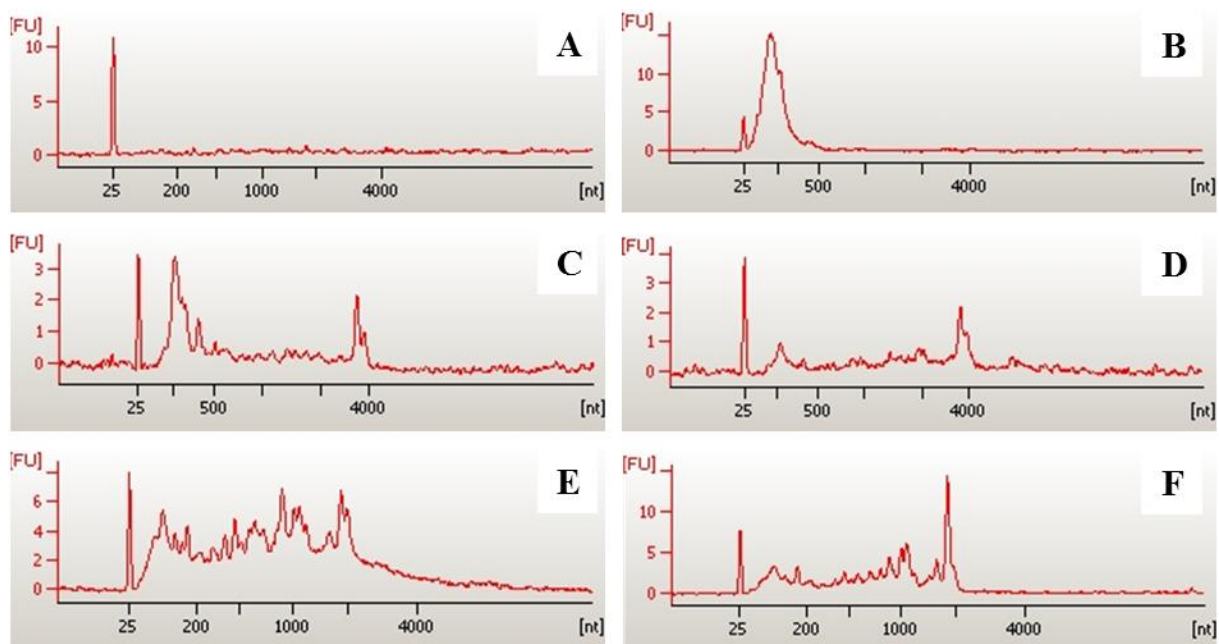


Abb. 33: Elektropherogramm-Beispiele verworfener RNA-Proben. **A-F** Proben isolierter *Cimex lectularius*-RNA wurden aufgrund von nicht nachweisbarer (**A**) oder degradierter RNA (**B-F**) nicht für die mRNA-Expressionsanalyse verwendet. **FU**: Fluoreszenz Units; **nt**: Nukleotide.

3.7 RT-PCR Amplifikate der Referenz- und CYP-Gene

Durch den Einsatz der Primerpaare für die Referenzgene *rps16*, *rpl8* und *rpl11* wurden je ein 100 bp, 112 bp bzw. 134 bp langes cDNA-Molekül amplifiziert. Aus den vier Genen *cyp397a1*, *cyp398a1*, *cyp4cm1* und *cyp6dn1* wurden Amplifikate der Längen 244 bp, 220 bp, 245 bp bzw. 219 bp (Abb. 34) produziert.

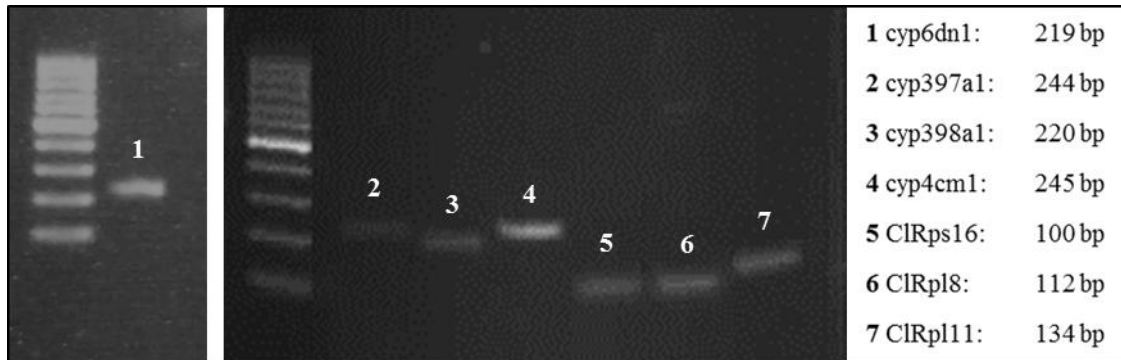


Abb. 34: PCR-Produkte der CYP- und Referenz-Gene. Durch den Einsatz der Primerpaare für die Referenzgene *rps16*, *rpl8* und *rpl11* und den vier Genen *cyp397a1*, *cyp398a1*, *cyp4cm1* und *cyp6dn1* wurden je ein 100 bp, 112 bp, 134 bp, 244 bp, 220 bp, 245 bp bzw. 219 bp langes cDNA-Molekül amplifiziert. Als Template dienten für diese PCR aufgereinigte Plasmid-DNAs mit cDNA-Inserts, die aus dem wirkstoffsensiblen UBA-Stamm kloniert wurden.

Der C_q und die RFU sämtlicher Amplifikationskurven der CYP-cDNA *cyp4cm1*, *cyp6dn1*, *cyp397a1*, *cyp398a1* und der Referenz-cDNA *rpl8*, *rpl11*, *rps16* sind im Anhang unter Punkt 8.2 angegeben. Am Beispiel des UBA-Stamms sind in Abbildung 35 repräsentative Amplifikationskurven eines Gens mit dem niedrigsten und dem höchsten C_q-Wert dargestellt, alle weiteren Amplifikationskurven lagen dazwischen.

Die Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse zeigen (Abb. 36), dass die Schmelztemperaturen (T_m) der Referenz-cDNA *rpl8*, *rpl11* sowie *rps16* bei $T_m = 80\text{ °C}$, $83,6\text{ °C}$ bzw. $83,5\text{ °C}$ und die der CYP cDNA *cyp4cm1*, *cyp6dn1*, *cyp397a1* sowie *cyp398a1* bei $T_m = 81,2\text{ °C}$, $84,5\text{ °C}$, $80,8\text{ °C}$ bzw. 82 °C liegen (Abb. 36). Abbildung 36 zeigt zudem, dass Verunreinigungen durch genomische DNA oder Primer-Dimere ausgeschlossen werden konnten, da neben den erwarteten Peaks der Schmelzkurven der RT-PCR-Amplifikate keine weiteren Peaks auftraten.

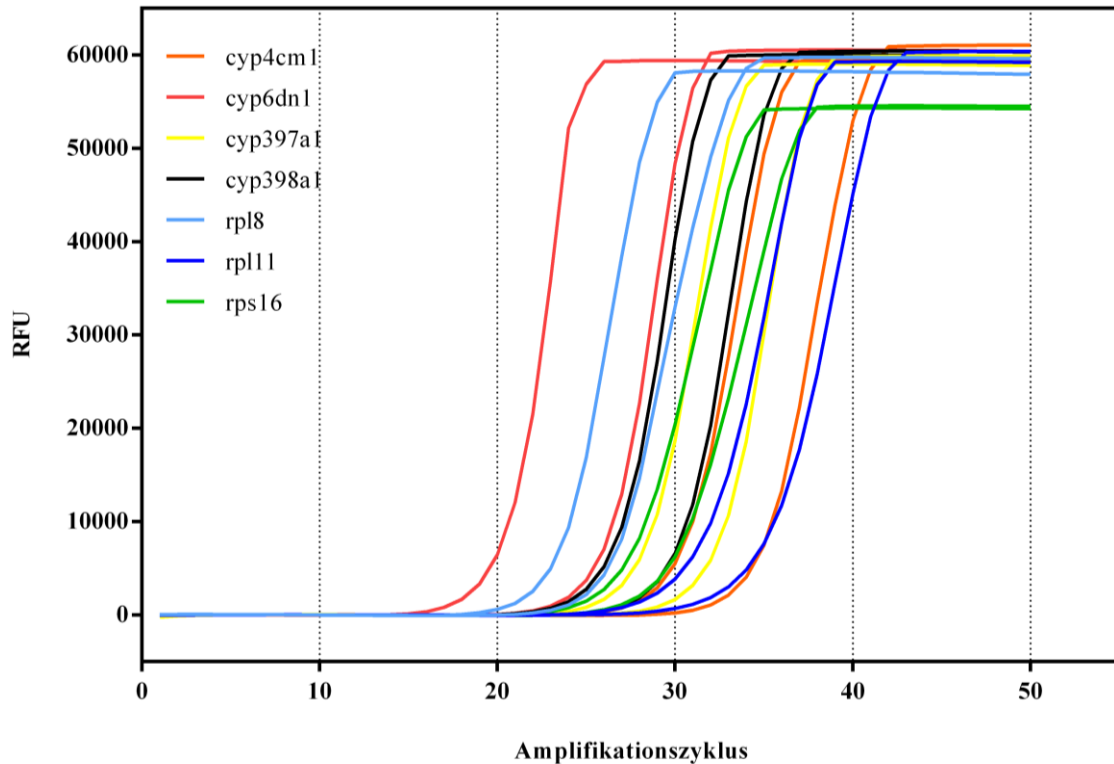


Abb. 35: qRT-PCR Amplifikationskurven der CYP-cDNA *cyp4cm1*, *cyp6dn1*, *cyp397a1*, *cyp398a1* und der Referenz-cDNA *rpl8*, *rpl11*, *rps16* am Beispiel des UBA-Stamms. Dargestellt sind die Amplifikationskurven mit dem jeweils niedrigsten und höchsten C_q-Wert. **RFU:** Relative Fluoreszenzeinheit.

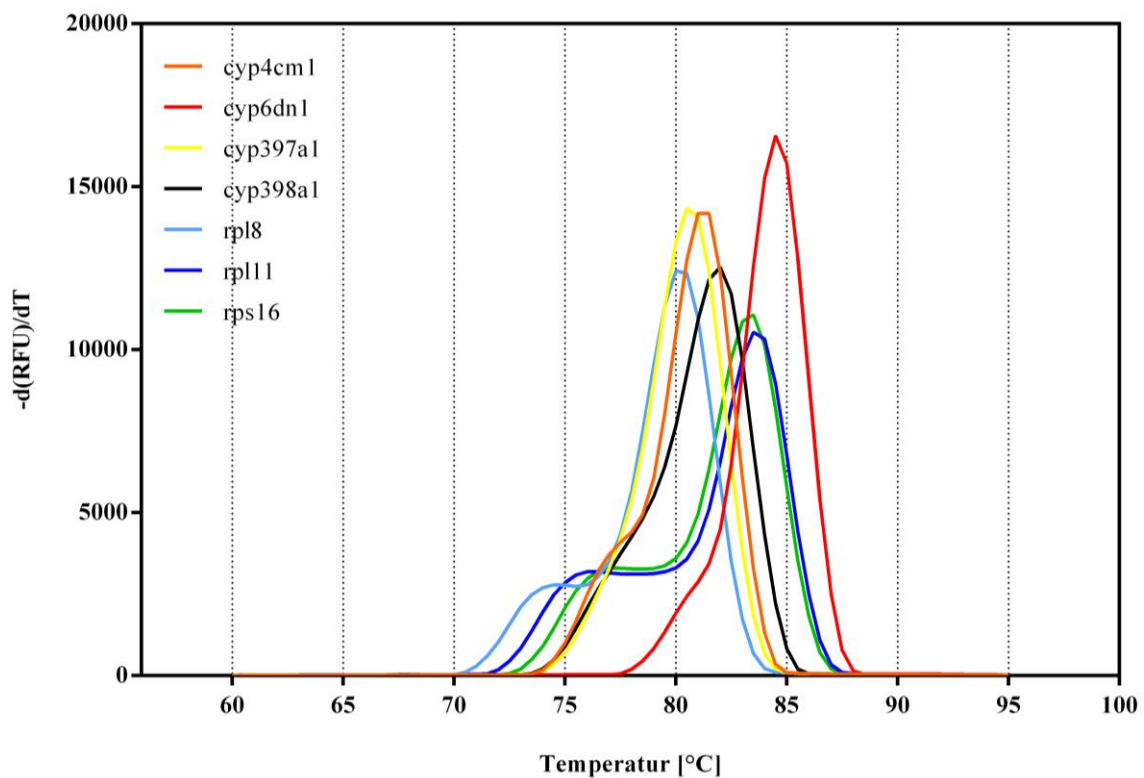


Abb. 36: Peaks der Schmelzkurven der CYP-cDNA *cyp4cm1*, *cyp6dn1*, *cyp397a1*, *cyp398a1* und der Referenz-cDNA *rpl8*, *rpl11*, *rps16* am Beispiel des UBA-Stamms aus repräsentativen qRT-PCRs. **-d(RFU)/dT:** erste negative Ableitung der Fluoreszenz in Abhängigkeit zur Temperatur.

3.8 Tauglichkeit der Referenzgene

Die Tauglichkeit der Referenzgene für die relative Quantifizierung der mRNA-Expression der vier untersuchten CYP-Gene wurde mit dem Excel-basierten Datenerfassungstool BestKeeper überprüft (Tab. 9 und 10). Die Ergebnisse der deskriptiven Statistik der drei untersuchten Referenzgene ($n = 3$) mit jeweils 95 untersuchten Cq-Werten zeigen (Tab. 9), dass *rpl8* $\pm 1,73$ fach, *rpl11* $\pm 2,11$ fach und *rps16* $\pm 1,93$ fach hoch bzw. herunter reguliert wurden. Somit waren die Variationen der Expressionen der Cq-Werte (SD [\pm Cq]) von *rpl8* mit 0,82 am niedrigsten und von *rpl11* mit 1,12 am höchsten. Die Variation der Expression von *rps16* lag mit 0,99 dazwischen. Damit hatte der aus dem geometrischen Mittel der Cq-Werte der drei Referenzgene kalkulierte BestKeeper Index eine SD [\pm Cq] von 0,92 Zyklen. Da *rpl11* höhere Variationen in den Cq-Werten aufzeigte als die anderen beiden Referenzgene und damit die maximal empfohlene SD [\pm Cq] von 1 überschritten hatte, wurde eine zweite Berechnung ohne *rpl11* durchgeführt. Durch den Ausschluss von *rpl11* ($n = 2$) sank die Variation des BestKeeper Index auf eine SD [\pm Cq] von 0,87 Zyklen.

Tab. 9: Deskriptive Statistik der drei Referenzgene *rps16*, *rpl8* und *rpl11*. Die Berechnung erfolgte auf Basis der Cq-Werte von je einer Probe des Doppelansatzes (pro Gen und Bettwanze) mit dem Excel-basierten Datenerfassungstool BestKeeper. Der BestKeeper-Index wurde mit denselben Parametern für alle drei Referenzgene (*rpl8*, *rpl11*, *rps16*; $n = 3$) und ohne *rpl11* (*rpl8*, *rps16*; $n = 2$) berechnet.

	<i>rpl8</i>	<i>rpl11</i>	<i>rps16</i>	BestKeeper ($n = 3$)	BestKeeper ($n = 2$)
	Daten der Referenzgene ($n = 3$)				
Anzahl	95	95	95	95	95
GM [Cq]	25,73	35,40	29,37	29,91	27,49
AM [Cq]	25,75	35,42	29,40	29,93	27,51
Min [Cq]	23,18	33,11	26,28	27,23	24,68
Max [Cq]	28,78	39,70	32,99	33,27	30,82
SD [\pm Cq]	0,82	1,12	0,99	0,92	0,87
CV [% Cq]	3,17	3,16	3,35	3,08	3,17
Min [x-fach]	-5,48	-3,14	-6,15	5,88	6,73
Max [x-fach]	7,72	8,63	8,39	9,29	9,59
SD [\pm x-fach]	$\pm 1,73$	$\pm 2,11$	$\pm 1,93$	$\pm 1,84$	$\pm 1,81$

Erläuterungen: **Anzahl:** untersuchte Bettwanzenproben; **GM [Cq]:** Geometrisches Mittel der Cq-Werte; **AM [Cq]:** Arithmetisches Mittel der Cq-Werte, **Min [Cq]** und **Max [Cq]:** Extrema der Cq-Werte; **SD [\pm Cq]:** Standardabweichung der Cq-Werte; **CV [% Cq]:** Variationskoeffizient, angegeben als Prozentsatz der Cq-Werte; **Min [x-fach]** und **Max [x-fach]:** Extrema der Expressionslevel, angegeben als ein Koeffizient der absoluten x-fachen Über- oder Unterregulation; **SD [\pm x-fach]:** Standardabweichung des Koeffizienten der absoluten Regulation.

Die Korrelation der Referenzgene untereinander und zum BestKeeper Index wurde mit einer paarweisen Korrelationsanalyse und einer anschließenden Regressionsanalyse berechnet (Tab. 10). Die Ergebnisse des Vergleichs der drei Referenzgene in der Korrelationsanalyse zeigen zwischen *rpl8* und *rpl11*, *rpl8* und *rps16* sowie *rpl11* und *rps16* mit $r = 0,869$, $r = 0,870$ bzw. $r = 0,819$ eine mit $p = 0,001$ für alle Berechnungen signifikante Korrelation untereinander (Tab. 10 A). Beim Vergleich der drei Referenzgene mit dem BestKeeper Index bestand mit $r = 0,962$ für *rpl8*, $r = 0,942$ für *rpl11* und $r = 0,945$ für *rps16* ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang ($p = 0,001$). Auch die Ergebnisse der Regressionsanalyse zeigen, dass für *rpl8* 93 % und für *rpl11* sowie *rps16* jeweils 89 % der Variationen durch das Modell erfasst wurden.

Tab. 10: Wiederholte paarweise Korrelationsanalyse der drei Referenzgene *rps16*, *rpl8* und *rpl11*. **A** innerhalb der drei Referenzgene (RG) sowie zwischen dem BestKeeper-Index ($n = 3$) und den Referenzgenen sowie **B** ohne *rpl11* innerhalb der zwei Referenzgene sowie zwischen dem BestKeeper- Index ($n = 2$) und den Referenzgenen.

A	Paarweise Korrelationsanalyse ($n = 3$)			B	Paarweise Korrelationsanalyse ($n = 2$)	
vs.	<i>rpl8</i>	<i>rpl11</i>	<i>rps16</i>	vs.	<i>rpl8</i>	<i>rps16</i>
<i>rpl11</i>	0,869	-	-	<i>rps16</i>	0,870	-
p-Wert	0,001	-	-	p-Wert	0,001	-
<i>rps16</i>	0,870	0,819	-	-	-	-
p-Wert	0,001	0,001	-	-	-	-
BestKeeper vs.	<i>rpl8</i>	<i>rpl11</i>	<i>rps16</i>	BestKeeper vs.	<i>rpl8</i>	<i>rps16</i>
r	0,962	0,942	0,945	r	0,966	0,968
p-Wert	0,001	0,001	0,001	p-Wert	0,001	0,001
Regressionsanalyse ($n = 3$)				Regressionsanalyse ($n = 2$)		
RG vs. BestKeeper (Index aus 3 RG)				RG vs. BestKeeper (Index aus 2 RG)		
	<i>rpl8</i>	<i>rpl11</i>	<i>rps16</i>		<i>rpl8</i>	<i>rps16</i>
r	0,962	0,942	0,945	r	0,966	0,968
r²	0,925	0,887	0,893	r²	0,933	0,937
Schnittpunkt [Cq]	-0,115	1,385	-1,017		0,614	-0,726
Steigung [Cq]	0,864	1,137	1,016		0,914	1,095
SE [Cq]	±0,284	±0,468	±0,405		±0,268	±0,311
p-Wert	0,001	0,001	0,001	p-Wert	0,001	0,001

Erläuterungen: **r**: Pearson Korrelationskoeffizient; **r²**: Determinationskoeffizient; **SE**: Standardfehler.

Die Korrelationsanalyse ohne *rpl11* ($n = 2$) zeigte mit $r = 0,870$ denselben signifikanten Zusammenhang ($p = 0,001$) zwischen *rpl8* und *rps16* (Tab. 10 B) wie zuvor. Im Vergleich zur Korrelationsanalyse mit allen drei Referenzgenen korrelierten *rpl8* mit $r = 0,966$ und *rps16* mit $r = 0,968$ in dieser Analyse etwas besser mit dem BestKeeper Index. Der p-Wert war mit 0,001 gleich geblieben. Auch die Ergebnisse der Regressionsanalyse zeigen mit 93,3 % für *rpl8* und 93,7 % für *rps16*, dass in diesem Modell 0,8 % bzw. 4,4 % mehr Variationen erfasst wurden.

Aufgrund der geringen Unterschiede zwischen beiden Modellen wurden für die mRNA-Expressionsanalyse alle drei Referenzgene verwendet.

3.9 Effizienz der qRT-PCR

Die genspezifischen PCR-Effizienzen wurden anhand verschiedener Verdünnungen von Plasmid-Standards bestimmt, welche in jedem Lauf mit analysiert wurden. Die Amplifikationskurven dieser Standards sind in Abbildung 37 am Beispiel des UBA-Stamms für das Gen *cyp397a1* dargestellt. Da die Cq-Werte von der Startkopienzahl in jeder Probe abhängig waren, hatten Verdünnungen mit hohen Konzentrationen niedrige Cq-Werte und niedrige Konzentrationen dementsprechend hohe Werte. Dadurch konnte das Gerät eine Regressionsgerade generieren, in der die Cq-Werte über den logarithmisch transformierten Anfangskonzentrationen der Verdünnungsreihe abgebildet wurden. Über die Steigungen der linearen Funktionen der Referenz- und CYP-Gene (Abb. 38) konnten mit Formel (a) die Effizienzen der Amplifikationen berechnet werden. Mit Formel (b) wurden die prozentualen Effizienzen berechnet.

$$\text{a) } E = 10^{\left[\frac{-1}{\text{Steigung}}\right]} \qquad \text{b) } E \% = (E - 1) \times 100$$

Die Effizienz bei der Amplifikation der Referenz-cDNA (Abb. 38) war bei *rpl8* mit $E = 97,7$ % am größten, gefolgt von *rps16* mit $E = 80,3$ % und bei *rpl11* mit $E = 64,7$ % am geringsten. Der Determinationskoeffizient zeigt außerdem, dass für *rpl8* 99,86 %, für *rps16* 99,80 % und für *rpl11* 99,76 % der Variationen durch das Modell erfasst wurden. Zudem besteht innerhalb der Referenz-cDNA *rpl8* mit $r = 0,9993$ sowie *rps16* und *rpl11* mit je $r = 0,9991$ ein fast vollständig positiver linearer Zusammenhang zwischen den Cq-Werten und den logarithmisch transformierten (Log) Kopienzahlen der Verdünnungsreihen.

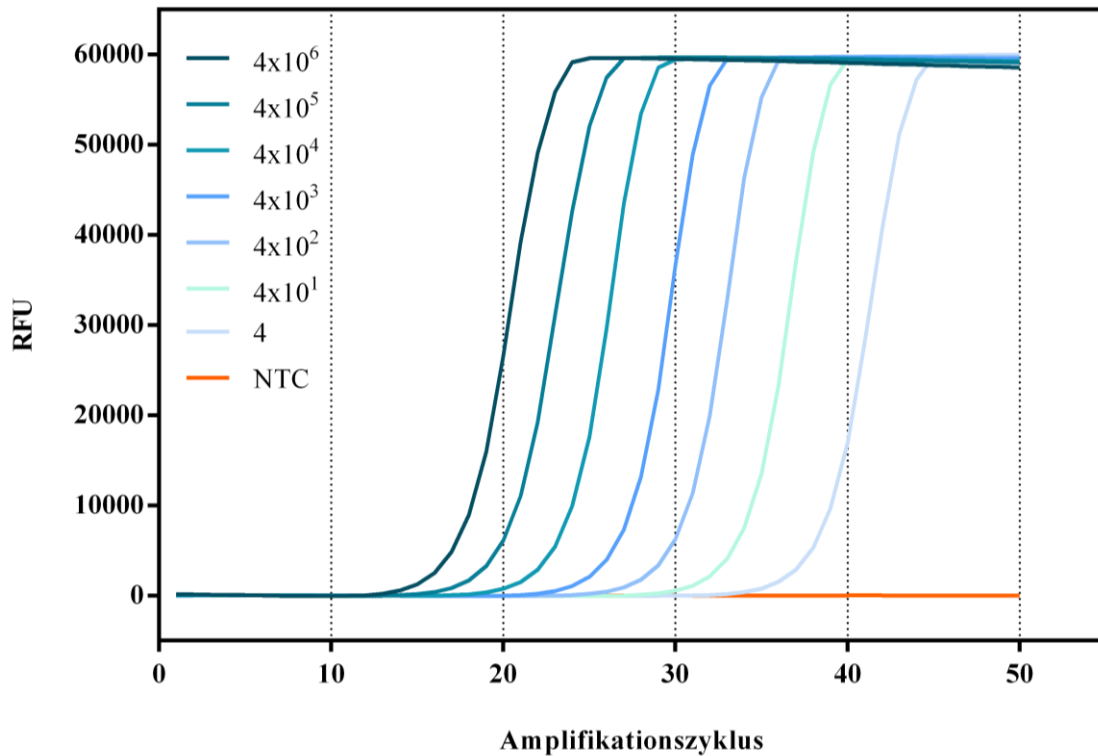


Abb. 37: Amplifikationskurven des Plasmid-Standards (4×10^6 bis 4 Kopien), und der negativen Reagenzienkontrolle (NTC) am Beispiel der CYP-cDNA *cyp397a1* des wirkstoffsensiblen UBA-Stamms. **RFU:** Relative Fluoreszenzeinheit.

Die Effizienz der Amplifikation der untersuchten CYP-cDNA (Abb. 38) war bei *cyp397a1* mit $E = 96,9\%$ am größten und bei *cyp4cm1* mit $E = 84,4\%$ am geringsten. Die Effizienzen von *cyp398a1* und *cyp6dn1* lagen mit $E = 96,4\%$ und $E = 90,6\%$ dazwischen. Bei *cyp4cm1*, *cyp398a1*, *cyp6dn1* bzw. *cyp397a1* wurden $99,92\%$, $99,74\%$, $99,59\%$ bzw. $98,81\%$ der Variationen durch das Modell erfasst. Innerhalb der CYP-cDNA *cyp4cm1* mit $r = 0,9996$, *cyp398a1* mit $r = 0,9987$, *cyp6dn1* mit $r = 0,9979$ und *cyp397a1* mit $r = 0,9940$ bestand ebenfalls ein annähernd vollständiger linearer Zusammenhang zwischen C_q-Werten und der Log-Kopienzahl der Plasmid-Standards.

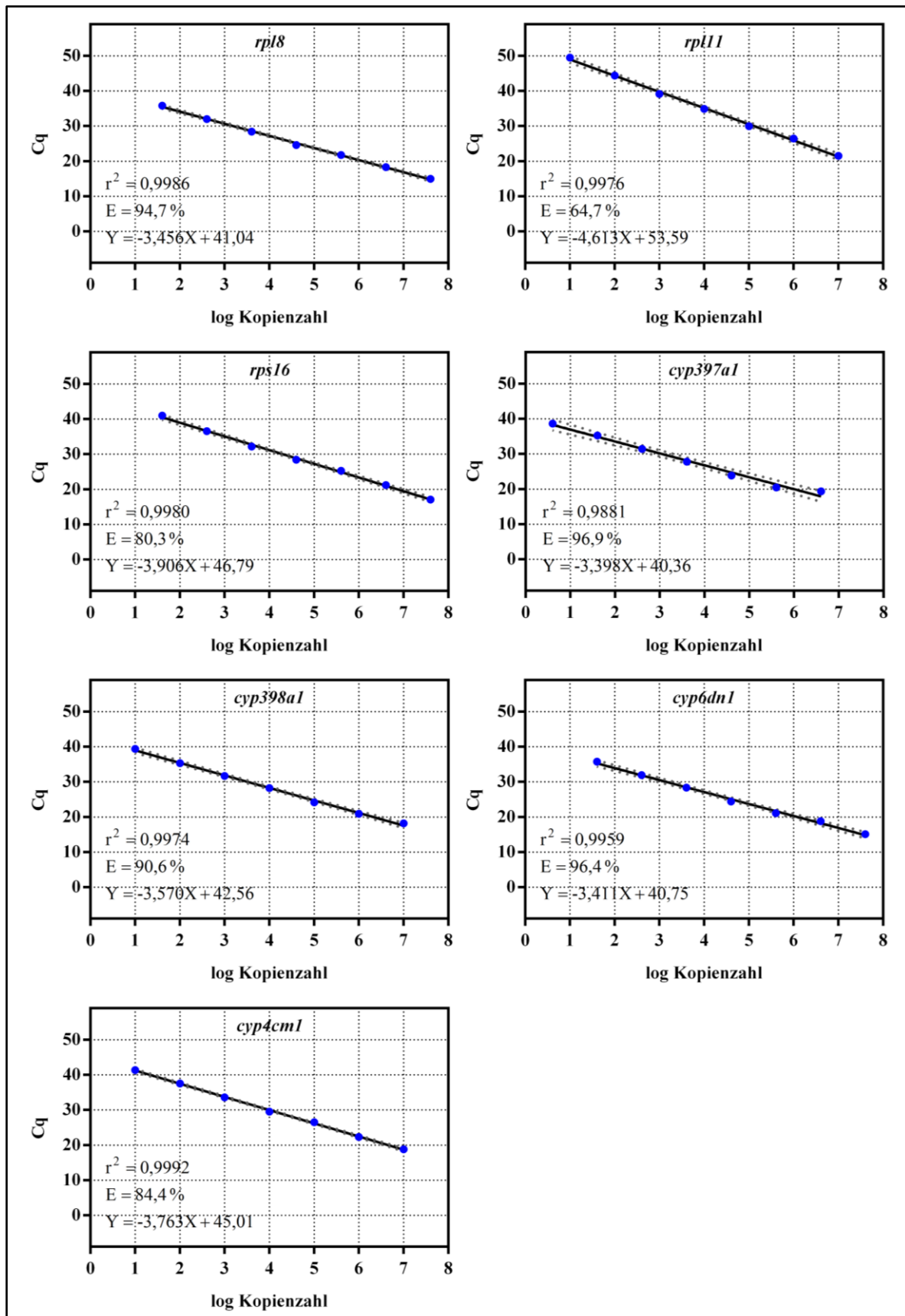


Abb. 38: Regressionsgeraden der Plasmid-Standards der Referenzgene *rpl8*, *rpl11* und *rps16* sowie der CYP-Gene *cyp397a1*, *cyp398a1*, *cyp6dn1* und *cyp4cm1*. Es wurden die Mittelwerte der Doppelansätze mit der Standardabweichung und die 95 %-Konfidenzlinien (gepunktete Linie) am Beispiel des UBA-Stamms aufgetragen. Für jedes Gen sind der Determinationskoeffizient (r^2), die Effizienz (E) und die Geradengleichung angegeben.

3.10 Expression der mRNAs für die Cytochrom P450-Gene *cyp397a1*, *cyp398a1*, *cyp4cm1* und *cyp6dn1*

Zur Detektion erhöhter Transkriptlevel der vier CYP-Gene *cyp397a1*, *cyp398a1*, *cyp4cm1* und *cyp6dn1* wurde die RNA von je zehn männlichen Bettwanzen der Stämme UBA, SK, AS, OB, LB, HO, GW, T und CC einzeln isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR untersucht. In den Stämmen HO, SK, AS, GW und T wurden für das CYP-Gen *cyp397a1* dem UBA-Stamm gegenüber signifikant erhöhte mRNA-Expressionslevel nachgewiesen. Der T-Stamm wies als einziger Stamm einen signifikant erhöhten Transkriptlevel für *cyp397a1* und *cyp398a1* auf. Sämtliche Daten zu den mRNA-Expressionsanalysen befinden sich im Anhang unter Punkt 8.3 (Tab. 14-20).

Die mRNA-Expressionsanalyse von den zehn untersuchten männlichen Bettwanzen pro Stamm zeigt (Abb. 39), dass die durchschnittlichen Transkriptlevel des Gens *cyp397a1* in den fünf Bettwanzenfeldstämmen mit 7,1 für den HO-Stamm ($p = 0,0421$), 17,3 für den SK-Stamm ($p = 0,0009$), 17,5 für den AS-Stamm ($p = 0,0011$), 56 für den GW-Stamm ($p < 0,0001$) und mit 44,9 für den T-Stamm ($p < 0,0001$) signifikant höher waren als im sensiblen UBA-Stamm mit 1,3. Die mRNA-Expressionslevel von *cyp397a1* waren in den Stämmen CC, LB und OB mit 4,9 ($p = 0,6584$), 5,1 ($p = 0,6115$) bzw. 5,3 ($p = 0,3131$) nicht signifikant höher als beim UBA-Stamm. Der durchschnittliche Transkriptlevel von *cyp398a1* war bei dem T-Stamm mit 4,9 ($p = 0,0042$) in Relation zum UBA-Stamm mit 1,4 signifikant höher. Für die anderen Feldstämme AS mit 1,3 ($p > 0,9999$), CC mit 0,5 ($p = 0,102$), GW mit 2,5 ($p = 0,8458$), HO mit 1,8 ($p > 0,9999$), LB mit 1,4 ($p > 0,9999$), OB mit 1,2 ($p > 0,9999$) und SK mit 2 ($p > 0,9999$) lagen die durchschnittlichen mRNA-Expressionslevel dieses Gens nicht signifikant über dem des UBA-Stamms. Die Unterschiede der Transkriptlevel des CYP Gens *cyp6dn1* bei den Feldstämmen AS mit 2,1 ($p = 0,7452$), CC mit 1,3 ($p > 0,9999$), GW mit 2,3 ($p = 0,8595$), HO mit 1,1 ($p > 0,9999$), LB ($p = 0,104$) und OB ($p = 0,2118$) mit jeweils 0,5, SK mit 0,9 ($p > 0,9999$) bzw. T mit 1,5 ($p > 0,9999$) und dem UBA-Stamm mit 1,1 waren ebenfalls nicht signifikant. Auch bei der Untersuchung das Gens *cyp4cm1* gab es zwischen den Feldstämmen AS mit 1,1 ($p > 0,9999$), CC mit 0,5 ($p = 0,8463$), GW mit 2,4 ($p = 0,8151$), HO mit 0,8 ($p > 0,9999$), LB mit 0,6 ($p > 0,9999$), OB mit 0,9 ($p > 0,9999$), SK mit 2,5 ($p > 0,9999$) bzw. T mit 1,6 ($p = 0,7055$) und dem sensiblen UBA-Stamm mit 1,1 im Durchschnitt keinen signifikanten Unterschied zwischen den mRNA-Expressionslevel.

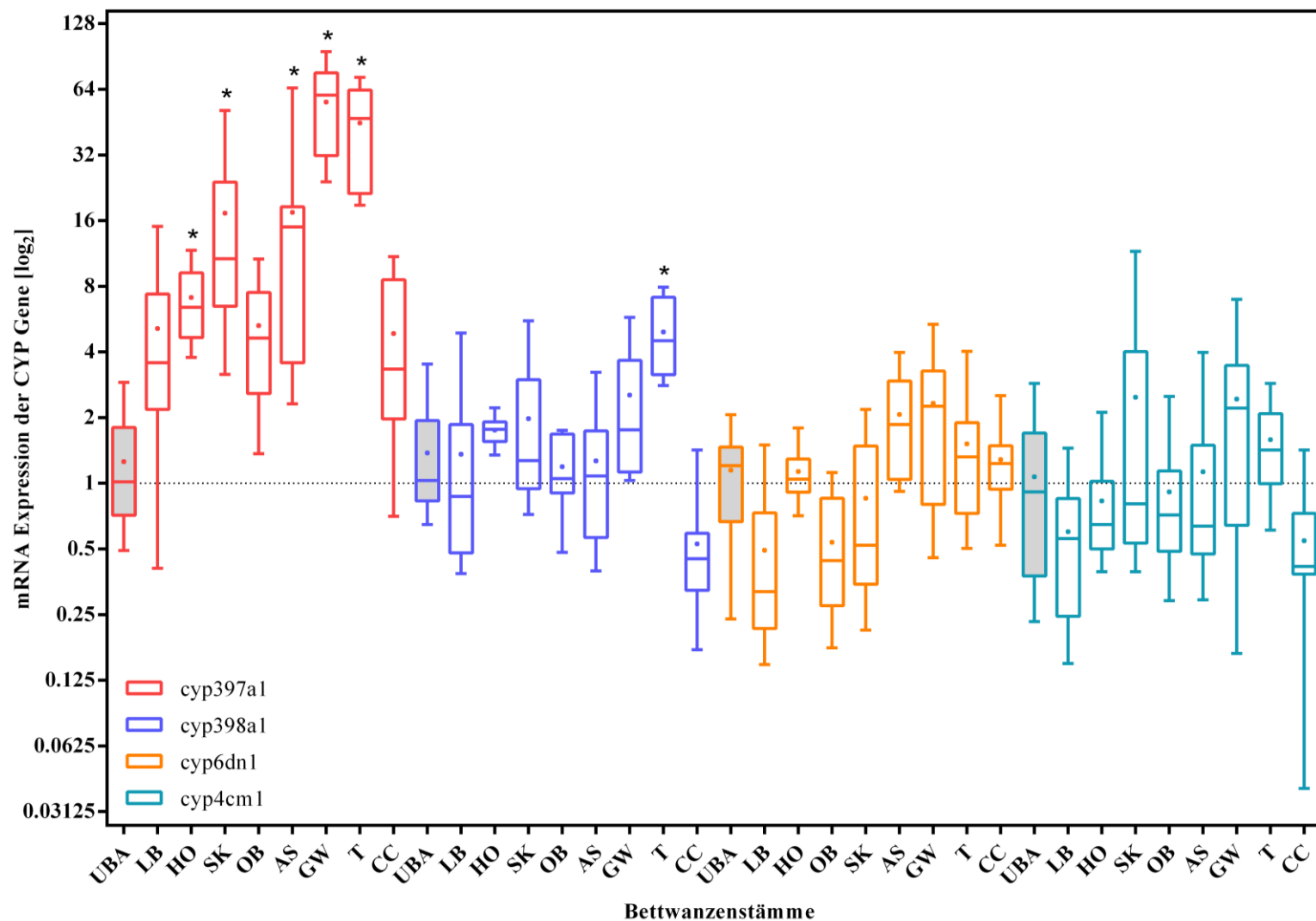


Abb. 39: mRNA-Expression der CYP-Gene *cyp397a1*, *cyp398a1*, *cyp6dn1* und *cyp4cm1* relativ zu den Referenzgenen *rpl8*, *rpl11* und *rps16*. Die Transkriptlevel der Feldstämme LB, HO, SK, OB, AS, GW und T, sowie des CC-Laborstamms wurden mit einer Kruskal-Wallis-Rangvarianzanalyse und dem Dunn Post-hoc-Test auf signifikante Unterschiede ($\alpha = 0,05$) relativ zum sensiblen UBA-Stamm (grau) untersucht.

3.11 Wirksamkeit von Kontaktinsektiziden gegen *C. lectularius*

Der Wahlversuch wurde als praxisnahes Testsystem für die Überprüfung der Wirksamkeit von Kontaktinsektiziden gegen Bettwanzen entwickelt. Die Prüftiere werden von einer Reizquelle aus einer Kombination von CO₂ und Wärme angelockt und können gemäß ihres natürlichen Verhaltens über mit Insektizid behandelte Oberflächen laufen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Wahlversuch um ein neues Kastensystem erweitert. Im Gegensatz zum vorherigen Versuchsaufbau erlaubt es durch seine Konstruktion auch die Prüfung unflexibler Prüfoberflächen. Um die Funktionalität des neuen Wahlversuchdesigns zu testen, wurde die Wirksamkeit der Kontaktinsektizide A (Alphacypermethrin) und B (Bendiocarb) auf den Prüfoberflächen Tapete, Teppich, Sperrholz und Hornitex[®] an jeweils 100 Bettwanzen im gleichen Geschlechterverhältnis in je drei Replikaten untersucht.

Zusammenhänge innerhalb der Wahl- und Zwangsversuche wurden mit der mid-p-Variante des Exakten Vierfeldertafeltests nach Fisher berechnet ($\alpha = 0,05$) und mittels der Bonferroni-Holm-Prozedur korrigiert. Sämtliche korrigierte p-Werte aus den Wahl- und Zwangsversuchen (UBA) befinden sich im Anhang unter den Punkten 8.4 und 8.5. Bei einigen Untersuchungen wurden zusätzlich die Einflüsse der erklärenden Variablen (Stamm, Geschlecht, Insektizid, Prüfoberflächen, Belagsalterung der Prüfoberflächen, Kontrolltag und Einwirkzeit) auf die Zielvariable (schwere Schädigung von *C. lectularius*) mittels binärer logistischer Regression berechnet. Sämtliche relevante Werte befinden sich im Anhang unter den Punkten 8.4 und 8.5. Die Kontrollmortalität lag in allen Versuchen unter 5 %, weshalb keine weiteren Korrekturen vorgenommen werden mussten.

3.11.1 Wirksamkeit von Insektizid A und B auf den sensiblen UBA-Stamm im Wahlversuch

Im Wahlversuch zeigen die Ergebnisse der beiden Berechnungsvarianten, dass zum Zeitpunkt 7 d p.a. nach Betrieb der Versuchsanlagen mit Insektizid A unabhängig von den Prüfoberflächen und der Belagsalterung signifikant mehr Bettwanzen schwer geschädigt waren als nach Betrieb mit Insektizid B. Zudem konnte unter der Verwendung von Insektizid A bei allen Prüfoberflächen zwischen den drei getesteten Belagsalterungen kein Unterschied in der Schädigungsrate von *C. lectularius* beobachtet werden. Unter der Verwendung von Insektizid B konnten im Gegensatz zu Insektizid A keine Unterschiede in der Schädigungsrate zwischen der Wirksamkeitskontrolle 24 h p.a. und 7 d p.a. festgestellt werden, unabhängig von der ver-

wendeten Prüfoberfläche und deren Belagsalterung. Zudem konnten zwischen einigen Prüfoberflächen Unterschiede in den Schädigungsraten beider Insektizide festgestellt werden. In den Wahlversuchen waren außerdem zum Zeitpunkt 7 d p.a. mehr Männchen schwer geschädigt als Weibchen.

3.11.1.1 Berechnung mittels mid-p-Variante des Exakten Vierfeldertafeltests nach Fisher

In der Wirksamkeitskontrolle nach Betrieb der Versuchsanlagen mit Insektizid A auf Tapete ohne (kB), mit einer (1WB) bzw. zwei Wochen (2WB) Belagsalterung (Abb. 40, Tapete) lag die prozentuale schwere Schädigung der gelaufenen Bettwanzen nach 24 h p.a. bei 99 %, 100 % und 96 %. An Tag 7 p.a. waren jeweils 100 % der Tiere schwer geschädigt. Zum Zeitpunkt 24 h p.a. waren nach zwei Wochen Belagsalterung signifikant weniger ($p = 0,0245$) Bettwanzen schwer geschädigt als 7 d p.a. Die Unterschiede zwischen den beiden Zeitpunkten der Wirksamkeitskontrolle waren bei frisch eingesprühten und einer Woche gealterten Tapeten nicht signifikant (s. Anhang, Tab. 22).

Zudem zeigen die Ergebnisse, dass es in dieser und allen weiteren mit Insektizid A untersuchten Versuchsanordnungen zwischen den Belagsalterungen innerhalb dieser Versuchsanordnungen zum Zeitpunkt 7 d p.a. keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl schwer geschädigter *C. lectularius* gab (s. Anhang, Tab. 21).

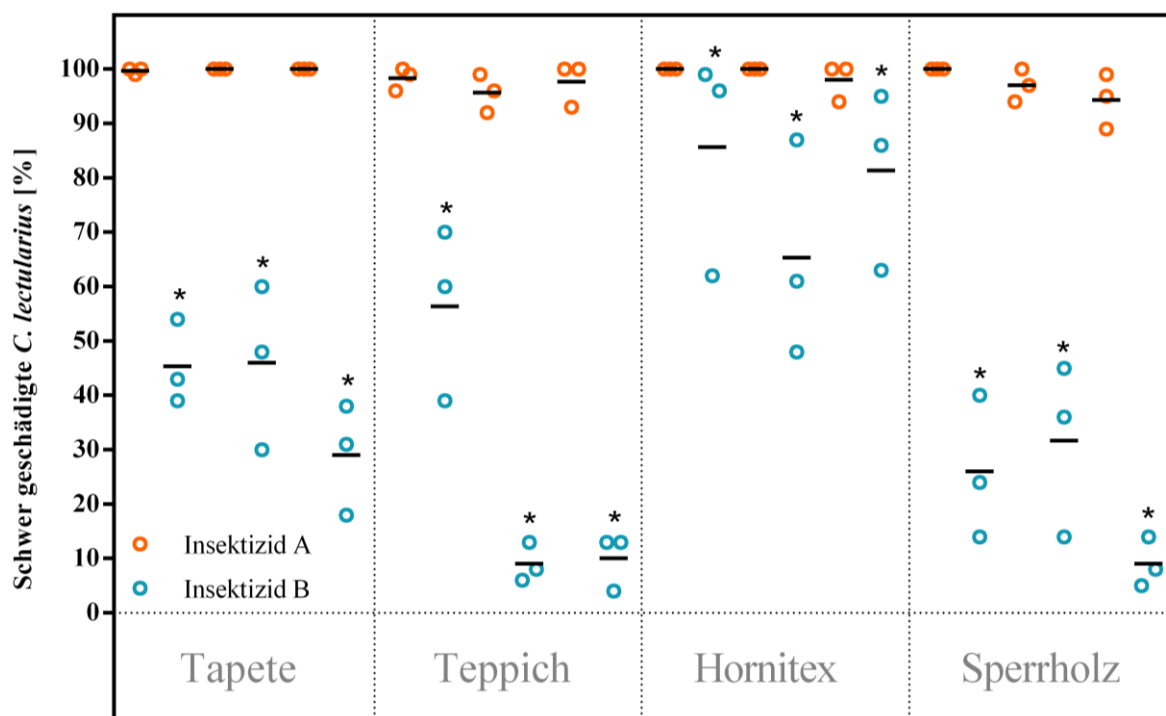
Eine Eiablage fand während der Wirksamkeitskontrollen zu keinem Zeitpunkt statt.

In der Wirksamkeitskontrolle nach Betrieb der Versuchsanlagen mit Insektizid B auf Tapete gab es in dieser und allen weiteren mit Insektizid B untersuchten Versuchskombinationen zwischen den Zeitpunkten 24 h p.a. und 7 d p.a. keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl schwer geschädigter *C. lectularius* des UBA-Stamms (s. Anhang, Tab. 22).

Bei Insektizid B auf Tapete (Abb. 40, Tapete) waren zum Zeitpunkt 7 d p.a. bei den Belagsalterungen kB 46 %, 1WB 47 % und 2WB 29 % der Tiere schwer geschädigt. Die Unterschiede in der Anzahl schwer geschädigter *C. lectularius* zwischen keiner und einer bzw. zwei Wochen Belagsalterung waren an Tag 7 p.a. nicht signifikant (s. Anhang, Tab. 21), wohingegen der Unterschied zwischen einer und zwei Wochen Belagsalterung in der gleichen Versuchsanordnung mit 18 % weniger schwer geschädigten Tieren nach 2WB signifikant war ($p = 0,0322$).

Bei Insektizid B waren im Vergleich zu Insektizid A auf Tapete zum Zeitpunkt 7 d p.a. bei den Belagsalterungen kB 54 %, 1WB 28 % und 2WB 71 % weniger Tiere schwer geschädigt. Die Unterschiede in der Anzahl schwer geschädigter *C. lectularius* waren mit $p = 0,000012$ bei allen Belagsalterungen signifikant.

Zudem fand nach jedem Versuchsdurchlauf mit Insektizid B auf Tapete während der Wirksamkeitskontrolle eine Eiablage statt.



Oberflächen jeweils ohne, mit 1 Woche und 2 Wochen Belagsalterung

Abb. 40: Vergleich der Wirksamkeit der Insektizide A und B auf den Oberflächen Tapete, Teppich, Hornitex[®] und Sperrholz gegen *Cimex lectularius* des sensiblen UBA-Stamms im Wahlversuch zum Zeitpunkt 7 d p.a. Statistische Zusammenhänge wurden mit der mid-p-Variante des Exakten Tests nach Fisher untersucht und die p-Werte mittels Bonferroni-Holm-Prozedur korrigiert. Die Kreise geben die biologischen Replikate an, die Querlinie den Mittelwert. * $p < 0,05$.

Nach Betrieb der Versuchsanlagen mit Insektizid A auf Teppich ohne und mit einwöchiger Belagsalterung (Abb. 40, Teppich), waren am ersten Tag p.a. jeweils 100 % der gelaufenen *C. lectularius* schwer geschädigt. Zum Zeitpunkt 7 d p.a. konnte für beide Belagsalterungen eine Wiedererholung von 2 % bzw. 4 % der Tiere beobachtet werden. Auf Teppich mit zweiwöchiger Belagsalterung waren zu den Zeitpunkten 24 h p.a. bzw. 7 d p.a. 97 % bzw. 98 % der Bettwanzen schwer geschädigt. Die Unterschiede waren zwischen beiden Zeitpunkten in allen drei Belagsalterungen nicht signifikant (s. Anhang, Tab. 22).

Eine Eiablage fand während der Wirksamkeitskontrollen zu keinem Zeitpunkt statt.

Bei der Versuchsanordnung Insektizid B auf Teppich (Abb. 40, Teppich) waren zum Zeitpunkt 7 d p.a. bei kB 56 % und 1WB bzw. 2WB jeweils 9 % der Tiere schwer geschädigt. Die Unterschiede in der Anzahl schwer geschädigter *C. lectularius* zwischen kB und 1WB bzw. kB und 2WB waren an Tag 7 p.a. mit jeweils 47 % weniger schwer geschädigten Tieren bei beiden signifikant ($p = 0,000012$). Bei einer und zwei Wochen Belagsalterung in der gleichen Versuchsanordnung war die Anzahl schwer geschädigter Tiere zum Zeitpunkt 7 d p.a. gleich (s. Anhang, Tab. 21).

Bei Insektizid B waren im Vergleich zu Insektizid A auf Teppich zum Zeitpunkt 7 d p.a. bei den Belagsalterungen kB 44 % und 1WB bzw. 2WB jeweils 91 % weniger Tiere schwer geschädigt. Die Unterschiede in der Anzahl schwer geschädigter *C. lectularius* waren mit $p = 0,000012$ bei allen Belagsalterungen signifikant.

Zudem fand nach jedem Versuchsdurchlauf mit Insektizid B auf Teppich während der Wirksamkeitskontrolle eine Eiablage statt.

Wurde Insektizid A auf Hornitex[®] in der Versuchsanlage ohne, mit einer bzw. zwei Wochen Belagsalterung verwendet (Abb. 40, Hornitex[®]), waren bei den Wirksamkeitskontrollen an Tag 1 p.a. 100 %, 93 % bzw. 99 % und an Tag 7 p.a. 100 %, 96 % bzw. 100 % der gelaufenen Bettwanzen schwer geschädigt. Die Unterschiede waren zwischen beiden Zeitpunkten in allen drei Belagsalterungen nicht signifikant (s. Anhang, Tab. 22).

Im Gegensatz zu den Untersuchungen mit Insektizid A auf Tapete und Teppich, wurden in einem der drei Replikate mit Insektizid A auf Hornitex[®] mit 1WB und bei allen Replikaten bei 2WB Eier abgelegt.

Bei Insektizid B auf Hornitex[®] (Abb. 40, Hornitex[®]) waren zum Zeitpunkt 7 d p.a. bei den Belagsalterungen kB 84 %, 1WB 64 % und 2WB 82 % der Tiere schwer geschädigt. Die Unterschiede in der Anzahl schwer geschädigter *C. lectularius* zwischen kB und 1WB sowie 1WB und 2WB waren an Tag 7 p.a. mit $p = 0,000143$ bzw. $p = 0,0137$ signifikant. Dahingehend waren die Unterschiede zwischen kB und 2WB nicht signifikant (s. Anhang, Tab. 21).

Bei Insektizid B waren im Vergleich zu Insektizid A auf Hornitex[®] zum Zeitpunkt 7 d p.a. bei den Belagsalterungen kB 16 %, 1WB 34 % und 2WB 18 % weniger Tiere schwer geschädigt. Die Unterschiede in der Anzahl schwer geschädigter *C. lectularius* waren bei allen Belagsalterungen mit $p = 0,000012$ signifikant.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen mit Insektizid A auf Tapete und Teppich, wurden hier nur in je einem der drei Replikate mit Insektizid B auf Hornitex[®] ohne und mit 1WB sowie bei zwei Replikaten bei 2WB Eier abgelegt.

Nach Betrieb der Versuchsanlagen mit Insektizid A auf Sperrholz war die schwere Schädigungsrate der gelaufenen Bettwanzen bei kB und 1WB (Abb. 40, Sperrholz) nach 7 d p.a. jeweils 9 % und bei 2WB 15 % höher als zum Zeitpunkt 24 h p.a. Die Unterschiede waren zwischen beiden Zeitpunkten in allen drei Belagsalterungen für kB mit $p = 0,000038$, 1WB mit $p = 0,0053$ und 2WB mit $p = 0,000064$ signifikant.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen mit Insektizid A auf Tapete und Teppich, wurden in zwei der drei Replikate mit Insektizid A auf Sperrholz mit 1WB und bei allen Replikaten bei 2WB Eier abgelegt.

In der Wirksamkeitskontrolle nach Betrieb der Versuchsanlagen mit Insektizid B auf Sperrholz (Abb. 40, Sperrholz) waren an Tag 7 p.a. bei den Belagsalterungen kB 24 %, 1WB 29 % und 2WB 9 % der Tiere schwer geschädigt. Die Unterschiede in der Anzahl schwer geschädigter *C. lectularius* zwischen kB und 1WB waren an Tag 7 p.a. nicht signifikant (s. Anhang, Tab. 21). Wohingegen die Unterschiede zwischen kB und 2WB mit $p = 0,0137$ sowie 1WB und 2WB mit $p = 0,00013$ signifikant waren.

Bei Insektizid B waren im Vergleich zu Insektizid A auf Sperrholz zum Zeitpunkt 7 d p.a. bei den Belagsalterungen kB 76 % 1WB 68 % und 2WB 86 % weniger Tiere schwer geschädigt. Die Unterschiede in der Anzahl schwer geschädigter *C. lectularius* waren mit $p = 0,000012$ bei allen Belagsalterungen signifikant.

Zudem fand nach jedem Versuchsdurchlauf mit Insektizid B auf Teppich während der Wirksamkeitskontrolle eine Eiablage statt.

Vergleicht man die Anzahl schwer geschädigter *C. lectularius* nach Betrieb der Versuchsanlage mit Insektizid A auf Tapete und Teppich waren die Unterschiede zwischen den beiden Oberflächen zum Zeitpunkt 7 d p.a. in allen drei Belagsalterungen nicht signifikant. Dies galt ebenso für die Vergleiche zwischen den Oberflächen Tapete und Hornitex[®], Teppich und Sperrholz, bzw. Teppich und Hornitex[®] (s. Anhang, Tab. 21).

Die Unterschiede zwischen den beiden Oberflächen Tapete und Sperrholz bzw. Hornitex[®] und Sperrholz mit Insektizid A waren ohne und mit einer Woche Belagsalterung nach 7 d p.a. ebenfalls nicht signifikant (s. Anhang, Tab. 21). Nach zwei Wochen Belagsalterung war die Anzahl schwer geschädigter Tiere am Tag 7 p.a. auf Sperrholz jeweils um 5 % niedriger als

auf Tapete und Hornitex[®]. Die Unterschiede waren mit $p = 0,0307$ für Tapete und $p = 0,0248$ für Hornitex[®] signifikant.

Vergleicht man die Anzahl schwer geschädigter *C. lectularius* nach Betrieb der Versuchsanlage mit Insektizid B auf Tapete und Teppich waren an Tag 7 p.a. bei kB zunächst 10 % weniger Tiere auf der Prüfoberfläche Tapete schwer geschädigt, dagegen bei 1WB 38 % bzw. 2WB 20 % mehr Tiere auf Tapete schwer geschädigt. Die Unterschiede zwischen den beiden Oberflächen Tapete und Teppich waren für kB mit $p = 0,000012$, 1WB $p = 0,000012$ und 2WB $p = 0,000076$ signifikant.

Nach Betrieb der Versuchsanlagen mit Insektizid B auf Tapete und Hornitex[®] waren im Vergleich zur Tapete an Tag 7 p.a. bei den Belagsalterungen kB 38 %, 1WB 17 % und 2WB 53 % mehr Tiere auf Hornitex[®] schwer geschädigt. Die Unterschiede waren für kB und 2WB mit $p = 0,000012$ für beide signifikant, für 1WB nicht (s. Anhang, Tab. 21).

Beim Vergleich der Oberflächen Tapete und Sperrholz in der gleichen Versuchsanordnung waren zum Zeitpunkt 7 d p.a. auf Tapete in den drei Belagsalterungen kB 22 %, 1WB 43 % und 2WB 20 % mehr Bettwanzen schwer geschädigt als auf Sperrholz. Die Unterschiede waren für kB mit $p = 0,00026$, 1WB $p = 0,0202$ und 2WB $p = 0,00026$ signifikant.

Vergleicht man die Anzahl schwer geschädigter *C. lectularius* nach Betrieb der Versuchsanlage mit Insektizid B auf Teppich und Hornitex[®] waren an Tag 7 p.a. bei den Belagsalterungen kB 28 %, 1WB 55 % bzw. 2WB 73 % mehr Tiere auf Hornitex[®] schwer geschädigt. Die Unterschiede zwischen den beiden Oberflächen waren für alle drei Belagsalterungen mit $p = 0,000076$ signifikant.

Nach Betrieb der Versuchsanlage mit Insektizid B auf Teppich und Sperrholz waren an Tag 7 p.a. bei den Belagsalterungen kB zunächst 32 % weniger, bei 1WB 20 % mehr Tiere auf Sperrholz schwer geschädigt, und bei 2WB gab es mit jeweils 9 % schwer geschädigten *C. lectularius* zwischen beiden Oberflächen keinen Unterschied (s. Anhang, Tab. 21). Die Unterschiede zwischen den beiden Oberflächen waren für kB mit $p = 0,000012$ und 1WB $p = 0,000018$ signifikant.

Beim Vergleich der Oberflächen Sperrholz und Hornitex[®] in der gleichen Versuchsanordnung waren zum Zeitpunkt 7 d p.a. auf Hornitex[®] in den drei Belagsalterungen kB 60 %, 1WB 35 % und 2WB 73 % mehr Bettwanzen schwer geschädigt als auf Sperrholz. Die Unterschiede waren für kB mit $p = 0,00026$, 1WB $p = 0,0202$ und 2WB mit $p = 0,000012$ signifikant.

In allen mit Insektizid A untersuchten Versuchskombinationen gab es zum Zeitpunkt 7 d p.a. keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl schwer geschädigter weiblicher und männlicher *C. lectularius* des UBA-Stamms (Bsp. Abb. 41 A; weitere siehe Anhang unter Punkt 8.7, Abb. 66). Für die mit Insektizid B untersuchten Versuchskombinationen gab es an Tag 7 p.a. für die Prüfoberflächen Teppich, Hornitex[®] und Sperrholz in allen drei Belagsalterungen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl schwer geschädigter weiblicher und männlicher *C. lectularius* des UBA-Stamms. Bei Insektizid B auf Tapete waren bei kB 29 %, 1WB 44 % und 2WB 25 % mehr Männchen schwer geschädigt als Weibchen. Die Unterschiede waren mit $p = 0,0027$, $p = 0,000012$ bzw. $p = 0,02624$ signifikant (Abb. 41 B; weitere siehe Anhang unter Punkt 8.7, Abb. 68).

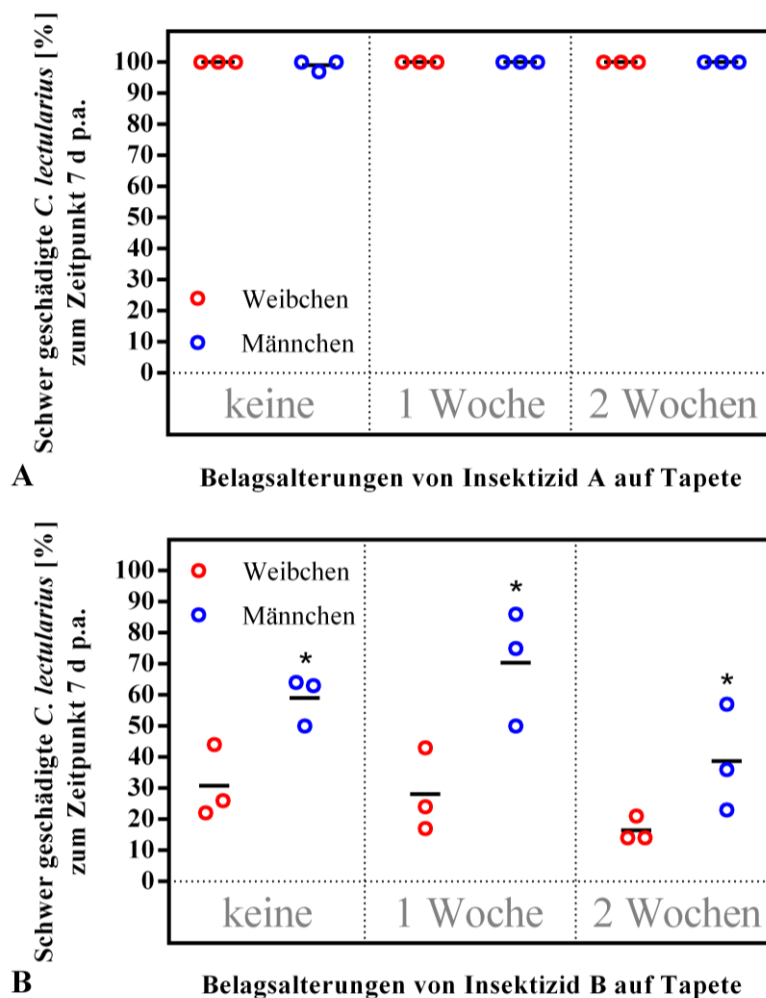


Abb. 41: Vergleich der Anzahl schwer geschädigter weiblicher und männlicher *Cimex lectularius* im Wahlversuch zum Zeitpunkt 7 d p.a. **A** unter der Verwendung von Insektizid A auf Tapete, **B** unter der Verwendung von Insektizid B auf Tapete. Statistische Zusammenhänge wurden mit der mid-p-Variante der Exakten Tests nach Fisher untersucht und die p-Werte mittels Bonferroni-Holm-Prozedur korrigiert. Die Kreise geben die biologischen Replikate an, die Querlinie den Mittelwert. * $p < 0,05$.

3.11.1.2 Berechnung mittels binärer logistischer Regression

Für den Wahlversuch zur Wirksamkeitsprüfung von Insektizid A und Insektizid B auf den verschiedenen Prüfoberflächen Tapete, Teppich, Hornitex[®] und Sperrholz, wurden zur weiteren statistischen Überprüfung zwei generalisierte lineare Modelle mit dem Statistikprogramm R berechnet. Das erste Modell wurde mit Interaktionen berechnet (s. Anhang, Tab. 24), das zweite ohne (s. Anhang, Tab. 26). In beiden wurde der Einfluss der erklärenden Variablen Insektizid, Prüfoberfläche, Belagsalterung, Geschlecht sowie Tag der Wirksamkeitskontrolle auf die Zielvariable schwere Schädigung untersucht. Die jeweiligen Referenzkategorien dieser erklärenden Variablen waren Insektizid A, die Prüfoberfläche Hornitex[®], keine Belagsalterung, Männchen sowie der erste Tag der Wirksamkeitskontrolle. Dabei hat sich das Modell mit Interaktionen, mit einem AIC von 6435,8, etwas besser an die vorliegenden Daten angepasst als das ohne Interaktionen mit einem AIC = 6793,2.

Die Effektkoeffizienten („odds ratios“, OR) beschreiben den Zusammenhang zwischen der Zielgröße schwere Schädigung und der Exposition von *C. lectularius* und sind für das Modell mit Interaktionen in Abbildung 42 dargestellt. Bei diesem Modell mit je einer Variable (Haupteffekte, Abb. 42 A) war die Chance beim Vergleich der Insektizide, dass unter der Verwendung von Insektizid B eine schwere Schädigung bei *C. lectularius* im Wahlversuch eintrat um den Faktor 0,0088 (95 % KI: 0,0005-0,04, $p = 0,0000027$) signifikant geringer als bei Insektizid A.

Beim Vergleich der verwendeten Oberflächen Sperrholz, Tapete und Teppich mit Hornitex[®] war die Chance auf eine schwere Schädigung bei der Oberfläche Sperrholz um den Faktor 0,039 (95 % KI: 0,002-0,2; $p = 0,001604$) signifikant geringer als bei Hornitex[®]. Der Unterschied zu Hornitex[®] war bei den Oberflächen Tapete ($p = 0,302$) und Teppich ($p = 0,1344$) nicht signifikant. Zudem überlappen sich die Konfidenzintervalle der einzelnen OR der drei gegen Hornitex[®] getesteten Prüfoberflächen, d.h. dass keine dieser Oberflächen sich signifikant in ihrem Einfluss auf die schwere Schädigung von *C. lectularius* unterscheiden. Die Chance, dass eine schwere Schädigung eintrat, war bei Oberflächen mit 1WB um den Faktor 0,048 (95 % KI: 0,003-0,2; $p = 0,003373$) signifikant geringer als bei frisch behandelten Oberflächen. Der Unterschied zwischen kB und 2WB war nicht signifikant ($p = 0,566$), ebenso wenig wie zwischen 1WB und 2WB (Überlappung der Konfidenzintervalle).

Zudem war die Chance auf schwere Schädigung für Weibchen um den Faktor 0,59 (95 % KI: 0,5-0,7; $p < 2 \times 10^{-16}$) signifikant geringer als für Männchen.

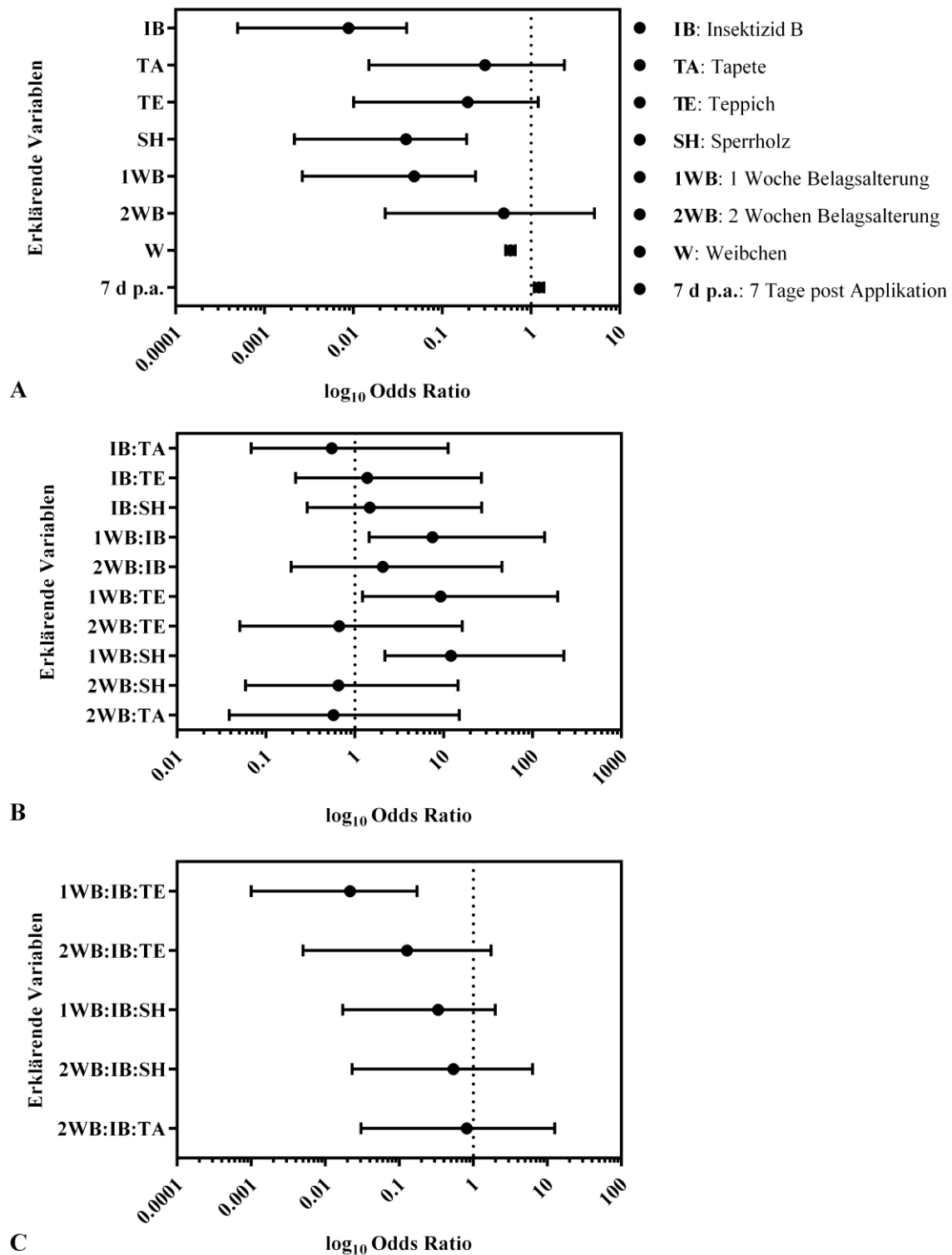


Abb. 42: Binäre logistische Regressionen der Ergebnisse aus den Wahlversuchen mit den Insektiziden A und B auf den Prüfoberflächen Tapete, Teppich, Sperrholz und Hornitex[®] gegen *Cimex lectularius* des wirkstoffsensiblen UBA-Stamms. Untersucht wurden die Einflüsse der erklärenden Variablen Insektizid, Prüfoberflächen, Belagsalterung der Prüfoberflächen, Geschlecht und Tag der Wirksamkeitskontrolle auf die Zielvariable schwere Schädigung von *C. lectularius*. Die jeweiligen Referenzkategorien der erklärenden Variablen waren Insektizid A, die Prüfoberfläche Hornitex[®], keine Belagsalterung, Männchen sowie der erste Tag der Wirksamkeitskontrolle. Berechnet wurde ein Modell mit Interaktionen mit jeweils: **A** einer Variablen, **B** zwei Variablen, **C** drei Variablen; AIC: 6435,8. Die Punkte geben die log₁₀ „odds ratios“ an, die Whisker das 95 % Konfidenzintervall.

Der Effekt des Tags der Wirksamkeitskontrolle auf die Zielvariable ist ebenfalls signifikant. Somit war die Chance auf eine schwere Schädigung am siebten Tag der Wirksamkeitskontrolle um den Faktor 1,23 (95 % KI: 1,089-1,396; $p = 0,000967$) höher als am ersten Tag der Wirksamkeitskontrolle.

Bei dem Modell mit Interaktion von je zwei Variablen (Interaktion, Abb. 42 B) haben die Interaktionen mit Insektizid B auf den Prüfoberflächen Tapete, Teppich oder Sperrholz mit einer oder zwei Wochen Belagsalterung keinen signifikanten Einfluss auf die Zielvariable schwere Schädigung. Die Interaktionen zwischen einer bzw. zwei Wochen Belagsalterung und den Prüfoberflächen Tapete (die Interaktion 1WB:TA konnte grafisch wegen zu breiter KI nicht dargestellt werden) bzw. Teppich hatten ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die Zielvariable. Allerdings hatte die Variable Sperrholz bei einer einwöchigen Belagsalterung einen signifikanten positiven Einfluss auf die Zielvariable (OR = 12; 95 % KI: 2,18-230; $p = 0,02$).

Bei dem Modell mit Interaktion von je drei Variablen (Interaktion, Abb. 42 C) hatte nur die Interaktion zwischen einer Woche Belagsalterung, Insektizid B und Teppich einen signifikant negativen Einfluss auf die Zielvariable schwere Schädigung (OR = 0,022; 95 % KI: 0,001-0,17; $p = 0,0015$). Die Interaktionen mit 1WB Insektizid B und Teppich sowie die Interaktionen mit 1WB oder 2WB, Insektizid B und den Prüfoberflächen Tapete und Sperrholz hatten keinen signifikanten Einfluss (Die Interaktion 1WB:IB:TA konnte grafisch wegen zu breiter KI nicht dargestellt werden).

Der „likelihood ratio“ Test zeigt (s. Anhang Tab. 25), dass es nicht möglich war einzelne Variablen aus dem Modell zu entfernen. Die AIC der restringierten Modelle lagen bei der Deletion des Geschlechts bei AIC = 6503,2, dem Tag der Wirksamkeitskontrolle bei AIC = 6444,7 sowie der Interaktion Belagsalterung, Männchen und Prüfoberfläche bei AIC = 6453,9 und waren somit schlechter als im Gesamtmodell. Deshalb wurde H_0 : die Modelle mit der jeweiligen Deletion sind nicht schlechter als die mit allen Variablen, für alle drei Variablen mit $p < 2,2 \times 10^{-16}$, $p = 0,00095$ bzw. $p = 0,000047$ abgelehnt, und das Gesamtmodell beibehalten.

Im Modell ohne Interaktionen (Abb. 43) mit je einem Haupteffekt war beim Vergleich der Insektizide die Chance, dass unter der Verwendung von Insektizid B eine schwere Schädigung

gung bei den Bettwanzen im Wahlversuch eintrat wie beim ersten Modell signifikant geringer (OR = 0,0124; 95 % KI: 0,010-0,014, $p < 2 \times 10^{-16}$) als bei Insektizid A.

Vergleich man die verwendeten Oberflächen Sperrholz, Tapete und Teppich mit Hornitex[®], so waren die Chancen auf eine schwere Schädigung im Gegensatz zum ersten Modell um den Faktor 0,064 (95 % KI: 0,053-0,078), 0,228 (95 % KI: 0,190-0,272) bzw. 0,121 (95 % KI: 0,101-0,144) signifikant (für alle $p < 2 \times 10^{-16}$) geringer als bei Hornitex[®]. Zudem überlappen sich die Konfidenzintervalle der einzelnen OR dieser drei gegen Hornitex[®] getesteten Prüfoberflächen nicht, d.h., dass alle Oberflächen gegenüber der anderen einen signifikanten Einfluss auf die schwere Schädigung von *C. lectularius* haben.

Die Chance, dass eine schwere Schädigung eintrat, war bei Oberflächen mit 1WB bzw. 2WB um den Faktor 0,463 (95 % KI: 0,400-0,536) bzw. 0,342 (95 % KI: 0,293-0,397) signifikant (für beide $p < 2 \times 10^{-16}$) geringer als bei frisch behandelten Oberflächen. Der Unterschied zwischen einer und zwei Wochen Belagsalterung war nicht signifikant (Überlappung der Konfidenzintervalle).

Wie beim Modell mit Interaktionen war die Chance auf schwere Schädigung um den Faktor 0,614 (95 % KI: 0,544-0,693; $p < 2,66 \times 10^{-15}$) für Weibchen signifikant niedriger als für Männchen.

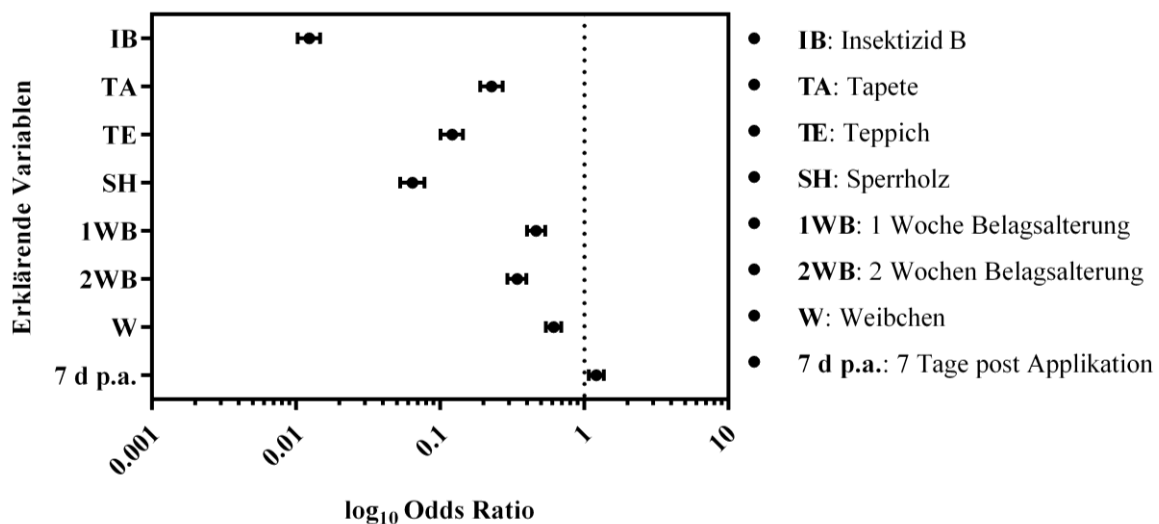


Abb. 43: Binäre logistische Regression der Ergebnisse aus den Wahlversuchen mit den Insektiziden A und B auf den Prüfoberflächen Tapete, Teppich, Hornitex[®] und Sperrholz gegen *Cimex lectularius* des wirkstoffsensiblen UBA-Stamm. Untersucht wurden die Einflüsse der erklärenden Variablen Insektizid, Prüfoberflächen, Belagsalterung der Prüfoberflächen, Geschlecht und Tag der Wirksamkeitskontrolle auf die Zielvariable schwere Schädigung von *C. lectularius*. Die jeweiligen Referenzkategorien der erklärenden Variablen waren Insektizid A, die Prüfoberfläche Hornitex[®], keine Belagsalterung, Männchen sowie der erste Tag der Wirksamkeitskontrolle. Berechnet wurde ein Modell ohne Interaktionen; AIC: 6793,2. Die Punkte geben die log₁₀ „odds ratios“ an, die Whisker das 95 % Konfidenzintervall.

Der Effekt des Tags der Wirksamkeitskontrolle auf die Zielvariable ist ebenfalls signifikant und wie im ersten Modell die einzige Variable mit einem positiven Einfluss. Somit war die Chance auf eine schwere Schädigung am siebten Tag der Wirksamkeitskontrolle um den Faktor 1,21 (95 % KI: 1,076-1,369; $p = 0,00164$) höher als am ersten Tag der Wirksamkeitskontrolle.

Auch bei diesem Modell hat der „likelihood ratio“ Test gezeigt (s. Anhang, Tab. 27), dass es nicht möglich war einzelne Variablen aus dem Modell zu entfernen. Die AIC der restringierten Modelle lagen bei der Deletion des Geschlechts bei 6854,74 ($p < 1,881 \times 10^{-15}$), der Belagsalterung bei 7008,9 ($p < 2,2 \times 10^{-16}$), dem Tag der Wirksamkeitskontrolle bei 6801,2 ($p = 0,001615$), der Männchen bei 11855,7 ($p < 2,2 \times 10^{-16}$), sowie der Belagsalterung bei 7828,4 ($p < 2,2 \times 10^{-16}$) und waren somit deutlich schlechter als im Gesamtmodell. Das heißt, auch hier wurden die Null Hypothesen (Modelle mit der jeweiligen Deletion nicht schlechter als mit allen Variablen) für alle Variablen abgelehnt und das Gesamtmodell beibehalten.

3.11.2 Wirksamkeit von Insektizid A auf den AS-Feldstamm im Wahlversuch

Der AS-Stamm zeigte im Vergleich zu den anderen untersuchten Stämmen im 24-Well-Filterkontakt-Biotest die niedrigste Suszeptibilität gegenüber Deltamethrin. Deshalb sollte auch im Wahlversuch die Wirksamkeit von Insektizid A in der vom Hersteller empfohlenen Aufwandmenge unter praxisähnlichen Bedingungen gegen den AS-Stamm untersucht werden. Beide Berechnungsvarianten für die Ergebnisse des Wahlversuchs zeigen, dass zum Zeitpunkt 7 d p.a. signifikant weniger Tiere des AS-Stamms schwer geschädigt waren als des UBA-Stamms.

3.11.2.1 Berechnung mittels mid-p-Variante des Exakten Vierfeldertafeltests nach Fisher

In der Wirksamkeitskontrolle nach Betrieb der Versuchsanlagen mit Insektizid A auf Tapete ohne, mit 1WB bzw. 2WB war die prozentuale schwere Schädigung der gelaufenen Bettwanzen des AS-Feldstamms nach 24 h p.a. um 23 %, 39 % und 36 % geringer als beim sensiblen UBA-Stamm mit 100 % schwer geschädigten Tieren. An Tag 7 p.a. waren bei denselben Untersuchungen beim AS-Feldstamm ohne Belagsalterung 26 %, mit 1WB 50 % und mit 2WB 42 % weniger Tiere schwer geschädigt.

Zwischen den Zeitpunkten 24 h p.a. und 7 d p.a. gab es in allen Belagsalterungen keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl schwer geschädigter *C. lectularius* des AS-Feldstamms (s. Anhang, Tab. 23).

Vergleicht man die Anzahl schwer geschädigter Bettwanzen der beiden Stämme zum Zeitpunkt 7 d p.a. miteinander, waren in allen drei Belagsalterungen die Unterschiede mit $p = 0,0000021$ signifikant (Abb. 44).

Zudem fand beim AS-Stamm im Gegensatz zum UBA-Stamm nach jedem Versuchsdurchlauf während der Wirksamkeitskontrolle eine Eiablage statt.

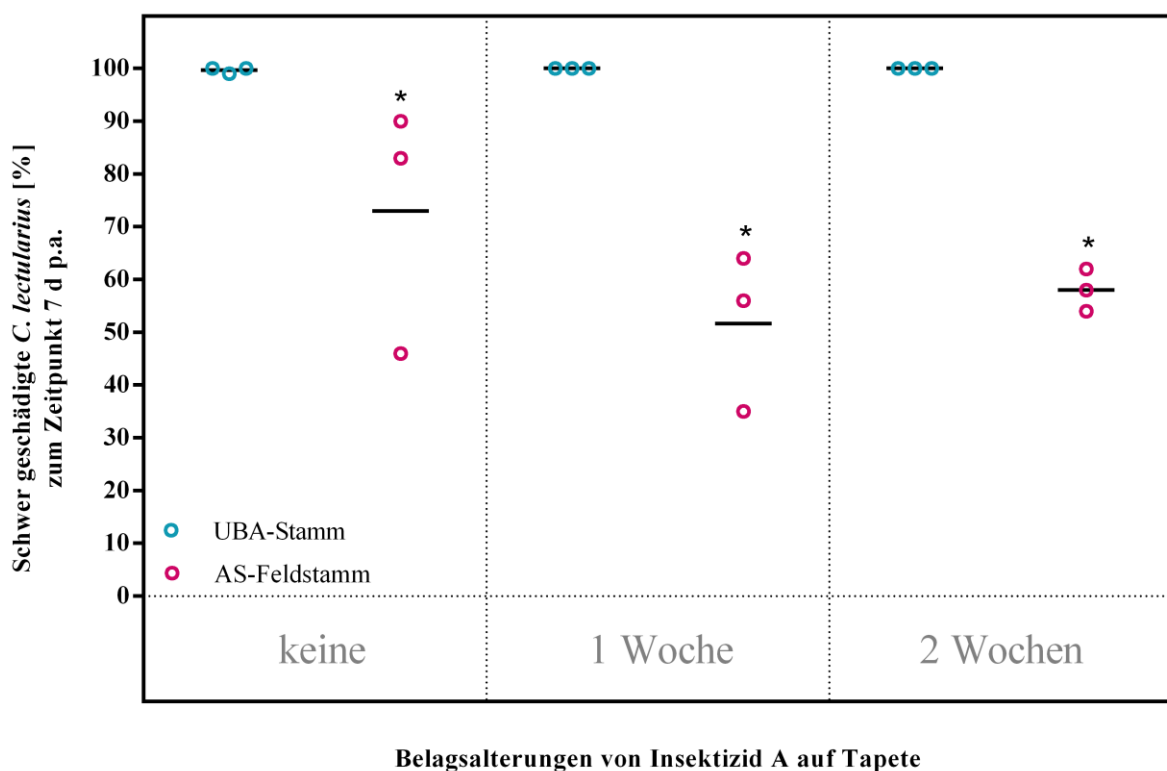


Abb. 44: Vergleich der Wirksamkeit des Insektizids A auf der Oberfläche Tapete gegen *Cimex lectularius* des sensiblen UBA-Stamms und des AS-Feldstamms im Wahlversuch zum Zeitpunkt 7 d p.a. Statistische Zusammenhänge wurden mit der mid-p-Variante der Exakten Tests nach Fisher untersucht und die p-Werte mittels Bonferroni-Holm-Prozedur korrigiert. Die Kreise geben die biologischen Replikate an, die Querlinie den Mittelwert. * $p < 0,05$.

Die Unterschiede in der Anzahl schwer geschädigter *C. lectularius* des AS-Feldstamms zwischen kB und 1WB sowie kB und 2WB waren an Tag 7 p.a. mit 24 % bei 1WB ($p = 0,00026$) bzw. 16 % bei 2WB ($p = 0,0124$) weniger schwer geschädigten Tieren signifikant. Zwischen 1WB und 2WB in der gleichen Versuchsanordnung war die Anzahl schwer geschädigter Tiere zum Zeitpunkt 7 d p.a. nicht signifikant (s. Anhang, Tab. 23).

Bei den Untersuchungen mit dem AS-Feldstamm gab es, wie beim UBA-Stamm auch, zum Zeitpunkt 7 d p.a. keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl schwer geschädigter weiblicher und männlicher *C. lectularius* (s. Anhang Tab. 23; ergänzende Abb. s. Anhang unter Punkt 8.6, Abb. 64).

3.11.2.2 Berechnung mittels binärer logistischer Regression

Für die Wahlversuche zur Wirksamkeitsprüfung von Insektizid A auf der Prüfoberfläche Tapete gegen den sensiblen UBA-Stamm im Vergleich zum AS-Feldstamm wurden zwei generalisierte lineare Modelle ohne Interaktionen berechnet (s. Anhang, Tab. 28 und 29). Dabei wurde der Einfluss der erklärenden Variablen Stamm, Belagsalterung, Geschlecht sowie der Tag der Wirksamkeitskontrolle auf die Zielvariable schwere Schädigung untersucht (Abb. 45). Die jeweiligen Referenzkategorien dieser erklärenden Variablen waren der wirkstoff sensible UBA-Stamm, keine Belagsalterung, Männchen sowie der erste Tag der Wirksamkeitskontrolle.

Die Chance beim Vergleich der beiden Stämme, dass unter der Verwendung von Insektizid A eine schwere Schädigung bei Tieren des AS-Feldstamms im Wahlversuch eintrat, war um den Faktor 0,0148 (95 % KI: 0,00821-0,0246, $p < 2 \times 10^{-16}$) signifikant geringer als beim sensiblen UBA-Stamm.

Innerhalb dieses Modells war auch die Chance, dass eine schwere Schädigung eintrat, bei Oberflächen mit 1WB bzw. 2WB um den Faktor 0,469 (95 % KI: 0,339-0,647; $p = 4,47 \times 10^{-6}$) bzw. 0,466 (95 % KI: 0,349-0,621; $p = 2,08 \times 10^{-7}$) signifikant geringer als bei frisch behandelten Oberflächen. Der Unterschied zwischen einer und zwei Wochen Belagsalterung war nicht signifikant (Überlappung der Konfidenzintervalle).

Die erklärenden Variablen Geschlecht und Tag der Wirksamkeitskontrolle hatten innerhalb dieses Modells keinen signifikanten Einfluss auf die Zielvariable schwere Schädigung (Abb. 45 A). Das berechnete Modell hat das AIC 1554,3. Die Deletion des Tags der Wirksamkeitskontrolle verbessert das AIC auf 1552,8. Im „likelihood ratio“ Test war dieses restringierte Modell nicht signifikant besser ($p = 0,229$) als das Modell, in dem der Tag der Wirksamkeitskontrolle berücksichtigt wurde (Abb. 45 B). Weitere Deletionen und Interaktionen haben das AIC ebenfalls nicht signifikant verändert.

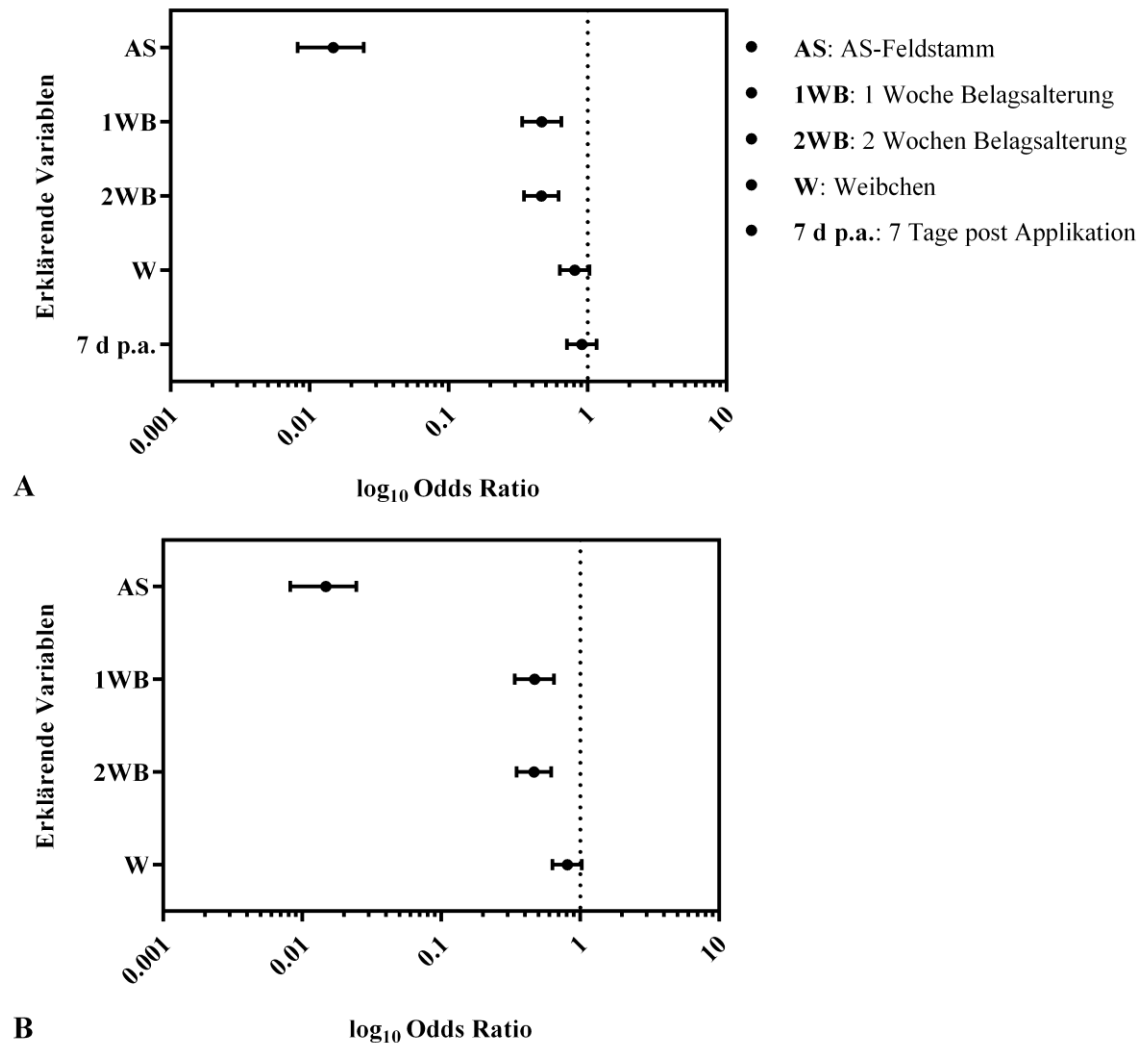


Abb. 45: Binäre logistische Regression der Ergebnisse aus den Wahlversuchen mit Insektizid A auf der Prüfoberfläche Tapete gegen *Cimex lectularius* des AS-Feldstamms im Vergleich zum wirkstoffsensiblen UBA-Stamm. Untersucht wurden die Einflüsse der erklärenden Variablen Stamm, Belagsalterung der Prüfoberflächen, Geschlecht und Tag der Wirksamkeitskontrolle auf die Zielvariable schwere Schädigung von *C. lectularius*. Die jeweiligen Referenzkategorien dieser erklärenden Variablen waren der wirkstoffsensible UBA-Stamm, keine Belagsalterung, Männchen sowie der erste Tag der Wirksamkeitskontrolle. Es wurden zwei Modelle ohne Interaktionen berechnet: das erste Modell mit allen Variablen (AIC: 1554,3), das zweite ohne die Variable 7 Tage post Applikation (AIC: 1552,8). Im „likelihood ratio“ Test ist der Unterschied zwischen den beiden Modellen nicht signifikant ($p = 0,23$). Die Punkte geben die log₁₀ „odds ratios“ an, die Whisker das 95 % Konfidenzintervall.

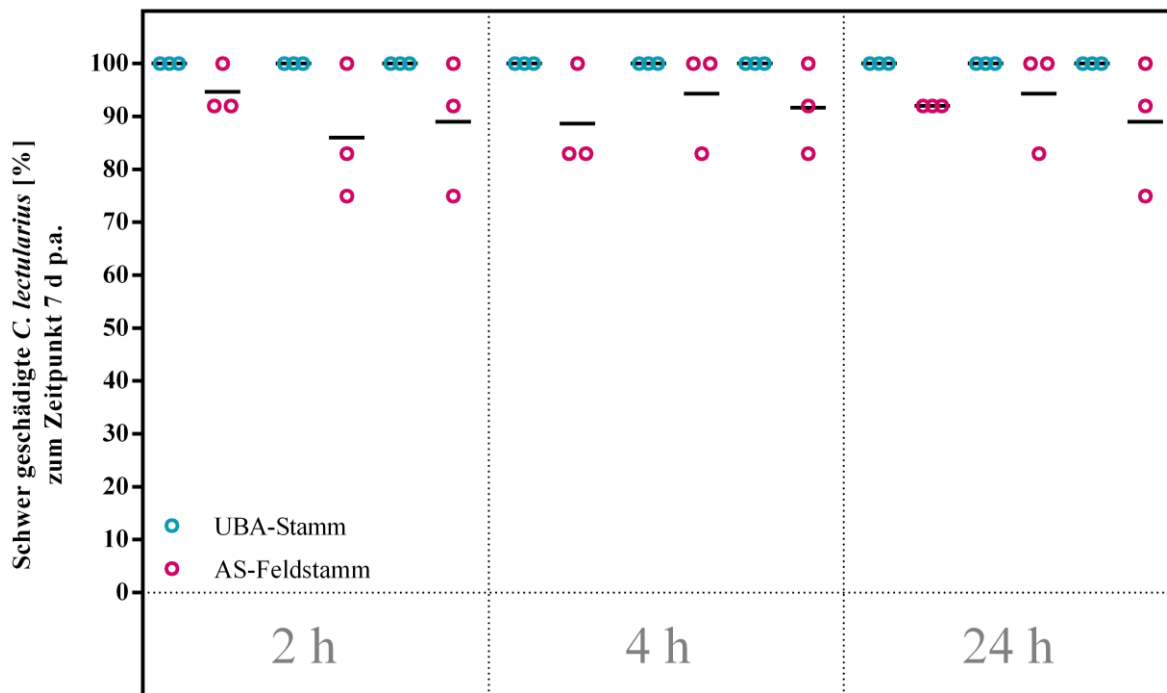
3.11.3 Wirksamkeit von Insektizid A gegen den AS-Feldstamm im UBA-Zwangsversuch

Wie unter 3.11.2 beschrieben sollte auch im UBA-Zwangsversuch die Wirksamkeit von Insektizid A in der vom Hersteller empfohlenen Aufwandmenge unter praxisähnlichen Bedingungen gegen den AS-Stamm untersucht werden. Beide Berechnungsvarianten für die Ergebnisse des UBA-Zwangsversuchs zeigen, dass es zum Zeitpunkt 7 d p.a. keinen signifikanten

Unterschied in der Schädigungsrate zwischen Bettwanzen des AS-Stamms und des UBA-Stamms gab.

3.11.3.1 Berechnung mittels mid-p-Variante des Exakten Vierfeldertafeltests nach Fisher

In den Wirksamkeitskontrollen der UBA-Zwangsversuche mit Insektizid A auf Tapete ohne Belagsalterung mit den verschiedenen Einwirkzeiten 2 h, 4 h und 24 h lag die prozentuale schwere Schädigungsrate der eingesetzten Bettwanzen des AS-Feldstamms 24 h p.a. bei 72 %, 92 % und 89 %. An Tag 7 p.a. waren bei denselben Untersuchungen am AS-Feldstamm nach den Einwirkzeiten 2 h 94 %, 4 h 89 % und 24 h 92 % der Tiere schwer geschädigt (Abb. 46).



EWZ von Insektizid A auf Tapete, ohne, mit 1 Woche und 2 Wochen Belagsalterung

Abb. 46: Vergleich der Wirksamkeit des Insektizids A auf der Oberfläche Tapete gegen *Cimex lectularius* des sensiblen UBA-Stamms und des AS-Feldstamms im UBA-Zwangsversuch zum Zeitpunkt 7 d p.a. Statistische Zusammenhänge wurden mit der mid-p-Variante der Exakten Tests nach Fisher untersucht und die p-Werte mittels Bonferroni-Holm-Prozedur korrigiert. Die Kreise geben die biologischen Replikate an, die Querlinie den Mittelwert. * $p < 0,05$.

In der gleichen Versuchsanordnung im Zwangskontakt auf Tapete mit einer Woche Belagsalterung waren bei den Einwirkzeiten 2 h, 4 h und 24 h, 24 h p.a. 53 %, 78 % bzw. 92 % und 7 d p.a. 86 % und jeweils 94 % der Tiere schwer geschädigt. Im Zwangskontakt auf Tapete

mit zwei Wochen Belagsalterung waren zum Zeitpunkt 24 h p.a. zu den Einwirkzeiten 2 h 67 %, 4 h 81 % und 24 h 92 % und an Tag 7 p.a. nach 2 h und 4 h 92 % und nach 24 h 89 % der eingesetzten Bettwanzen des AS-Feldstamms schwer geschädigt.

Im Vergleich dazu lag die Anzahl schwer geschädigter *C. lectularius* des UBA-Stamms in sämtlichen bisher beschriebenen UBA-Zwangsversuchen bei 100 %.

Vergleicht man die Schädigungsraten der Bettwanzen zwischen den Zeitpunkten 24 h p.a. und 7 d p.a., gab es in allen mit Insektizid A auf Tapete untersuchten Versuchskombinationen keine signifikanten Unterschiede in der Schädigungsrate von *C. lectularius* sowohl beim UBA-Stamm als auch beim AS-Feldstamm (s. Anhang, Tab. 30).

Beim UBA-Stamm fand zudem wie im Wahlversuch keine Eiablage während der Wirksamkeitskontrollen statt. Auch beim AS-Stamm wurden in der Wirksamkeitskontrolle nur in einem Replikat mit Bettwanzen auf Insektizid A mit einwöchiger Belagsalterung auf Tapete und 4 h Dauerkontakt Eier abgelegt.

Auch beim Vergleich der Anzahl schwer geschädigter Bettwanzen zwischen den beiden Stämmen zum Zeitpunkt 7 d p.a. konnten für die drei Einwirkzeiten und die drei Belagsalterungen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (s. Anhang, Tab. 31).

Zudem gab es sowohl für den UBA- als auch für den AS-Stamm in allen mit Insektizid A auf Tapete untersuchten Versuchskombinationen zum Zeitpunkt 7 d p.a. keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl schwer geschädigter weiblicher und männlicher *C. lectularius* (siehe Anhang Tab. 32).

Beim Vergleich sämtlicher Einwirkzeiten und Belagsalterungen untereinander konnten ebenfalls für beide Stämme keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (s. Anhang Tab. 31).

3.11.3.2 Berechnung mittels binärer logistischer Regression

Für die UBA-Zwangsversuche zur Wirksamkeitsprüfung von Insektizid A auf der Prüfoberfläche Tapete gegen den sensiblen UBA-Stamm im Vergleich zum AS-Feldstamm wurde ebenfalls ein generalisiertes lineares Modell ohne Interaktionen berechnet (s. Anhang, Tab. 33). In diesem Modell wurden die Variablen Geschlecht und Belagsalterung, da sie bereits bei der mid-p-Variante des Exakten Tests nach Fisher keinen signifikanten Einfluss auf die Zielvariable hatten, entfernt (s. Anhang, Tab. 34). Somit blieben die Variablen Stamm, Tag der Wirksamkeitskontrolle und Einwirkzeit (EWZ) übrig (Abb. 47). Die EWZ wurde in diesem Modell nicht wie die anderen Variablen faktorisiert, sondern als metrische Variable verwendet. Die jeweiligen Referenzkategorien der erklärenden Variablen waren der wirkstoff sensible

UBA-Stamm und der erste Tag der Wirksamkeitskontrolle. Das AIC dieses Modells lag bei 499,7.

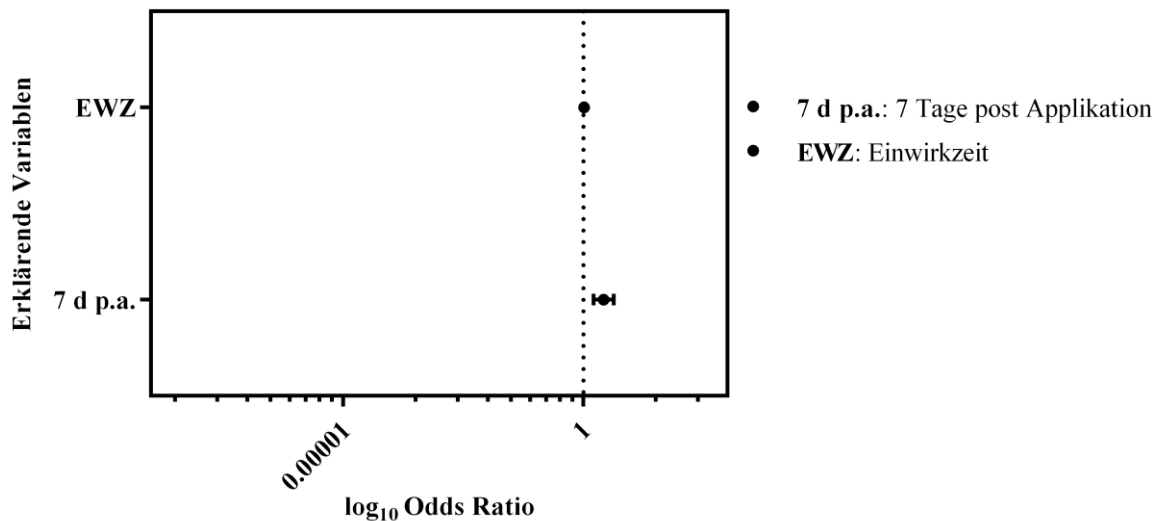


Abb. 47: Binäre logistische Regression der Ergebnisse aus den UBA-Zwangversuchen mit Insektizid A auf der Prüfoberfläche Tapete gegen *Cimex lectularius* des AS-Feldstamms im Vergleich zum wirkstoffsensiblen UBA-Stamm. Untersucht wurden die Einflüsse der erklärenden Variablen Stamm (Abbildung aufgrund von zu breiter Konfidenzintervalle nicht möglich), Einwirkzeit (metrische Variable) und Tag der Wirksamkeitskontrolle auf die Zielvariable schwere Schädigung von *C. lectularius*. Die jeweiligen Referenzkategorien dieser erklärenden Variablen waren der wirkstoffsensible UBA-Stamm und der erste Tag der Wirksamkeitskontrolle. Es wurde ein Modell ohne Interaktionen berechnet. AIC 499,7. Die Punkte geben den \log_{10} „odds ratio“ an, die Whisker das 95 % Konfidenzintervall.

Beim Vergleich der beiden Stämme unter der Verwendung von Insektizid A hatten der AS-Feldstamm und der UBA-Stamm anders als im Wahlversuch im UBA-Zwangversuch keinen signifikant unterschiedlichen Einfluss (OR: 7,35, 95 % KI: $2,09 \times 10^{-118}$ -154,4, $p = 0,97798$) auf die Zielvariable schwere Schädigung. Eine Abbildung war aufgrund der enormen Konfidenzintervalle nicht möglich.

Der Einfluss der EWZ auf die Zielvariable war hingegen signifikant ($p = 0,00229$) und positiv. Somit nahm die Chance, dass eine schwere Schädigung eintrat pro Stunde um den Faktor 1,042 (95 % KI: 1,016-1,072) zu.

Der Effekt des Tags der Wirksamkeitskontrolle auf die Zielvariable war ebenfalls signifikant, d.h. die Chance auf eine schwere Schädigung war am siebten Tag der Wirksamkeitskontrolle um den Faktor 2,64 (95 % KI: 1,642-4,346; $p = 0,0000872$) höher als am ersten Tag der Wirksamkeitskontrolle.

3.12 Blutfütterung

3.12.1 Vergleich der Fütterung am Kaninchen und der artifiziellen Fütterung mit Kaninchenblut

Um die Methode der artifiziellen Blutfütterung mit der herkömmlichen Fütterungsmethode am Kaninchen zu vergleichen wurden Bettwanzen parallel am Kaninchen (je 1000 Bettwanzen pro Stadium in jeweils 10 Replikaten mit 100 Juvenilen (J) der Stadien 1-5 und 10 Replikaten mit je 50 Weibchen und 50 Männchen) und artifiziell mit Kaninchenblut (je 200-300 Bettwanzen pro Stadium in jeweils zwei bis drei Replikaten mit je 100 Juvenilen (J) der Stadien 1-5 und drei Replikaten mit je 50 Weibchen und 50 Männchen) gefüttert. Die durchschnittliche Anzahl gesogener Bettwanzen (%) und die durchschnittlich aufgenommene Blutmenge der Replikate (g) sowie deren Standardabweichungen (SD) wurden dokumentiert (Abb. 48 und 49).

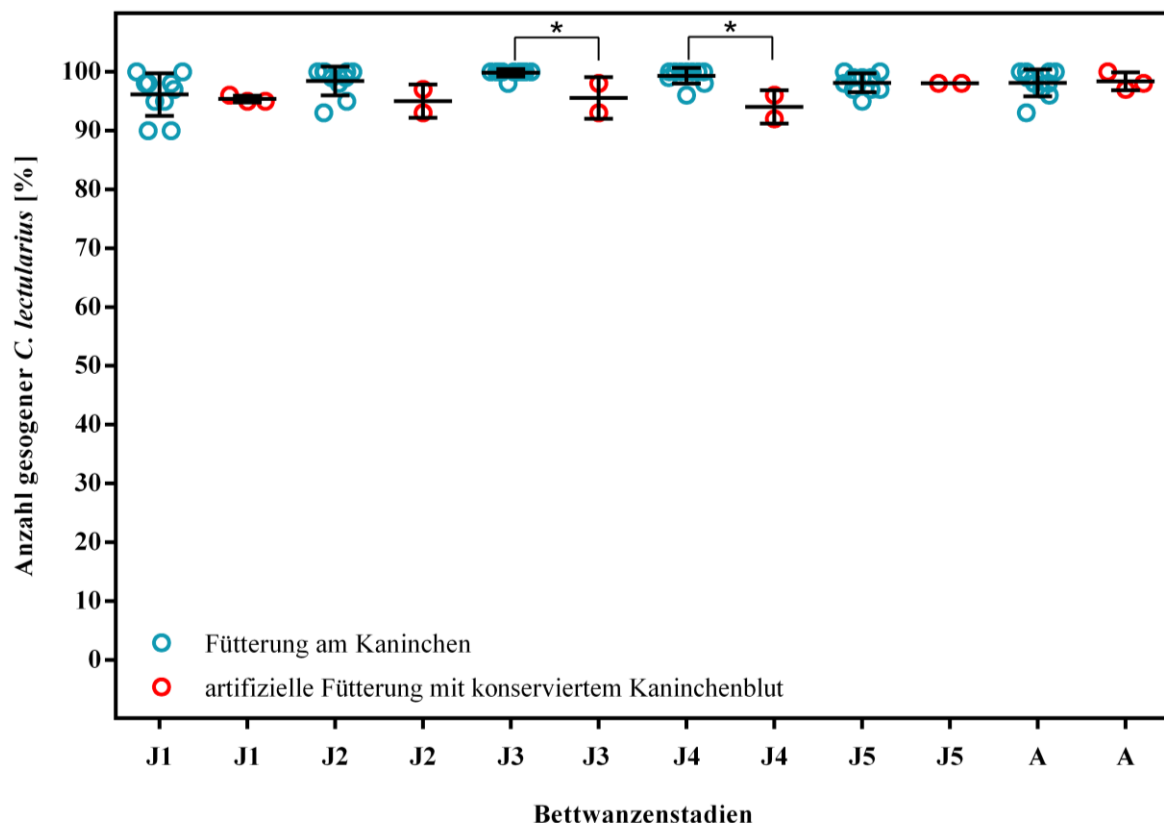


Abb. 48: Anzahl (%) der einzelnen gesogenen *Cimex lectularius*-Stadien bei der konventionellen Fütterung am Kaninchen und der artifiziellen Kaninchenblutfütterung. Gefüttert wurden je 100 Bettwanzen. Statistische Zusammenhänge wurden mittels multiplen t-Tests untersucht (ungepaart; $\alpha = 0,05$; p-Werte mittels Bonferroni-Holm-Prozedur korrigiert). Die Kreise geben die biologischen Replikate an, die Querlinien den Mittelwert und die Whisker die Standardabweichung. * $p < 0,05$.

Die Untersuchungen zeigen, dass die Mortalitätsrate innerhalb der Zuchtansätze je nach gefüttertem Bettwanzenstadium und damit auch der Zuchterfolg sowohl von der Blutsorte als auch von dessen Frische abhängig sind.

In den vorliegenden Untersuchungen hat bei der artifiziellen Fütterung mit konserviertem Kaninchenblut mit Ausnahme der J3 und J4 eine der Fütterung am Kaninchen vergleichbare Anzahl an Bettwanzen Blut gesogen. Insgesamt haben die Wanzen jedoch immer weniger, die J1 und J3 sogar signifikant weniger Blut gesogen.

Die Ergebnisse aus der Fütterung am Kaninchen zeigen, dass von den je 100 untersuchten Bettwanzenstadien durchschnittlich zwischen 96 % (J1; SD: 3,63 %) und 100 % (J3; SD: 0,63 %) Blut gesogen haben (Abb. 48). Die durchschnittlich aufgenommene Blutmenge am Kaninchen hat sich mit jedem Entwicklungsstadium erhöht. Sie war bei den J1 mit 0,003 g (SD: 0,007 g) am geringsten und mit 0,48 g (SD: 0,146 g) bei den Adulten am höchsten (Abb. 49).

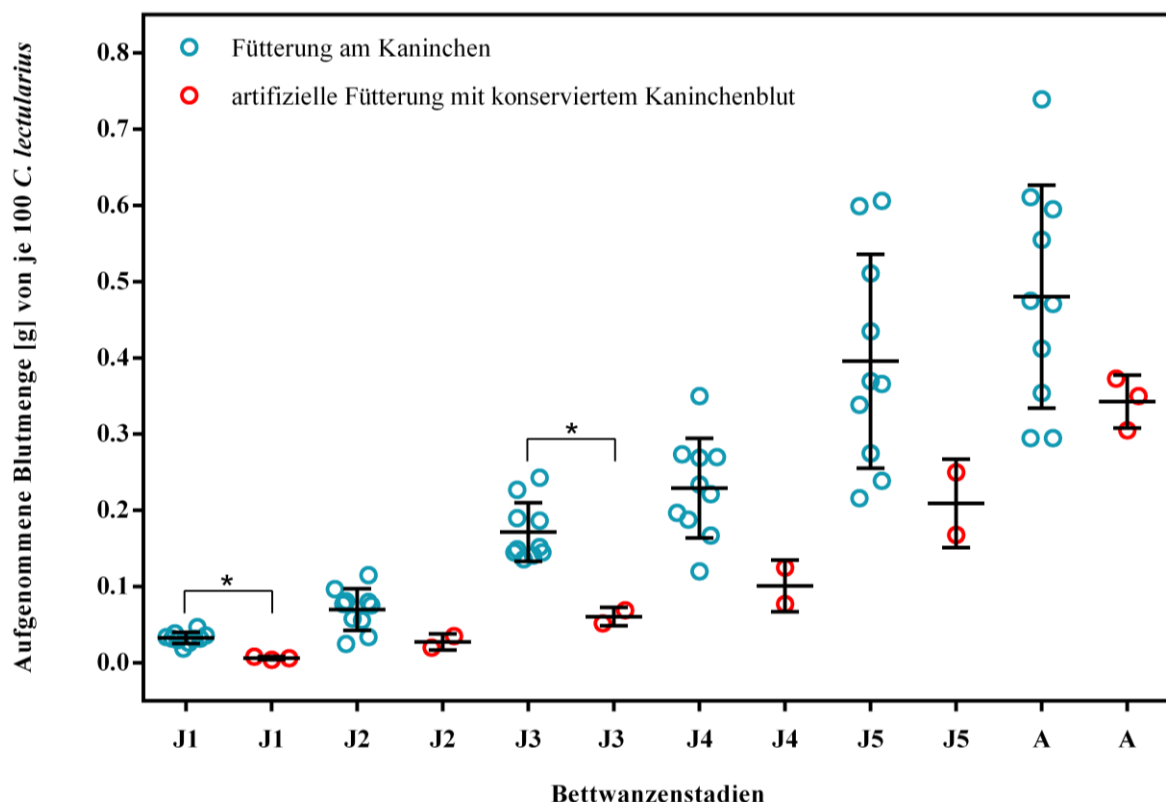


Abb. 49: Vergleich der von je 100 *Cimex lectularius* aufgenommenen Blutmenge (g) bei der konventionellen Fütterung am Kaninchen und der artifiziellen Kaninchenblutfütterung. Statistische Zusammenhänge wurden mittels multiplen t-Tests untersucht (ungepaart; $\alpha = 0,05$; p-Werte mittels Bonferroni-Holm-Prozedur korrigiert). Die Kreise geben die biologischen Replikate an, die Querlinien den Mittelwert und die Whisker die Standardabweichung. * $p < 0,05$.

Die Ergebnisse der artifiziellen Fütterung mit Kaninchenblut zeigen, dass durchschnittlich zwischen 95 % (J1; SD: 0,58 %) und 98 % (J5; SD: 0,00 %; Adulte; SD: 1,53 %) der gefütterten Bettwanzenstadien Blut gesogen haben (Abb. 49). Bei der *in vitro*-Fütterung konnte nur für J3 und J4 ein signifikanter Unterschied zur *in vivo*-Fütterung festgestellt werden (J3: $p = 0,0014$; J4: $p = 0,0013$; jeweils $n = 100$) (Abb. 48).

Die durchschnittlich aufgenommene Kaninchenblutmenge hat sich bei der *in vitro*-Fütterung, wie bei der *in vivo*-Fütterung, mit jedem Entwicklungsstadium erhöht. Sie war bei den J1 mit 0,006 g (SD: 0,002 g) am geringsten und bei den Adulten mit 0,343 g (SD: 0,035 g) am höchsten (Abb. 52). Von den je 100 untersuchten J1 und J3 haben bei der artifiziellen Fütterung mit durchschnittlich 0,027 g bzw. 0,11 g signifikant ($p = 0,000092$ bzw. $p = 0,0029$) weniger Blut aufgenommen im Vergleich zur *in vivo*-Fütterung am Kaninchen (Abb. 49).

3.12.2 Vergleich der Attraktivität verschiedener Blutsorten gegenüber der Fütterung am Kaninchen

Zur Überprüfung der Attraktivität verschiedener Blutsorten zur artifiziellen Fütterung, wurden die durchschnittliche Anzahl gesogener Bettwanzen (Abb. 50) und die durchschnittlich aufgenommenen Blutmengen (Abb. 51) von je 100 Bettwanzen (50 Weibchen und 50 Männchen) mit denen der Fütterung am Kaninchen verglichen. Alle Bettwanzen hatten zuvor sechs Fütterungen am Kaninchen erhalten. Dementsprechend wurden sie zum siebten Mal am Kaninchen oder zum ersten Mal artifiziell mit konserviertem Kaninchenblut, defibriniertem Schweineblut, Rinderblut, Schafsblut oder verdorbenem Schweineblut (Blut mit violett-schwarzer Färbung und intensivem Fäulnisgeruch durch unsachgemäße Lagerung offenkundig verdorben, s. 2.2.7.4) gefüttert.

Die Ergebnisse zeigen, dass es keinen signifikanten Unterschied in der Attraktivität zwischen der *in vitro*-Fütterung mit konserviertem Kaninchenblut oder defibriniertem Rinderblut und der *in vivo*-Fütterung am Kaninchen gab. Defibriniertes Schafsblut und offensichtlich verdorbenes defibriniertes Schweineblut waren die für Bettwanzen unattraktivsten Blutsorten und defibriniertes Schweineblut die attraktivste.

Bei der Fütterung am Kaninchen haben von 100 Bettwanzen durchschnittlich 92 % (SD: 11,047) gesogen und dabei durchschnittlich 0,417 g (SD: 0,157 g) Blut aufgenommen.

Nach der artifiziellen Fütterung mit konserviertem Kaninchenblut haben von 100 adulten Bettwanzen durchschnittlich 98 % (SD: 1,528 %) gesogen und dabei durchschnittlich 0,343 g (SD: 0,035 g) Blut gesogen.

Es gab zwischen der Fütterung am Kaninchen und der Membranfütterung mit konserviertem Kaninchenblut sowohl in der Anzahl gesogener *C. lectularius* als auch in den aufgenommenen Blutmengen keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,5791$ bzw. $p = 0,5781$) (Abb. 50 und 51).

Zwischen der Fütterung am Kaninchen und der Membranfütterung mit frischem defibriniertem Schweineblut (95 %, SD: 1,643 %) war der Unterschied in der Anzahl gesogener Bettwanzen ebenfalls nicht signifikant ($p = 0,9182$). Allerdings haben Bettwanzen mit durchschnittlich 0,684 g (SD: 0,055 g) signifikant ($p < 0,0001$) mehr Schweineblut an der Membran gesogen als am Kaninchen (Abb. 50 und 51).

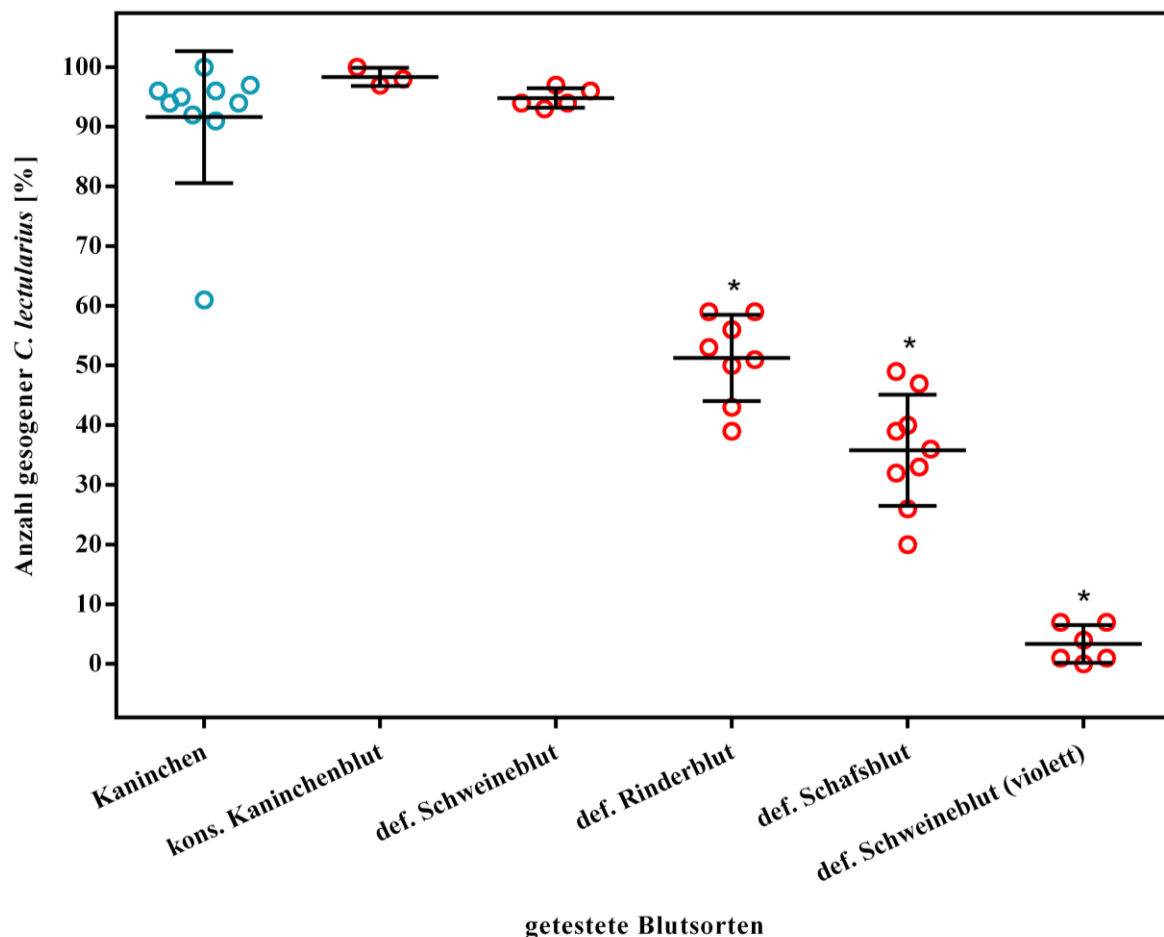


Abb. 50: Vergleich der Anzahl (%) gesogener adulter *Cimex lectularius* zwischen der 7. Fütterung am Kaninchen und der ersten (zuvor 6 Fütterungen am Kaninchen) artifiziellen Fütterung mit konserviertem Kaninchenblut, defibriniertem frischem Schweineblut, Rinderblut, Schafsblut und offensichtlich verdorbenem Schweineblut (violett). Die Mittelwerte aus der Anzahl gesogener Tiere der artifiziellen Fütterung wurden mit den entsprechenden Mittelwerten der Fütterung am Kaninchen mittels parametrischer One-Way ANOVA und Dunnett's Post-hoc-Test verglichen und auf signifikante Unterschiede ($\alpha = 0,05$) untersucht. Die Kreise geben die biologischen Replikate an, die Querlinien den Mittelwert und die Whisker die Standardabweichung. * $p < 0,05$.

Bei der artifiziiellen Fütterung mit defibriniertem Rinderblut, defibriniertem Schafsblut und offensichtlich verdorbenem defibriniertem Schweineblut, haben nur durchschnittlich 51 % (SD: 7,226 %), 36 % (SD: 9,324 %) bzw. 3 % (SD: 3,141) der 100 Bettwanzen gesogen. Im Gegensatz zur Fütterung am Kaninchen haben an diesen Blutsorten mit 41 %, 56 % bzw. 89 % signifikant weniger (für alle $p < 0,0001$) Wanzen Blut gesogen (Abb. 50).

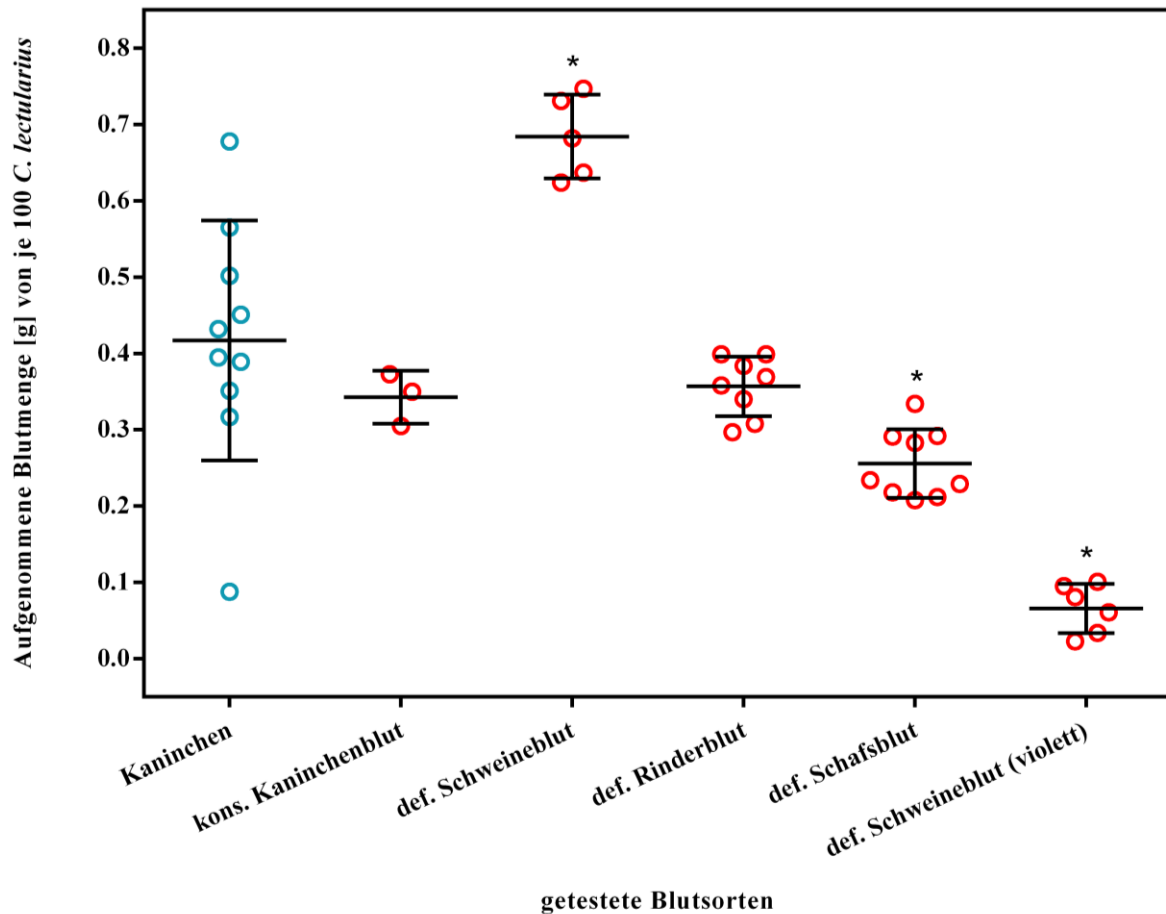


Abb. 51: Vergleich der aufgenommenen Blutmenge (g) von je 100 adulten *Cimex lectularius* zwischen der 7. Fütterung am Kaninchen und der ersten (zuvor 6 Fütterungen am Kaninchen) artifiziiellen Fütterung mit konserviertem Kaninchenblut, defibriniertem frischen Schweineblut, Rinderblut, Schafsblut und offensichtlich verdorbenem Schweineblut (violett). Die Mittelwerte aus der aufgenommenen Blutmenge bei der artifiziiellen Fütterung wurden mit den entsprechenden Mittelwerten der Fütterung am Kaninchen mittels parametrischer One-Way ANOVA und Dunnett's Post-hoc-Test verglichen und auf signifikante Unterschiede ($\alpha = 0,05$) untersucht. Die Kreise geben die biologischen Replikate an, die Querlinien den Mittelwert und die Whisker die Standardabweichung. * $p < 0,05$.

Zudem haben Bettwanzen bei der artifiziiellen Fütterung mit Schafsblut und offensichtlich verdorbenem Schweineblut mit 0,256 g (SD: 0,045 g) bzw. 0,066 g (SD: 0,032 g) eine signifikant geringere Blutmenge ($p = 0,0014$ bzw. $p < 0,0001$) an der Membran aufgenommen als am Kaninchen. Die Unterschiede zwischen den aufgenommenen Blutmengen in der artifiziiellen

Fütterung mit defibriniertem Rinderblut (0,0357 g, SD: 0,039 g) und der Fütterung am Kaninchen waren hingegen nicht signifikant ($p = 0,4702$) (Abb. 51).

3.12.3 Parallele Aufzucht von Bettwanzen des UBA-Stamms am Kaninchen und mittels artifizieller Fütterung mit defibriniertem Rinderblut

Da defibriniertes Rinderblut bereits zur Fütterung der Mücken in der Gliedertierzucht des FG IV 1.4 verwendet wurde, und die aufgenommene Blutmenge von je 100 *C. lectularius* nicht signifikant schlechter war als am Kaninchen, wurde damit ein erster Zuchtversuch unternommen. Die Tierzahlen zu den jeweiligen Fütterungszeitpunkten aus der Zucht mittels artifizieller Fütterung mit defibriniertem Rinderblut (Nachkommen aus acht Replikaten mit je 50 Männchen und 50 Weibchen) und der zum Vergleich durchgeführten klassischen Fütterung am Kaninchen (Nachkommen aus sieben Replikaten mit je 50 Männchen und 50 Weibchen) sind für sämtliche Replikate der jeweiligen Fütterungsmethode in Abbildung 52 dargestellt. Die durchschnittliche Anzahl der Nachkommen aus je 100 adulten Bettwanzen zum Zeitpunkt der ersten und siebten Fütterung (Abb. 53) wurde innerhalb des jeweiligen Versuchsansatzes mit einem gepaarten t-Test (a) berechnet. Die gleichen Unterschiede zwischen den beiden Versuchsansätzen mit den beiden Fütterungsmethoden wurden mit zwei ungepaarten t-Tests (b) berechnet und die p-Werte mit dem Sidak-Bonferroni Post-Hoc-Test korrigiert.

Die Ergebnisse des Aufzuchtversuchs mit defibriniertem Rinderblut zeigen, dass je 100 adulte Bettwanzen signifikant weniger Eier abgelegt haben und die Mortalitätsrate insgesamt höher war als nach der *in vivo*-Fütterung am Kaninchen. Die Aufzucht mit defibriniertem Rinderblut musste nach der ersten Generation aufgrund von insgesamt zu geringen Tierzahlen zum Zeitpunkt der siebten Fütterung abgebrochen werden.

Eine Woche nach der siebten Fütterung am Kaninchen haben 100 adulte Bettwanzen pro Replikat durchschnittlich 372 (SD: 69) Eier produziert (Gesamtzahlen s. Anhang Abb. 68 A). Von diesen Nachkommen waren nach sieben Fütterungen am Kaninchen noch im Durchschnitt 333 (SD: 60) Bettwanzen pro Replikat vital. Die Bettwanzenanzahl zum Zeitpunkt der ersten Fütterung am Kaninchen war mit $p = 0,0003$ signifikant geringer als bei der siebten (Abb. 53). Von diesen durchschnittlich 333 Tieren waren im Durchschnitt 304 (SD: 43) adult. Davon waren 165 (SD: 28) männlich und 139 (SD: 19) weiblich. Die Weibchen jedes Replikats dieser nächsten Generation haben eine Woche nach der letzten Fütterung durchschnittlich 572 (SD: 146) Eier abgelegt.

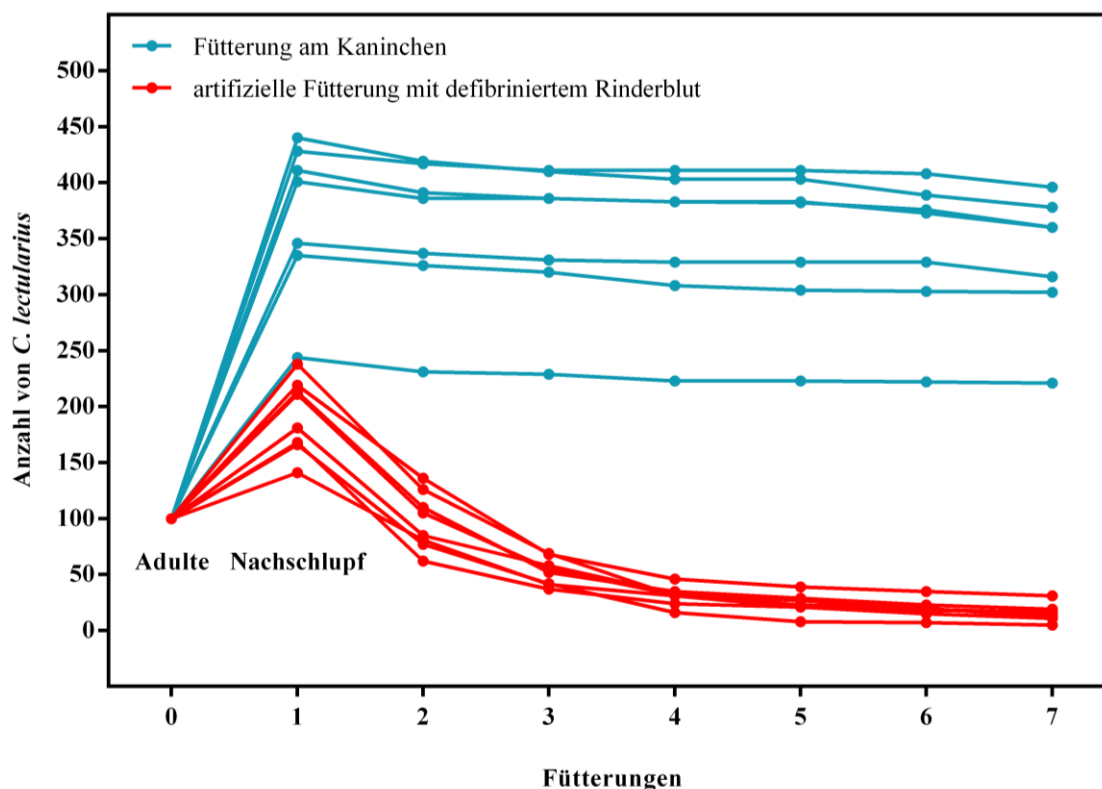


Abb. 52: Vergleich der Anzahl der zu den jeweiligen Fütterungszeitpunkten vorhandenen *Cimex lectularius* bei der Fütterung am Kaninchen (7 Replikate) und der artifiziellen Fütterung mit defibriniertem Rinderblut (8 Replikate). Der Nachschlupf wurde von je 100 adulten Bettwanzen pro Replikate nach sieben Fütterungen (7. Fütterung am Kaninchen und 1. artifizielle Fütterung mit Rinderblut) abgenommen.

Nach der ersten Membranfütterung mit Rinderblut (zuvor sechs Fütterungen am Kaninchen), haben 100 adulte Bettwanzen pro Replikate im Durchschnitt 192 (SD: 33) Eier produziert (Gesamtzahlen siehe Anhang Abb. 68 B). Von diesen Nachkommen waren nach der siebten artifiziellen Fütterung mit Rinderblut pro Replikate durchschnittlich 16 (SD: 8) Bettwanzen übrig. Dies entsprach einer Mortalitätsrate von 92 %. Der Unterschied in der Bettwanzenanzahl zwischen der ersten und siebten Fütterung war mit $p = 0,0002$ wie bei der Fütterung am Kaninchen signifikant (Abb. 53).

Am Kaninchen erfolgt die Abnahme der Eiablage für die nächste Generation üblicherweise nach der siebten Fütterung. Da von den durchschnittlich übrig gebliebenen 16 Tieren pro Replikate alle noch juvenil waren, konnte keine Eiablage erfolgen.

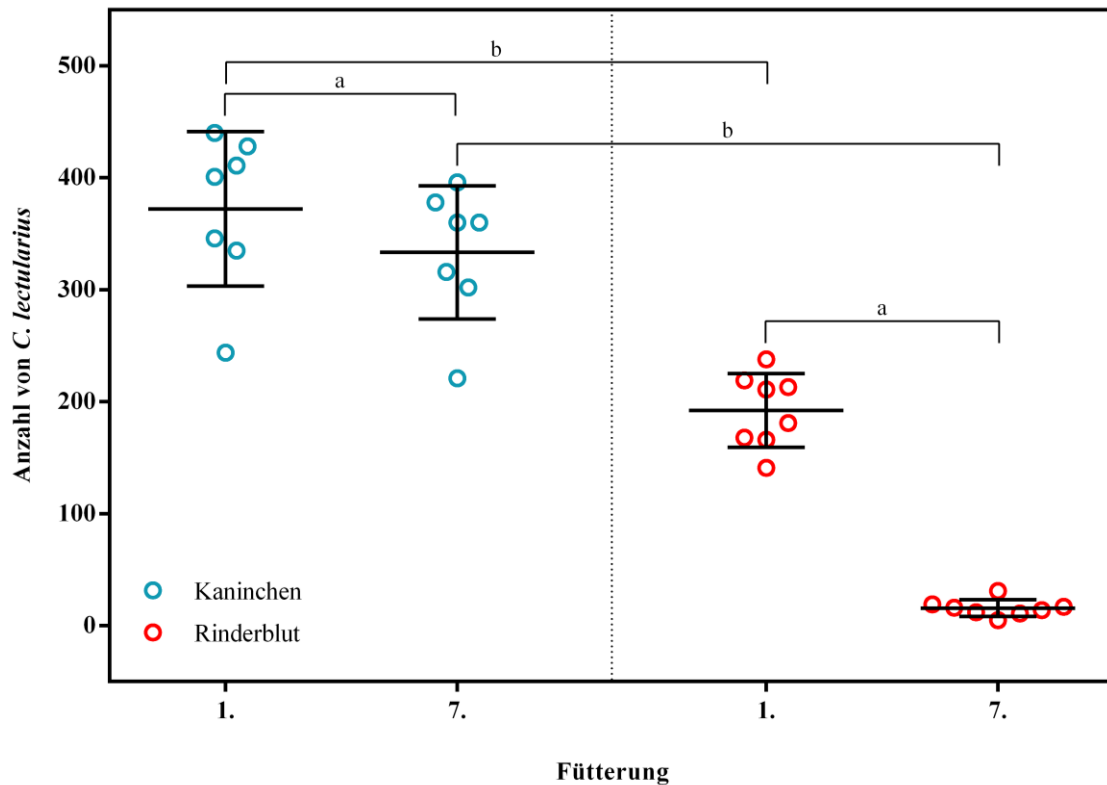


Abb. 53: Vergleich der Anzahl der zur ersten und letzten Fütterung vorhandenen *Cimex lectularius* bei der Fütterung am Kaninchen (7 Replikate) und der artifiziellen Fütterung mit defibriniertem Rinderblut (8 Replikate). Signifikante Unterschiede zwischen der durchschnittlichen Anzahl der Nachkommen aus je 100 (50 Weibchen und 50 Männchen) adulten Bettwanzen, zum Zeitpunkt der ersten und siebten Fütterung, wurden innerhalb der jeweiligen Teilpopulationen mit einem gepaarten t-Test (a) berechnet. Die gleichen Unterschiede zwischen den beiden Teilpopulationen mit den beiden Fütterungsmethoden wurden mit zwei ungepaarten t-Tests (b) berechnet und die p-Werte mit dem Sidak-Bonferroni Post-Hoc-Test korrigiert. Die Punkte geben die biologischen Replikate an, die Querlinien den Mittelwert und die Whisker die Standardabweichung.

Die Unterschiede zwischen der durchschnittlichen Anzahl der Nachkommen aus je 100 adulten Bettwanzen, zum Zeitpunkt der ersten und siebten Fütterung, waren zwischen den beiden Fütterungsmethoden mit $p = 0,000017$ bzw. $p = 0,0000000013$ signifikant (Abb. 53).

Ebenso waren nach der siebten Fütterung am Kaninchen signifikant mehr Männchen ($p = 3,5 \times 10^{-10}$) und Weibchen ($p = 2,35 \times 10^{-11}$) vorhanden und es wurden signifikant mehr Eier abgelegt ($p = 2,06 \times 10^{-8}$) als bei der artifiziellen Fütterung mit Rinderblut. Die durchschnittliche Anzahl von Juvenilen war nach sieben Fütterungen bei beiden Methoden nicht signifikant unterschiedlich ($p = 0,1557$) (Abb. 54).

Aufgrund von zu geringen Tierzahlen musste die artifizielle Fütterung mit defibriniertem Rinderblut abgebrochen werden.

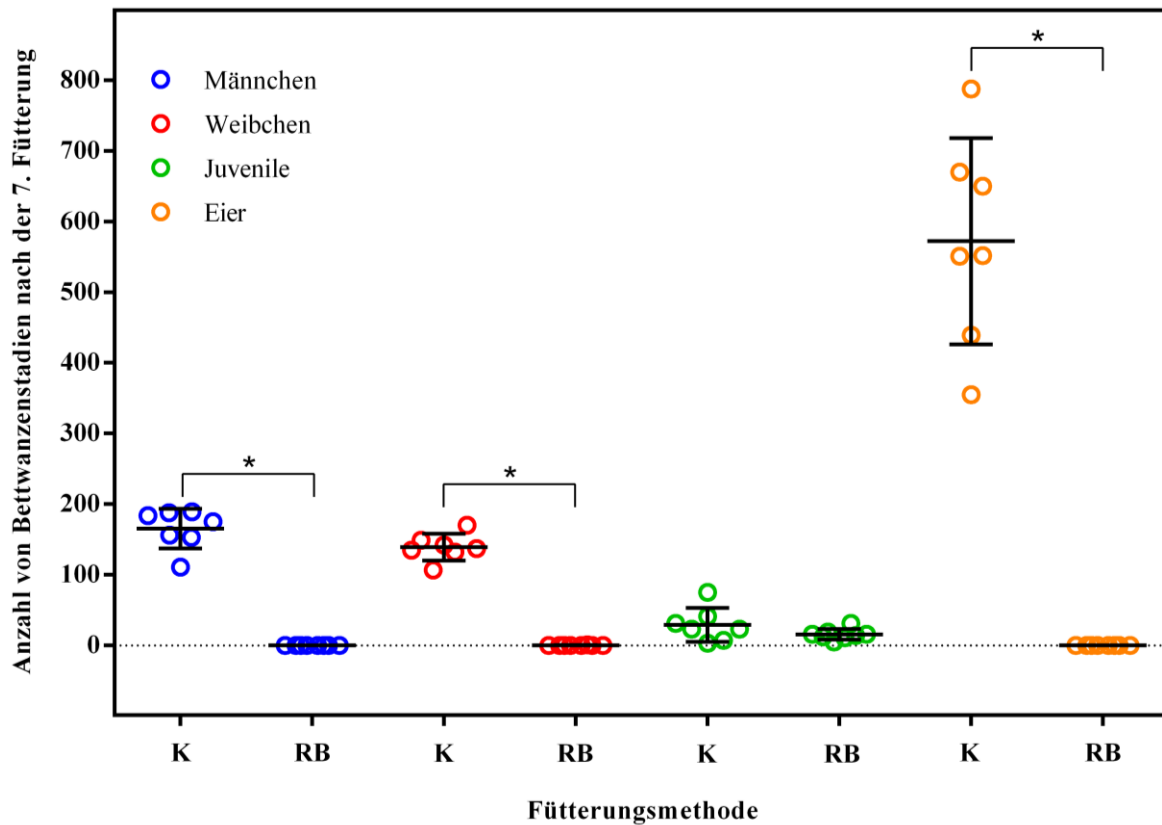


Abb. 54: Vergleich der Anzahl vorhandener männlicher und weiblicher *Cimex lectularius*, Juvenilstadien und Eier bei der Fütterung am Kaninchen (7 Replikate) und der künstlichen Fütterung mit defibriniertem Rinderblut (8 Replikate) zum Zeitpunkt der letzten Fütterung. Signifikante Unterschiede in den durchschnittlichen Tierzahlen aus beiden Methoden wurden mit multiplen ungepaarten t-Test (b) berechnet und die p-Werte mit dem Sidak-Bonferroni Post-Hoc-Test korrigiert. Die Punkte geben die biologischen Replikate an, die Querlinien den Mittelwert und die Whisker die Standardabweichung. * $p < 0,05$.

3.12.4 Aufzucht von Bettwanzen des UBA-Stamms mittels künstlicher Fütterung mit defibriniertem Schweine- und Schafsblut

Die Vorversuche zur Überprüfung der Attraktivität verschiedener Blutsorten zur künstlichen Fütterung haben gezeigt, defibriniertem Schweineblut die für Bettwanzen attraktivste Blutsorte war. Aus diesem Grund wurden zwei Versuchsansätze (A: 1320 und B: 2148 Tiere) mit adulten Bettwanzen in jeweils sechs Petrischalen ohne definierte Anfangstierzahlen wie in der Bettwanzenzucht üblich, künstlich gefüttert (Abb. 55). Ein Vergleich mit der Zucht durch Fütterung am Kaninchen erfolgte hier nicht mehr. Die Umstellung auf Membranfütterung erfolgte bei beiden Versuchsansätzen sieben Tage nach der sechsten Blutmahlzeit am Kaninchen. Eine Woche später wurden die Eiablagen abgenommen und wiederum eine Woche später der Nachschlupf (J1) an Schweineblut gefüttert. Die Mortalität innerhalb der Versuchsansätze und Generationen wurde wöchentlich dokumentiert. Aufgrund von Lieferschwierigkeiten und der daraus resultierenden ungenügenden Kühlung des Schweinebluts wurde Blut ver-

schiedener Qualität geliefert (s. 2.2.7.4). Offensichtlich verdorbenes Blut wurde für die Fütterung nicht mehr verwendet wodurch diese ausgesetzt werden mussten. Die Gesamt-tierzahlen sind im Anhang in Abb. 69 angegeben.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Aufzucht mit defibriniertem Schweineblut im Gegensatz zur Fütterung mit defibriniertem Rinderblut bei dem ersten Versuchsansatz bis zur dritten Generation und dem zweiten Versuchsansatz bis zur zweiten Generation gelang.

Bei Generation 1 Versuchsansatz A (G1(A)) wurden die sechste, neunte und zehnte Fütterung wegen offensichtlich verdorbenen Bluts um eine Woche verschoben. Für die sechste bis achte Fütterung musste unsachgemäß gelagertes Schweineblut ohne offensichtlichen Qualitätsverlust verwendet werden. Da eine visuelle Inspektion auf eine ungenügende Anzahl von Adulten deutete, konnte die erste Eiablage für die zweite Generation nicht wie üblich nach der siebten Fütterung, sondern erst nach der achten Fütterung abgenommen werden (G2-E1(A): 219 Tiere). Aufgrund von geringen Tierzahlen wurden nach der neunten Fütterung erneut Eier abgenommen (G2-E2(A): 591 Tiere. Nach insgesamt zehn Fütterungen lag die Mortalität der Bettwanzen von G1(A) bei 19 %. Wegen weiterer Lieferschwierigkeiten konnte die erste Fütterung von G2-E1(A) erst eine Woche verspätet erfolgen. Zwei Wochen nach der ersten Fütterung von G2-E1(A) begann parallel die Fütterung von G2-E2(A). Deshalb erfolgte die Fütterung am selben Blut. Die fünfte, siebte und elfte Fütterung von G2-E1(A) bzw. die dritte, fünfte und neunte Fütterung von G2-E2(A) erfolgte mit unsachgemäß gelagertem Schweineblut ohne offensichtlichen Qualitätsverlust. Aufgrund von zu wenigen Adulten erfolgte die Eiabnahme bei G2-E1(A) erst nach der zehnten Fütterung, bei G2-E2(A) bereits nach der achten. Die Eiabnahme erfolgte somit zum gleichen Zeitpunkt und konnte zusammengelegt werden (G3(A): 1079 Tiere). Nach insgesamt elf Fütterungen von G2-E1(A) und neun Fütterungen von G2-E2(A), lagen die Mortalitätsraten bei 31 % bzw. 14 %. Die erste Fütterung dieser dritten Generation (G3(A)) erfolgte direkt mit unsachgemäß gelagertem Schweineblut ohne offensichtlichen Qualitätsverlust. Eine Woche später waren 50 % der gesogenen J1 tot. Nach drei weiteren Fütterungen mit frischem Schweineblut lag die Mortalitätsrate gegenüber der Anfangstierzahl von G3(A) bei insgesamt 53 %. Um den Versuch aufgrund weiterer Lieferschwierigkeiten des Schweinebluts nicht abzubrechen wurde versucht die bisherige Zucht auf Schafsblut umzustellen. Obwohl das Blut immer frisch geliefert wurde, konnte die Abnahme der Eiablage aufgrund von zu wenig Adulten erst nach der elften Fütterung erfolgen. Die Mortalitätsrate lag gegenüber der Anfangstierzahl von G3(A) zu diesem Zeitpunkt bei 79 %.

Da Generation G4(A) nur aus 23 Bettwanzen bestand, wurde dieser Zuchtversuch abgebrochen.

Parallel zur Fütterung der Wanzen von G2-E1(A) wurde die erste Generation der zweiten Teilpopulation B (G1(B)) an demselben Schweineblut gefüttert. Deshalb wurden auch hier die Bettwanzen während der dritten, fünften und neunten Fütterung mit unsachgemäß gelagertem Schweineblut gefüttert (Abb. 57). Nach der achten Fütterung wurde die erste Eiablage (G2-E1(B): 447 Tiere) abgenommen und nach der neunten Fütterung (G2-E2(B): 669 Tiere) die zweite. Die zweite Generation von Versuchsansatz B G2-E1(B) wurde parallel mit demselben Blut wie die dritte Generation von Versuchsansatz A (G3(A)) gefüttert. Wie bei G3(A) war die Mortalität der gesogenen J1 mit 66 % sehr hoch. G2-E2(B) wurde zwei Wochen später parallel zu G2-E1(B) am selben Blut gefüttert. Da das Blut der fünften und sechsten Fütterung von G2-E1(B) und parallel bei G2-E2(B) das Blut der dritten und vierten Fütterung offensichtlich verdorben geliefert wurde, wurden die weiteren Fütterungen ebenfalls mit Schafsblut durchgeführt. Nach insgesamt zehn Fütterungen von G2-E1(B) und acht Fütterungen von G2-E2(B) lagen die Mortalitätsraten bei 88 % bzw. 71 %. Eine Eiabnahme konnte aufgrund der zu geringen Anzahl adulter Bettwanzen in beiden Versuchsansätzen nicht erfolgen. Der Zuchtversuch musste ebenfalls abgebrochen werden.

Um herauszufinden, ob die spontane Umstellung von Schweineblut auf Schafsblut innerhalb einer Generation für die höheren Mortalitätsraten bei der Fütterung mit Schafsblut verantwortlich war, oder ob es an der Attraktivität und Verträglichkeit des Schafsblutes an sich lag, wurden drei Replikate (insg. 384 Tiere) (s. Anhang, Abb. 68C) in einem dritten Versuchsansatz C nur an Schafsblut gefüttert. Die Umstellung auf die artifizielle Fütterung mit Schafsblut erfolgte auch hier bei der siebten Fütterung der Adulten (zuvor sechs Fütterungen am Kaninchen). Eine Woche später wurde die erste Eiablage (G1-E1(C): 308 Tiere) abgenommen. Zum Erhalt von mehr Nachkommen wurde nach einer weiteren Fütterung eine zweite (G1-E2(C): 167 Tiere) Eiablage abgenommen. Die Fütterungen erfolgten um eine Woche versetzt parallel am selben Blut (Abb. 55). Nach insgesamt neun Fütterungen lag die Mortalitätsrate von G1-E1(C) bei 73 %. Bei G1-E2(C) waren bei der Mortalitätskontrolle vor der achten Fütterung alle Bettwanzen tot. Dadurch musste auch dieser Zuchtversuch abgebrochen werden.

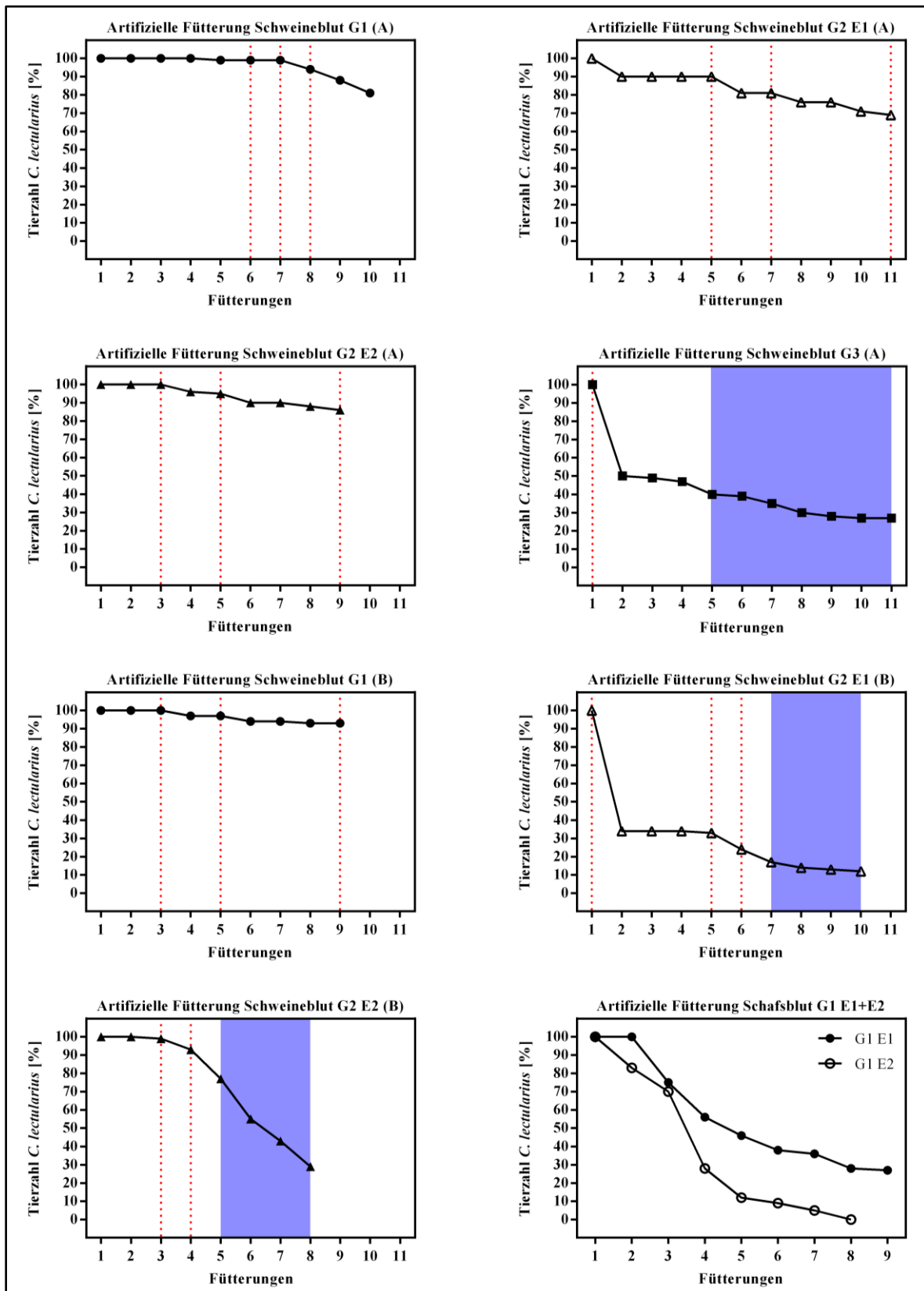


Abb. 55: Zuchtversuche von *Cimex lectularius* mittels artifizieller Fütterung unter der Verwendung von Schweineblut bei den Teilpopulationen A und B und unter der Verwendung von Schafsblut, mit jeweils verschiedenen Generationen (G) aus ein bis zwei Eiablagen (E1+E2). Rot gepunktete Linien markieren die Fütterung mit unsachgemäß gelagertem Schweineblut ohne offensichtlichen Qualitätsverlust, blaue Flächen markieren innerhalb einer Generation den Übergang zur artifiziellen Fütterung mit Schafsblut, da kein Schweineblut mehr geliefert wurde.

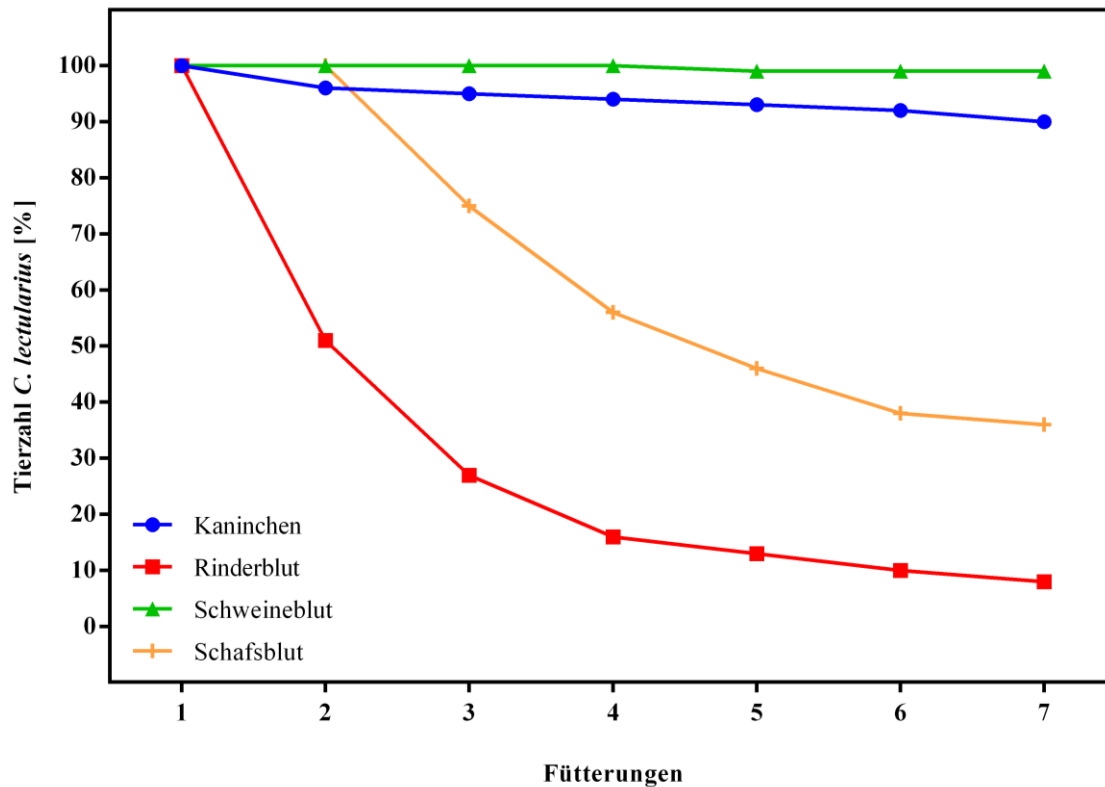


Abb. 56: Vergleich der Tierzahlen [%] der zu den jeweiligen Fütterungszeitpunkten vorhandenen *Cimex lectularius* der jeweils ersten Generation bei der Fütterung am Kaninchen (7 Replikate) und den artifiziellen Fütterungen mit defibriniertem Schweineblut (6 Replikate), Rinderblut (8 Replikate) und Schafsblut (3 Replikate).

Zum Vergleich des Zuchterfolgs der beiden Fütterungsmethoden wurden die prozentualen Tierzahlen zu den jeweiligen Fütterungszeitpunkten der jeweils ersten Generation der Fütterung am Kaninchen (7 Replikate) und den artifiziellen Fütterungen mit defibriniertem Schweineblut (6 Replikate), Rinderblut (8 Replikate) und Schafsblut (3 Replikate) in Abbildung 56 dargestellt. Nach der siebten Fütterung waren bei der Fütterung am Kaninchen mit 90 % und der artifiziellen Fütterung mit Schweineblut mit 99 % fast alle der eingesetzten Bettwanzen noch am Leben. Bei den artifiziellen Fütterungen mit defibriniertem Schafsblut waren mit 36 % und Rinderblut mit 8 % lebenden Bettwanzen, deutlich mehr als die Hälfte der eingesetzten Tiere tot.

3.13 Ergebnisse der deutschlandweiten Umfrage zur Erfassung der aktuellen Bettwanzensituation

In den Jahren 2011 bis 2013 wurde deutschlandweit eine Umfrage zur aktuellen Bettwanzensituation durchgeführt. Von den 329 Schädlingsbekämpfungsunternehmen (SBK), denen der „Fragenkatalog zur aktuellen Bettwanzensituation in Deutschland“ in den Jahren 2011 bis

2014 zugeschickt oder online angeboten wurde, haben insgesamt 26 Firmen den Fragebogen beantwortet. Fünf dieser Firmen führten keine Bettwanzenbekämpfungen durch. Somit konnten die Antworten von 21 Firmen aus neun Bundesländern für die Jahre 2008, 2009 und 2010 ausgewertet werden. Davon je vier aus Sachsen sowie Nordrhein-Westfalen, je drei aus Berlin sowie Niedersachsen, jeweils zwei aus Baden-Württemberg sowie Bayern und je eine aus Brandenburg, Rheinland-Pfalz sowie aus dem Saarland. Aufgrund der wenigen Antworten erschien eine statistische Auswertung der Ergebnisse nicht sinnvoll. Dennoch kann man in Abbildung 57 die Tendenz erkennen, dass die Anzahl der Bettwanzenbekämpfungen pro Schädlingsbekämpfungsunternehmen und Jahr vor allem in den privaten Haushalten aber auch in den öffentlichen Einrichtungen gestiegen sind.

In medizinischen Einrichtungen wurden insgesamt nur sehr selten Bekämpfungen durchgeführt und die Zahlen sind von 2008-2010 gleich geblieben. In den Städten Berlin, Hürth und Düsseldorf wurden innerhalb dieser drei Jahre die meisten Bekämpfungen pro SB durchgeführt.

Von den 21 SBK haben 13 Firmen berichtet, dass sie zur Tilgung eines Bettwanzenbefalls zwischen einer bis fünf Bekämpfungen benötigten. Die anderen SBK haben diesbezüglich nichts angegeben. Zudem haben 15 der 21 SBK Angaben zu ihrer Methode der Bettwanzenbekämpfung gemacht. Diese wurden in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tab. 11: Von den Schädlingsbekämpfern verwendete Wirkstoffe und Methoden zu Bettwanzenbekämpfung.

SBK	Pyrethroid	Carbamat	Pyrolle	Organophosphat	Hitze	Kälte
1	+	+	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	+	-
4	+	+	-	-	-	-
5	+	-	-	-	+	-
6	+	-	-	-	+	-
7	+	-	-	-	-	+
8	+	-	+	-	-	-
9	-	-	-	+	+	+
10	+	-	-	-	-	-
11	+	-	-	+	-	-
12	-	+	-	-	-	-
13	+	+	-	-	-	-
14	+	-	-	-	-	-
15	+	-	+	-	-	-

Vier der 21 SBK hatten Probleme bei der Bekämpfung unter der Verwendung von Pyrethroiden und eine davon auch bei der Verwendung des Wirkstoffs Bendiocarb, jeweils in verschiedenen Formulierungen, was ein Hinweis auf das Vorhandensein von Resistenzen sein könnte.

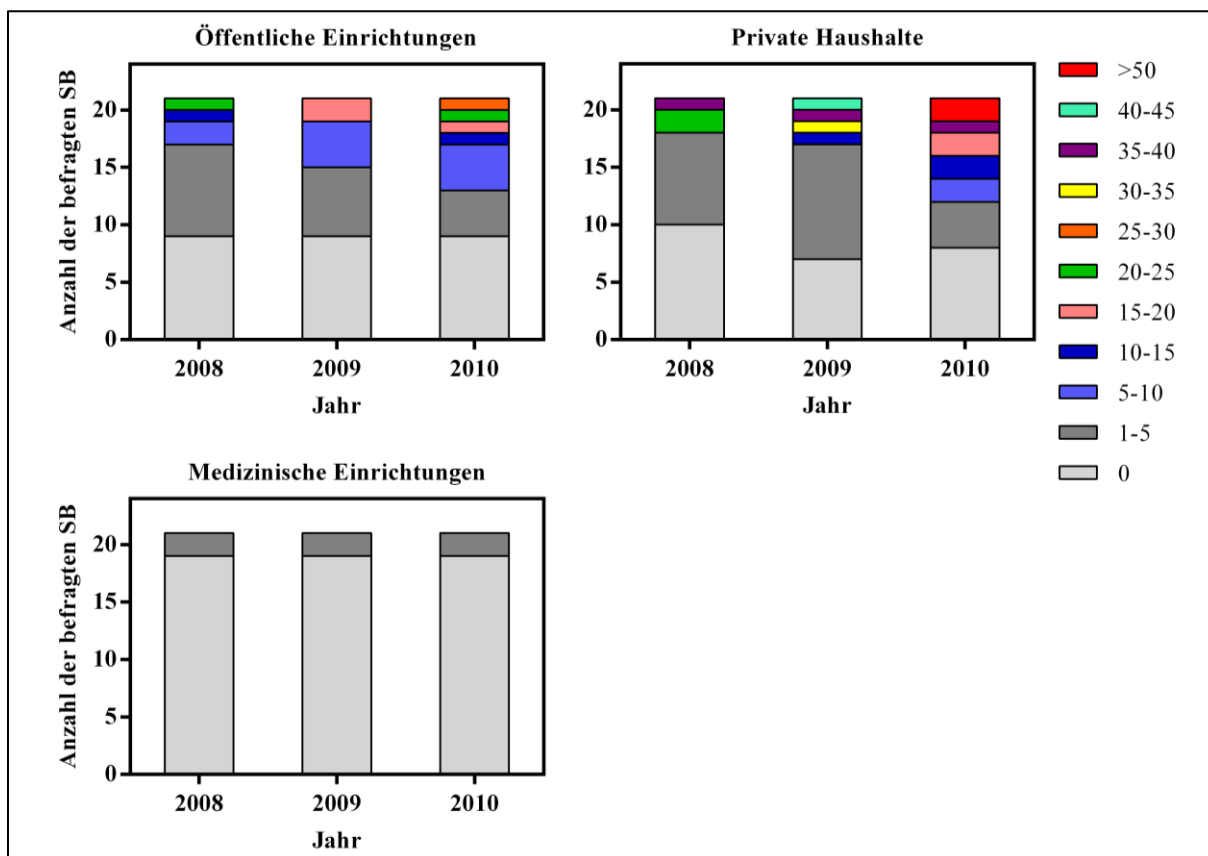


Abb. 57: Anzahl der Bettwanzenbekämpfungen pro Schädlingbekämpfer (SB) pro Jahr in privaten Haushalten, öffentlichen Einrichtungen und medizinischen Einrichtungen.

4 Diskussion

Die Bettwanze *C. lectularius* war in industrialisierten Ländern vor allem zu Kriegszeiten (BOASE 2008) ein weit verbreiteter hämatophager Ektoparasit und Lästling. Die Globalisierung, die vermehrte Reisetätigkeit der Menschen, der nationale und internationale Handel mit Gebrauchsgütern sowie eine eingeschränkte Auswahl an derzeit verfügbaren Wirkstoffen sind mit dafür verantwortlich, dass die Bettwanze seit den 1990er Jahren wieder weltweit auftritt (DAVIS et al. 2009; KOLB et al. 2009; PINTO et al. 2007). Als Hauptgrund für die Ausbreitung der Bettwanzen in den letzten Jahren wird die Entstehung von Resistenzen gegen die Wirkstoffe Pyrethroide genannt (DAVIES ET AL. 2012; MAMIDALA ET AL. 2011A; MAMIDALA ET AL. 2012; ROMERO ET AL. 2007; SEONG ET AL. 2010; YOON ET AL. 2008; ZHU ET AL. 2010A; ZHU ET AL. 2010B), wobei jedoch aus Deutschland bisher keine wissenschaftlichen Daten über die Verbreitung resistenter Bettwanzen und deren Resistenzstatus vorliegen. Dies ist die erste Arbeit, in der bei *C. lectularius*-Feldstämmen in Deutschland mittels Filterkontakt-Biotests erhöhte Resistenzindizes (R_i) ermittelt werden. Darüber hinaus wurden hier erstmals mit Hilfe verschiedener molekularbiologischer Methoden sowohl die potentiell *kdr*-verursachenden Mutationen V419L und L925I als auch erhöhte Transkriptlevel von zwei P450-Enzymen nachgewiesen.

4.1 Aufzucht von Bettwanzenfeldpopulationen

Im Zeitraum von 2008 bis 2013 wurden in Berlin an 20 Befallsorten Bettwanzen eingesammelt, oder diese wurden von Schädlingsbekämpfern bereitgestellt. Für den 24B wurden jeweils 600 männliche Bettwanzen benötigt. Diese hohen Tierzahlen konnten lediglich bei der Aufzucht der fünf Feldstämme HO, LB, SK, OB, AS in einem Zeitraum von mindestens einem Jahr erreicht werden. Bei zehn Feldpopulationen (B1-B10) konnte dagegen entweder aufgrund von zu geringen Tierzahlen oder der Abgabe bereits toter Bettwanzen kein Aufzuchtversuch erfolgen.

Auch die Aufzucht des T-, GW-, RS-, LBII- und des LBIII-Feldstamms sowie des Bayer CC-Laborstamms blieb trotz hoher Anfangstierzahlen erfolglos. Dafür verantwortlich könnten Fitnessnachteile durch möglicherweise vorhandene Insektizid-Resistenzen sein, wie es bereits für andere Insekten nachgewiesen wurde (BRITO et al. 2013; CARRIERE et al. 1994; DINIZ et al. 2014; ROUSH und PLAPP 1982; ROUSH und MCKENZIE 1987; ROY et al. 2010). Der Resistenzindex (R_i) der Feldstämme ohne Zuchterfolg und der Populationen konnte aller-

dings aufgrund unzureichender Tierzahlen nicht untersucht werden, so dass hier in Bezug auf die untersuchten Bettwanzen eine konkrete Aussage nicht möglich ist. Der molekulare Nachweis von potentiellen Pyrethroid-Resistenzmechanismen mit auffallend starker Ausprägung in den untersuchten Stämmen ohne Züchterfolg weist aber auf eine vorhandene Pyrethroid-Resistenz hin (s. 4.3.2). Dies widerspricht jedoch den Vermutungen von POLANCO et al. (2011b), dass *C. lectularius* bei der Idee, dass sich erbliche Resistenzmechanismen nachteilig auf die Fitness der Tiere auswirken könnten, eine Ausnahme bildet. Sie konnten nachweisen, dass Bettwanzen des hoch Pyrethroid-resistenten Richmond-Stamms im Gegensatz zu einem suszeptiblen Stamm eine höhere Überlebensrate sowie eine kürzere Entwicklungsdauer vom Ei bis zum adulten Tier aufwiesen.

Eine andere Untersuchung von POLANCO et al. (2011a) zeigt, dass multiple traumatische Inseminationen die Fertilität der weiblichen Bettwanzen herabsetzten. Ein Geschlechterverhältnis zu Gunsten der Männchen erhöht die Häufigkeit der Paarungen wodurch die Eiablage rate pro Weibchen verringert wird. Da das Geschlechterverhältnis vor der Aufzucht der Bettwanzenfeldstämme in dieser Arbeit nicht überprüft wurde, könnte dies ein weiterer Grund für die erfolglose Aufzucht der oben genannten Feldstämme sein.

4.2 Beurteilung des 24-Well-Filterkontakt-Biotests

Der in dieser Arbeit angewandte 24-Well-Filterkontakt-Biotest (24B) (adaptiert von ROMERO et al. (2007)) ist durch die parallele Untersuchung einer großen Anzahl von Bettwanzen eine schnelle Methode, um Wirkstoffresistenzen in Feldstämmen zu detektieren. Er wurde angesichts großer Schwankungen in den Ergebnissen des zuvor im UBA etablierten Petrischalen-Filterkontakt-Biotests (PB) eingeführt. Als Ursache für die größere Streuung der Versuchsergebnisse in den PB-Versuchen wurde zunächst das natürliche Aggregationsverhalten von *C. lectularius* (MARX 1955; SILJANDER et al. 2008) gesehen. Es konnte beobachtet werden, dass die Tiere nach dem Einsetzen in die Petrischalen für kurze Zeit auf dem Filterpapier herumliefen und anschließend aggregierten. In solchen Bettwanzenaggregaten hatten einige Tiere wenig bis keinen Kontakt mehr zu der mit Wirkstoff behandelten Oberfläche. Im Gegensatz zum PB war im 24B durch den Einsatz einzelner Bettwanzen eine Aggregation der Tiere unmöglich. Der direkte Vergleich der beiden Biotestmethoden unter Verwendung von Deltamethrin hat zwar gezeigt, dass die Methode keinen signifikanten Einfluss auf die letale Schädigung von männlichen Bettwanzen hatte, was vermutlich dem schnellen Knockdown-Effekt des Wirkstoffs geschuldet ist. Bei dem Einsatz weniger schnell wirkender Wirkstoffe

könnte allerdings die schnelle Aggregation der Bettwanzen Schwankungen in der Schädigung einzelner Tiere verursachen, und daher bleibt es sinnvoll, die Tiere getrennt voneinander in den Versuch einzubringen.

Eine weitere Erklärung für die Schwankungen im PB könnte die Verwendung beider Geschlechter sein. BUSVINE (1958) konnte in Versuchen mit DDT und Dieldrin beobachten, dass weibliche *C. lectularius* sensibler auf diese Wirkstoffe reagierten als männliche. Grundsätzlich könnte davon ausgegangen werden, dass die durchschnittlich größeren und schwereren Weibchen weniger anfällig gegen die verwendeten Insektizide sind. Allerdings kann die wiederholte traumatische Insemination vor Versuchsbeginn Verletzungen und Schwächungen verursacht haben, was wiederum Schwankungen in der Schädigung einzelner Weibchen nach sich gezogen haben kann. Verschiedene Untersuchungen bestätigen, dass häufiges Paaren die Fitness der Weibchen herabsetzt (REINHARDT und SIVA-JOTHY 2007; SIVA-JOTHY 2006; STUTT und SIVA-JOTHY 2001). Auch das Geschlechterverhältnis in den Zuchtpetrischalen, in welchen männliche und weibliche Wanzen gehalten wurden, kann einen Einfluss auf die Paarungshäufigkeit und damit auf die Fitness der Weibchen gehabt haben. So ist die Wahrscheinlichkeit, dass Weibchen häufig begattet werden, in einer Petrischale mit einer größeren Anzahl von Männchen höher (BENOIT 2011; BENOIT et al. 2012; POLANCO et al. 2011a).

Da die Verletzungen durch traumatische Insemination mit bloßem Auge nicht erkennbar sind, ist eine Unterscheidung von begatteten und unbegatteten Weibchen vor Versuchsbeginn nicht möglich gewesen. Die randomisierte Auswahl der Versuchstiere könnte zu Folge gehabt haben, dass Tiere unterschiedlich anfälligen Zustands, z.B. sich frisch vor Versuchsbeginn verpaarte Weibchen oder über einem längeren Zeitraum nicht begattete Weibchen, eingesetzt wurden.

In den Untersuchungen am UBA-Feldstamm im PB starben beispielsweise die Weibchen bei einer signifikant geringeren Deltamethrin-Konzentration als die Männchen, während dies bei Einsatz der Tiere des SK-Stamms genau umgekehrt war. Aufgrund der durch Verletzungen bedingten intergeschlechtlichen und bei Weibchen auch intrageschlechtlichen zu beobachtenden Schwankungen ist es daher sinnvoll, voneinander getrennt eingesetzte, männliche Tiere zur Überprüfung des Resistenzstaus von Bettwanzenpopulationen zu verwenden. Außerdem können die geschlechtsabhängigen Unterschiede in den Mortalitätsraten nicht unerhebliche Auswirkungen auf die Versuchsergebnisse haben. So lag der R_i im SK-Stamm von beiden Geschlechtern zusammen bei $R_i = 13,4$, der von Weibchen allein war mit $R_i = 21,11$ jedoch

mehr als doppelt so hoch wie der der Männchen mit $R_i = 8,46$. Im Hinblick auf die Festlegung eines R_i (s. 4.3.1), bei dem ein Bettwanzenstamm als resistent einzustufen ist, ist es daher empfehlenswert, auch die Verwendung des Geschlechts der Tiere festzulegen, mit denen ein standardisierter Test durchgeführt wird.

4.3 Nachweis von Pyrethroid-Resistenzen bei der Bettwanze *C. lectularius* in Deutschland

4.3.1 Detektion von Toleranzen in den Feldstämmen gegen den Wirkstoff Deltamethrin

Die Untersuchungen im 24B haben gezeigt, dass die Unterschiede in den EC_{50} -Werten für Deltamethrin zwischen dem wirkstoffsensiblen UBA-Stamm und den fünf Feldstämmen mit erfolgreicher Aufzucht (LB, HO, SK, OB und AS) statistisch hoch signifikant waren. Zudem konnte eine letale Schädigung von 100 % bei der höchsten Konzentration von $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (bzw. $7,81 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) bei den Tieren des UBA-Stamms, nicht aber bei den Bettwanzen dieser Feldstämme erreicht werden. Zu den resultierenden Resistenzindizes von $R_i = 4,3$ bis $R_i = 20,6$ (Tab. 12) ist anzumerken, dass diese im Vergleich zu Berichten aus den USA mit Resistenzindizes von beispielsweise annähernd 5.200 (ADELMAN et al. 2011) und 12.800 (ROMERO et al. 2007) oder Australien mit 432.000 (LILLY et al. 2009) wesentlich niedriger waren.

Ein Grund für die um mehrere Größenordnungen niedrigeren R_i der in Berlin gesammelten Feldstämme könnten Unterschiede in den Aufzuchtzeiten der Bettwanzen zwischen dieser und den anderen Untersuchungen sein. ROMERO et al. (2007) haben überwiegend ihre gesammelten Bettwanzen direkt im 24B eingesetzt. ADELMAN et al. (2011) konnten parallel den hochresistenten Richmond-Stamm bereits nach einem halben Jahr Aufzucht im Biotest auf Pyrethroid-Resistenz untersuchen. Dahingegen erfolgte die Aufzucht der fünf in dieser Arbeit im 24B untersuchten Feldstämme bis zum Erhalt von ausreichenden Tierzahlen über einen Zeitraum von mindestens einem Jahr im Labor ohne Selektionsdruck durch Wirkstoffe. Es ist möglich, dass sich der R_i in diesem Zeitraum durch den fehlenden Selektionsdruck verringert hat.

Resistente Bettwanzen könnten ohne Selektionsdruck durch Insektizid-Exposition einen Selektionsnachteil aufgrund der bereits unter 4.1 diskutierten Fitnessnachteile haben. Dadurch könnten Resistenzen verursachende Mechanismen mit der Zeit verloren gegangen sein. Diese Annahme wird durch Untersuchungen im 24B mit dem SK-Stamm unterstützt, bei welchem der R_i in einem Zeitraum von über drei Jahren (2009-2012) bei fehlender Insektizid-

Exposition um mehr als das 16fache gesunken ist. ZHU et al. (2013) haben ebenfalls festgestellt, dass der R_i des Cin1-Stamms (ursprünglicher Stamm des CC-Stamms von Bayer in dieser Arbeit) bei einer Aufzucht im Labor ohne Selektionsdruck bei fehlender Wirkstoffexposition in einem Zeitraum von etwa fünf Jahren von einem $R_i > 10.000$ auf einen $R_i = 51$ gesunken ist. Ähnliches konnten POLANCO et al. (2011b) beim Kramer-Stamm beobachten. Der R_i dieses Stamms lag nach einem halben Jahr Zucht ohne Wirkstoffexposition im Juni 2006 bei 339,6 und sank bei der erneuten Untersuchung im Februar 2011 auf einen Wert von $R_i = 3,83$.

Ein weiterer Grund für die im Vergleich mit anderen Studien niedrigen R_i in dieser Arbeit könnte die Tatsache sein, dass nur die R_i von Stämmen mit Zuchterfolg im Labor des UBA evaluiert werden konnten. Die Aufzucht ausreichender Tierzahlen für den 24B der Feldstämme T, GW, RS, LBII, LBIII und des CC-Stamms sowie der Feldpopulationen B1-10 blieb möglicherweise auf Grund von Fitnessnachteilen bedingt durch vorhandene Resistenzen (s. Punkt 4.1) ohne Erfolg. Das würde zur Folge haben, dass die Auswahl der untersuchten Stämme nicht zufällig erfolgte, sondern die R_i selektiv in Stämmen mit höherer Suszeptibilität gegenüber Deltamethrin bestimmt wurden.

Dass auch methodische Unterschiede in den Resistenzuntersuchungen einen Einfluss auf die letale Schädigung der Bettwanzen und damit auch auf die resultierenden R_i der Stämme haben können, zeigen die Untersuchungen von KOGANEMARU et al. (2013). Der R_i des Pyrethroid-resistenten Richmond-Stamms stieg von 5.200 auf > 200.000 durch Umstellung der Methode von direkter Injektion in den Wanzenkörper auf die topikale Applikation. Auch LILLY et al. (2009) haben den R_i von 432.000 mittel der topikalen Applikation nachgewiesen. KOGANEMARU et al. (2013) haben in diesem Stamm erhöhte Transkriptlevel von Genen, die kutikuläre Proteine kodieren, nachgewiesen und vermuten deshalb, dass die unterschiedlichen R_i durch ein vermindertes Eindringen der Insektizide bedingt sind. Der Einfluss solcher Modifikationen in der Lipidschicht der Kutikula auf die R_i der in dieser Arbeit untersuchten Bettwanzenstämme wurde nicht untersucht und kann deshalb nicht ausgeschlossen werden.

Die Diskrepanzen zwischen den R_i der Bettwanzenfeldstämme aus Deutschland und denen aus anderen Ländern könnten auch die tatsächliche Resistenzsituation widerspiegeln. Sollte dies der Fall sein, könnten die niedrigen R_i in Deutschland als ein Resultat aus abweichenden Bekämpfungsstrategien der einzelnen Länder oder sogar aus der unsachgemäßen Insektizidausbringung bei Bettwanzenbekämpfungen gesehen werden, welche eine Resistenz-

entwicklung begünstigen. So gibt es zwar seit einigen Jahren Dokumente mit Empfehlungen zur korrekten Durchführung einer Bettwanzenbekämpfung (BLOOM et al. 2010; DOGGETT 2013; KILLGERM 2012; NPMA 2011), jedoch keine Vergleichsdaten über die tatsächliche Bekämpfungsroutine in den einzelnen Ländern.

Der R_i repräsentiert das Maß für Resistenz eines Stamms oder einer Population und dient vor allem als Vergleichswert zwischen verschiedenen Stämmen und Stadien. Trotzdem wurde bisher auf internationaler Ebene nicht geklärt, welchen R_i ein Bettwanzenstamm aufweisen muss, um als resistent definiert zu werden.

Eine Insektizid-Resistenz ist allgemein definiert als die Heritabilität der durch ständige Insektizidexposition selektierten Merkmale die zu einer geringeren Suszeptibilität von Insekten gegenüber Insektiziden und damit zu einer unzureichenden Tilgung dieser Insekten in der Praxis führt (ONSTAD 2014; SAWICKI 1987).

Ergänzend dazu hat die United States Environmental Protection Agency (EPA) 2012 in einem Entwurf einer Richtlinie zum Testen von Insektiziden gegen Bettwanzen im Laborversuch (Draft Product Performance Test Guidelines, OCSPP 810.3900: Laboratory Testing Methods for Bed Bug Pesticide Products) eine resistente Bettwanzenpopulation dadurch definiert, „dass die Mehrheit der Bettwanzen einer Population fähig ist, eine in einer wirkstoffsensiblen Population letale Dosis zu überleben“. Weiterhin heißt es, „dass ein $R_i \geq 100$ charakteristisch für einen resistenten Stamm ist“.

Obwohl bei allen fünf im 24B getesteten Bettwanzenfeldstämmen bei der höchsten Konzentration nie eine letale Schädigungsrate von 100 % erreicht wurde, wäre nach dieser Definition keiner der Stämme resistent gegenüber Deltamethrin. Dies impliziert, dass Tiere dieser Stämme ebenso wie der wirkstoffsensible UBA-Stamm in einer praxisnahen Bekämpfungssituation unter der Verwendung von Pyrethroiden vollständig getilgt würden.

Der AS-Feldstamm ($R_i = 20,6$) wurde jedoch unter praxisnahen Bedingungen im in dieser Arbeit weiterentwickelten Wahlversuch als *simulated use*-Test (s. 4.5.1) im Gegensatz zum UBA-Stamm nicht getilgt. Daher ist die Definition einer resistenten Bettwanzenpopulation der EPA und des darin empfohlene Grenzwerts von $R_i \geq 100$ kritisch zu betrachten, da offensichtlich bereits bei Bettwanzenpopulationen mit deutlich geringeren R_i eine Tilgung nicht erreicht werden kann.

In der Praxis könnte die unzureichende Tilgung von Bettwanzenpopulationen mit resistenten Individuen eine Weiterverbreitung der Tiere erleichtern und zur weiteren Selektion resistenter Bettwanzen innerhalb dieser Population führen (POTTER 2005). Daher wird die allgemeine

Definition einer Insektizid-Resistenz an dieser Stelle favorisiert, und der AS-Feldstamm kann aufgrund der vorliegenden Untersuchungsergebnisse als Pyrethroid-resistent eingestuft werden. Demnach müsste der Grenzwert für die Definition eines Pyrethroid-resistenten Bettwanzenfeldstamms unter der Verwendung des 24B bereits bei einem $R_i \geq 20$ liegen.

4.3.2 Nachweis potentieller Resistenzmechanismen auf molekularer Ebene

Eine physiologische Pyrethroid-Resistenz konnte nur für den AS-Stamm nachgewiesen werden (s. 4.5.1). Das Vorhandensein von potentiellen Resistenzmechanismen in mehreren molekularbiologisch untersuchten Feldstämmen und -populationen lässt jedoch die Vermutung zu, dass bei einer Bekämpfung mit pyrethroiden Insektiziden eine Tilgung ebenfalls ausbleiben könnte. In Tabelle 12 sind sämtliche Ergebnisse der Untersuchungen zur Detektion von Pyrethroid-Resistenzen und der sechs potentiellen Resistenzmechanismen in den einzelnen Feldstämmen und Populationen zusammengefasst.

Für eine dauerhaft erfolgreiche Bekämpfungsstrategie sowie ein adäquates Resistenzmanagement, vor allem bei Infestationen, die ganze Häuserkomplexe betreffen, ist ein in wenigen Tagen auswertbarer Nachweis von Pyrethroid-Resistenzen in Bettwanzen unerlässlich (STANLEY 2014). Im Rahmen dieser Arbeit konnte, wie auch schon in anderen Untersuchungen (KNOLHOFF und ONSTAD 2014; ZHU et al. 2013), gezeigt werden, dass wenn die für Resistenzen verantwortlichen Mutationen bekannt sind, die Pyrosequenzierung als Methode der quantitativen und qualitativen Sequenzierung von SNPs und die qRT-PCR zur Quantifizierung der mRNA-Expression fremdstoffmetabolisierender Enzyme zum Monitoring von Bettwanzen Feldpopulationen geeignet sind. Es ist vorstellbar, dass mit Hilfe dieser Methoden von Schädlingsbekämpfern als resistent beurteilte Bettwanzen innerhalb kürzester Zeit im Labor untersucht werden können, und die Bekämpfungsstrategie aufgrund der Ergebnisse angepasst werden kann.

Tab. 12: Potentielle Resistenzmechanismen die in den jeweils zehn *Cimex lectularius*-Feldstämmen und -populationen sowie im CC-Laborstamm detektiert wurden. Angegeben sind die prozentualen Allelfrequenzen von je 100 männlichen und weiblichen Bettwanzen, sowie die heterozygoten und homozygoten Bettwanzen der Mutation L925I (vom CC-Stamm auch von V419L). Mutierte Tiere, die nur während der Genotypisierung der Einzeltiere und nicht bei der Untersuchung der Allelfrequenzen detektiert wurden, sind mit einem * gekennzeichnet. Zudem sind nur die dem wirkstoffsensiblen UBA-Stamm gegenüber signifikant erhöhten mRNA-Expressionslevel der untersuchten Feldstämme angegeben.

FS/FP	Allelfrequenzen [%]		Genotypen L925I	mRNA-Expressionslevel der CYP-Gene				R _i
	V419L	L925I		<i>cyp397a1</i>	<i>cyp398a1</i>	<i>cyp4cm1</i>	<i>cyp6dn1</i>	
UBA	-	-	0 H / 0 HM	-	-	-	-	-
LB	-	31/30	3 H / 1 HM	-	-	-	-	4,3
HO	-	-	17 H / 2 HM*	7,1	-	-	-	4,9
SK	-	39/44	14 H / 2 HM	17,3	-	-	-	7,2
OB	-	60/59	10 H / 2 HM	-	-	-	-	10,9
AS	-	67/51	9 H / 2 HM	17,5	-	-	-	20,6
GW	-	100/99	n.a.	56	-	-	-	n.a.
T	-	-	n.a.	44,9	4,9	-	-	n.a.
CC	-	32/76	14 H / 3 HM 3 H (V419L)*	-	-	-	-	n.a.
RS	96/40	100/100	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
LBII	-	98	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
LBIII	-	100	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
B1	-	n.a.	1 HM	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
B2	-	100/100	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
B3	-	100/100	2 HM	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
B4	-	79/92	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
B5	-	100/100	1 HM	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
B6	-	n.a.	2 HM	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
B7	-	100	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
B8	-	100	1 HM/	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
B9	-	100/100	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
B10	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

Erläuterungen: R_i: Resistenzindex; H: heterozygot; HM: homozygot; FS: Feldstämme; FP: Feldpopulationen.

Mittels der Pyrosequenzierung konnten die Allelfrequenzen der potentiellen *kdr*-Mutationen V419L und L925I in gepoolten Proben der 20 Feldstämme und -populationen sowie des CC-Stamms bestimmt werden. Weder in Bettwanzen des UBA-Stamms noch in Tieren aus den Feldstämmen T und B10 konnte eine der beiden Mutationen detektiert werden. Bettwanzen von 17 der 20 deutschen Stämme und Populationen wiesen nur die Mutation L925I auf, und in Bettwanzen des RS-Feldstamms sowie des CC-Stamms konnten beide Mutationen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse bestätigen die Existenz von beiden Mutationen in Bettwanzenpopulationen aus Deutschland. Von den fünf Feldstämmen mit Zuchterfolg wiesen die drei

Stämme AS, OB und SK mit dem jeweils höchsten R_i auch die höchsten Allelfrequenzen von L925I auf (Tab. 12). Für den AS-Stamm wurde im Wahlversuch unter Praxisbedingungen bereits gezeigt, dass dieser resistent gegenüber Pyrethroiden ist. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Mutation L925I für eine Pyrethroid-Resistenz bzw. eine verminderte Suszeptibilität gegenüber Pyrethroiden bei Bettwanzen verantwortlich sein könnte.

Die Mutation V419L trat nur in Kombination mit der Mutation L925I bei den Stämmen RS und CC auf. Die Mutation V419L war damit deutlich unterrepräsentiert. Dieses Ergebnis wird von verschiedenen Studien aus den USA und Australien bestätigt (ADELMAN et al. 2011; DANG et al. 2014b; ZHU et al. 2010b; ZHU et al. 2013).

In der Genotypisierung von acht Feldstämmen (je 20 einzelne Bettwanzen im gleichen Geschlechterverhältnis) in dieser Arbeit wurden für den Austausch L925I sowohl heterozygote als auch homozygote Individuen nachgewiesen. So konnte für den in dieser Arbeit als „pyrethroid-resistent“ charakterisierten AS-Stamm gezeigt werden, dass in 10 % der untersuchten Bettwanzen die Mutation homozygot und in 45 % der Fälle heterozygot vorlag. Es konnte aber nicht geklärt werden, ob das Auftreten des Austausches L925I in heterozygoter Form eine Erhöhung des R_i zu Folge hat, oder ob das Allel dazu in homozygoter Form vorliegen muss. Vier der im Pool untersuchten Feldstämme ohne Zuchterfolg (GW, RS, LBII, LBIII) sowie sechs Bettwanzenpopulationen (B2, B3, B5, B7, B8, B9) wiesen für L925I Allelfrequenzen im Bereich von 100 % auf (Tab. 12). Damit müssten die Stämme fast gänzlich aus homozygot mutierten Individuen bestehen. Die Ermittlung des R_i im Biotest war aber aufgrund von Zuchtschwierigkeiten nicht möglich, so dass eine Aussage über den Resistenzstatus dieser Populationen nicht möglich ist.

ROMERO et al. (2007) vermuten auf Grund von Kreuzungsstudien, die sie mit wirkstoffsensiblen und Pyrethroid-resistenten Bettwanzenstämmen durchgeführt haben, dass das oder die für die Resistenz verantwortlichen Gene unvollständig dominant vererbt werden. Darüber hinaus gibt es in der Literatur keine konkreten Informationen dazu, welcher Erbgang der *kdr*-vermittelten Pyrethroid-Resistenz bei den Bettwanzen zugrunde liegt.

Die Ergebnisse der Bestimmung der Allelfrequenzen und der Genotypisierung des HO-Feldstamms waren im Gegensatz zu den anderen Feldstämmen widersprüchlich (Tab. 12). Im 24-Well-Filterkontakt-Biotest waren die EC_{50} -Werte für Deltamethrin im HO-Stamm zwar signifikant höher als beim wirkstoffsensiblen UBA-Stamm. Allerdings gab es in der letalen Schädigung bei der höchsten Konzentration keinen Unterschied, und bei der Untersuchung

der Allelfrequenzen konnten die beiden Mutationen V419L und L925I nicht nachgewiesen werden. Umso überraschender war die Detektion für L925I heterozygot und homozygot mutierter Bettwanzen (17 heterozygote und 2 homozygote von insgesamt 20 Individuen) bei der Genotypisierung einzelner Tiere. Da die Bettwanzen aus demselben Vorrat eingefrorener Wanzen stammten wie diejenigen für die Genotypisierung, ist eine Verwechslung von Stämmen schwer vorstellbar. Innerhalb dieser Arbeit konnte keine weitere Erklärung für die Diskrepanzen in diesen Versuchsergebnissen gefunden werden.

Die mRNA-Expression der CYP-Gene *cyp397a1*, *cyp398a1*, *cyp4cm1* und *cyp6dn1*, die nachweislich für die bei Bettwanzen verminderte Suszeptibilität gegenüber Pyrethroiden verantwortlich sind (ZHU et al. 2013), wurde mittels qRT-PCR an acht Feldstämmen untersucht. In insgesamt fünf der acht untersuchten Feldstämme (HO, SK, AS, GW und T) wurden für das CYP-Gen *cyp397a1* ein dem UBA-Stamm gegenüber signifikant erhöhter mRNA-Expressionslevel nachgewiesen (Tab. 12). Untersuchungen von ADELMAN et al. (2011) zeigen ebenfalls, dass der Transkriptlevel dieses CYP-Gens in Pyrethroid-resistenten Bettwanzenstämmen stark erhöht (> 36fach) ist. Der T-Stamm wies als einziger Stamm einen signifikant erhöhten Transkriptlevel für ein zweites CYP-Gen auf (*cyp398a1*). Ein erhöhter mRNA-Transkriptlevel geht nicht zwangsläufig mit einer erhöhten Expression von Proteinen einher (FEYEREISEN 2005; PITTENDRIGH et al. 2014b), aber die Tatsache, dass die mRNA-Expressionslevel der vier untersuchten CYP-Gene beim wirkstoffsensiblen UBA-Referenzstamm nicht erhöht waren, lässt zumindest für die CYP-Gene *cyp397a1* und *cyp398a1* vermuten, dass diese mit einer möglichen Pyrethroid-Resistenz in den untersuchten Bettwanzenfeldstämmen in Verbindung stehen.

Bei der Betrachtung sämtlicher Ergebnisse dieser Feldstämme ist ein Zusammenhang zwischen den detektierten potentiellen Resistenzmechanismen und den resultierenden R_i erkennbar. Die Allelfrequenzen der Mutation L925I lagen in beiden Geschlechtern der Feldstämme AS und OB bei knapp 60 %. Der um das 17fache erhöhte mRNA-Expressionslevel des CYP-Gens *cyp397a1* im AS-Stamm könnte als zusätzlicher Resistenzmechanismus für den fast doppelt so hohen R_i des AS-Stamms im Vergleich zum OB-Stamm verantwortlich sein. Der mRNA-Expressionslevel des CYP-Gens *cyp397a1* war auch im SK-Stamm um das 17fache erhöht. Allerdings war die Mutation L925I hier nur in einer Frequenz von 39 % der untersuchten Bettwanzenmännchen vorhanden, was den deutlich niedrigeren R_i im Vergleich zum AS-Stamm ebenfalls erklären könnte. Beim LB-Feldstamm war der Transkriptlevel von kei-

nem der CYP-Gene erhöht und die Allelfrequenz von L925I lag nur bei 31 % (Wert für die Männchen), was auch in diesem Fall den vergleichsweise niedrigen R_i erklären könnte.

Der T-Stamm wies den höchsten mRNA-Expressionslevel des CYP-Gens *cyp397a1* auf. Auch der Level des CYP-Gens *cyp398a1* war leicht erhöht, aber es konnte keine der beiden *kdr*-Mutationen nachgewiesen werden. Die Ermittlung des R_i im 24B, welcher Hinweise insbesondere auf die Rolle des CYP-Gens *cyp397a1* in der Pyrethroidresistenz hätte geben können, war aufgrund der erfolglosen Aufzucht des T-Stamms jedoch nicht möglich. Die Tiere des T-Stamms wurden am Befallsort wiederholt von den Wohnungsmietern mit einem pyrethroidhaltigen Spray für den Haushaltsbedarf behandelt. Solch ein Spray ist aufgrund der darin enthaltenen geringen Wirkstoffmenge für eine Bettwanzenbekämpfung ungeeignet. Der wiederholte Kontakt der Wanzen mit subletalen Pyrethroid-Dosen könnte aber die Selektion von Tieren mit einem erhöhten Transkriptlevel der CYP-Gene *cyp397a1* und *cyp398a1*, die potentielle fremdstoffmetabolisierende P450-Enzyme kodieren, begünstigt haben. Unter der Annahme, dass die hier vergleichsweise stark erhöhte Expression von *cyp397a1* einen Einfluss auf die Pyrethroid-Suszeptibilität der Bettwanzen hat, könnte dies ein weiterer Nachweis für die Hypothese sein, dass resistenzbedingte Nachteile in der Fitness der Tiere verantwortlich für die erfolglose Anzucht einiger Stämme sein könnten (s. 4.1).

Bei dem Cin1-Stamm, der 2007 in Cincinnati (Ohio) gesammelt wurde und aus dem der in dieser Arbeit untersuchte CC-Stamm entstanden ist, konnten ZHU et al. (2010b) keine der beiden *kdr*-Mutationen nachweisen. Der hohe R_i dieses Stamms wurde mit dem Vorhandensein signifikant erhöhter Transkriptlevel von den vier auch in dieser Arbeit untersuchten CYP-Genen begründet (ZHU et al. 2013). Die von ZHU et al. 2013 nachgewiesenen relativen Transkriptlevel lagen von *cyp397a1* und *cyp4cm1* bei $> 2,5$ sowie bei *cyp398a1* und *cyp6dn1* zwischen 1,5-2,5. In dieser Arbeit lagen die Transkriptlevel bei Bettwanzen des CC-Stamms der CYP-Gene *cyp397a1* mit 4,9, *cyp398a1* und *cyp4cm1* jeweils mit 0,5 sowie *cyp6dn1* mit 1,3 nur knapp unter denen von ZHU et al. (2013). Im Gegensatz zu ihren Ergebnissen waren die Transkriptlevel der CYP-Gene relativ zum wirkstoffsensiblen UBA-Stamm nicht erhöht, jedoch konnten beide *kdr*-Mutationen detektiert werden. Die molekularen Untersuchungen zur Detektion dieser beiden Mutationen wurden in dieser Arbeit mit je 100 männlichen und weiblichen gepoolten *C. lectularius* durchgeführt. ZHU et al. (2013) haben ihre Untersuchungen mit nur drei gepoolten Bettwanzen im Doppelansatz durchgeführt und so möglicherweise durch Zufall Tiere ohne die Mutation untersucht.

Im CC- und RS-Stamm lagen zudem beide *kdr*-Mutationen vor. Bisher gibt es in der Literatur keine Angaben darüber, ob das gleichzeitige Vorkommen beider Mutationen bei Bettwanzen die Suszeptibilität gegenüber Pyrethroiden stärker herabsetzt als das Vorhandensein nur einer Mutation, und ob sie bei fehlendem Selektionsdruck durch Insektizid-Exposition die Fitness der Tiere beeinflussen. Im Rahmen dieser Arbeit war es ebenfalls nicht möglich, den R_i im Filterkontakt-Biotest zu ermitteln, da beim CC- und RS-Stamm die Aufzucht nicht möglich war. Es ist jedoch bekannt, dass die Population des RS-Stamms am Befallsort trotz des wiederholten sachgerechten Einsatzes von Pyrethroiden vom Schädlingsbekämpfer nicht getilgt werden konnte und somit per Definition Pyrethroid-resistent ist (s. 4.3.1). Dies weist ebenfalls darauf hin, dass mindestens eine der beiden Mutationen an der Pyrethroid-Resistenz bei Bettwanzen beteiligt ist.

Die kurze Infestationsdauer des RS-Stamms von weniger als einem halben Jahr, die Einschleppung durch einen Gast aus Nordamerika und keinerlei Bekämpfung vor Ort weisen darauf hin, dass die Resistenzmechanismen vermutlich zuvor erworben wurden. Gleiches könnte auch für den GW-Stamm und die Population B7 mit Allelfrequenzen für L925I im Bereich von 100 %, die in einem Hotel bzw. einer Ferienwohnung mit internationalen Gästen gesammelt wurden, gelten.

Die erfolglose Aufzucht des RS-Stamms in Zusammenhang mit hohen Allelfrequenzen für beide *kdr*-Mutationen unterstreicht ebenfalls die oben angeführte Hypothese, dass eine Resistenz Fitnessnachteile mit sich bringt. Allerdings zeigte die Untersuchung der Allelverteilung auf das Vorliegen eines Hardy-Weinberg-Gleichgewichts dass die Mutation L925I in den Stämmen LB, SK, OB, AS und CC sowie die Mutation V419L im CC-Stamm ohne Pyrethroid-Selektion keinen signifikanten Nachteil darstellen würden. Es konnte allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden, ob die katalytische Aktivität und strukturelle Änderungen weiterer P450-Enzyme oder anderer fremdstoffmetabolisierender Enzyme wie Esterasen und Glutathion-S-Transferasen sowie weitere Mutationen im *C1vssc*-Gen ebenfalls die Suszeptibilität und die Fitness dieser Bettwanzenfeldstämmen beeinflussen können.

Ein Zusammenhang zwischen insektiziden Behandlungen vor Ort und den detektierten potentiellen Resistenzmechanismen konnte bei den fünf im Biotest untersuchten Feldstämmen im Rahmen dieser Arbeit nicht hergestellt werden. An keinem der Befallsorte, von denen die Feldstämmen stammten, wurde vor dem Einsammeln der Bettwanzen eine Behandlung mit Pyrethroiden durchgeführt. Der Zeitpunkt, an dem die jeweiligen Populationen das letzte Mal mit Pyrethroiden in Kontakt gekommen sind, lässt sich aus der Dauer der Infestation vor dem

Entdecken des Befalls abschätzen. Diese betrug zwischen einem und höchstens fünf Jahren (s. Tab. 2). Dennoch konnten Resistenzmechanismen nachgewiesen und zumindest beim AS-Stamm mit einer physiologischen Pyrethroid-Resistenz in Verbindung gebracht werden. Dies spricht dafür, dass diese Mechanismen bereits vorher an einem anderen Befallsort erworben wurden, und sich durch Verschleppung resistenter Wanzen auch an dem aktuell untersuchten Befallsort verbreitet haben. Entsprechend dieser Zeitdauer ist es daher nicht überraschend, dass die Resistenzen verursachende Mutationen ohne Selektionsdruck durch Wirkstoffe teilweise aus dem Genpool der jeweiligen Populationen verloren gegangen sind (ZHU et al. 2013).

Die beiden Stämme LBII und LBIII stammten aus Sozialwohnungen, wo im gesamten Häuserblock aufgrund von immer wiederkehrenden Bettwanzenbefall in einem Zeitraum von fünf Jahren wiederholt Schädlingsbekämpfungen durchgeführt wurden. Da einige der Bewohner die Kosten einer professionellen Schädlingsbekämpfung nicht tragen konnten, wurde entweder gar nicht bekämpft oder eigene Bekämpfungsversuche mit unzureichend wirksamen Mitteln unternommen. Dies führt in vielen Fällen zu Reinfestationen, da Bettwanzen in andere Wohnungen abwandern oder sich der Befall durch die Mitnahme falsch entsorgter infestierter Möbelstücke ausbreitet (DOGGETT et al. 2012). Da beide Stämme Allelfrequenzen im Bereich von 100 % für die Mutation L925I aufwiesen, liegt hier die Vermutung nahe, dass unzureichende Bekämpfungsmaßnahmen zur Selektion von Tieren mit diesem potentiellen Resistenzmechanismus beigetragen haben.

Von weiteren Stämmen ohne Zuchtmöglichkeit war es aufgrund der geringen untersuchten Tierzahlen und den lückenhaften Angaben von Befallsorten nicht möglich, einen Zusammenhang zwischen insektiziden Behandlungen vor Ort und den detektierten potentiellen Resistenzmechanismen herzustellen.

Grundsätzlich ist anhand der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse davon auszugehen, dass die Pyrethroid-Resistenz bei der Bettwanze *C. lectularius* auf unterschiedlichen Mechanismen, wie der *kdr*-Mutation und der Hochregulierung von unterschiedlichen Cytochromoxidasen (*cyp397a1* und *cyp398a1*) basiert. Es ist auch wahrscheinlich, dass weitere, in dieser Arbeit nicht untersuchte Mechanismen einen Einfluss auf die Pyrethroid-Suszeptibilität haben (ZHU et al. 2013).

4.4 Detektion des Hidden-Break in der 28S rRNA von *C. lectularius*

Für Insekten der Ordnungen Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera und Hemiptera wurde bereits beschrieben, dass die 28S-Einheit der rRNA unter denaturierenden Bedingungen in zwei etwa gleichgroße Untereinheiten mit ähnlicher elektrophoretischer Mobilität zerfallen kann (FUJIWARA und ISHIKAWA 1986; ISHIKAWA und NEWBURGH 1972; MACHARIA et al. 2015; WINNEBECK et al. 2010). Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei der Integritätsmessung sämtlicher RNA-Proben auch bei *C. lectularius* ein Hidden-Break in der 28S-Einheit der rRNA nachgewiesen. Im Gegensatz zu den anderen Untersuchungen trat das Phänomen sowohl mit als auch ohne Hitzedenaturierung bei 70 °C auf. Dies spricht dafür, dass die 28S rRNA bereits während der RNA-Isolation zerfallen ist. Molekulare Mechanismen bei der Entstehung des Hidden-Break sowie dessen biologischer Sinn sind, obwohl einige Versuche unternommen wurden (OGINO et al. 1990), bis heute nicht geklärt.

Die Qualität der verwendeten RNA kann nachweislich die Genauigkeit von Expressionsanalysen beeinflussen (FLEIGE und PFAFFL 2006). Eine verlässliche Qualitätskontrolle ist deshalb sehr wichtig. Die standardisierte Qualitätskontrolle von RNA mittels RIN ist für Organismen mit einem Hidden Break wie der Bettwanze ungeeignet. Die bei der Kapillarelektrophorese generierten Elektropherogramme konnten dennoch die Qualitätskontrolle der RNA für die mRNA-Expressionsanalyse der CYP-Gene in dieser Arbeit gegenüber der klassischen Gelelektrophorese, bei der die Qualität der RNA allein durch die visuelle Inspektion von Gelbildern bestimmt wird, verbessern.

4.5 Beurteilung des erweiterten Wahlversuchsdesigns

Bei der Durchführung der Wahlversuche stand nicht die Wirksamkeitsprüfung verschiedener Insektizide auf unterschiedlichen Oberflächen im Vordergrund. Vielmehr sollte durch den Erhalt differenzierter Ergebnisse die realistische Simulation von Praxisbedingungen im Wahlversuch verifiziert werden. Ein solches Testdesign entspricht den für die Biozidproduktzulassung geforderten *simulated use*-Tests (EUROPEAN UNION 2012).

Der Wahlversuch wurde bereits in der dieser Arbeit vorangegangenen Diplomarbeit als probates praxisnahes Testsystem für die Überprüfung der Wirksamkeit von Kontaktinsektiziden gegen Bettwanzen eingestuft (unveröffentlichte Daten). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Wahlversuch um ein neues Plexiglaskastensystem für die aufgrund des damaligen Versuchsdesigns nicht mögliche Prüfung unflexibler praxisrelevanter Prüfoberflächen erweitert. Da bei

einer Schädlingsbekämpfung neben der Behandlung von Tapeten vor allem Möbelstücke und Böden behandelt werden, ist die Wirksamkeitskontrolle von Insektiziden auf starren Materialien wie Holz sehr wichtig. In dem ursprünglichen Aufbau der Wahlversuchsanlage wurden Prüfoberflächen in enge Plexiglasrohre eingeklebt. Durch die Modifikation des Wahlversuchs wurde das Einbringen der Prüfoberflächen insgesamt deutlich einfacher.

Um sämtliche Zusammenhänge und mögliche Einflüsse verschiedener Faktoren auf die schwere Schädigung der Bettwanzen innerhalb der Wahlversuche zu erfassen, wurden die Ergebnisse mit der mid-p-Variante des Exakten Vierfeldertafeltests nach Fisher und ergänzend mittels binärer logistischer Regression ausgewertet. Unterschiede in den Ergebnissen zwischen den beiden Berechnungsmethoden basieren vor allem darauf, dass bei der Berechnung der mid-p-Variante lediglich ein Vergleich von zwei unterschiedlichen Versuchen möglich ist. Bei der binären logistischen Regression werden hingegen sämtliche Daten aus allen Versuchen in der Auswertung berücksichtigt. Wie wichtig die Betrachtung der Gesamtdatenlage sein kann, zeigt sich am Beispiel der geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Schädigungsrate der Bettwanzen in den Wahlversuchen. Bei der Berechnung der mid-p-Variante waren nur in einem Versuchsdurchlauf des Wahlversuchs mit dem UBA-Stamm unter der Verwendung von Insektizid B auf Tapete zum Zeitpunkt 7 d p.a. mehr Männchen schwer geschädigt als Weibchen, in allen anderen Wahlversuchen gab es mit dieser Auswertungsmethode keinen Unterschied zwischen den Geschlechtern. Die Ergebnisse aus der Berechnung mittels binärer logistischer Regression der Wahlversuche mit dem UBA-Stamm besagen hingegen, dass die Wahrscheinlichkeit einer schweren Schädigung für Weibchen im Wahlversuch mit dem UBA-Stamm signifikant geringer war als für Männchen. Die Detektion dieser Unterschiede war vermutlich aufgrund der hohen Tierzahlen, die in diese statistische Auswertung einbezogen wurde, möglich.

Im Gegensatz zu den mittels der binären logistischen Regression berechneten Konfidenzintervalle (KI) des Effektkoeffizienten beim Vergleich der Geschlechter wiesen die Einflüsse der anderen erklärenden Variablen sehr breite KI auf und waren demnach mit einem großen Fehler behaftet. Die Aussagekraft möglicher Einflüsse ist dadurch nicht sehr groß und eine getrennte Betrachtung der Ergebnisse mittels mid-p-Variante wird sinnvoll. Nachteile der jeweiligen Berechnungsmethoden können durch die jeweiligen Vorteile der jeweils anderen Methode ausgeglichen werden. Aus diesem Grund sollten immer beide Berechnungsmethoden verwendet werden.

Zur Überprüfung des neuen Kastensystems der Wahlversuchsanlage wurden aufgrund ihrer unterschiedlichen Eigenschaften und Wirkmechanismen die Kontaktinsektizide A (Alphacypermethrin, Pyrethroid) und B (Bendiocarb, Carbamat) verwendet. Im Wahlversuch zeigen die Ergebnisse der beiden Berechnungsvarianten (mid-p-Variante und binäre logistische Regression), dass zum Zeitpunkt 7 d p.a. nach Betrieb der Versuchsanlagen mit Insektizid A unabhängig von den Prüfoberflächen und der Belagsalterung signifikant mehr Bettwanzen schwer geschädigt waren, als nach Betrieb mit Insektizid B. Zudem waren die Ergebnisse der Wirksamkeitskontrollen der einzelnen Replikate mit Insektizid B größeren Schwankungen unterlegen. Die inkonsistenten Ergebnisse von Insektizid B lassen vermuten, dass der Einfluss der Expositionszeit bei Insektizid B höher ist als bei Insektizid A. Da die Expositionsdauer im Wahlversuch anders als im UBA-Zwangversuch vom natürlichen Laufverhalten wirtsuchender Bettwanzen abhängt, weist die Streuung der Ergebnisse nicht auf eine schlechte Reproduzierbarkeit der Daten hin, sondern bildet die realistischen Bedingungen ab.

Um einen Eindruck vom Laufverhalten der Bettwanzen in der Wahlversuchsanlage zu erhalten wurden einige Vorversuche ohne Insektizidausbringung durchgeführt und die Wanzen beobachtet. Dabei wurde die Verweildauer auf der Expositionsoberfläche nicht weiter quantifiziert, allerdings konnten verschiedene Verhaltensweisen beim Überqueren der 20 cm langen Oberfläche beobachtet werden. Einige der Wanzen haben ohne Unterbrechung die Oberfläche schnell und geradeaus überquert. Andere Tiere sind eher im Zickzack über die Oberfläche gelaufen. Auch das mehrfache Überqueren der Oberfläche konnte beobachtet werden. Zudem blieben in seltenen Fällen Wanzen bis zum Versuchsende auf der Oberfläche sitzen. Es muss angenommen werden, dass solche Verhaltensunterschiede auch unter realen Bedingungen auftreten, die erhebliche Unterschiede in der Expositionsdauer zur Folge haben. Bei dem direkten Überqueren der Prüfoberflächen benötigen Bettwanzen bei einer Laufgeschwindigkeit von ca. 1,4 cm/s (OLSON et al. 2008) nur ca. 14 s, während eine Wanze, die im Zickzack über die Oberfläche läuft oder dort verweilt, erheblich länger Insektizid-exponiert ist. Es kann davon ausgegangen werden, dass die beobachtbare Verhaltensvariabilität auch bei praktischen Bekämpfungssituationen vorkommt. Das schnelle Überqueren der behandelten Oberfläche, und damit eine sehr kurze Expositionsdauer, stellt für die Bewertung der Wirksamkeit eines Insektizids den *worst case* dar, der in einem Zwangsversuch bei Einwirkzeiten im Sekundenbereich rein technisch kaum darstellbar ist. Zudem kann der Wahlversuch auch die mögliche Wirkung des Insektizids auf das Verhalten der Wanzen, zum Beispiel durch repellierende Effekte, abbilden. Es ist bei Betrachtung der offenbar möglichen sehr kurzen Einwirkzeiten

von Insektiziden gegen Bettwanzen unter Nicht-Zwangsbedingungen fraglich, in wie weit Zwangsversuche, bei denen die Expositionsdauer mindestens im Minutenbereich liegen, überhaupt eine realistische Simulation der Insektizidanwendung ermöglichen. Dies wird in den hier vorgestellten Versuchen vor allem für Insektizid B deutlich, da hier offenbar die kurze Expositionsdauer im Wahlversuch die Mortalitätsraten beeinflusst hat.

Die Oberflächeneigenschaften von Substraten, auf denen Insektizide zur Bettwanzenbekämpfung ausgebracht werden, beeinflussen aufgrund ihrer unterschiedlichen sorptiven Eigenschaften deren praktische Wirksamkeit. Auch dies ist vor allem vor dem Hintergrund möglicher sehr kurzer Expositionszeiträume von Bedeutung: bei beiden getesteten Insektiziden war, auf sorptiven Oberflächen (Sperrholz, Tapete und Teppich) die Zahl der überlebenden Bettwanzen höher als auf einem unsorptiven Substrat (Hornitex[®]). Durch die starke Sorptionskraft der Prüfoberfläche Sperrholz erfolgte selbst unter der Verwendung des hochwirksamen Insektizid A eine Tilgung der Bettwanzen nur auf frisch behandeltem Sperrholz.

Auf der Teppichoberfläche konnte sogar bei keiner der untersuchten Belagsalterungen eine Tilgung erreicht werden. Der Grund hierfür ist vermutlich die enorme Oberflächenvergrößerung des Teppichs, wodurch das aufgesprühte Insektizid zwischen die einzelnen Fasern dringen konnte. Da die Wanzen nur mit einem kleinen Teil der Gesamtoberfläche beim Überqueren in Kontakt kamen, könnten sie im Vergleich zum Teppich auf Tapete und Hornitex[®] mit einer höheren Dosis des Insektizids in Kontakt gekommen sein.

Aufgrund der unzureichenden Wirksamkeit von Insektizid B werden die unterschiedlichen Sorptionseigenschaften der getesteten Prüfoberflächen und der Einfluss der Expositionsdauer noch deutlicher.

Der bislang verwendete UBA-Zwangsversuch kann die prinzipielle Wirksamkeit eines Insektizids nachweisen, ist aber aufgrund der geringen Tierzahl und der statischen und möglicherweise unrealistisch langen Einwirkzeiten nur begrenzt für eine Beurteilung der Wirksamkeit eines Insektizides unter Praxisbedingungen geeignet. Im Wahlversuch kann die Wirksamkeit von Kontaktinsektiziden gegen Bettwanzen im Gegensatz zum UBA-Zwangsversuch unter der Berücksichtigung natürlicher Verhaltensweisen und deren mögliche Einflüsse auf die Wirksamkeit ermittelt und beurteilt werden. Auch wenn der Wahlversuch die Untersuchung der Wirksamkeit eines Insektizids in der Praxis nicht ersetzen kann, könnten Abweichungen in der Wirksamkeit von Insektiziden zwischen Labor- und realen Bedingungen verringert werden.

Deshalb sollten Wirksamkeitsuntersuchungen von Insektiziden im Wahlversuch ergänzend zu denen im UBA-Zwangsversuch erfolgen.

4.5.1 Nachweis einer physiologischen Resistenz beim AS-Stamm

Da der AS-Stamm im Filterkontaktbiotest den höchsten R_i aufwies, wurde im Wahlversuch die Wirksamkeit von Insektizid A in der vom Hersteller empfohlenen Aufwandmenge auf Tapete unter praxisähnlichen Bedingungen getestet.

Sowohl die Berechnungen der mid-p-Variante als auch die binäre logistische Regression bestätigten, dass im Wahlversuch signifikant weniger Tiere des AS-Stamms als des UBA-Stamms schwer geschädigt waren. Bei einwöchiger Belagsalterung von Insektizid A (Pyrethroid) auf Tapete haben durchschnittlich 50 % der Tiere bis zum Zeitpunkt 7 d p.a. überlebt. Außerdem fand nach jedem Versuch mit dem AS-Stamm in der Phase der Wirksamkeitsbewertung im Gegensatz zum UBA-Stamm eine Eiablage statt.

Die Suzeptibilität des AS-Stamms gegenüber dem hier eingesetzten Pyrethroid führte im Wahlversuch unter Praxisbedingungen zu einer unzureichenden Tilgung. Anhand dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass bei dem AS-Stamm eine Pyrethroid-Resistenz vorliegt, und somit eine Bekämpfung unter der Verwendung von Pyrethroiden nicht erfolgreich wäre. Unter Praxisbedingungen könnte dies zu einer Selektion resistenter Bettwanzen und zu deren Weiterverbreitung beitragen.

Im UBA-Zwangsversuch hingegen konnten mit Insektizid A auf Tapete bei keiner Belagsalterung und keinem Berechnungsmodell signifikante Unterschiede in der Anzahl schwer geschädigter *C. lectularius* zwischen dem UBA- und dem AS-Stamm ermittelt werden. Es wurden bewusst sehr lange EWZ von 2 h, 4 h und 24 h ausgewählt, um die nach §18 IfSG vorgesehene Tilgung der Tiere 7 d p.a. sicher erreichen zu können. Diese trat jedoch selbst nach einem Dauerkontakt der Tiere von 24 h nicht ein.

Ein Grund für die Diskrepanzen zwischen beiden Versuchsmodellen könnten die dem Wahlversuch ($n = 100$ Bettwanzen) gegenüber deutlich geringeren Tierzahlen im UBA-Zwangsversuch ($n = 12$ Bettwanzen) sein. Dadurch wurde die Teststärke der statistischen Tests herabgesetzt und mögliche Unterschiede blieben unentdeckt. Dies würde bedeuten, dass die Wirksamkeitsprüfung eines Insektizids an einem Feldstamm im UBA-Zwangsversuch möglicherweise nicht hinreichend aussagekräftig ist.

4.6 Artificielle Blutfütterung von *C. lectularius*

Die Zucht der Bettwanze *C. lectularius* im Labor ist Voraussetzung für die Wirksamkeitsprüfung von Bekämpfungsmitteln. Die Aufnahme von Blut ist für Bettwanzen essentiell und muss daher auch im Labor möglich sein. In der Zucht des UBA werden Bettwanzen an Kaninchen (s. 2.1.1.1) gefüttert. Um eine Labortierhaltung zu vermeiden und auf die für die Kaninchen sehr belastende Prozedur im Sinne des Tierschutzes zu verzichten, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Anlage zur artifiziellen Bettwanzenfütterung mit verschiedenen Blutsorten erprobt. Für den Erhalt kleiner Bettwanzenzuchten ist die Membranfütterung bereits eine etablierte Fütterungsmethode (z.B. MONTES et al. 2002, ROMERO et al. 2007; YOON et al. 2008; ZHU et al. 2013). Für Massenzuchten, wie die des FG IV 1.4 im UBA, bei welcher tausende von Bettwanzen gehalten werden, wurde eine solche Methode noch nicht beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine artifizielle Fütterung von mehr als 2000 Bettwanzen parallel möglich ist. Eine Aufzucht über mehr als drei Generationen hinweg konnte jedoch nicht erreicht werden.

4.6.1 Beurteilung des Versuchsaufbaus der Blutfütterungsanlage

Die in dieser Arbeit verwendete und von der Firma Eurofins konstruierte Blutfütterungsanlage wurde nach MONTES et al. (2002) adaptiert. Da die Bettwanzen in der Massenzucht des UBA nach Entwicklungsstadien und Alter getrennt in Petrischalen gehalten werden, wurde die Anlage dahingehend angepasst, dass eine Verwendung der üblichen Fütterungsgefäße (Wanzengläschen) weiterhin möglich war. Dazu wurden die Fütterungseinheiten um 180 ° gedreht, so dass die Öffnung des Glaszylinders nach oben zeigte. Dadurch konnten die Wanzengläschen mit der Gaze nach unten auf die mit Blut gefüllte und mit Parafilm abgedeckte Öffnung aufgesetzt werden. Bereits die ersten Versuche der artifiziellen Fütterung mit konserviertem Kaninchenblut haben gezeigt, dass sämtliche Bettwanzenstadien den doppelt gedehnten Parafilm durchstechen und Blut saugen konnten.

Die Handhabung der Blutfütterungsanlage ist insgesamt einfach, könnte aber durch weitere Modifikationen noch verbessert werden. Die größten Probleme an der nach oben gerichteten Öffnung stellen das Absinken der Erythrozyten im Blut sowie die Bildung von Luftbläschen an der Unterseite der Membran dar. Während der Versuche wurde das Problem dahingehend gelöst, dass das Blut nach jeder Fütterung durch mehrmaliges Aufziehen und Entleeren der Spritze durchmischt wurde. Nach drei Fütterungen an einer Membran reichte dies allerdings

nicht mehr aus, und es bildete sich eine ca. 1 mm dicke Plasmaphase. Obwohl die Wanzen trotzdem sogen, konnte eine Häutung und Eiablage anschließend nicht beobachtet werden. Daher wurde nach den drei Fütterungen die Membran entfernt, das Blut in der Vertiefung der Glaszylinder gerührt, anschließend mehrmals mit der Spritze durchmischt und eine neue Membran aufgezogen. Diese Prozedur kostet Zeit und ist bei einer Verwendung von mehreren Fütterungseinheiten sehr aufwendig. Eine mögliche Lösung wäre, auch das Blut ähnlich wie den zur Temperierung der Anlage notwendigen Wasserkreislauf mit Hilfe einer Pumpe im System zirkulieren zu lassen (TAKANO-LEE et al. 2003).

Die Blut- und Wassertemperatur von 40 °C - 41 °C verursachte eine starke Dehnung und das Reißen der Parafilmmembran. Dieses Problem konnte durch das Ergänzen einer weiteren Lage Parafilm am Rand der oberen Öffnung behoben werden.

4.6.2 Unterschiede in der Attraktivität verschiedener Blutsorten

Bei der Wahl der Blutsorte wurde neben der Attraktivität und Verträglichkeit darauf geachtet, dass das Blut nicht von Tieren stammte, denen die Labortierhaltung durch die Umstellung auf eine artifizielle Fütterung im Sinne des Tierschutzes eigentlich erspart werden sollte. Somit wurden Blutsorten von Großtieren gegenüber dem von Kleintieren bevorzugt. Das in dieser Arbeit untersuchte Rinder-, Schweine- und Schafsblut stammte von Schlachttieren, bei denen die Blutabnahme direkt vor der Schlachtung erfolgte. Obwohl das Ziel der Untersuchung war, Kaninchen als lebenden Wirt für die Bettwanzen zu ersetzen, wurde auch Kaninchenblut für die *in vitro*-Fütterung getestet. Ziel war hierbei, die möglichen Auswirkungen der *in vitro*-Fütterung im Vergleich zur *in vivo*-Fütterung auf die Saugraten der Bettwanzen zu überprüfen.

Die artifizielle Fütterung mit konserviertem Kaninchenblut hat gezeigt, dass mit Ausnahme der J3 und J4 eine der Fütterung am Kaninchen vergleichbare Anzahl an Tieren Blut gesogen hat. Ungeachtet dessen haben die Wanzen im Vergleich zur *in vivo*-Fütterung stets weniger, die J1 und J3 sogar signifikant weniger Blut gesogen. Die Ursache für die signifikanten Unterschiede in den Saugraten und der aufgenommenen Blutmenge bei diesen Juvenilstadien ist unklar. Da die J2 nicht signifikant weniger Blut gesogen haben und insgesamt alle Bettwanzenstadien in der *in vitro*-Fütterung mit Kaninchenblut weniger als bei der *in vivo*-Fütterung gesogen haben, kann ein Einfluss der Membranbeschaffenheit auf das Saugverhalten der verschiedenen Entwicklungsstadien ausgeschlossen werden.

Auch das als Konservierungsmittel verwendete Formalin oder das als Antikoagulans eingesetzte Citrat im Kaninchenblut könnten einen Einfluss auf die Attraktivität haben. MONTES et al. (2002) konnten Unterschiede in den Saugraten bei der Fütterung mit Blutsorten ausmachen, deren Koagulation durch unterschiedliche Methoden verhindert wurde. Bettwanzen zogen in der genannten Untersuchung heparinisiertes Blut dem defibrinierten vor. Über den Einfluss von Citrat und Formalin auf die Saugraten von Bettwanzen gegenüber anderen Antikoagulantien oder Konservierungsmitteln ist bisher nichts bekannt.

Insgesamt deuten die Fütterungsversuche mit konserviertem Kaninchenblut darauf hin, dass die *in vitro*-Fütterung von Bettwanzen grundsätzlich eine geeignete Methode darstellt, auch wenn verglichen mit der *in vivo*-Methode die von den Bettwanzen aufgenommenen Blutmengen etwas geringer sind.

Beim Vergleich der drei anderen Blutsorten stellte sich heraus, dass defibriniertes Schafsblut die für Bettwanzen unattraktivste Blutsorte war. Auch in den Untersuchungen von MONTES et al. (2002) war defibriniertes Lammblood für Wanzen bei der artifiziellen Fütterung am wenigsten attraktiv. Rinderblut war in dieser Arbeit ähnlich attraktiv wie Kaninchenblut in der *in vivo* und *in vitro* Fütterung. Die im Vergleich zur Fütterung am Kaninchen mit Abstand attraktivste Blutsorte war defibriniertes Schweineblut. Im Vergleich zur Fütterung am lebenden Kaninchen haben die adulten Bettwanzen 64 % mehr defibriniertes Schweineblut aufgenommen. Die Blutsorte kann demnach einen positiven oder negativen Einfluss auf die Saugrate und Menge an aufgenommenem Blut haben.

Ein großes Problem bei den hier vorgestellten Untersuchungen war jedoch, dass sich während des gesamten Untersuchungszeitraums die Lieferungen des defibrinierten Schweinebluts wiederholt verzögerten (s. 2.2.7.4). Überwiegend konnte kein offensichtlicher Unterschied zu dem pünktlich gelieferten und somit sachgemäß gelagertem Blut festgestellt werden. In Einzelfällen wurde offenkundig verdorbenes Schweineblut geliefert. Um die möglichen Abweichungen durch Fütterung von verdorbenem Blut mit zu erfassen wurden auch diese Blutchargen in die Untersuchung mit einbezogen. Im Vergleich der Saugraten war das in der Blutfütterungsanlage angebotene aufgrund unsachgemäßer Lagerung offensichtlich verdorbene defibrinierte Schweineblut von allen getesteten Blutsorten am wenigsten attraktiv. Dies spricht dafür, dass nicht nur die angebotene Blutsorte, sondern auch deren Qualität entscheidend für den Erfolg einer artifiziellen Fütterung von *C. lectularius* ist. AAK et al. (2014) konnten bei der artifiziellen Fütterung von Bettwanzen mit heparinisiertem Menschenblut ebenfalls feststellen, dass die Qualität des Blutes einen Einfluss auf die Saugrate und die aufgenommene

Blutmenge hatte. Sie vermuteten, dass neben physikalischen Veränderungen des Blutes auch der Geschmack einen Einfluss haben könnte. Dies deckt sich mit der Annahme von ROMERO und SCHAL (2014), dass verschiedene Phagostimulantien und auch der Geschmack der angebotenen Nahrung bei Insekten mit stechend-saugenden Mundwerkzeugen über Chemorezeptoren im Nahrungskanal wahrgenommen werden können. Dafür sprechen auch ihre Beobachtungen, bei denen *C. lectularius* und *Cimex hemipterus* (tropische Bettwanze) eine kleine Menge Blut vor dem eigentlichen Saugakt möglicherweise zum Vorkosten aufnehmen. Diese Beobachtungen wurden auch während der Fütterung der Bettwanzen an weniger attraktiven Blutsorten wie defibriniertem Schafsblut und verdorbenem Schweineblut in der vorliegenden Arbeit gemacht. Bei relativ attraktiven Blutsorten liefen die Wanzen nach dem Aufsetzen auf die Membran zunächst herum, stachen den Saugrüssel an einer präferierten Stelle in die Membran ein und blieben bis zur Vollendung der Blutaufnahme dort sitzen. Bei den weniger attraktiven Blutsorten zogen die Wanzen kurz nach dem Einstechen den Saugrüssel wieder heraus und suchten anschließend die Oberfläche der Membran nach einer offenbar geeigneteren Blutquelle ab, wobei sie ihren Saugrüssel immer wieder hineinstachen. Bei der anschließenden visuellen Inspektion der Tiere konnten nur sehr geringe Mengen an Blut im Darm entdeckt werden.

4.6.3 Versuch der Aufzucht von Bettwanzen des UBA-Stamms mit den defibrinierten Blutsorten Rinderblut, Schweineblut und Schafsblut

Das Vorhaben, einen durch artifizielle Fütterung gehaltenen Bettwanzenstamm zu etablieren, der parallel zu dem in der Gliedertierzucht des UBA seit Jahren an die Fütterung am Kaninchen adaptierten und etablierten Bettwanzenstamm gehalten wird, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht realisiert werden.

Die Aufzucht mit defibriniertem Rinderblut musste bereits nach der ersten Generation aufgrund von insgesamt zu geringen Tierzahlen zum Zeitpunkt der siebten Fütterung abgebrochen werden. Die Auswertung der Ergebnisse ergab, dass die durchschnittliche Anzahl der Nachkommen nach der Fütterung mit defibriniertem Rinderblut, im Vergleich mit der *in vivo*-Fütterung am Kaninchen signifikant geringer war. Einflüsse unterschiedlicher Blutsorten auf die Eiablage rate konnten auch MONTES et al. (2002) bei ihren Versuchen feststellen.

Im Gegensatz zur Fütterung mit defibriniertem Rinderblut gelang die Aufzucht der Bettwanzen mit defibriniertem Schweineblut im ersten Ansatz bis zur dritten Generation, im zweiten

Ansatz nur bis zur zweiten Generation. Danach mussten auch hier die Versuche abgebrochen werden, allerdings aufgrund der bereits unter 4.6.2 diskutierten Lieferprobleme.

Die Anzahl der Bettwanzen nahm bei der Aufzucht mit defibriniertem Rinderblut von der ersten bis zur siebten Fütterung mit einer Mortalitätsrate von 92 % signifikant ab. Zwar konnte eine geringe Mortalitätsrate von 5-10 % auch bei den Tieren, die an Kaninchen gefüttert wurden, beziehungsweise defibriniertes Schweineblut erhielten, festgestellt werden. Diese Verluste ergaben sich vermutlich aus der natürlichen Mortalität und durch das Verletzen einiger Bettwanzen während der Vor- und Nachbereitungen der Fütterungen, und wurden als tolerabel eingestuft.

BARBARIN et al. (2012) konnten in ihren Versuchen feststellen, dass die Mortalität von *C. lectularius* stark von der angebotenen Blutsorte abhängig ist. Dies zeigt sich auch in der vorliegenden Arbeit bei der Fütterung mit defibriniertem Rinderblut durch die signifikante Abnahme der Tieranzahl, verursacht durch eine geringe Eiablage und eine erhöhte Mortalität.

Ein vergleichbarer Einbruch der Bettwanzenpopulation konnte auch bei der artifiziellen Fütterung mit defibriniertem Schafsblut beobachtet werden. So waren bei der ersten Generation nach neun Fütterungen nur noch 27 % der Wanzen am Leben und bei der zweiten Generation sogar alle Wanzen bereits nach der achten Fütterung tot. Es ist allerdings einschränkend zu bemerken, dass der Ansatz zuvor mit Schweineblut gefüttert worden war. Es bleibt daher unklar, ob die Qualität des zuvor gefütterten Schweineblutes, das defibrinierte Schafsblut an sich oder beide Faktoren dafür verantwortlich waren.

Bei der Aufzucht mit defibriniertem Schweineblut hingegen war die Mortalitätsrate von der Qualität des Blutes abhängig. In Ermangelung einer anderen Schweineblutquelle musste in den Zuchtversuchen das unsachgemäß gelagerte Schweineblut, bei welchem kein offensichtlicher Qualitätsverlust festgestellt werden konnte, verwendet werden. Bei der Aufzucht von Bettwanzen des UBA-Stamms mit diesem Blut konnte beobachtet werden, dass die Mortalität der Bettwanzen mit einer Ausnahme jedes Mal anstieg. Der höchste Anstieg in der Mortalität nach der Fütterung dieses Schweineblutes von mehr als 50 % konnte nach der Fütterung der J1 aus den Generationen G3(A) und G2E1(B) beobachtet werden. Dies weist darauf hin, dass die unsachgemäße Lagerung einen Einfluss auf die Qualität des nach sensorischer Beurteilung durch die Versuchsdurchführende frisch wirkenden, defibrinierten Schweineblutes hatte, der im Laufe der Untersuchungen allerdings nicht erfasst werden konnte. Die frisch geschlüpften

J1 sind diesem unsachgemäß gelagerten Blut gegenüber offenbar besonders anfällig, was sich in der Mortalitätsrate von 50 % widerspiegelt.

Aufgrund des Einflusses der artifiziellen Fütterung mit defibriniertem Rinderblut auf die Eiablage- und Mortalitätsraten von *C. lectularius* ist auch eine Einflussnahme auf die Entwicklungsdauer der einzelnen Stadien und damit auf den gesamten Entwicklungszyklus wahrscheinlich. Die Datenlage dazu ist jedoch aufgrund der verschiedenen verwendeten Fütterungsmethoden und Blutsorten nicht eindeutig. Während MONTES et al. (2002) sowie AAK et al. (2014) keine Unterschiede in der Entwicklungsdauer von Bettwanzen, die artifiziell oder an einem Wirbeltierwirt gefüttert wurden, festgestellt haben, konnten BARBARIN et al. (2012) in einigen Juvenilstadien, die artifiziell mit Kaninchenblut gefüttert wurden, eine verzögerte Entwicklung nachweisen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ebenfalls nicht geklärt werden, ob die geringe Anzahl von Adulten zum Zeitpunkt der siebten Fütterung mit defibriniertem Rinderblut allein auf die hohe Mortalitätsrate oder auch auf Verzögerungen innerhalb der Entwicklung der Juvenilstadien zurückzuführen war.

Gleiches gilt für die Aufzucht von mit defibriniertem Schweineblut gefütterten Bettwanzen. Die Eiabnahme konnte auch hier nie, wie bei der Fütterung am Kaninchen üblich, nach der siebten Fütterung erfolgen, sondern frühestens nach der achten. Es gilt allerdings zu klären, ob dies durch die Qualität der Blutchargen bedingt war oder defibriniertes Schweineblut an sich die Entwicklung verzögern kann.

Vergleicht man die Tierzahlen der ersten Generationen nach artifizieller Fütterung mit defibriniertem Rinderblut, Schweineblut und Schafsblut mit denen nach der Fütterung am Kaninchen, wird auf den ersten Blick klar, dass von den getesteten Blutsorten defibriniertes Schweineblut für weitere Untersuchungen am geeignetsten scheint. Viele Faktoren wie die zellulären Bestandteile des Blutes, der Hämatokritwert, im Blut enthaltene Enzyme und andere Proteine, Salze, der Glucose- und der Cholesterolgehalt, verschiedene Anorganika, Blutgase, der osmotische Druck verschiedener Ionenverbindungen und Faktoren der Blutkoagulation könnten einen Einfluss auf die Verträglichkeit des Blutes haben (LEHANE 2005; ROMERO und SCHAL 2014). Im Rahmen dieser Arbeit konnte nicht geklärt werden, welche dieser Faktoren die Attraktivität und Verträglichkeit von Schweineblut für Bettwanzen gegenüber den anderen Blutsorten erhöht hat.

4.7 Erfassung der aktuellen Bettwanzensituation in Deutschland

Der „Fragenkatalog zur aktuellen Bettwanzensituation in Deutschland“ sollte Daten sowohl zur Häufigkeit und Ausbreitung, zu angewandten Bekämpfungsmethoden und deren Erfolg, als auch zum Resistenzstatus der Wanzenstämme liefern. Von den 329 befragten SBK haben in einem Zeitraum von vier Jahren nur knapp 8 % den Fragenkatalog beantwortet, von denen fünf Firmen keine Bettwanzenbekämpfungen durchgeführt hatten. Somit konnten die Antworten von knapp 6 %, d.h. 21 Antworten ausgewertet werden. Eine statistische Auswertung der Ergebnisse war aufgrund der zu geringen Anzahl an Antworten nicht möglich. Trotz aller Bemühungen konnten daher keine statistisch validen Daten zur aktuellen Verbreitungssituation der Bettwanzen *C. lectularius* in Deutschland erfasst werden.

Ähnlich geringe Beteiligungswerte gab es auch bei einer 2011 durchgeführten Umfrage der National Pest Management Association (NPMA) dem größten Schädlingsbekämpferverband in den USA. Von 4.540 befragten Schädlingsbekämpfungsunternehmen nahmen ebenfalls nur 9 % (415 Antworten) an der Datenerhebung teil (POTTER et al. 2011). Im Jahr 2013 wurde die Umfrage wiederholt, wobei die Anzahl an Antworten auf 251 sank. Wie schwierig es ist selbst innerhalb eines Berufsverbandes genügend Antworten zu erhalten zeigt die Tatsache, dass von den 4.540 Befragten 3.882 NPMA Mitglieder waren. Der Erhalt valider Daten könnte vermutlich über eine Meldepflicht erfolgen.

Es ist dennoch möglich bei Auswertung der 21 verwertbaren Antworten der Befragung vor allem in den privaten Haushalten aber auch in den öffentlichen Einrichtungen eine steigende Tendenz in der Anzahl der Bekämpfungen pro SBK und Jahr zu erkennen. In medizinischen Einrichtungen konnte hingegen kein Anstieg in der Zahl der Bekämpfungen beobachtet werden. Diese Tendenzen decken sich mit den Ergebnissen aus Umfragen anderer Länder (BOASE 2001; BOASE 2008; DOGGETT et al. 2004; DOGGETT und RUSSEL 2008; POTTER et al. 2011; RICHARDS et al. 2009).

Die Abfrage der von den SBK zur Bettwanzenbekämpfung verwendeten Methoden hat ergeben, dass Pyrethroide am häufigsten eingesetzt werden (11 von 15 SBK). Nur eines von 15 SBK hat gar keine Insektizide eingesetzt. In fast allen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Bettwanzenfeldstämmen und -populationen wurden Resistenzmechanismen, die mit Pyrethroid-Resistenz in Verbindung gebracht werden, detektiert (Tab. 12). Dies lässt die Vermutung zu, dass die hauptsächliche Verwendung von Pyrethroiden ebenso wie in anderen Ländern

auch in Deutschland die Entwicklung solcher Pyrethroid-Resistenzen und dementsprechend auch die Verbreitung resistenter Bettwanzenstämme fördern könnte.

In Amerika werden in den letzten Jahren aufgrund der weiten Verbreitung hoch Pyrethroid-resistenter Bettwanzenpopulationen vor allem Insektizide mit anderen Wirkstoffen verwendet (POTTER et al. 2011). Es ist anzunehmen, dass auch die intensive Nutzung dieser Wirkstoffgruppen in den nächsten Jahren zur Resistenzentwicklung bei Bettwanzen führt. Um dem entgegenzuwirken ist ein gutes Insektizid-Resistenz-Management unerlässlich (ONSTAD 2014). Die Rotation von Wirkstoffen und der Einsatz alternativer Mittel wie Diatomeenerde zur mechanischen Zerstörung der Lipidschicht die dem Schutz der Bettwanzen vor Austrocknung dient oder Verfahren wie die Hitzebehandlung von Bettwanzenbefallsorten könnte der weiteren Entwicklung von Pyrethroid-Resistenzen in Bettwanzen entgegen wirken.

4.8 Ausblick

4.8.1 Pyrethroid-Resistenz bei *C. lectularius* in Deutschland

Die Versuchsergebnisse der molekularen Analysen ergeben neue Fragestellungen und weisen damit den Weg für weiterführende Untersuchungen. Zunächst sollten weitere Bettwanzenfeldstämme aus ganz Deutschland untersucht werden um einen Eindruck über die Verbreitung der im Rahmen dieser Arbeit detektierten Resistenzmechanismen zu bekommen. Ferner sollte die Beteiligung von weiteren bereits in anderen Bettwanzenfeldstämmen nachgewiesenen Resistenzmechanismen (erhöhte Detoxifizierung durch Esterasen, Glutathion-S-Transferasen, kutikuläre Proteine, ABC-Transporter (ATP binding cassette)) in Pyrethroid-resistenten Stämmen molekularbiologisch untersucht werden.

Für die Durchführung des 24B zur Ermittlung von Pyrethroid-Resistenzen werden $n = 600$ männliche Bettwanzen benötigt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein molekularer Nachweis der *kdr*-Mutationen welche mit Pyrethroid-Resistenz bei der Bettwanze in Verbindung gebracht werden mit je 100 männlichen und weiblichen Bettwanzen eine deutlich geringere Tierzahl benötigt wurde als im 24B. Ein endgültiger Beweis für die Funktion der beiden Mutationen bei der Pyrethroid-Resistenz von *C. lectularius* würde bedeuten, dass ein molekularer Nachweis von V419L und L925I ohne die Durchführung eines zusätzlichen Biotests als Beleg für das Vorhandensein einer Pyrethroid-Resistenz ausreicht. Bisher wurden keine funktionalen Analysen der beiden *Vssc*-Mutationen V419L und L925I für *C. lectularius* durchgeführt. Der Effekt dieser Substitutionen auf die Affinität und Torkinetik

spannungsabhängiger Natriumkanäle gegenüber Pyrethroiden wurde nur durch funktionale Analysen der beiden *Vssc*-Mutationen V409L (Mutation im spannungsabhängigen Natriumkanal von *B. germanica*, welche zur Mutation V419L in *C. lectularius* korrespondiert) (OLIVEIRA et al. 2013) und L925I im *Vssc*-Gen von *Drosophila melanogaster* (USHERWOOD et al. 2007) nachgewiesen.

In Abhängigkeit von der Population am Befallsort könnte durch die alleinige molekulare Untersuchung die Zuchtzeit verkürzt oder die Wanzen sogar direkt untersucht werden. Dieses sogenannte Monitoring von Bettwanzen aus Originalpopulationen des Befallsortes würde einen realistischen Überblick der tatsächlichen Prävalenz dieser beiden Mutationen in Deutschland liefern. Auf Basis dieser Daten könnten dauerhaft erfolgreiche Bekämpfungs- und Resistenzmanagementstrategien entwickelt werden.

Das Vorhandensein von negativen Kreuzresistenzen sollte anhand des AS-Stamms im 24-Well-Filterkontakt-Biotest untersucht werden. Sie tritt auf, wenn ein Allel dem Organismus gegenüber einem Wirkstoff Resistenz verleiht und ihn gleichzeitig gegen einen anderen Wirkstoff deutlich suszeptibler macht (PITTENDRIGH et al. 2014a). Sowohl bei der Bekämpfung von Pflanzenschädlingen (PITTENDRIGH et al. 2000) als auch bei der Bekämpfung von Vektoren wie Stechmücken (WHITE et al. 2014) werden erste Bemühungen unternommen, die negative Kreuzresistenz beim Resistenz-Management einzusetzen. Dies könnte auch zu einem erfolgreichen Insektizid-Resistenz-Management bei Bettwanzenbekämpfungen beitragen.

4.8.2 Wahlversuch

Der in der vorliegenden Arbeit weiterentwickelte Wahlversuch stellt eine Erweiterung des Testrepertoires für Wirksamkeitsprüfungen von Kontaktinsektiziden gegen Bettwanzen unter Laborbedingungen dar. Diese Versuchsmethode weist im Vergleich zu dem bislang für die Wirksamkeitsprüfung nach § 18 IfSG verwendeten UBA-Zwangsversuch eine Reihe von Vorteilen auf. Für einen abschließenden Methodenvergleich zwischen Wahl- und Zwangsversuch sollten parallele Untersuchungen mit dem gleichen Insektizid und gleichen Prüfoberflächen durchgeführt werden.

In den bisherigen Versuchsdurchläufen des Wahlversuches wurden ausschließlich adulte Bettwanzen eingesetzt. Es sollten daher, um den Wahlversuch als *simulated-use* Test zu optimieren, auch andere kleinere Bettwanzenstadien oder alters- und geschlechtsgemischte Popu-

lationen im Versuch untersucht werden. Auf diese Weise kann die Wirksamkeit von Kontaktinsektiziden auf verschiedene Stadien, wie sie auch an einem Befallsort vorkommen, praxisnäher getestet werden.

4.8.3 Artificielle Blutfütterung

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass die Verwendung von Schweineblut die aussichtsreichste Methodik zur artifiziellen Fütterung der Bettwanzen darstellt. Dementsprechend sollte diese weiter verfolgt werden. Eine vollständige Umstellung sollte allerdings erst nach weiteren Langzeitstudien über viele Bettwanzengenerationen erfolgen, in denen ausgeschlossen werden kann, dass Schweineblut einen negativen Einfluss auf die Fruchtbarkeit der Weibchen, die Entwicklungsrate und die Lebensdauer der Tiere oder das Geschlechterverhältnis hat. Einbrüche in den Tierzahlen aufgrund der Blutsorte oder Lieferschwierigkeiten, wie sie während des Zuchtversuchs mit Schweineblut in den Generationen G3(A) und G2E1(B) beobachtet wurden, müssen organisatorisch ausgeschlossen werden und wären in einer Massenzucht wie der des UBA inakzeptabel.

Zur einfacheren Installation und Reinigung der einzelnen Komponenten der Blutfütterungsanlage sollten sowohl die Schläuche zur Wasserzufuhr zwischen der Pumpe und den Fütterungseinheiten, als auch die Schläuche zur Blutzufuhr über Schraubverbindungen verbunden werden. Dies würde zusätzlich die Option bieten, autoklavierbares Material zu verwenden und die einzelnen Gegenstände nicht nur durch Ethanol steril zu halten. Dadurch würde man Biofilm bildenden Bakterien, Pilzen und Protozoen in dem mit Wasser gefüllten Bereich der Fütterungseinheiten, welche auch durch vermehrtes Spülen der Glaszylinder mit Ethanol nicht entfernt werden konnten, vorbeugen. Die Verwendung eines geschlossenen Wasserreservoirs könnte den Eintrag solcher Mikroorganismen aus der Luft in das destillierte Wasser zusätzlich verhindern.

5 Zusammenfassung

In den letzten 20 Jahren sind in den Industrieländern die Befallsraten der Bettwanze *Cimex lectularius* weltweit stark gestiegen. Als Ursachen für die Zunahme werden die vermehrte Reisetätigkeit der Menschen, der nationale und internationale Handel mit Gebrauchsgütern und der Wegfall von einigen Wirkstoffen diskutiert. Als entscheidende Ursache für die gegenwärtige Verbreitungssituation wird die Entstehung von Resistenzen gegen die bei Bettwanzenbekämpfungen hauptsächlich eingesetzten Pyrethroide genannt. Aus Deutschland liegen bisher keine wissenschaftlichen Daten zum Auftreten von Pyrethroid-Resistenzen bei Bettwanzen und den zugrunde liegenden Mechanismen vor. Die bei Bettwanzen am häufigsten untersuchte Knockdown-Resistenz (*kdr*) wird vermutlich durch die Mutationen V419L und L925I im Gen der α -Untereinheit des spannungsabhängigen Natriumkanals, dem Wirkort von Pyrethroiden, ausgelöst. Neben dieser Wirkort-Resistenz wurde bei Bettwanzen eine metabolische Resistenz durch die Überexpressionen der vorhandenen Cytochrom P450-Enzyme des Fremdstoffmetabolismus detektiert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten mittels eines Filterkontakt-Biotests mit dem Pyrethroid Deltamethrin bei fünf von 20 *C. lectularius* Feldstämmen aus Berlin Resistenzindizes (R_i) zwischen $R_i = 4,3$ und $R_i = 20,6$ detektiert werden. Die potentiellen *kdr*-Mutationen V419L und L925I wurden mittels Pyrosequenzierung nachgewiesen. Dabei wurde sowohl genomische DNA von je 100 männlichen und weiblichen Bettwanzen gepoolt sequenziert, als auch der Genotyp von je zehn Männchen und Weibchen einzeln untersucht. Die Mutation L925I wurde in 17 von 20 Feldstämmen und -populationen nachgewiesen. Die Allelfrequenzen von L925I lagen zwischen 30 % und 100 %. Zwei dieser Stämme wiesen zusätzlich die Mutation V419L mit Allelfrequenzen zwischen 40 % und 96 % auf. Bei der Genotypisierung wurden für den Austausch L925I in sechs Stämmen Bettwanzen mit homozygot nicht mutierten, homozygot mutierten und heterozygoten Genotypen nachgewiesen. Mittels quantitativer Echtzeit-PCR wurden die Transkriptlevel der vier CYP-Gene *cyp397a1*, *cyp398a1*, *cyp4cm1* und *cyp6dn1* mit denen von drei Referenzgenen und dem eines Referenzstamms verglichen. Bei vier von acht untersuchten Stämmen mit je zehn männlichen und weiblichen Bettwanzen konnte ein dem wirkstoffsensiblen UBA-Stamm gegenüber erhöhtes mRNA-Expressionslevel von *cyp397a1*, bei einem Stamm von *cyp397a1* und *cyp398a1* festgestellt werden. Der Feldstamm mit dem höchsten R_i ($R_i = 20,6$) wurde unter praxisnahen Bedingungen (Wahlversuch) mit einem bei Bettwanzenbekämpfungen häufig verwendeten

Insektizid auf Pyrethroid-Resistenz hin untersucht. Da bis zu 50 % der eingesetzten Bettwanzen überlebt haben, wurde der Stamm als Pyrethroid-resistent eingestuft.

Ein zuvor entwickeltes Wahlversuchssystem für die praxisnahe Wirksamkeitsprüfung von Insektiziden (*simulated use-Tests*) gegen *C. lectularius* wurde um ein neues Plexiglaskastensystem ergänzt. Dadurch konnten flexible und unflexible Oberflächen wie sie in mit Bettwanzen infestierten Wohnungen vorkommen (z.B. Holz) getestet werden. Im Wahlversuch wurden die Bettwanzen durch CO₂ und Wärme zur Simulation eines Wirtes aus dem Versteck gelockt. Auf dem Weg zur Reizquelle mussten sie eine mit Insektizid behandelte Oberfläche überqueren. Nur Tiere die diese Oberfläche überquert haben wurden in die Auswertung einbezogen. Die individuelle Kontaktdauer der Bettwanzen mit dem Insektizid wurde daher durch ihr natürliches Laufverhalten bestimmt. Die Ergebnisse dieser Wirksamkeitsprüfung weisen darauf hin, dass der Wahlversuch eine wichtige Bedeutung bei der Wirksamkeitsbeurteilung von Insektiziden gegen Bettwanzen als Ergänzung zu dem Laborzwangstest hat, da er eine Praxisanwendung unter kontrollierten und reproduzierbaren Bedingungen simuliert.

Die Haltung von *C. lectularius* im Labor ist Voraussetzung für die Wirksamkeitsprüfung von Bekämpfungsmitteln. Die Aufnahme von Blut ist für Bettwanzen essentiell und muss daher auch im Labor möglich sein. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bettwanzen wurden *in vivo* an Kaninchen gefüttert. Um eine Labortierhaltung zu vermeiden und auf die für die Kaninchen sehr belastende Prozedur der Blutfütterung im Sinne des Tierschutzes zu verzichten, wurde eine Anlage zur artifiziellen Bettwanzenfütterung mit verschiedenen Blutsorten erprobt. Entscheidend war die Fragestellung, ob mit der artifiziellen Fütterung und den verwendeten Blutsorten eine Aufzucht verschiedener Stämme mit großer Tierzahl möglich ist. Das Vorhaben, einen durch artifizielle Fütterung gehaltenen Bettwanzenstamm zu etablieren, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht realisiert werden. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass die Mortalitätsraten der einzelnen Entwicklungsstadien und die Reproduktionsraten von der Blutsorte und deren Qualität abhängig sind.

Da nach derzeitigem Erkenntnisstand keine Daten zu der Bettwanzenverbreitung in Deutschland vorliegen, wurde eine deutschlandweite Befragung von Schädlingsbekämpfungsunternehmen (SBK) zur aktuellen Verbreitungssituation durchgeführt. Mit nur 21 auswertbaren Antworten konnte zwar kein repräsentativer Überblick gewonnen werden, in privaten Haushalten und öffentlichen Einrichtungen war jedoch eine steigende Tendenz in der Anzahl der Bekämpfungen pro SBK und Jahr zu erkennen.

6 Summary

Over the last twenty years there has been an increase in reports on bed bug (*Cimex lectularius*) infestations in hotels, public buildings and private houses worldwide. International travel and migration, the trade of second-hand articles, the unavailability of some insecticides and as the main reason the development of resistance against Pyrethroids, which are the insecticides primarily used for bed bug control, are considered to be responsible for the expansion of the bed bug. Pyrethroid-resistance in bed bugs has been described in many countries. However, for Germany no data about the occurrence and the mechanisms inducing pyrethroid-resistance are available so far. Knockdown-resistance (*kdr*) to pyrethroids has been shown to be associated with the presence of two point mutations (V419L or L925I) in the voltage gated sodium channel α -subunit gene, the target site of pyrethroids. An increased metabolic detoxification by cytochrome P450s has been described as an additional mechanism causing pyrethroid resistance in bed bugs.

In the present study, bed bug field strains and populations were collected from 20 infested apartments in Berlin, Germany. In five of these field strains the susceptibility to deltamethrin of *C. lectularius* was determined in a filter contact bioassay. Resistance ratios (R_i), calculated from LD_{50} -values ranged between $R_i = 4.3$ and $R_i = 20.6$. Furthermore, pyrosequencing of genomic DNA fragments containing the possible polymorphisms of single (10 male and female bed bugs each) and pooled (100 male and female bed bugs each) samples was performed in order to analyze the presence of the two mutations (V419L, L925I) and to evaluate the genotypes with which they appear.

Pyrosequencing showed the presence of mutation L925I in 17 of the 20 studied field strains with allele frequencies between 30 % and 100 %. Two of these strains additionally had the mutation V419L with allele frequencies between 40 % and 96 %. Results from tests on single bed bugs in each field strain showed non-mutated, heterozygous as well as homozygous mutated bed bugs for the substitution L925I.

Relative mRNA-expression levels of the four CYP-genes *cyp397a1*, *cyp398a1*, *cyp4cm1* and *cyp6dn1* were determined with quantitative real time PCR for eight bed bug strains. 10 male and 10 female bed bugs were investigated per strain. The relative mRNA-expression levels of these four CYP-genes were examined among an insecticide susceptible strain and eight field strains, also comparing them with the mRNA-expression of three reference-genes. In four of

the eight samples a higher relative mRNA-expression level of *cyp397a1* was detected. One strain showed higher mRNA-expression level of *cyp397a1* and *cyp398a1*.

The strain which showed the highest R_i was tested for pyrethroid-resistance under conditions of practice (choice trial system) with an insecticide primarily used for bed bug control. Pyrethroid-resistance was proven, as up to 50 % of the bed bugs survived.

A previously developed choice trial system for *simulated use*-tests of contact insecticides was modified. Adding a plexiglass box allowed the testing of a variety of flexible and unflexible treated surfaces which are present in bed bug infested rooms, e.g. wood. Bed bugs were attracted by CO₂ and heat to mimic a potential host. They either crossed the insecticide treated surface or stayed in their shelter. Only the insects which crossed the treated surface were included in the effectiveness test. In contrast to non-choice surface contact bioassays, where bed bugs were exposed under no choice conditions for a defined time, the time period bed bugs spent on the treated surfaces in the choice test corresponded to their natural seeking behavior. The results showed that the choice experiment simulates a typical bed bug treatment in practice under controlled and reproducible conditions. Therefore it should be used as an important supplement to non-choice surface contact bioassays.

As bed bugs are obligate blood feeding insects, their rearing in the laboratory requires the keeping of small mammals as blood donors. The bed bugs used in this study were fed on rabbits. In order to reduce the number of animals kept as blood donors, a membrane blood-feeding system that could feed all lifestages and large numbers of bed bugs was tested with different types of animal blood. Within the scope of this work it was not possible to establish a bed bug strain which was exclusively reared on the artificial feeder. The results showed that the mortality of the different lifestages as well as the reproduction rate depended on the type and quality of animal blood used in the experiments.

Within our present state of knowledge in Germany no data about the current bed bug prevalence are available. In order to obtain information towards the spread of bed bugs, a Germany-wide survey of pest control companies was conducted. With only 21 evaluable answers it was not possible to show representative data, but the tendency of growing numbers of bed bug treatments in private households and public facilities became apparent.

7 Literatur

- AAK, A., RUKKE, B. A., SOLENG, A., & ROSNES, M. K. (2014). Questing activity in bed bug populations: male and female responses to host signals. *Physiological Entomology*, 39, 199-207.
- ABBOTT, W. S. (1925). A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18, 265-267.
- ADELMAN, Z. N., KILCULLEN, K. A., KOGANEMARU, R., ANDERSON, M. A., ANDERSON, T. D., & MILLER, D. M. (2011). Deep sequencing of pyrethroid-resistant bed bugs reveals multiple mechanisms of resistance within a single population. *PLoS ONE*, 6, 1-9.
- AHMADIAN, A., GHARIZADEH, B., GUSTAFSSON, A. C., STERKY, F., NYRÉN, P., UHLÉN, M., & LUNDEBERG, J. (2000). Single-Nucleotide Polymorphism Analysis by Pyrosequencing. *Analytical Biochemistry*, 280, 103-110.
- ANDERSON, J. F., FERRANDINO, F. J., MCKNIGHT, S., NOLEN, J., & MILLER, J. (2009). A carbon dioxide, heat and chemical lure trap for the bedbug, *Cimex lectularius*. *Medical and veterinary entomology*, 23, 99-105.
- BAI, X., MAMIDALA, P., RAJARAPU, S. P., JONES, S. C., & MITTAPALLI, O. (2011). Transcriptomics of the Bed Bug (*Cimex lectularius*). *PLoS ONE*, 6, e16336
- BARBARIN, A. M., JENKINS, N. E., RAJOTTE, E. G., & THOMAS, M. B. (2012). A preliminary evaluation of the potential of *Beauveria bassiana* for bed bug control. *Journal of Invertebrate Pathology*, 111, 82-85.
- BAUER-DUBAU, K. (2009). Bettwanzen (*Cimex lectularius*) und ihre gesundheitliche Bedeutung. *Pest Control News*, 42, 8-9.
- BENOIT, J. (2011). Stress Tolerance of Bed Bugs: A Review of Factors That Cause Trauma to *Cimex lectularius* and *C. hemipterus*. *Insects*, 2, 151-172.
- BENOIT, J. B., JAJACK, A. J., & YODER, J. A. (2012). Multiple traumatic insemination events reduce the ability of bed bug females to maintain water balance. *Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology*, 182, 189-198.
- BERENBAUM, M. R. (2002). Postgenomic chemical ecology: from genetic code to ecological interactions. *Journal of Chemical Ecology*, 28, 873-896.
- BERGÉ, J. B., R., F., & AMICHOT, M. (1998). Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 353, 1701-1705.
- BLOOM, G. M., COOPER, R. A., COREA, R., GANGLOFF-KAUFMANN, J., & LOPEZ, R. (2010). Recommendations for the Management of Bed Bugs in New York City. In N. Y. C. B. B. A. BOARD (Ed.).
- BOASE, C. (2001). Bedbugs - back from the brink. *Pesticide Outlook*, 12, 159-162.
- BOASE, C. (2008). Bed bugs (Hemiptera: Cimicidae): An evidence-based analysis of the current situation. Paper presented at the *Sixth International Conference on Urban Pests*, H-8200 Veszprém, Pápai út 37/a, Hungary.
- BRADFIELD, J. Y., LEE, Y. H., & KEELEY, L. L. (1991). Cytochrome P450 family 4 in a cockroach: molecular cloning and regulation by hypertrehalosemic hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 4558-4562.
- BRITO, L. P., LINSS, J. G., LIMA-CAMARA, T. N., BELINATO, T. A., PEIXOTO, A. A., LIMA, J. B., VALLE, D., & MARTINS, A. J. (2013). Assessing the effects of *Aedes*

- aegypti kdr* mutations on pyrethroid resistance and its fitness cost. *PLoS ONE*, 8, e60878.
- BUSTIN, S. A., BENES, V., GARSON, J. A., HELLEMANS, J., HUGGETT, J., KUBISTA, M., MUELLER, R., NOLAN, T., PFAFFL, M. W., SHIPLEY, G. L., VANDESOMPELE, J., & WITTEWER, C. T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55, 611-622.
- BUSVINE, J. R. (1958). Insecticide-Resistance in Bed-Bugs. *Bulletin of the World Health Organization*, 19, 1041-1052.
- BUSVINE, J. R., & LIEN, J. (1961). Methods of Measuring Insecticide Susceptibility Levels in Bed-bugs, Cone-nosed Bugs, Fleas and Lice. *Bulletin of the World Health Organization*, 24, 509-517.
- BUSVINE, J. R. (1964). Medical entomology in Britain. *Annals of Applied Biology*, 53, 190-199.
- CARRIERE, Y., DELAND, J.-P., ROFF, D. A., & VINCENT, C. (1994). Life-History Costs Associated with the Evolution of Insecticide Resistance. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 258, 35-40.
- CATTERALL, W. A. (2000). From Ionic Currents to Molecular Mechanisms: The Structure and Function of Voltage-Gated Sodium Channels. *Neuron*, 26, 13-25.
- CATTERALL, W. A. (2003). International Union of Pharmacology: Approaches to the Nomenclature of Voltage-Gated Ion Channels. *Pharmacological Reviews*, 55, 573-574.
- DANG, K., LILLY, D. G., BU, W., & DOGGETT, S. L. (2014a). Simple, rapid and cost-effective technique for the detection of pyrethroid resistance in bed bugs, *Cimex* spp. (Hemiptera: Cimicidae). *Austral Entomology*, 54, 191-196.
- DANG, K., TOI, C. S., LILLY, D. G., BU, W., & DOGGETT, S. L. (2014b). Detection of knockdown resistance mutations in the common bed bug, *Cimex lectularius* (Hemiptera: Cimicidae), in Australia. *Pest Management Science*, doi: 10.1002/ps.3861.
- DAVIES, T. G., FIELD, L. M., & WILLIAMSON, M. S. (2012). The re-emergence of the bed bug as a nuisance pest: implications of resistance to the pyrethroid insecticides. *Medical and veterinary entomology*, 26, 241-254.
- DAVIS, R. F., JOHNSTON, G. A., & SLADDEN, M. J. (2009). Recognition and management of common ectoparasitic diseases in travelers. *American Journal of Clinical Dermatology*, 10, 1-8.
- DERVEAUX, S., VANDESOMPELE, J., & HELLEMANS, J. (2010). How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods*, 50, 227-230.
- DINIZ, M. M. C. D. S. L., HENRIQUES, A. D. D. S., LEANDRO, R. D. S., AGUIAR, D. L., & BESERRA, E. B. (2014). Resistance of *Aedes aegypti* to temephos and adaptive disadvantages. *Revista de Saúde Pública*, 48, 775-782.
- DOGGETT, S. L., GEARY, M. J., & RUSSELL, R. C. (2004). The Resurgence of Bed Bugs in Australia: With Notes on Their Ecology and Control. *Environmental Health*, 4, 30-38.
- DOGGETT, S. L., & RUSSELL, R. C. (2008). The resurgence of bed bugs in australia. Paper presented at the *Sixth International Conference on Urban Pests*, H-8200 Veszprém, Pápai út 37/a, Hungary.
- DOGGETT, S. L., ORTON, C. J., LILLY, D. G., & RUSSELL, R. C. (2011). Bed Bugs: The Australian Response. *Insects*, 2, 96-111.
- DOGGETT, S. L., DWYER, D. E., PENAS, P. F., & RUSSELL, R. C. (2012). Bed bugs: clinical relevance and control options. *Clinical Microbiology Reviews*, 25, 164-192.

- DOGGETT, S. L. (2013). A Code of Practice For the Control of Bed Bug Infestations in Australia.
- DONG, K., DU, Y., RINKEVICH, F., NOMURA, Y., XU, P., WANG, L., SILVER, K., & ZHOROV, B. S. (2014). Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 50, 1-17.
- DURAND, R., CANNET, A., BERDJANE, Z., BRUEL, C., HAOUCHINE, D., DELAUNAY, P., & IZRI, A. (2012). Infestation by pyrethroids resistant bed bugs in the suburb of Paris, France. *Parasite*, 19, 381–387.
- ENGELS, W. R. (2009). Exact tests for Hardy-Weinberg proportions. *Genetics*, 183, 1431-1441.
- EOM, I. Y., RISTICEVIC, S., & PAWLISZYN, J. (2012). Simultaneous sampling and analysis of indoor air infested with *Cimex lectularius* L. (Hemiptera: Cimicidae) by solid phase microextraction, thin film microextraction and needle trap device. *Analytica Chimica Acta*, 716, 2-10.
- ESKENAZI, B., CHEVRIER, J., ROSAS, L. G., ANDERSON, H. A., BORNMAN, M. S., BOUWMAN, H., CHEN, A., COHN, B. A., DE JAGER, C., HENSHEL, D. S., LEIPZIG, F., LEIPZIG, J. S., LORENZ, E. C., SNEDEKER, S. M., & STAPLETON, D. (2009). The Pine River statement: human health consequences of DDT use. *Environmental Health Perspectives*, 117, 1359-1367.
- ESTABROOK, R. W. (1996). The remarkable P450s: a historical overview of these versatile heme protein catalysts. *FASEB Journal*, 10, 202-204.
- EUROPEAN UNION. (2012). *TNsG on Products Evaluation. (Revised Appendix to Chapter 7) Guidance Efficacy Evaluation of Insecticides PT 18 and 19. Ca-Dec12-Doc 6.a*. Brüssel: European Commission Environment Directorate General.
- FEYEREISEN, R. (2005). Insect Cytochrome P450. In L. I. GILBERT, K. IATROU, UNDS. S. GILL (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science* (Vol. 4, pp. 1-77). Oxford: Elsevier Science & Technology.
- FEYEREISEN, R. (2012). Insect CYP Genes and P450 Enzymes. In L. I. GILBERT (Ed.), *Insect Molecular Biology and Biochemistry* (pp. 236–316). London, UK: Academic Press.
- FLEIGE, S., & PFAFFL, M. W. (2006). RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 126-139.
- FUENTES, M. V., SAINZ-ELIPE, S., SÁEZ-DURÁN, S., & GALÁN-PUCHADES, M. T. (2010). Bedbug infestations acquired whilst travelling in the European Union. *Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitología*, 69, 204-209.
- FUJIWARA, H., & ISHIKAWA, H. (1986). Molecular mechanism of introduction of the hidden break into the 28S rRNA of insects: implication based on structural studies. *Nucleic Acids Research*, 14, 6393-6401.
- GBAKIMA, A. A., TERRY, B. C., KANJA, F., KORTEQUEE, S., DUKULEY, I., & SAHR, F. (2002). High prevalence of bedbugs *Cimex hemipterus* and *Cimex lectularius* in camps for internally displaced persons in Freetown, Sierra Leone: a pilot humanitarian investigation. *West African Journal of Medicine*, 21, 268-271.
- GIORDA, F., GUARDONE, L., MANCINI, M., ACCORSI, A., MACCHIONI, F., & MIGNONE, W. (2013). Cases of bed bug (*Cimex lectularius*) infestations in Northwest Italy. *Veterinaria Italiana*, 49, 335-340.
- GODDARD, J., & DESHAZO, R. (2009). Bed bugs (*Cimex lectularius*) and clinical consequences of their bites. *Journal of the American Medical Association*, 301, 1358-1366.
- GOLDIN, A. L. (2003). Mechanisms of sodium channel inactivation. *Current Opinion in Neurobiology*, 13, 284-290.

- HARDSTONE, M. C., STRYCHARZ, J. P., KIM, J., PARK, I. K., YOON, K. S., AHN, Y. J., HARRINGTON, L. C., LEE, S. H., & CLARK, J. M. (2014). Development of multifunctional metabolic synergists to suppress the evolution of resistance against pyrethroids in insects that blood feed on humans. *Pest Management Science*, 71, 842-849.
- HARLAN, H. J. (2006). Bed Bugs 101: the Basics of *Cimex lectularius*. *American Entomologist*, 52, 99-101.
- HARRACA, V., RYNE, C., & IGNELL, R. (2010). Nymphs of the common bed bug (*Cimex lectularius*) produce anti-aphrodisiac defence against conspecific males. *BMC Biology*, 8, 1-7.
- HARRACA, V., RYNE, C., BIRGERSSON, G., & IGNELL, R. (2012). Smelling your way to food: can bed bugs use our odour? *Journal of Experimental Biology*, 215, 623-629.
- HELLEMANS, J., MORTIER, G., DE PAEPE, A., SPELEMAN, F., & VANDESOMPELE, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology*, 8, R19.
- HEMINGWAY, J., & RANSON, H. (2000). Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology*, 45, 371-391.
- HOW, Y.-F., & LEE, C.-Y. (2010). Effects of Temperature and Humidity on the Survival and Water Loss of *Cimex hemipterus* (Hemiptera: Cimicidae). *Journal of Medical Entomology*, 47, 987-995.
- ISHIKAWA, H., & NEWBURGH, R. W. (1972). Studies of the thermal conversion of 28 S RNA of *Galleria mellonella* (L.) to an 18 S product. *Journal of Molecular Biology*, 64, 135-144.
- JOHNSON, C. G. (1941). The ecology of the bed-bug, *Cimex lectularius* L., in Britain. *Journal of Hygiene*, 41, 347-461.
- KEMPER, H. (1930). Beiträge zur Biologie der Bettwanze. I. Über den Einfluss des Nahrungsmangels. *Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere*, 19, 160-182.
- KEMPER, H. (1931). Beiträge zur Biologie der Bettwanze. II. Über die Häutung. *Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere*, 22, 53-108.
- KHATTAT, F. H., & BUSVINE, J. R. (1965). A Modified Test Method for Measuring Resistance to Dichlorvos Vapour. *Bulletin of the World Health Organization*, 32, 551-556.
- KILLGERM. (2012). *Bedbug Manual*. Ossett, West Yorkshire: Killgerm Chemicals Limited.
- KILPINEN, O., VAGN JENSEN, K. M., & KRISTENSEN, M. (2008). Bed bug Problems in denmark, with a european perpespective. Paper presented at the *Sixth International Conference on Urban Pests*, Hungary.
- KILPINEN, O., KRISTENSEN, M., & VAGN JENSEN, K. M. (2011). Resistance differences between chlorpyrifos and synthetic pyrethroids in *Cimex lectularius* population from Denmark. *Parasitology Research*, 109, 1461-1464.
- KNOLHOFF, L. M., & ONSTAD, D. W. (2014). Resistance by Ectoparasites. In D. W. ONSTAD (Ed.), *Insect Resistance Management Biology, Economics, and Prediction* (2 ed., pp. 185-231). London, UK: Academic Press.
- KOGANEMARU, R., MILLER, D. M., & ADELMAN, Z. N. (2013). Robust cuticular penetration resistance in the common bed bug (*Cimex lectularius* L.) correlates with increased steady-state transcript levels of CPR-type cuticle protein genes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 106, 190-197.
- KOLB, A., NEEDHAM, G. R., NEYMAN, K. M., & HIGH, W. A. (2009). Bedbugs. *Dermatology and Therapy*, 22, 347-352.

- KOMAGATA, O., KASAI, S., & TOMITA, T. (2010). Overexpression of cytochrome P450 genes in pyrethroid-resistant *Culex quinquefasciatus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40, 146-152.
- LASKOWSKI, D. A. (2002). Physical and chemical properties of pyrethroids. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 174, 49-170.
- LEE, I. Y., REE, H. I., AN, S. J., LINTON, J. A., & YONG, T. S. (2008). Reemergence of the bedbug *Cimex lectularius* in Seoul, Korea. *Korean Journal of Parasitology*, 46, 269-271.
- LEHANE, M. J. (2005). *The Biology of Blood-Sucking in Insects* (2 ed.). Cambridge: Cambridge University Press.
- LEVINSON, H. Z., LEVINSON, A. R., & MASCHWITZ, U. (1974). Action and composition of the alarm pheromone of the bedbug *Cimex lectularius* L. *The Science of Nature*, 61, 684-685.
- LEVY BENCHETON, A., BERENGER, J. M., DEL GIUDICE, P., DELAUNAY, P., PAGES, F., & MORAND, J. J. (2011). Resurgence of bedbugs in southern France: a local problem or the tip of the iceberg? *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 25, 599-602.
- LI, X., SCHULER, M. A., & BERENBAUM, M. R. (2007). Molecular Mechanisms of Metabolic Resistance to Synthetic and Natural Xenobiotics. *Annual Review of Entomology*, 52, 231-253.
- LIEBOLD, K., SCHLIEMANN-WILLERS, S., & WOLLINA, U. (2003). Disseminated bullous eruption with systemic reaction caused by *Cimex lectularius*. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 17, 461-463.
- LILLY, D. G., DOGGETT, S. L., ZALUCKI, M. P., ORTON, C. J., & RUSSEL, R. C. (2009). Bed bugs that bite back Confirmation of Insecticide resistance in Australia in the common bed bug, *Cimex lectularius*. *Professional Pest Manager*, 13, 22-24.
- LUCIUS, R., & LOOS-FRANK, B. (2008). *Biologie von Parasiten* (Vol. 2): Springer Verlag, Berlin, Deutschland.
- MACHARIA, R. W., OMBURA, F. L., & AROKO, E. O. (2015). Insects' RNA Profiling Reveals Absence of "Hidden Break" in 28S Ribosomal RNA Molecule of Onion Thrips, *Thrips tabaci*. *Journal of Nucleic Acids*, 2015, 1-8.
- MAMIDALA, P., JONES, S. C., & MITTAPALLI, O. (2011a). Metabolic Resistance in Bed Bugs. *Insects*, 2, 36-48.
- MAMIDALA, P., RAJARAPU, S. P., JONES, S. C., & MITTAPALLI, O. (2011b). Identification and Validation of Reference Genes for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction in *Cimex lectularius*. *Journal of Medical Entomology*, 48, 947-951.
- MAMIDALA, P., WIJERATNE, A. J., WIJERATNE, S., KORNACKER, K., SUDHAMALLA, B., RIVERA-VEGA, L. J., HOELMER, A., MEULIA, T., JONES, S. C., & MITTAPALLI, O. (2012). RNA-Seq and molecular docking reveal multi-level pesticide resistance in the bed bug. *BMC Genomics*, 13, 1-16.
- MANSUY, D. (1998). The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P450. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 121, 5-14.
- MARX, R. (1955). Über die Wirtsfindung und die Bedeutung des artspezifischen Duftstoffes bei *Cimex lectularius* Linné. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 17, 41-73.
- MASETTI, M., & BRUSCHI, F. (2007). Bedbug infestations recorded in Central Italy. *Parasitology International*, 56, 81-83.

- MONTES, C., CUADRILLERO, C., & VILELLA, D. (2002). Maintenance of a Laboratory Colony of *Cimex lectularius* (Hemiptera: Cimicidae) Using an Artificial Feeding Technique. *Journal of Medical Entomology*, 39, 675-679.
- MOYES, C. D., & SCHULTE, P. M. (2010). *Tierphysiologie* (Vol. 1): Pearson Studium.
- NARAHASHI, T. (1992). Nerve membrane Na⁺ channels as targets of insecticides. *Trends in Pharmacological Sciences*, 13, 236-241.
- NARAHASHI, T. (1996). Neuronal Ion Channels as the Target Sites of Insecticides. *Pharmacology & Toxicology*, 79, 1-14.
- NEBERT, D. W. (1991). Proposed role of drug-metabolizing enzymes: regulation of steady state levels of the ligands that effect growth, homeostasis, differentiation, and neuroendocrine functions. *Molecular Endocrinology*, 5, 1203-1214.
- NEBERT, D. W., NELSON, D. R., COON, M. J., ESTABROOK, R. W., FEYEREISEN, R., FUJII-KURIYAMA, Y., GONZALEZ, F. J., GUENGERICH, F. P., GUNSALUS, I. C., JOHNSON, E. F., LOPER, J. C., SATO, R., WATERMAN, M. R., & WAXMAN, D. J. (1991). The P450 Superfamily: Update on New Sequences, Gene Mapping, and Recommended Nomenclature. *DNA and Cell Biology*, 10, 1-14.
- NPMA. (2011). *Best Management Practices for Bed Bugs*. Fairfax: National Pest Management Association.
- OGINO, K., EDA-FUJIWARA, H., FUJIWARA, H., & ISHIKAWA, H. (1990). What causes the aphid 28S rRNA to lack the hidden break? *Journal of Molecular Evolution*, 30, 509-513.
- OLIVEIRA, E. E., DU, Y., NOMURA, Y., & DONG, K. (2013). A residue in the transmembrane segment 6 of domain I in insect and mammalian sodium channels regulate differential sensitivities to pyrethroid insecticides. *Neurotoxicology*, 38, 42-50.
- OLSON, J. F., MOON, R. D., & KELLS, S. A. (2008). Off-host aggregation behavior and sensory basis of arrestment by *Cimex lectularius* (Heteroptera: Cimicidae). *Journal of Insect Physiology*, 55, 580-587.
- OMURA, T., & SATO, R. (1964). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes I. evidence for its hemoprotein nature *Journal of Biological Chemistry*, 239, 2370-2378
- OMURA, T. (1993). History of Cytochrome P450. In T. OMURA, Y. ISHIMURA, UNDY. FUJII-KURIYAMA (Eds.), *Cytochrome P-450* (pp. 1-15). Tokyo: Kodansha.
- ONSTAD, D. W. (2014). Major Issues in Insect Resistance Management. In D. W. ONSTAD (Ed.), *Insect Resistance Management Biology, Economics, and Prediction* (2 ed., pp. 1-23). London, UK: Academic Press.
- PAUL, J., & BATES, J. (2000). Is infestation with the common bedbug increasing? *British Medical Journal*, 320, 1141-1142.
- PFAFFL, M. W., TICHOPAD, A., PRGOMET, C., & NEUVIANS, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, 26, 509-515.
- PINTO, L. J., COOPER, R., & KRAFT, S. K. (2007). *Bed Bug Handbook: The Complete Guide to Bed Bugs and their Control* (1 ed.): Pinto & Associates.
- PITTENDRIGH, B. R., GAFFNEY, P., & MURDOCK, L. L. (2000). Deterministic Modeling of Negative Cross-resistance Strategies for use in Transgenic Host-plant Resistance. *Journal of Theoretical Biology*, 204, 135-150.
- PITTENDRIGH, B. R., HUESING, J., WALTERS, K. R., OLDS, B. P., STELE, L. D., SUN, L., GAFFNEY, P., & GASSMANN, A. J. (2014a). Negative Cross-Resistance: History, Present Status and Emerging Opportunities. In D. W. ONSTAD (Ed.), *Insect*

- Resistance Management Biology, Economics and Prediction* (2 ed., pp. 373-401). London, UK: Academic Press.
- PITTENDRIGH, B. R., MARGAM, V., WALTERS, K., STEELE, L. D., OLDS, B. P., SUN, L., HUESING, J., LEE, S. H., & CLARK, M. J. (2014b). Understanding Resistance and Induced Responses of Insects to Xenobiotics and Insecticides in the Ages of "Omics" and Systems Biology. In D. W. ONSTAD (Ed.), *Insect Resistance Management Biology, Economics and Prediction* (2 ed., pp. 55-98). London, UK: Academic Press.
- POLANCO, A., MILLER, D. M., & BREWSTER, C. (2011a). Reproductive Potential of Field-collected Populations of *Cimex lectularius* L. and the Cost of Traumatic Insemination. *Insects*, 2, 326-335.
- POLANCO, A. M., BREWSTER, C. C., & MILLER, D. M. (2011b). Population Growth Potential of the Bed Bug, *Cimex lectularius* L.: A Life Table Analysis. *Insects*, 2, 173-185.
- POLANCO, A. M., MILLER, D. M., & BREWSTER, C. C. (2011c). Survivorship During Starvation for *Cimex lectularius* L. *Insects*, 2, 232-242.
- POTTER, M. F. (2005). A bed bug state of mind: emerging issues in bed bug management. *Pest Control Technology*, 33, 82-85, 88, 90, 92-93, 96-97.
- POTTER, M. F. (2006). The Perfect Storm: An Extension View on Bed Bugs. *American Entomologist*, 52, 102-104.
- POTTER, M. F. (2010). The sensitivity spectrum: human reactions to bed bug bites. *Pest Control Technology*, 38, 70-74.
- POTTER, M. F., HAYNES, K. F., ROSENBERG, B., & HENRIKSEN, M. (2011). Bugs Without Borders survey 2011. *National Pest Management Association Pestworld*, 1-12.
- RAYMOND, M., BERTICAT, C., WEILL, M., PASTEUR, N., & CHEVILLON, C. (2001). Insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*- what have we learned. *Genetica*, 112-113, 287-296.
- REINHARDT, K., & SIVA-JOTHY, M. T. (2007). Biology of the bed bugs (Cimicidae). *Annual Review of Entomology*, 52, 351-374.
- RICHARDS, L., BOASE, C. J., GEZAN, S., & CAMERON, M. M. (2009). Are bed bug infestations on the increase within Greater London? *Journal of Environmental Health Research*, 9, 1-9.
- ROMERO, A., POTTER, M. F., POTTER, D. A., & HAYNES, K. F. (2007). Insecticide Resistance in the Bed Bug: A Factor in Pests Sudden Resurgence? *Journal of Medical Entomology*, 44, 175-178.
- ROMERO, A., POTTER, M. F., & HAYNES, K. F. (2009). Behavioral Responses of the Bed Bug to Insecticide Residues. *Journal of Medical Entomology*, 46, 51-57.
- ROMERO, A., & SCHAL, C. (2014). Blood constituents as phagostimulants for the bed bug *Cimex lectularius* L. *Journal of Experimental Biology*, 217, 552-557.
- ROUSH, R. T., & PLAPP, F. W. J. (1982). Effects of insecticide resistance on biotic potential of the house fly (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology*, 75, 708-713.
- ROUSH, R. T., & MCKENZIE, J. A. (1987). Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. *Annual Review of Entomology*, 32, 361-380.
- ROY, S., MUKHOPADHYAY, A., & GURUSUBRAMANIAN, G. (2010). Fitness traits of insecticide resistant and susceptible strains of tea mosquito bug *Helopeltis theivora* Waterhouse (Heteroptera: Miridae). *Entomological Research*, 40, 229-232.
- SAHIL, M., LAFFITTE, E., & SUDRE, P. (2013). Bed Bugs: know them better. Deal with them better. *Revue médicale suisse*, 9, 718-722.

- SAWICKI, R. M. (1987). *Definition, detection and documentation of insecticide resistance* (R. M. SAWICKI Ed.). England: Vch Pub.
- SCOTT, J. G. (1999). Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29, 757-777.
- SCOTT, J. G. (2001). Cytochrome P450 Monooxygenases and Insecticide Resistance: Lessons from CYP6D1. In I. ISHAAYA (Ed.), *Biochemical Sites of Insecticide Action and Resistance* (pp. 255-267). Berlin, Deutschland: Springer.
- SEONG, K. M., LEE, D.-Y., YOON, K. S., KWON, D. H., KIM, H. C., KLEIN, T. A., CLARK, J. M., & LEE, S. H. (2010). Establishment of Quantitative Sequencing and Filter Contact Vial Bioassay for Monitoring Pyrethroid Resistance in the Common Bed Bug, *Cimex lectularius*. *Journal of Medical Entomology*, 47, 592-599.
- SHUM, M., BEAUDET, S. A., COMACK, E., KOSATSKY, T., STUART, T., AYRE, R., & PERRON, S. (2012). Bed Bugs and Public Health: New Approaches for an Old Scourge. *Canadian Journal of Public Health*, 103, 399-403.
- SILJANDER, E., GRIES, R., KHASKIN, G., & GRIES, G. (2008). Identification of the airborne aggregation pheromone of the common bed bug, *Cimex lectularius*. *Journal of Chemical Ecology*, 34, 708-718.
- SILJANDER, E. D. (2006). Foraging and Communication Ecology of bed bugs, *Cimex lectularius* L. (Hemiptera: Cimicidae). *American Entomologist*, 52, 116-117.
- SINGH, N., WANG, C., COOPER, R., & LIU, C. (2012). Interactions among Carbon Dioxide, Heat, and Chemical Lures in Attracting the Bed Bug, *Cimex lectularius* L. (Hemiptera: Cimicidae). *Psyche: A Journal of Entomology*, 2012, 1-9.
- SINGH, N., WANG, C., & COOPER, R. (2013). Effect of trap design, chemical lure, carbon dioxide release rate and source of carbon dioxide on efficacy of bed bug monitors. *Journal of Economic Entomology*, 106, 1802-1811.
- SIVA-JOTHY, M. T. (2006). Trauma, disease and collateral damage: conflict in cimicids. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361, 269-275.
- SODERLUND, D. M., & BLOOMQUIST, J. R. (1990). Molecular Mechanisms of Insecticide Resistance. In R. T. ROUSH UND B. E. TABASHNIK (Eds.), *Pesticide Resistance in Arthropods* (pp. 58-86). New York, USA: Chapman and Hall.
- SODERLUND, D. M. (2012). Molecular Mechanisms of Pyrethroid Insecticide Neurotoxicity: Recent Advances. *Archives of Toxicology*, 86, 165-181.
- STANLEY, B. H. (2014). Monitoring Resistance. In D. W. ONSTAD (Ed.), *Insect Resistance Management Biology, Economics, and Prediction* (2 ed., pp. 485-513). London, UK: Academic Press.
- STAROSCIK, A. (2004). Calculator for determining the number of copies of a template. Retrieved 25.04.2015, from URI Genomics & Sequencing Center <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>.
- STELZL, U., CONNELL, S., NIERHAUS, K. H., & WITTMANN-LIEBOLD, B. (2001). Encyclopedia of Life Sciences. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-12.
- STUTT, A. D., & SIVA-JOTHY, M. T. (2001). Traumatic insemination and sexual conflict in the bed bug *Cimex lectularius*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 5683-5687.
- SUCHY, J. T., & LEWIS, V. R. (2011). Host-Seeking Behavior in the Bed Bug, *Cimex lectularius*. *Insects*, 2, 22-35.
- SUTHERLAND, T. D., UNNITHAN, G. C., ANDERSEN, J. F., EVANS, P. H., MURATALIEV, M. B., SZABO, L. Z., MASH, E. A., BOWERS, W. S., & FEYEREISEN, R. (1998). A cytochrome P450 terpenoid hydroxylase linked to the suppression of insect juvenile hormone synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 12884-12889.

- SUWANNAYOD, S., CHANBANG, Y., & BURANAPANICHPAN, S. (2010). The Life Cycle and Effectiveness of Insecticides against the Bed Bugs of Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 41, 548-554.
- TAKANO-LEE, M., VELTEN, R. K., EDMAN, J. D., MULLENS, B. A., & CLARK, J. M. (2003). An automated feeding apparatus for in vitro maintenance of the human head louse, *Pediculus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *Journal of Medical Entomology*, 40, 795-799.
- TAWATSIN, A., THAVARA, U., CHOMPOOSRI, J., PHUSUP, Y., JONJANG, N., KHUMSAWADS, C., BHAKDEENUAN, P., SAWANPANYALERT, P., ASAVADACHANUKORN, P., MULLA, M. S., SIRIYASATIEN, P., & DEBBOUN, M. (2011). Insecticide Resistance in Bedbugs in Thailand and Laboratory Evaluation of Insecticides for the Control of *Cimex hemipterus* and *Cimex lectularius* (Hemiptera: Cimicidae). *Journal of Medical Entomology*, 48, 1023-1030.
- TEMU, E. A., MINJAS, J. N., SHIFF, C. J., & MAJALA, A. (1999). Bedbug control by permethrin-impregnated bednets in Tanzania. *Medical and veterinary entomology*, 13, 457-459.
- TER POORTEN, M. C., & PROSE, N. S. (2005). The return of the common bedbug. *Pediatric Dermatology*, 22, 183-187.
- USHERWOOD, P. N., DAVIES, T. G., MELLOR, I. R., O'REILLY, A. O., PENG, F., VAIS, H., KHAMBAY, B. P., FIELD, L. M., & WILLIAMSON, M. S. (2007). Mutations in DIIS5 and the DIIS4-S5 linker of *Drosophila melanogaster* sodium channel define binding domains for pyrethroids and DDT. *FEBS Letters*, 581, 5485-5492.
- USINGER, R. L. (1966). *Monograph of Cimicidae (Hemiptera-Heteroptera)* (Vol. 7). College Park, MD: Entomological Society of America.
- VANDESOMPELE, J., DE PRETER, K., PATTYN, F., POPPE, B., VAN ROY, N., DE PAEPE, A., & SPELEMAN, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3, 1-12.
- VIJVERBERG, H. P., & VAN DEN BERCKEN, J. (1990). Neurotoxicological effects and the mode of action of pyrethroid insecticides. *Critical Reviews in Toxicology*, 21, 105-126.
- VIJVERBERG, H. P. M., & VAN DEN BERCKEN, J. (1982). Action of Pyrethroid Insecticides on the Vertebrate Nervous System. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 8, 421-440.
- VONTAS, J. G., SMALL, G. J., & HEMINGWAY, J. (2001). Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochemical Journal*, 357, 65-72.
- WANG, C., GIBB, T., BENNETT, G. W., & MCKNIGHT, S. (2009). Bed Bug (Heteroptera: Cimicidae) Attraction to Pitfall Traps Baited With Carbon Dioxide, Heat, and Chemical Lure. *Journal of Economic Entomology*, 102, 1580-1585.
- WANG, C., & COOPER, R. (2011). *Urban Pest Management: An Environmental Perspective*. CABI.
- WEEKS, E. N., LOGAN, J. G., GEZAN, S. A., WOODCOCK, C. M., BIRKETT, M. A., PICKETT, J. A., & CAMERON, M. M. (2011). A bioassay for studying behavioural responses of the common bed bug, *Cimex lectularius* (Hemiptera: Cimicidae) to bed bug-derived volatiles. *Bulletin of Entomological Research*, 101, 1-8.
- WERCK-REICHHART, D., & FEYEREISEN, R. (2000). Cytochromes P450: a success story. *Genome Biology*, 1, reviews3003-reviews3003.3009
- WHITE, M. T., LWETOJERA, D., MARSHALL, J., CARON-LORMIER, G., BOHAN, D. A., DENHOLM, I., & DEVINE, G. J. (2014). Negative cross resistance mediated by

- co-treated bed nets: a potential means of restoring pyrethroid-susceptibility to malaria vectors. *PLoS ONE*, 9, e95640.
- WHO. (1957). Expert Committee on Insecticides Seventh Report. *World Health Organisation Technical Report Series*, 125.
- WHO. (1998). Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticide on treated surfaces. *WHO/CDS/CPC/MAL/98.12*.
- WINNEBECK, E. C., MILLAR, C. D., & WARMAN, G. R. (2010). Why Does Insect RNA Look Degraded? *Journal of Insect Science*, 10, 1-7.
- YOON, K. S., KWON, D. H., STRYCHARZ, J. P., HOLLINGSWORTH, C. S., LEE, S. H., & CLARK, J. M. (2008). Biochemical and Molecular Analysis of Deltamethrin Resistance in the Common Bed Bug (Hemiptera: Cimicidae). *Journal of Medical Entomology*, 45, 1092-1101.
- YU, S. J. (2008). *The Toxicology and Biochemistry of Insecticides*. Florida, USA: CRC Press.
- ZHU, F., PARTHASARATHY, R., BAI, H., WOITHE, K., KAUSSMANN, M., NAUEN, R., HARRISON, D. A., & PALLI, S. R. (2010a). A brain-specific cytochrome P450 responsible for the majority of deltamethrin resistance in the QTC279 strain of *Tribolium castaneum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 8557-8562.
- ZHU, F., WIGGINTON, J., ROMERO, A., MOORE, A., FERGUSON, K., PALLI, R., POTTER, M. F., HAYNES, K. F., & PALLI, S. R. (2010b). Widespread distribution of knockdown resistance mutations in the bed bug, *Cimex lectularius* (Hemiptera: Cimicidae), populations in the United States. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 73, 245-257.
- ZHU, F., SAMS, S., MOURAL, T., HAYNES, K. F., POTTER, M. F., & PALLI, S. R. (2012). RNA interference of NADPH-cytochrome P450 reductase results in reduced insecticide resistance in the bed bug, *Cimex lectularius*. *PLoS ONE*, 7, e31037.
- ZHU, F., GUJAR, H., GORDON, J. R., HAYNES, K. F., POTTER, M. F., & PALLI, S. R. (2013). Bed bugs evolved unique adaptive strategy to resist pyrethroid insecticides. *Scientific Reports*, 3, 1-8.
- ZLOTKIN, E. (2001). The Functional Diversity of Insecticides. In I. ISHAAYA (Ed.), *Biochemical Sites of Insecticide Action and Resistance* (pp. 54-56). Berlin, Deutschland: Springer.

8 Anhang

8.1 Hardy Weinberg-Gleichgewicht

Tab. 13: Ergebnisse aus der Berechnung des Hardy Weinberg-Gleichgewichts (Package „Hardy-Weinberg“ für die Statistiksoftware R) für die in den Feldstämmen LB, HO; SK, OB und AS (A) sowie im CC-Stamm (B) nachgewiesene Mutation L925I und die im CC-Stamm nachgewiesene Mutation V419L (B).

A										
Mutation	L925I									
Stämme	LB		HO		SK		OB		AS	
Test	Statistik	p-Wert	Statistik	p-Wert	Statistik	p-Wert	Statistik	p-Wert	Statistik	p-Wert
Chi ² -Test	1,976	0,160	9,920	0,002	3,430	0,064	0,196	0,658	0,013	0,909
Chi ² -Test mit Yates Korrektur	0,290	0,590	7,926	0,005	2,299	0,129	0,019	0,891	0,096	0,756
Likelihood ratio Test	1,468	0,226	11,057	0,001	3,570	0,059	0,199	0,656	0,013	0,908
Exakter test mit selome p-Wert	n.a.	0,246	n.a.	0,005	n.a.	0,169	n.a.	1,000	n.a.	1,000
Exakter test mit dost p-Wert	n.a.	0,492	n.a.	0,007	n.a.	0,191	n.a.	0,817	n.a.	1,000
Exakter test mit mid p-Wert	n.a.	0,128	n.a.	0,004	n.a.	0,127	n.a.	1,000	n.a.	0,803
Permutations Test	1,976	0,244	9,920	0,005	3,430	0,104	0,196	1,000	0,013	1,000

B				
Mutation	V419L		L925I	
Stamm	CC			
Test	Statistik	p-Wert	Statistik	p-Wert
Chi ² -Test	0,131	0,717	3,200	0,074
Chi ² -Test mit Yates Korrektur	1,371	0,242	2,125	0,145
Likelihood ratio Test	0,244	0,622	3,291	0,070
Exakter test mit selome p-Wert	n.a.	1,000	n.a.	0,176
Exakter test mit dost p-Wert	n.a.	1,000	n.a.	0,213
Exakter test mit mid p-Wert	n.a.	0,538	n.a.	0,130
Permutations Test	0,131	1	3,200	0,179

8.2 Elektropherogramme der in der Transkriptionsanalyse verwendeten RNA-Proben

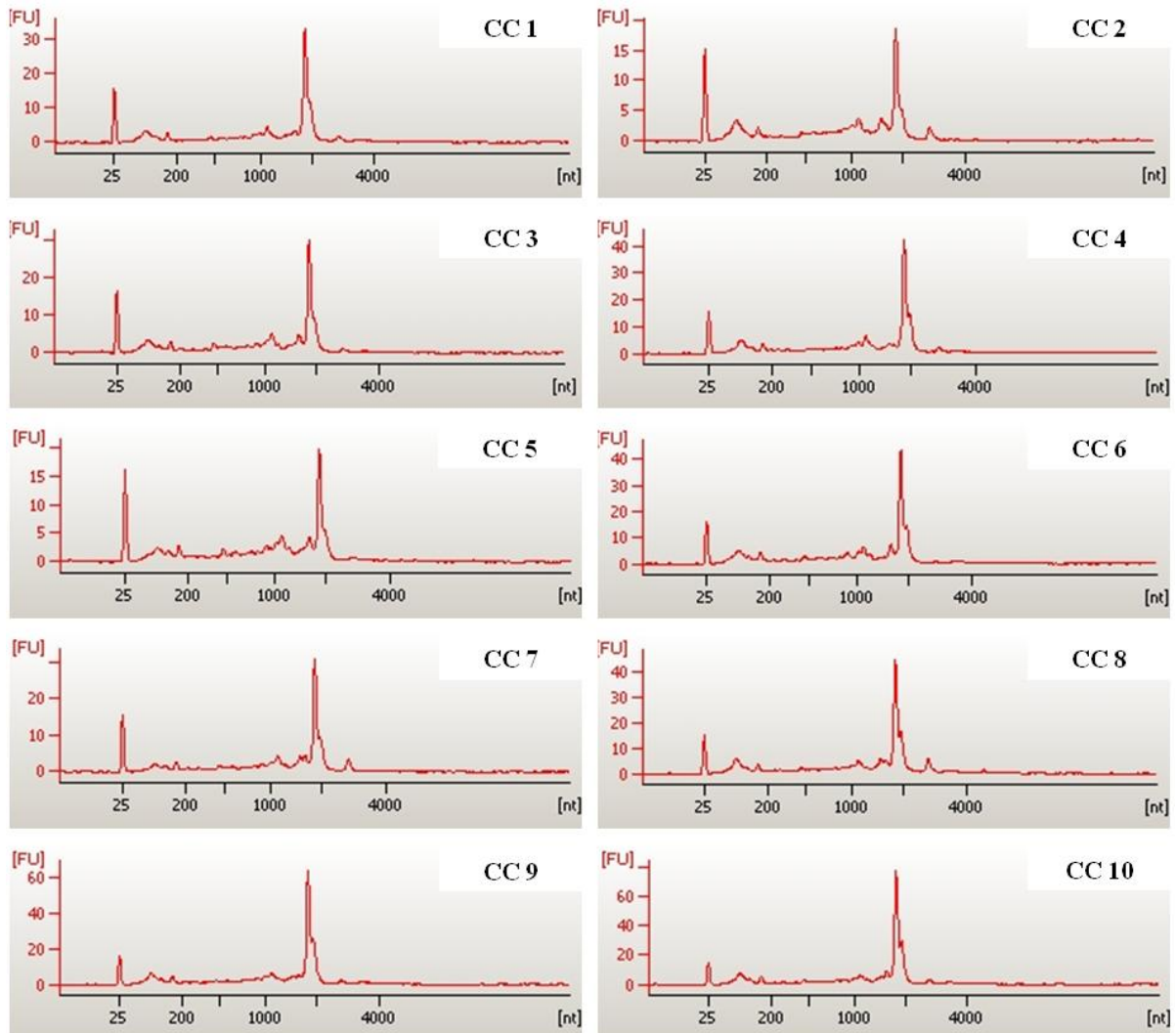


Abb. 58: Elektropherogramme der RNA von männlichen *Cimex lectularius* des CC-Stamms für die mRNA-Expressionsanalyse ohne vorherige Hitzedenaturierung. (1-10). Die Auswahl nicht degradierter RNA erfolgte mittels visueller Inspektion, da durch einen sog. Hidden-Break in der 28S-Einheit der rRNA eine Berechnung der RIN unmöglich war. **FU:** Fluoreszenz Units; **nt:** Nukleotide.

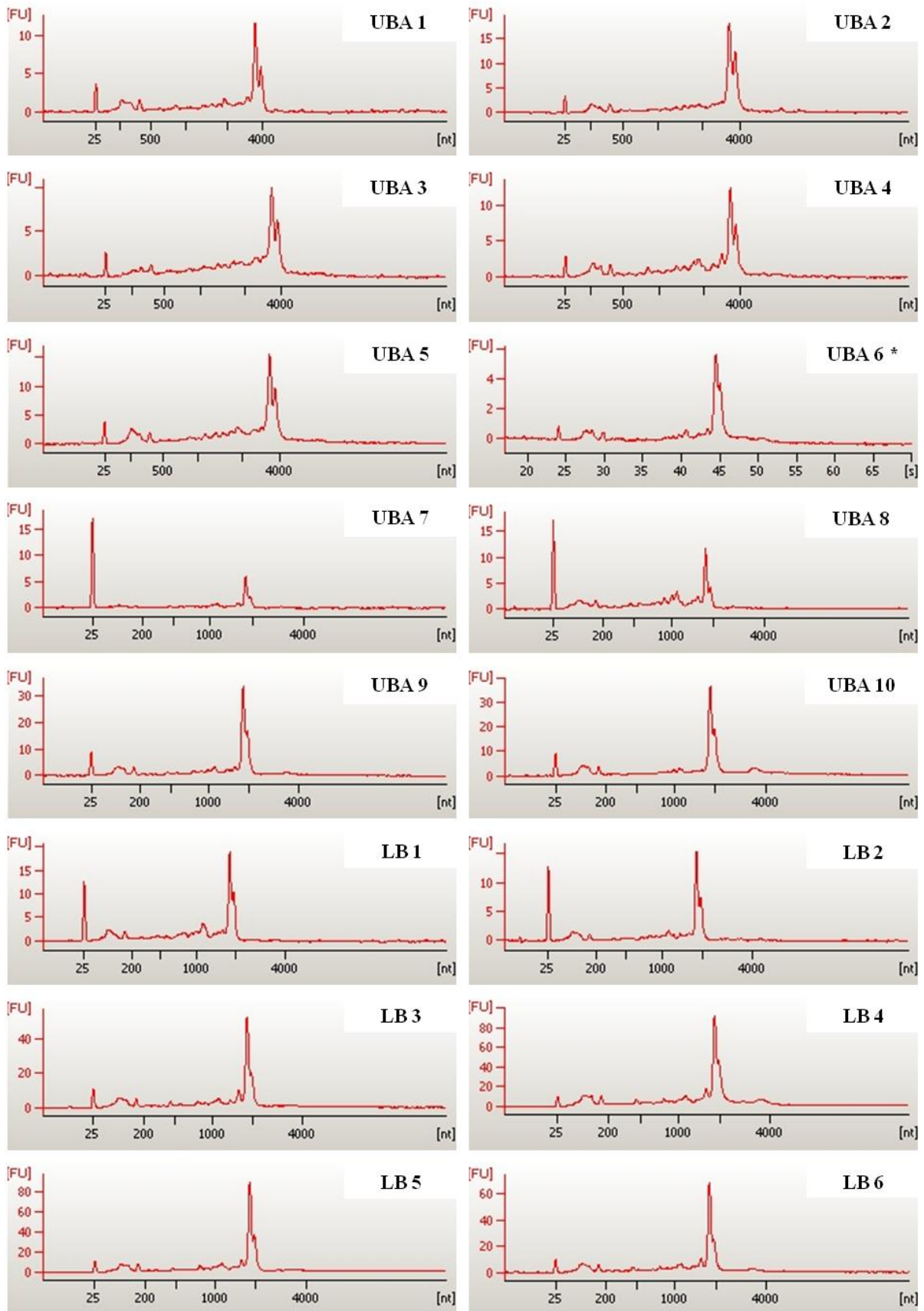


Abb. 59: Elektropherogramme der RNA von männlichen *Cimex lectularius* des UBA- und LB-Stamms für die mRNA-Expressionsanalyse ohne vorherige Hitzedenaturierung. UBA (1-10) und LB (1-6). Die Auswahl nicht degradiertes RNA erfolgte mittels visueller Inspektion, da durch einen sog. Hidden-Break in der 28S-Einheit der rRNA eine Berechnung der RIN unmöglich war. **FU:** Fluoreszenz Units; **nt:** Nukleotide.

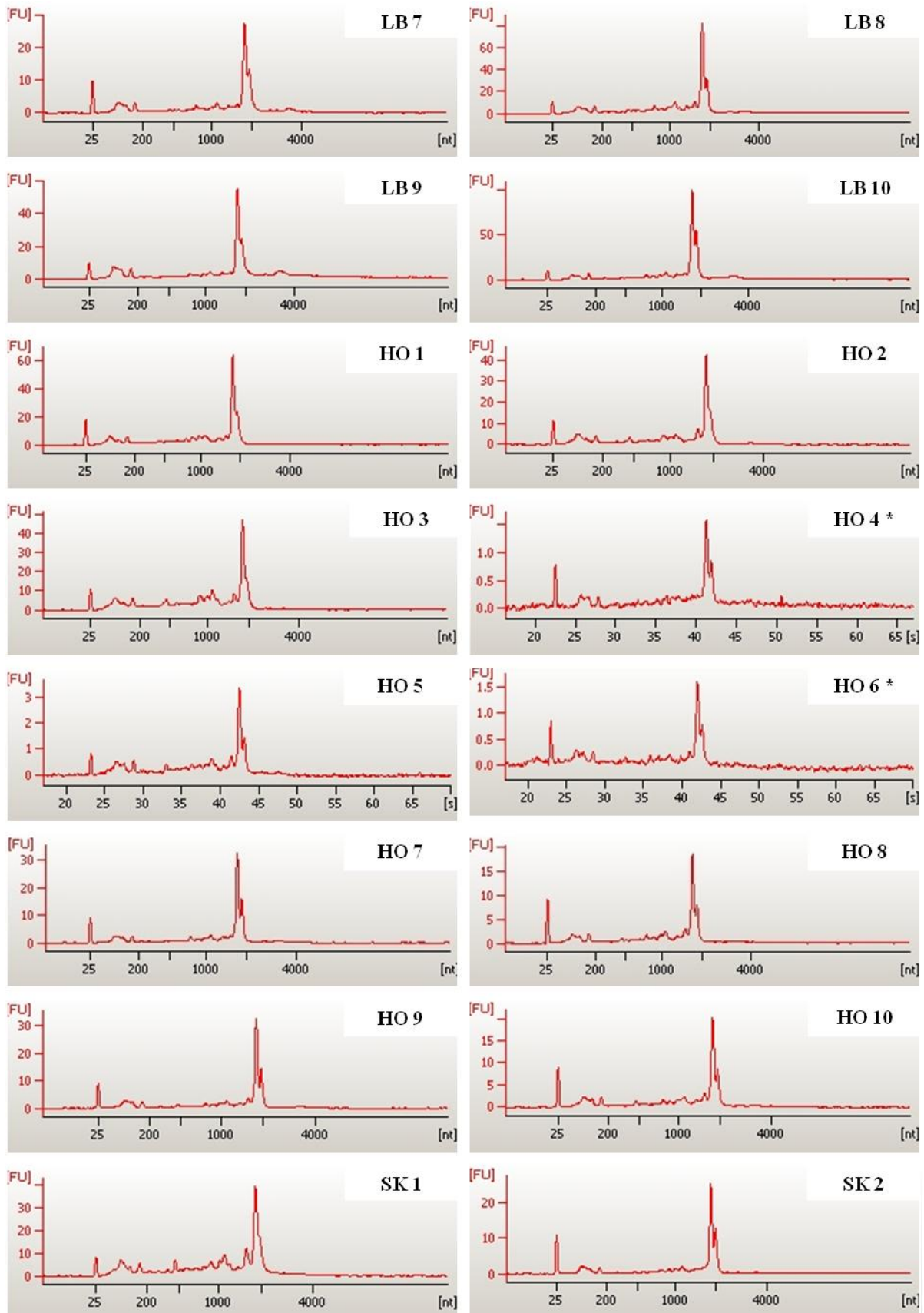


Abb. 60: Elektropherogramme der RNA von männlichen *Cimex lectularius* des LB-, HO- und SK-Stamms für die mRNA-Expressionsanalyse ohne vorherige Hitzedenaturierung. LB (7-10), HO (1-10) und SK (1, 2). Die Auswahl nicht degradiertes RNA erfolgte mittels visueller Inspektion, da durch einen sog. Hidden-Break in der 28S-Einheit der rRNA eine Berechnung der RIN unmöglich war. **FU**: Fluoreszenz Units; **nt**: Nukleotide.

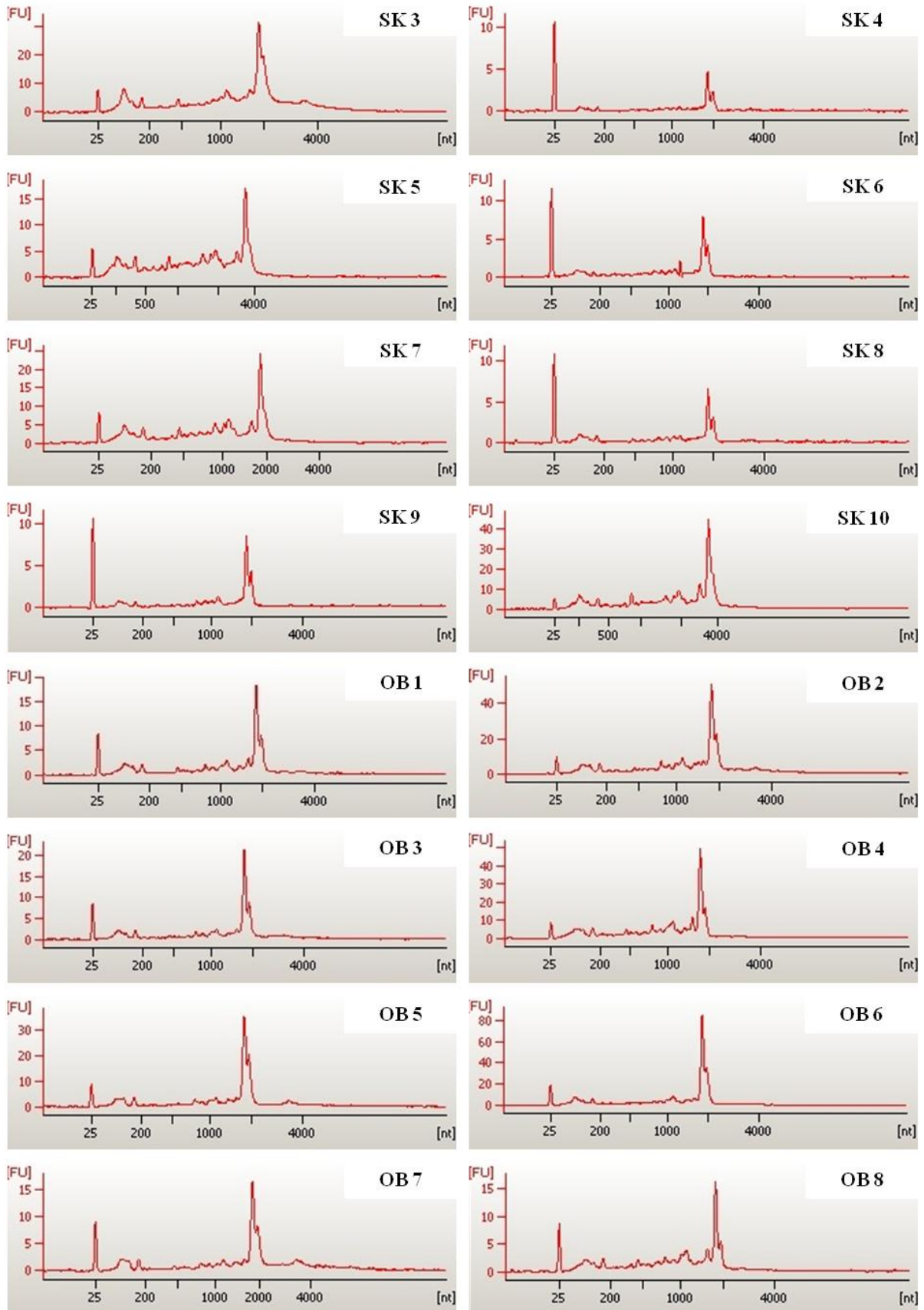


Abb. 61: Elektropherogramme der RNA von männlichen *Cimex lectularius* des SK- und OB-Stamms für die mRNA-Expressionsanalyse ohne vorherige Hitzedenaturierung. SK (3-10) und OB (1-8). Die Auswahl nicht degradiertes RNA erfolgte mittels visueller Inspektion, da durch einen sog. Hidden-Break in der 28S-Einheit der rRNA eine Berechnung der RIN unmöglich war. **FU:** Fluoreszenz Units; **nt:** Nukleotide.

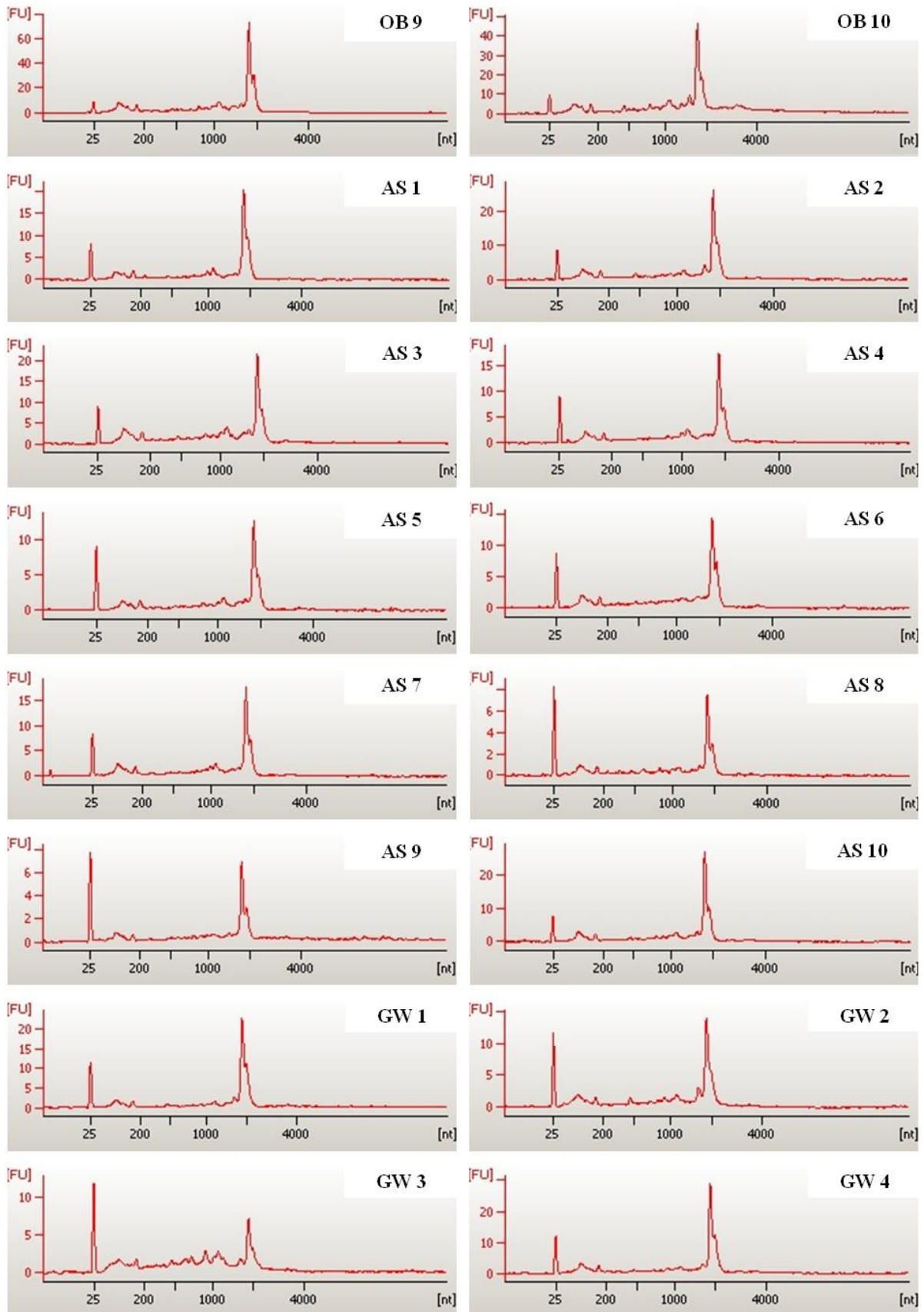


Abb. 62: Elektropherogramme der RNA von männlichen *Cimex lectularius* des OB-, AS-, und GW-Stamms für die mRNA-Expressionsanalyse ohne vorherige Hitzedenaturierung. OB (9, 10), AS (1-10) und GW (1-4). Die Auswahl nicht degradiertes RNA erfolgte mittels visueller Inspektion, da durch einen sog. Hidden-Break in der 28S-Einheit der rRNA eine Berechnung der RIN unmöglich war. FU: Fluoreszenz Units; nt: Nukleotide.

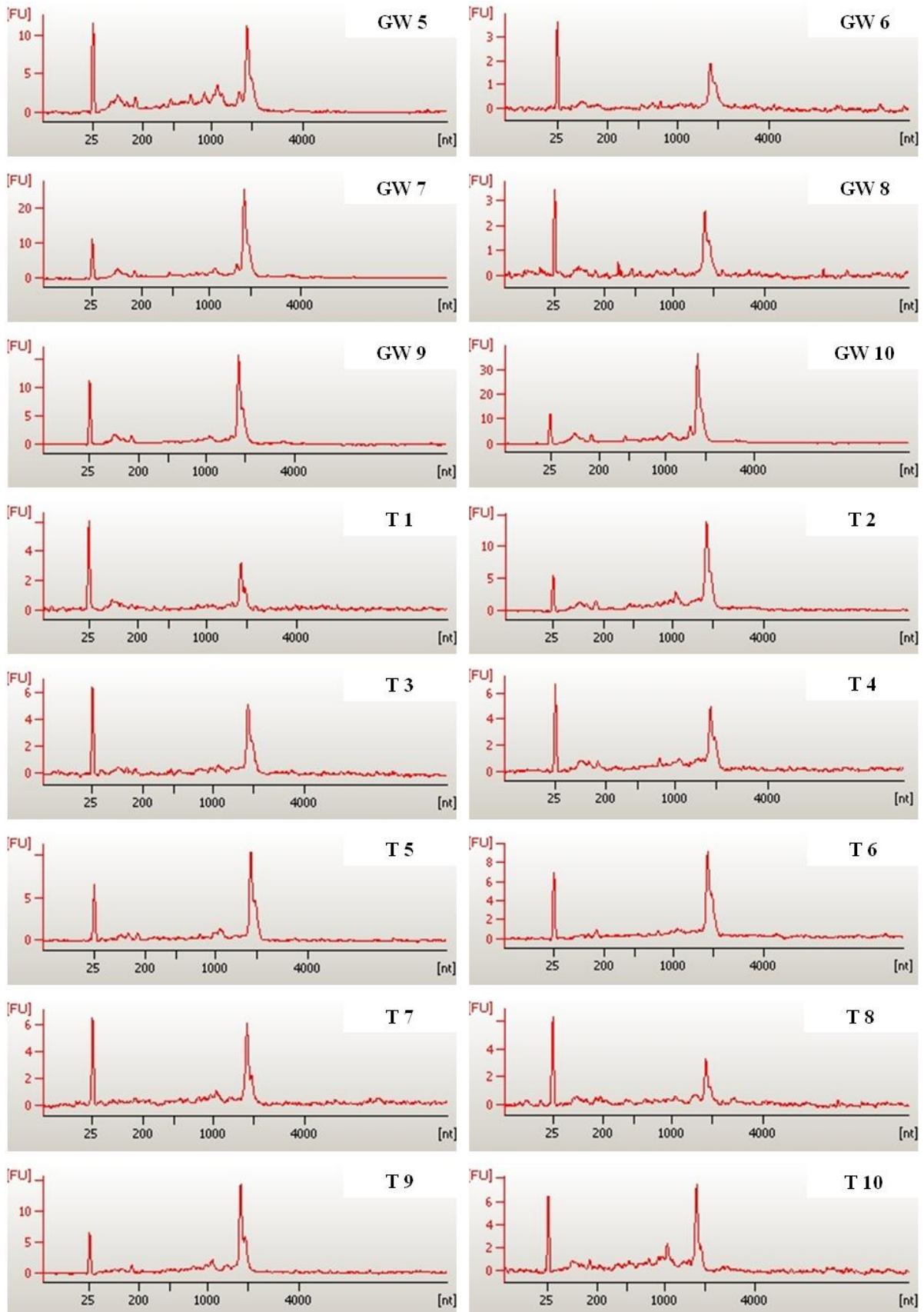


Abb. 63: Elektropherogramme der RNA von männlichen *Cimex lectularius* des GW- und T-Stamms für die mRNA-Expressionsanalyse ohne vorherige Hitzedenaturierung. GW (5-10) und T (1-10). Die Auswahl nicht degradiertes RNA erfolgte mittels visueller Inspektion, da durch einen sog. Hidden-Break in der 28S-Einheit der rRNA eine Berechnung der RIN unmöglich war. **FU**: Fluoreszenz Units; **nt**: Nukleotide.

8.3 mRNA-Expressionsanalyse der CYP- und Referenzgene

Tab. 14: mRNA-Expressionsanalyse von *cyp397a1*.

		<i>cyp397a1</i>								
Proben und Replikate		Relative Quantität	Relative Quantität SD	Relative Quantität SEM	Unskalierte Expression	Unskalierte Expression SD	Unskalierte Expression SEM	Cq MW	Cq SD	Cq SEM
REF*	12	1,000	0,077	0,022	1,000	0,090	0,026	30,580	0,111	0,032
UBA1	2	1,742	0,074	0,052	1,746	0,111	0,078	29,780	0,061	0,043
UBA2	2	0,930	0,027	0,019	1,964	0,078	0,055	30,690	0,042	0,030
UBA3	2	0,092	0,003	0,002	0,492	0,040	0,029	34,030	0,054	0,038
UBA4	2	0,201	0,005	0,003	0,706	0,058	0,041	32,900	0,035	0,024
UBA5	2	0,462	0,010	0,007	1,072	0,083	0,059	31,700	0,031	0,022
UBA6	2	0,440	0,022	0,016	0,960	0,124	0,088	31,770	0,072	0,051
UBA7	2	0,316	0,016	0,011	0,716	0,078	0,055	32,240	0,072	0,051
UBA8	2	1,097	0,118	0,083	2,903	0,396	0,280	30,450	0,155	0,109
UBA9	2	1,212	0,067	0,047	1,073	0,071	0,050	30,310	0,079	0,056
UBA10	2	1,728	0,026	0,018	0,920	0,032	0,023	29,790	0,021	0,015
AS1	2	36,489	4,470	3,161	16,119	2,080	1,470	25,390	0,177	0,125
AS2	2	33,940	0,632	0,447	24,498	3,119	2,205	25,500	0,027	0,019
AS3	2	3,026	0,127	0,089	3,662	0,446	0,315	28,990	0,060	0,043
AS4	2	8,185	0,534	0,377	3,290	0,233	0,165	27,550	0,094	0,067
AS5	2	19,374	0,366	0,259	15,456	0,589	0,417	26,310	0,027	0,019
AS6	2	50,654	4,987	3,526	13,543	1,585	1,121	24,920	0,142	0,100
AS7	2	4,898	0,137	0,097	2,314	0,112	0,079	28,290	0,040	0,028
AS8	2	19,422	0,813	0,575	14,449	1,186	0,839	26,300	0,060	0,043
AS9	2	41,366	0,256	0,181	16,496	0,813	0,575	25,210	0,009	0,006
AS10	2	87,559	2,177	1,540	64,944	3,435	2,429	24,130	0,036	0,025
CC1	2	8,133	0,879	0,621	7,812	0,859	0,607	27,560	0,156	0,110
CC2	2	1,149	0,007	0,005	2,396	0,100	0,071	30,380	0,009	0,006
CC3	2	2,559	0,040	0,029	5,484	0,402	0,284	29,230	0,023	0,016
CC4	2	12,086	0,482	0,341	10,938	0,754	0,533	26,990	0,058	0,041
CC5	2	0,913	0,080	0,056	2,130	0,236	0,167	30,710	0,126	0,089
CC6	2	2,637	0,070	0,049	2,613	0,187	0,132	29,180	0,038	0,027
CC7	2	4,113	0,561	0,397	4,067	0,563	0,398	28,540	0,197	0,139
CC8	2	0,811	0,112	0,079	0,705	0,097	0,069	30,890	0,199	0,141
CC9	2	14,179	0,824	0,583	10,900	0,723	0,511	26,760	0,084	0,059
CC10	2	1,756	0,045	0,032	1,499	0,044	0,031	29,770	0,037	0,026
GW1	2	72,497	0,559	0,395	48,703	2,711	1,917	24,400	0,011	0,008
GW2	2	30,209	3,796	2,684	76,246	12,429	8,789	25,670	0,181	0,128
GW3	2	21,730	2,130	1,506	95,348	10,979	7,764	26,140	0,141	0,100
GW4	2	125,097	2,059	1,456	76,258	2,533	1,791	23,620	0,024	0,017
GW5	2	13,218	0,545	0,385	72,026	3,337	2,359	26,860	0,059	0,042
GW6	2	8,574	0,565	0,400	28,195	2,020	1,428	27,480	0,095	0,067
GW7	2	42,400	3,542	2,505	34,431	3,014	2,131	25,180	0,121	0,085
GW8	2	16,854	0,963	0,681	33,017	2,394	1,693	26,510	0,082	0,058
GW9	2	46,967	0,337	0,239	71,541	10,072	7,122	25,030	0,010	0,007
GW10	2	19,024	0,427	0,302	24,103	1,214	0,858	26,330	0,032	0,023
HO1	2	11,716	0,009	0,006	11,713	0,410	0,290	27,030	0,001	0,001
HO2	2	5,086	0,499	0,353	8,826	0,932	0,659	28,240	0,142	0,100
HO3	2	2,542	0,194	0,137	6,660	0,583	0,412	29,240	0,110	0,078
HO4	2	0,501	0,051	0,036	3,771	0,458	0,324	31,580	0,146	0,103
HO5	2	1,021	0,091	0,064	4,757	0,474	0,335	30,550	0,128	0,091

Erläuterungen: REF*: Kalibrator; Cq: Quantifikationszyklus; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; SEM: Standardfehler.

Fortsetzung Tab. 14: mRNA-Expressionsanalyse von *cyp397a1*.

<i>cyp397a1</i>										
Proben und Replikate	Relative Quantität	Relative Quantität SD	Relative Quantität SEM	Unskalierte Expression	Unskalierte Expression SD	Unskalierte Expression SEM	Cq MW	Cq SD	Cq SEM	
HO6	2	0,563	0,044	0,031	4,354	0,357	0,253	31,410	0,113	0,080
HO7	2	1,772	0,180	0,127	9,139	1,117	0,790	29,760	0,147	0,104
HO8	2	2,022	0,273	0,193	9,500	1,338	0,946	29,570	0,195	0,138
HO9	2	1,995	0,129	0,091	6,108	1,116	0,789	29,590	0,093	0,066
HO10	2	2,715	0,090	0,064	6,152	0,233	0,164	29,140	0,048	0,034
LB1	2	8,118	0,486	0,344	8,952	0,633	0,447	27,560	0,086	0,061
LB2	2	0,695	0,039	0,027	0,407	0,025	0,018	31,110	0,081	0,057
LB3	2	12,795	0,903	0,639	6,855	0,646	0,457	26,910	0,102	0,072
LB4	2	2,057	0,012	0,008	1,656	0,149	0,105	29,540	0,008	0,006
LB5	2	2,205	0,121	0,085	2,459	0,236	0,167	29,440	0,079	0,056
LB6	2	1,851	0,051	0,036	2,360	0,108	0,076	29,700	0,039	0,028
LB7	2	6,895	0,262	0,185	15,054	1,984	1,403	27,800	0,055	0,039
LB8	2	3,878	0,214	0,151	4,683	0,304	0,215	28,630	0,080	0,056
LB9	2	2,862	0,114	0,081	2,352	0,129	0,091	29,070	0,058	0,041
LB10	2	5,298	0,158	0,111	6,436	0,302	0,213	28,180	0,043	0,030
OB1	2	5,579	0,104	0,073	6,772	0,359	0,254	28,100	0,027	0,019
OB2	2	0,275	0,016	0,011	2,806	0,282	0,200	32,450	0,082	0,058
OB3	2	0,301	0,001	0,001	3,955	0,158	0,112	32,320	0,004	0,003
OB4	2	0,272	0,004	0,003	4,151	0,314	0,222	32,460	0,020	0,014
OB5	2	1,644	0,286	0,202	10,664	2,025	1,432	29,870	0,251	0,178
OB6	2	9,154	1,032	0,730	9,707	1,271	0,899	27,390	0,163	0,115
OB7	2	1,288	0,022	0,016	1,897	0,222	0,157	30,220	0,025	0,018
OB8	2	0,898	0,024	0,017	1,366	0,052	0,037	30,740	0,038	0,027
OB9	2	1,018	0,012	0,008	5,105	0,472	0,333	30,560	0,016	0,012
OB10	2	2,175	0,278	0,196	6,461	0,901	0,637	29,460	0,184	0,130
SK1	2	1,718	0,240	0,170	3,155	0,459	0,325	29,800	0,202	0,143
SK2	2	8,988	0,415	0,293	51,099	3,057	2,162	27,420	0,067	0,047
SK3	2	7,665	0,715	0,506	7,655	0,902	0,638	27,650	0,135	0,095
SK4	2	23,720	0,745	0,527	12,158	0,479	0,339	26,020	0,045	0,032
SK5	2	3,983	0,020	0,014	6,503	0,169	0,120	28,590	0,007	0,005
SK6	2	4,820	0,496	0,351	9,257	1,105	0,781	28,310	0,148	0,105
SK7	2	75,570	3,260	2,305	47,550	2,978	2,106	24,340	0,062	0,044
SK8	2	8,280	0,249	0,176	6,395	0,283	0,200	27,530	0,043	0,031
SK9	2	9,492	1,056	0,746	12,987	1,588	1,123	27,340	0,160	0,113
SK10	2	10,595	0,818	0,578	16,219	1,322	0,935	27,180	0,111	0,079
T1	2	16,054	1,720	1,216	42,230	4,612	3,261	26,580	0,155	0,109
T2	2	21,198	0,397	0,281	46,659	1,233	0,872	26,180	0,027	0,019
T3	2	32,090	0,075	0,053	68,385	1,401	0,990	25,580	0,003	0,002
T4	2	10,642	1,151	0,814	18,847	2,181	1,542	27,170	0,156	0,110
T5	2	45,627	3,551	2,511	61,838	5,339	3,775	25,070	0,112	0,079
T6	2	65,878	12,771	9,030	72,673	14,985	10,596	24,540	0,280	0,198
T7	2	19,759	3,865	2,733	47,387	11,006	7,783	26,280	0,282	0,200
T8	2	5,297	0,432	0,305	21,861	1,818	1,286	28,180	0,118	0,083
T9	2	16,166	1,926	1,362	49,209	6,744	4,769	26,570	0,172	0,122
T10	2	6,579	0,387	0,274	19,703	1,286	0,909	27,870	0,085	0,060

Erläuterungen: Cq: Quantifikationszyklus; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; SEM: Standardfehler.

Tab. 15: mRNA-Expressionsanalyse von *cyp398a1*.

<i>cyp398a1</i>										
Proben und Replikate	Relative Quantität	Relative Quantität SD	Relative Quantität SEM	Unskalierte Expression	Unskalierte Expression SD	Unskalierte Expression SEM	Cq MW	Cq SD	Cq SEM	
REF*	11	1,000	0,036	0,011	1,000	0,059	0,018	28,990	0,051	0,015
UBA1	2	1,909	0,243	0,172	1,913	0,259	0,183	28,060	0,184	0,130
UBA2	2	1,667	0,082	0,058	3,521	0,198	0,140	28,250	0,071	0,050
UBA3	2	0,176	0,045	0,032	0,944	0,252	0,178	31,500	0,370	0,262
UBA4	2	0,311	0,010	0,007	1,095	0,094	0,066	30,680	0,048	0,034
UBA5	2	0,453	0,030	0,021	1,052	0,105	0,074	30,130	0,095	0,067
UBA6	2	0,461	0,034	0,024	1,007	0,141	0,100	30,110	0,106	0,075
UBA7	2	0,286	0,016	0,011	0,648	0,072	0,051	30,800	0,081	0,057
UBA8	2	0,765	0,058	0,041	2,023	0,229	0,162	29,380	0,109	0,077
UBA9	2	0,766	0,129	0,091	0,679	0,117	0,083	29,380	0,243	0,172
UBA10	2	1,651	0,013	0,009	0,879	0,029	0,021	28,270	0,012	0,008
AS1	2	1,962	0,147	0,104	0,867	0,074	0,052	28,020	0,108	0,076
AS2	2	0,610	0,029	0,020	0,440	0,059	0,042	29,700	0,068	0,048
AS3	2	1,319	0,003	0,002	1,596	0,183	0,129	28,590	0,003	0,002
AS4	2	1,506	0,053	0,038	0,605	0,027	0,019	28,400	0,051	0,036
AS5	2	2,710	0,246	0,174	2,162	0,209	0,148	27,550	0,131	0,093
AS6	2	1,482	0,216	0,152	0,396	0,063	0,044	28,420	0,210	0,148
AS7	2	1,319	0,163	0,115	0,623	0,081	0,057	28,590	0,178	0,126
AS8	2	1,734	0,013	0,009	1,290	0,092	0,065	28,200	0,011	0,008
AS9	2	3,708	0,117	0,083	1,479	0,086	0,061	27,100	0,045	0,032
AS10	2	4,350	0,211	0,149	3,227	0,217	0,153	26,870	0,070	0,049
CC1	2	0,180	0,013	0,009	0,173	0,013	0,009	31,470	0,106	0,075
CC2	2	0,304	0,026	0,018	0,633	0,060	0,043	30,710	0,123	0,087
CC3	2	0,121	0,003	0,002	0,260	0,020	0,014	32,040	0,035	0,025
CC4	2	0,381	0,010	0,007	0,345	0,021	0,015	30,380	0,039	0,027
CC5	2	0,247	0,001	0,001	0,576	0,039	0,028	31,010	0,007	0,005
CC6	2	0,419	0,059	0,042	0,416	0,064	0,046	30,250	0,202	0,143
CC7	2	0,492	0,008	0,006	0,487	0,014	0,010	30,010	0,024	0,017
CC8	2	0,450	0,001	0,000	0,391	0,001	0,001	30,140	0,002	0,001
CC9	2	0,739	0,080	0,056	0,568	0,064	0,045	29,430	0,155	0,110
CC10	2	1,666	0,233	0,165	1,422	0,200	0,141	28,260	0,202	0,143
GW1	2	2,687	0,273	0,193	1,805	0,209	0,148	27,570	0,147	0,104
GW2	2	1,289	0,085	0,060	3,254	0,401	0,283	28,630	0,096	0,068
GW3	2	1,312	0,152	0,107	5,755	0,752	0,532	28,600	0,167	0,118
GW4	2	1,880	0,111	0,078	1,146	0,075	0,053	28,080	0,085	0,060
GW5	2	0,897	0,003	0,002	4,891	0,105	0,074	29,150	0,005	0,003
GW6	2	0,519	0,056	0,039	1,707	0,189	0,134	29,940	0,154	0,109
GW7	2	1,318	0,069	0,049	1,070	0,063	0,044	28,590	0,075	0,053
GW8	2	0,764	0,041	0,029	1,497	0,104	0,074	29,380	0,077	0,055
GW9	2	2,117	0,015	0,011	3,225	0,454	0,321	27,910	0,010	0,007
GW10	2	0,813	0,065	0,046	1,030	0,094	0,067	29,290	0,115	0,081
HO1	2	1,783	0,153	0,108	1,782	0,166	0,117	28,160	0,124	0,088
HO2	2	0,777	0,006	0,004	1,349	0,054	0,038	29,360	0,012	0,008
HO3	2	0,600	0,005	0,004	1,573	0,069	0,049	29,730	0,012	0,009
HO4	2	0,234	0,001	0,001	1,757	0,118	0,083	31,090	0,007	0,005
HO5	2	0,323	0,004	0,003	1,503	0,070	0,049	30,620	0,016	0,011

Erläuterungen: REF*: Kalibrator; Cq: Quantifikationszyklus; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; SEM: Standardfehler.

Fortsetzung Tab. 15: mRNA-Expressionsanalyse von *cyp398a1*.

<i>cyp398a1</i>										
Proben und Replikate	Relative Quantität	Relative Quantität SD	Relative Quantität SEM	Unskalierte Expression	Unskalierte Expression SD	Unskalierte Expression SEM	Cq MW	Cq SD	Cq SEM	
HO6	2	0,232	0,016	0,011	1,796	0,132	0,093	31,100	0,100	0,070
HO7	2	0,370	0,025	0,017	1,907	0,181	0,128	30,430	0,096	0,068
HO8	2	0,410	0,020	0,014	1,927	0,123	0,087	30,280	0,071	0,050
HO9	2	0,725	0,054	0,038	2,220	0,414	0,293	29,460	0,108	0,076
HO10	2	0,765	0,013	0,009	1,734	0,043	0,030	29,380	0,025	0,018
LB1	2	4,427	0,342	0,242	4,882	0,419	0,296	26,850	0,111	0,079
LB2	2	0,658	0,119	0,084	0,386	0,070	0,050	29,600	0,261	0,184
LB3	2	0,909	0,017	0,012	0,487	0,032	0,022	29,130	0,027	0,019
LB4	2	1,006	0,013	0,009	0,810	0,073	0,052	28,980	0,019	0,014
LB5	2	1,637	0,090	0,064	1,825	0,175	0,124	28,280	0,080	0,056
LB6	2	0,730	0,032	0,022	0,930	0,053	0,037	29,450	0,063	0,044
LB7	2	0,517	0,033	0,024	1,130	0,160	0,113	29,940	0,093	0,066
LB8	2	0,614	0,035	0,025	0,741	0,049	0,035	29,700	0,082	0,058
LB9	2	0,558	0,018	0,013	0,458	0,023	0,016	29,830	0,046	0,032
LB10	2	1,610	0,162	0,114	1,956	0,209	0,148	28,300	0,145	0,102
OB1	2	0,792	0,062	0,044	0,961	0,089	0,063	29,330	0,113	0,080
OB2	2	0,099	0,002	0,001	1,013	0,086	0,061	32,320	0,027	0,019
OB3	2	0,072	0,031	0,022	0,941	0,406	0,287	32,800	0,620	0,438
OB4	2	0,115	0,008	0,005	1,748	0,174	0,123	32,120	0,096	0,068
OB5	2	0,167	0,021	0,015	1,086	0,160	0,113	31,570	0,183	0,129
OB6	2	1,584	0,023	0,016	1,679	0,114	0,081	28,330	0,021	0,015
OB7	2	1,039	0,039	0,028	1,530	0,186	0,132	28,940	0,055	0,039
OB8	2	0,519	0,013	0,009	0,789	0,029	0,021	29,940	0,036	0,025
OB9	2	0,096	0,011	0,008	0,482	0,072	0,051	32,370	0,170	0,120
OB10	2	0,566	0,082	0,058	1,682	0,262	0,185	29,810	0,210	0,148
SK1	2	0,424	0,029	0,020	0,779	0,061	0,043	30,230	0,097	0,069
SK2	2	0,500	0,040	0,028	2,845	0,253	0,179	29,990	0,116	0,082
SK3	2	1,179	0,108	0,076	1,177	0,137	0,097	28,750	0,132	0,093
SK4	2	1,404	0,131	0,093	0,720	0,069	0,049	28,500	0,135	0,095
SK5	2	0,612	0,001	0,001	1,000	0,026	0,018	29,700	0,003	0,002
SK6	2	1,765	0,180	0,127	3,389	0,401	0,284	28,170	0,147	0,104
SK7	2	1,609	0,110	0,078	1,012	0,083	0,059	28,310	0,099	0,070
SK8	2	2,511	0,232	0,164	1,940	0,190	0,134	27,660	0,133	0,094
SK9	2	0,995	0,034	0,024	1,362	0,083	0,059	29,000	0,049	0,035
SK10	2	3,629	0,382	0,270	5,556	0,603	0,426	27,130	0,152	0,107
T1	2	2,643	0,009	0,006	6,953	0,148	0,105	27,590	0,005	0,003
T2	2	2,053	0,007	0,005	4,518	0,086	0,061	27,950	0,005	0,004
T3	2	2,106	0,121	0,086	4,488	0,274	0,194	27,920	0,083	0,059
T4	2	1,628	0,052	0,037	2,883	0,150	0,106	28,290	0,046	0,033
T5	2	3,691	0,112	0,079	5,003	0,241	0,170	27,110	0,044	0,031
T6	2	2,929	0,258	0,182	3,231	0,364	0,257	27,440	0,127	0,090
T7	2	1,651	0,190	0,135	3,960	0,674	0,477	28,270	0,166	0,118
T8	2	1,852	0,172	0,122	7,643	0,721	0,510	28,100	0,134	0,095
T9	2	2,604	0,469	0,332	7,928	1,525	1,078	27,610	0,260	0,184
T10	2	0,938	0,038	0,027	2,808	0,138	0,098	29,080	0,058	0,041

Erläuterungen: Cq: Quantifikationszyklus; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; SEM: Standardfehler.

Tab. 16: mRNA-Expressionsanalyse von *cyp4cm1*.

Proben und Replikate	Relative Quantität	<i>cyp4cm1</i>								
		Relative Quantität SD	Relative Quantität SEM	Unskalierte Expression	Unskalierte Expression SD	Unskalierte Expression SEM	Cq MW	Cq SD	Cq SEM	
REF*	14	1,000	0,067	0,018	1,000	0,082	0,022	32,020	0,097	0,026
UBA1	2	1,658	0,087	0,062	1,661	0,117	0,083	31,290	0,076	0,054
UBA2	2	1,357	0,094	0,067	2,867	0,213	0,151	31,580	0,100	0,071
UBA3	2	0,073	0,004	0,002	0,392	0,034	0,024	35,800	0,069	0,049
UBA4	2	0,066	0,005	0,003	0,232	0,025	0,017	35,950	0,102	0,072
UBA5	2	0,142	0,028	0,020	0,330	0,070	0,049	34,840	0,285	0,202
UBA6	2	0,264	0,013	0,009	0,575	0,074	0,052	33,950	0,069	0,049
UBA7	2	0,803	0,023	0,016	1,818	0,183	0,129	32,340	0,041	0,029
UBA8	2	0,364	0,088	0,062	0,964	0,246	0,174	33,480	0,347	0,245
UBA9	2	0,971	0,127	0,090	0,860	0,117	0,083	32,070	0,189	0,133
UBA10	2	1,917	0,426	0,301	1,021	0,229	0,162	31,090	0,321	0,227
AS1	2	1,230	0,043	0,030	0,543	0,029	0,020	31,730	0,050	0,035
AS2	2	1,023	0,026	0,018	0,738	0,095	0,067	31,990	0,036	0,026
AS3	2	0,241	0,001	0,001	0,292	0,033	0,024	34,080	0,007	0,005
AS4	2	1,352	0,041	0,029	0,544	0,022	0,016	31,590	0,044	0,031
AS5	2	0,914	0,173	0,122	0,729	0,140	0,099	32,150	0,273	0,193
AS6	2	1,784	0,185	0,131	0,477	0,058	0,041	31,190	0,150	0,106
AS7	2	0,988	0,060	0,042	0,467	0,034	0,024	32,040	0,088	0,062
AS8	2	3,088	0,281	0,199	2,297	0,265	0,187	30,400	0,131	0,093
AS9	2	3,070	0,047	0,033	1,224	0,063	0,044	30,410	0,022	0,015
AS10	2	5,370	0,874	0,618	3,983	0,675	0,477	29,600	0,235	0,166
CC1	2	0,434	0,060	0,043	0,417	0,058	0,041	33,230	0,200	0,141
CC2	0	0,000	0,000	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0,000	N.A.
CC3	2	0,019	0,002	0,001	0,040	0,005	0,004	37,770	0,153	0,108
CC4	2	0,416	0,044	0,031	0,376	0,045	0,032	33,290	0,152	0,108
CC5	2	0,168	0,011	0,008	0,391	0,037	0,026	34,600	0,094	0,066
CC6	2	0,843	0,059	0,042	0,836	0,080	0,057	32,270	0,101	0,071
CC7	2	0,420	0,041	0,029	0,416	0,041	0,029	33,270	0,139	0,098
CC8	2	0,453	0,003	0,002	0,393	0,003	0,002	33,170	0,011	0,008
CC9	2	0,808	0,098	0,070	0,621	0,078	0,055	32,330	0,175	0,124
CC10	2	1,664	0,156	0,110	1,421	0,134	0,095	31,290	0,135	0,095
GW1	2	3,008	0,101	0,072	2,021	0,130	0,092	30,440	0,049	0,034
GW2	2	1,369	0,053	0,038	3,455	0,383	0,271	31,570	0,056	0,040
GW3	2	0,145	0,006	0,004	0,638	0,046	0,033	34,810	0,058	0,041
GW4	2	3,118	0,391	0,277	1,901	0,245	0,173	30,380	0,181	0,128
GW5	2	0,647	0,043	0,030	3,525	0,246	0,174	32,650	0,096	0,068
GW6	2	0,731	0,018	0,013	2,405	0,091	0,064	32,480	0,036	0,026
GW7	2	0,793	0,034	0,024	0,644	0,032	0,023	32,360	0,062	0,044
GW8	2	1,340	0,043	0,030	2,625	0,144	0,102	31,600	0,046	0,033
GW9	2	4,576	0,228	0,161	6,970	1,040	0,735	29,830	0,072	0,051
GW10	2	0,131	0,022	0,016	0,166	0,029	0,020	34,960	0,242	0,171
HO1	2	2,113	0,304	0,215	2,112	0,313	0,221	30,950	0,208	0,147
HO2	2	0,227	0,073	0,051	0,393	0,127	0,090	34,170	0,462	0,327
HO3	2	0,361	0,006	0,005	0,945	0,044	0,031	33,490	0,026	0,018
HO4	2	0,106	0,012	0,009	0,796	0,105	0,075	35,260	0,165	0,117
HO5	2	0,088	0,004	0,003	0,412	0,025	0,018	35,520	0,060	0,043

Erläuterungen: REF*: Kalibrator; Cq: Quantifikationszyklus; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; SEM: Standardfehler.

Fortsetzung Tab. 16: mRNA-Expressionsanalyse von *cyp4cm1*.

<i>cyp4cm1</i>										
Proben und Replikate	Relative Quantität	Relative Quantität SD	Relative Quantität SEM	Unskalierte Expression	Unskalierte Expression SD	Unskalierte Expression SEM	Cq MW	Cq SD	Cq SEM	
HO6	2	0,075	0,005	0,003	0,581	0,039	0,027	35,760	0,089	0,063
HO7	2	0,103	0,002	0,001	0,529	0,037	0,026	35,310	0,026	0,018
HO8	2	0,266	0,048	0,034	1,250	0,233	0,165	33,930	0,262	0,186
HO9	2	0,209	0,055	0,039	0,640	0,200	0,141	34,280	0,378	0,267
HO10	2	0,288	0,110	0,078	0,653	0,249	0,176	33,820	0,549	0,388
LB1	2	0,858	0,006	0,004	0,947	0,036	0,025	32,240	0,009	0,007
LB2	2	0,255	0,016	0,011	0,149	0,010	0,007	34,000	0,088	0,062
LB3	2	0,419	0,079	0,056	0,225	0,045	0,032	33,280	0,273	0,193
LB4	2	0,581	0,034	0,024	0,468	0,050	0,035	32,810	0,083	0,059
LB5	2	0,711	0,006	0,004	0,792	0,063	0,044	32,520	0,011	0,008
LB6	2	0,507	0,007	0,005	0,647	0,025	0,018	33,000	0,019	0,014
LB7	2	0,375	0,030	0,021	0,818	0,122	0,086	33,440	0,114	0,080
LB8	2	0,209	0,024	0,017	0,252	0,031	0,022	34,280	0,169	0,120
LB9	2	0,312	0,046	0,033	0,256	0,039	0,028	33,700	0,214	0,151
LB10	2	1,192	0,102	0,072	1,448	0,135	0,095	31,770	0,124	0,087
OB1	2	0,421	0,010	0,007	0,511	0,028	0,020	33,270	0,035	0,025
OB2	2	0,099	0,004	0,003	1,005	0,094	0,066	35,370	0,062	0,044
OB3	2	0,190	0,016	0,011	2,503	0,233	0,165	34,420	0,122	0,086
OB4	2	0,027	0,001	0,001	0,416	0,038	0,027	37,220	0,075	0,053
OB5	2	0,101	0,009	0,006	0,656	0,076	0,054	35,330	0,127	0,090
OB6	2	1,048	0,012	0,009	1,112	0,075	0,053	31,960	0,017	0,012
OB7	2	0,827	0,026	0,018	1,217	0,146	0,103	32,300	0,045	0,031
OB8	2	0,429	0,010	0,007	0,652	0,024	0,017	33,250	0,034	0,024
OB9	2	0,058	0,009	0,006	0,290	0,053	0,038	36,140	0,229	0,162
OB10	2	0,260	0,016	0,012	0,774	0,065	0,046	33,960	0,091	0,064
SK1	2	0,214	0,070	0,049	0,393	0,129	0,091	34,250	0,469	0,332
SK2	2	0,115	0,060	0,043	0,655	0,344	0,243	35,140	0,755	0,534
SK3	2	0,875	0,185	0,131	0,874	0,195	0,138	32,220	0,305	0,216
SK4	2	1,045	0,070	0,049	0,536	0,038	0,027	31,960	0,096	0,068
SK5	2	0,318	0,028	0,020	0,519	0,047	0,033	33,680	0,126	0,089
SK6	2	2,206	0,181	0,128	4,237	0,432	0,305	30,880	0,119	0,084
SK7	2	6,256	0,397	0,280	3,936	0,307	0,217	29,380	0,091	0,065
SK8	2	1,742	0,213	0,150	1,346	0,170	0,120	31,220	0,176	0,125
SK9	2	0,537	0,016	0,012	0,735	0,044	0,031	32,920	0,044	0,031
SK10	2	7,559	0,736	0,521	11,572	1,167	0,825	29,110	0,141	0,099
T1	2	1,034	0,003	0,002	2,721	0,058	0,041	31,980	0,004	0,003
T2	2	0,386	0,000	0,000	0,849	0,016	0,011	33,400	0,000	0,000
T3	2	0,600	0,045	0,032	1,278	0,100	0,071	32,760	0,109	0,077
T4	2	0,850	0,077	0,055	1,506	0,150	0,106	32,260	0,131	0,093
T5	2	2,119	0,196	0,138	2,872	0,286	0,202	30,940	0,133	0,094
T6	2	1,698	0,260	0,184	1,873	0,316	0,223	31,260	0,221	0,156
T7	2	0,557	0,059	0,042	1,337	0,220	0,155	32,870	0,153	0,108
T8	2	0,148	0,018	0,013	0,610	0,076	0,053	34,780	0,177	0,125
T9	2	0,573	0,038	0,027	1,743	0,165	0,117	32,830	0,096	0,068
T10	2	0,349	0,028	0,020	1,044	0,089	0,063	33,540	0,116	0,082

Erläuterungen: Cq: Quantifikationszyklus; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; SEM: Standardfehler.

Tab. 17: mRNA-Expressionsanalyse von *cyp6dn1*.

Proben und Replikate		<i>cyp6dn1</i>								
		Relative Quantität	Relative Quantität SD	Relative Quantität SEM	Unskalierte Expression	Unskalierte Expression SD	Unskalierte Expression SEM	Cq MW	Cq SD	Cq SEM
REF*	12	1,000	0,041	0,012	1,000	0,063	0,018	22,920	0,060	0,017
UBA1	2	0,698	0,025	0,017	0,699	0,041	0,029	23,440	0,051	0,036
UBA2	2	0,269	0,116	0,082	0,568	0,245	0,173	24,810	0,622	0,440
UBA3	2	0,045	0,000	0,000	0,239	0,017	0,012	27,410	0,005	0,004
UBA4	2	0,310	0,063	0,045	1,091	0,239	0,169	24,610	0,294	0,208
UBA5	2	0,588	0,096	0,068	1,364	0,246	0,174	23,680	0,237	0,167
UBA6	2	0,581	0,053	0,038	1,267	0,191	0,135	23,700	0,132	0,093
UBA7	2	0,912	0,154	0,109	2,063	0,401	0,283	23,050	0,243	0,172
UBA8	2	0,431	0,053	0,038	1,141	0,171	0,121	24,130	0,178	0,126
UBA9	2	1,580	0,108	0,077	1,400	0,109	0,077	22,260	0,099	0,070
UBA10	2	3,114	0,091	0,064	1,659	0,072	0,051	21,280	0,042	0,030
AS1	2	3,740	0,233	0,165	1,652	0,123	0,087	21,010	0,090	0,064
AS2	2	3,894	0,187	0,132	2,811	0,379	0,268	20,950	0,069	0,049
AS3	2	0,832	0,007	0,005	1,007	0,115	0,082	23,180	0,011	0,008
AS4	2	2,619	0,068	0,048	1,053	0,040	0,028	21,530	0,037	0,026
AS5	2	2,588	0,037	0,026	2,065	0,075	0,053	21,540	0,021	0,015
AS6	2	3,438	0,025	0,017	0,919	0,059	0,041	21,130	0,010	0,007
AS7	2	3,263	0,003	0,002	1,541	0,061	0,043	21,210	0,001	0,001
AS8	2	3,131	0,041	0,029	2,330	0,167	0,118	21,270	0,019	0,013
AS9	2	8,352	0,059	0,042	3,330	0,164	0,116	19,850	0,010	0,007
AS10	2	5,368	0,148	0,104	3,982	0,216	0,153	20,490	0,040	0,028
CC1	2	1,082	0,022	0,016	1,039	0,030	0,021	22,800	0,030	0,021
CC2	2	0,847	0,024	0,017	1,766	0,088	0,062	23,160	0,040	0,028
CC3	2	0,242	0,006	0,004	0,519	0,039	0,028	24,960	0,037	0,026
CC4	2	1,275	0,012	0,008	1,154	0,066	0,046	22,570	0,013	0,010
CC5	2	0,276	0,006	0,004	0,643	0,046	0,032	24,780	0,031	0,022
CC6	2	2,545	0,122	0,086	2,522	0,206	0,146	21,570	0,069	0,049
CC7	2	1,287	0,047	0,033	1,273	0,055	0,039	22,550	0,053	0,037
CC8	2	1,367	0,031	0,022	1,187	0,027	0,019	22,470	0,033	0,023
CC9	2	1,765	0,022	0,015	1,357	0,046	0,033	22,100	0,018	0,013
CC10	2	1,628	0,053	0,038	1,390	0,050	0,035	22,210	0,047	0,034
GW1	2	4,781	0,496	0,351	3,212	0,377	0,267	20,660	0,150	0,106
GW2	2	1,372	0,137	0,097	3,462	0,498	0,352	22,460	0,144	0,102
GW3	2	1,219	0,019	0,014	5,350	0,334	0,236	22,630	0,023	0,016
GW4	2	3,355	0,184	0,130	2,045	0,127	0,090	21,170	0,079	0,056
GW5	2	0,084	0,002	0,001	0,456	0,013	0,009	26,490	0,027	0,019
GW6	2	0,224	0,002	0,002	0,736	0,022	0,015	25,080	0,014	0,010
GW7	2	2,819	0,212	0,150	2,289	0,182	0,129	21,420	0,109	0,077
GW8	2	1,135	0,048	0,034	2,223	0,136	0,097	22,730	0,061	0,043
GW9	2	1,752	0,432	0,306	2,669	0,758	0,536	22,110	0,356	0,252
GW10	2	0,648	0,012	0,008	0,822	0,040	0,028	23,540	0,026	0,019
HO1	2	1,129	0,063	0,044	1,129	0,074	0,052	22,740	0,080	0,057
HO2	2	0,661	0,040	0,028	1,147	0,082	0,058	23,510	0,087	0,061
HO3	2	0,392	0,038	0,027	1,027	0,109	0,077	24,270	0,140	0,099
HO4	2	0,238	0,019	0,013	1,791	0,187	0,132	24,990	0,116	0,082
HO5	2	0,370	0,023	0,016	1,723	0,131	0,092	24,350	0,088	0,062

Erläuterungen: REF*: Kalibrator; Cq: Quantifikationszyklus; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; SEM: Standardfehler.

Fortsetzung Tab. 17: mRNA-Expressionsanalyse von *cyp6dn1*.

<i>cyp6dn1</i>										
Proben und Replikate	Relative Quantität	Relative Quantität SD	Relative Quantität SEM	Unskalierte Expression	Unskalierte Expression SD	Unskalierte Expression SEM	Cq MW	Cq SD	Cq SEM	
HO6	2	0,133	0,005	0,004	1,028	0,047	0,033	25,830	0,056	0,039
HO7	2	0,206	0,023	0,016	1,062	0,139	0,098	25,200	0,161	0,114
HO8	2	0,207	0,009	0,007	0,971	0,059	0,042	25,190	0,066	0,046
HO9	2	0,238	0,020	0,014	0,729	0,139	0,098	24,990	0,122	0,087
HO10	2	0,313	0,011	0,008	0,709	0,028	0,020	24,590	0,052	0,037
LB1	2	0,276	0,026	0,019	0,304	0,031	0,022	24,770	0,137	0,097
LB2	2	0,404	0,014	0,010	0,237	0,010	0,007	24,220	0,049	0,035
LB3	2	0,365	0,027	0,019	0,196	0,019	0,013	24,370	0,106	0,075
LB4	2	0,413	0,017	0,012	0,332	0,033	0,023	24,190	0,061	0,043
LB5	2	0,132	0,002	0,001	0,148	0,012	0,008	25,830	0,018	0,013
LB6	2	0,175	0,000	0,000	0,223	0,008	0,006	25,430	0,002	0,001
LB7	2	0,327	0,038	0,027	0,714	0,122	0,087	24,530	0,167	0,118
LB8	2	0,650	0,039	0,028	0,785	0,054	0,038	23,540	0,087	0,061
LB9	2	0,608	0,047	0,033	0,500	0,043	0,031	23,630	0,112	0,079
LB10	2	1,234	0,035	0,025	1,499	0,069	0,049	22,610	0,041	0,029
OB1	2	0,699	0,039	0,027	0,848	0,063	0,045	23,430	0,080	0,057
OB2	2	0,023	0,001	0,001	0,236	0,021	0,015	28,350	0,049	0,035
OB3	2	0,085	0,012	0,008	1,119	0,161	0,114	26,470	0,199	0,141
OB4	2	0,012	0,000	0,000	0,176	0,013	0,009	29,350	0,014	0,010
OB5	2	0,068	0,013	0,009	0,442	0,091	0,065	26,790	0,277	0,196
OB6	2	0,295	0,004	0,003	0,313	0,021	0,015	24,680	0,021	0,015
OB7	4	0,255	0,066	0,033	0,375	0,106	0,053	24,890	0,373	0,186
OB9	2	0,091	0,003	0,002	0,457	0,044	0,031	26,370	0,040	0,028
OB10	2	0,288	0,013	0,009	0,857	0,061	0,043	24,710	0,064	0,045
SK1	2	1,188	0,020	0,014	2,183	0,096	0,068	22,670	0,024	0,017
SK2	2	0,247	0,013	0,009	1,404	0,089	0,063	24,930	0,073	0,052
SK3	2	1,722	0,215	0,152	1,720	0,248	0,175	22,130	0,180	0,127
SK4	2	0,414	0,029	0,020	0,212	0,016	0,011	24,190	0,100	0,071
SK5	2	0,319	0,005	0,004	0,520	0,016	0,011	24,570	0,023	0,017
SK6	2	0,136	0,003	0,002	0,261	0,017	0,012	25,800	0,028	0,020
SK7	2	0,721	0,014	0,010	0,453	0,022	0,016	23,390	0,028	0,020
SK8	2	0,482	0,007	0,005	0,372	0,013	0,009	23,970	0,022	0,016
SK9	2	0,379	0,006	0,004	0,518	0,028	0,019	24,320	0,022	0,015
SK10	2	0,575	0,028	0,020	0,880	0,049	0,035	23,710	0,071	0,050
T1	2	0,712	0,009	0,006	1,873	0,046	0,033	23,410	0,018	0,013
T2	2	0,333	0,009	0,007	0,734	0,024	0,017	24,500	0,040	0,028
T3	2	0,334	0,017	0,012	0,711	0,039	0,027	24,500	0,073	0,051
T4	2	2,271	0,000	0,000	4,021	0,165	0,117	21,730	0,000	0,000
T5	2	1,244	0,061	0,043	1,686	0,104	0,073	22,600	0,070	0,050
T6	2	0,920	0,007	0,005	1,015	0,072	0,051	23,040	0,010	0,007
T7	2	0,601	0,041	0,029	1,443	0,206	0,146	23,650	0,099	0,070
T8	2	0,291	0,020	0,014	1,199	0,083	0,059	24,700	0,097	0,069
T9	2	0,643	0,031	0,022	1,957	0,163	0,115	23,550	0,070	0,049
T10	2	0,168	0,005	0,003	0,503	0,020	0,014	25,490	0,039	0,028

Erläuterungen: Cq: Quantifikationszyklus; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; SEM: Standardfehler.

Tab. 18: mRNA-Expressionsanalyse von *rpl11*.

Proben und Replikate		<i>rpl11</i>								
		Relative Quantität	Relative Quantität SD	Relative Quantität SEM	Unskalierte Expression	Unskalierte Expression SD	Unskalierte Expression SEM	Cq MW	Cq SD	Cq SEM
REF*	10	1,000	0,073	0,023	n.a.	n.a.	n.a.	34,760	0,105	0,033
UBA1	2	1,219	0,107	0,075	n.a.	n.a.	n.a.	34,480	0,126	0,089
UBA2	2	0,539	0,009	0,006	n.a.	n.a.	n.a.	35,650	0,024	0,017
UBA3	2	0,182	0,036	0,025	n.a.	n.a.	n.a.	37,220	0,284	0,201
UBA4	2	0,269	0,016	0,011	n.a.	n.a.	n.a.	36,660	0,086	0,061
UBA5	2	0,411	0,028	0,020	n.a.	n.a.	n.a.	36,050	0,099	0,070
UBA6	2	0,442	0,099	0,070	n.a.	n.a.	n.a.	35,940	0,323	0,228
UBA7	2	0,320	0,048	0,034	n.a.	n.a.	n.a.	36,410	0,218	0,154
UBA8	2	0,386	0,006	0,005	n.a.	n.a.	n.a.	36,140	0,024	0,017
UBA9	2	0,872	0,041	0,029	n.a.	n.a.	n.a.	34,960	0,068	0,048
UBA10	2	2,652	0,133	0,094	n.a.	n.a.	n.a.	33,360	0,072	0,051
AS1	2	2,188	0,003	0,002	n.a.	n.a.	n.a.	33,630	0,002	0,002
AS2	2	1,064	0,312	0,220	n.a.	n.a.	n.a.	34,680	0,423	0,299
AS3	2	0,627	0,200	0,141	n.a.	n.a.	n.a.	35,440	0,459	0,324
AS4	2	2,338	0,054	0,038	n.a.	n.a.	n.a.	33,540	0,033	0,023
AS5	2	1,264	0,095	0,067	n.a.	n.a.	n.a.	34,430	0,108	0,076
AS6	2	2,909	0,494	0,350	n.a.	n.a.	n.a.	33,220	0,245	0,173
AS7	2	2,014	0,208	0,147	n.a.	n.a.	n.a.	33,750	0,149	0,105
AS8	2	1,295	0,249	0,176	n.a.	n.a.	n.a.	34,390	0,278	0,196
AS9	2	1,810	0,128	0,090	n.a.	n.a.	n.a.	33,910	0,102	0,072
AS10	2	1,200	0,148	0,105	n.a.	n.a.	n.a.	34,500	0,178	0,126
CC1	2	1,448	0,014	0,010	n.a.	n.a.	n.a.	34,230	0,014	0,010
CC2	2	0,754	0,039	0,028	n.a.	n.a.	n.a.	35,170	0,075	0,053
CC3	2	0,457	0,059	0,042	n.a.	n.a.	n.a.	35,890	0,186	0,131
CC4	2	1,409	0,117	0,083	n.a.	n.a.	n.a.	34,270	0,119	0,084
CC5	2	0,474	0,050	0,035	n.a.	n.a.	n.a.	35,840	0,151	0,107
CC6	2	1,297	0,084	0,059	n.a.	n.a.	n.a.	34,390	0,094	0,066
CC7	2	1,212	0,021	0,015	n.a.	n.a.	n.a.	34,490	0,025	0,018
CC8	2	1,501	0,005	0,004	n.a.	n.a.	n.a.	34,180	0,005	0,003
CC9	2	2,036	0,174	0,123	n.a.	n.a.	n.a.	33,740	0,123	0,087
CC10	2	1,294	0,022	0,015	n.a.	n.a.	n.a.	34,390	0,024	0,017
GW1	2	1,843	0,215	0,152	n.a.	n.a.	n.a.	33,880	0,168	0,119
GW2	2	0,405	0,046	0,032	n.a.	n.a.	n.a.	36,070	0,164	0,116
GW3	2	0,208	0,005	0,003	n.a.	n.a.	n.a.	37,030	0,031	0,022
GW4	2	2,336	0,053	0,037	n.a.	n.a.	n.a.	33,540	0,033	0,023
GW5	2	0,175	0,009	0,006	n.a.	n.a.	n.a.	37,280	0,075	0,053
GW6	2	0,458	0,009	0,007	n.a.	n.a.	n.a.	35,890	0,029	0,021
GW7	2	1,720	0,126	0,089	n.a.	n.a.	n.a.	33,980	0,106	0,075
GW8	2	0,851	0,088	0,062	n.a.	n.a.	n.a.	35,000	0,149	0,105
GW9	2	0,662	0,255	0,181	n.a.	n.a.	n.a.	35,360	0,556	0,393
GW10	2	0,808	0,102	0,072	n.a.	n.a.	n.a.	35,070	0,181	0,128
HO1	2	1,011	0,098	0,070	n.a.	n.a.	n.a.	34,750	0,140	0,099
HO2	2	0,514	0,039	0,028	n.a.	n.a.	n.a.	35,720	0,111	0,078
HO3	2	0,350	0,024	0,017	n.a.	n.a.	n.a.	36,280	0,098	0,069
HO4	2	0,087	0,004	0,003	n.a.	n.a.	n.a.	38,280	0,066	0,047
HO5	2	0,169	0,007	0,005	n.a.	n.a.	n.a.	37,330	0,058	0,041

Erläuterungen: REF*: Kalibrator; Cq: Quantifikationszyklus; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; SEM: Standardfehler.

Fortsetzung Tab. 18: mRNA-Expressionsanalyse von *rpl11*

<i>rpl11</i>										
Proben und Replikate	Relative Quantität	Relative Quantität SD	Relative Quantität SEM	Unskalierte Expression	Unskalierte Expression SD	Unskalierte Expression SEM	Cq MW	Cq SD	Cq SEM	
HO6	2	0,086	0,006	0,004	n.a.	n.a.	n.a.	38,300	0,094	0,067
HO7	2	0,171	0,034	0,024	n.a.	n.a.	n.a.	37,310	0,285	0,201
HO8	2	0,187	0,017	0,012	n.a.	n.a.	n.a.	37,180	0,128	0,091
HO9	2	0,301	0,098	0,069	n.a.	n.a.	n.a.	36,500	0,470	0,333
HO10	2	0,399	0,009	0,006	n.a.	n.a.	n.a.	36,090	0,031	0,022
LB1	2	0,915	0,084	0,059	n.a.	n.a.	n.a.	34,890	0,132	0,093
LB2	2	2,724	0,145	0,103	n.a.	n.a.	n.a.	33,320	0,077	0,054
LB3	2	2,002	0,252	0,178	n.a.	n.a.	n.a.	33,760	0,182	0,128
LB4	2	1,441	0,142	0,100	n.a.	n.a.	n.a.	34,240	0,142	0,100
LB5	2	0,764	0,176	0,124	n.a.	n.a.	n.a.	35,150	0,332	0,235
LB6	2	0,649	0,021	0,015	n.a.	n.a.	n.a.	35,390	0,046	0,033
LB7	2	0,483	0,042	0,030	n.a.	n.a.	n.a.	35,810	0,126	0,089
LB8	2	1,187	0,102	0,072	n.a.	n.a.	n.a.	34,520	0,124	0,088
LB9	2	1,369	0,149	0,105	n.a.	n.a.	n.a.	34,310	0,157	0,111
LB10	2	0,894	0,002	0,001	n.a.	n.a.	n.a.	34,930	0,003	0,002
OB1	2	0,899	0,130	0,092	n.a.	n.a.	n.a.	34,920	0,209	0,148
OB2	2	0,069	0,015	0,011	n.a.	n.a.	n.a.	38,610	0,321	0,227
OB3	2	0,023	0,000	0,000	n.a.	n.a.	n.a.	40,200	0,022	0,016
OB4	2	0,048	0,007	0,005	n.a.	n.a.	n.a.	39,160	0,197	0,140
OB5	2	0,085	0,019	0,013	n.a.	n.a.	n.a.	38,320	0,324	0,229
OB6	2	1,020	0,201	0,142	n.a.	n.a.	n.a.	34,740	0,284	0,201
OB7	2	0,481	0,160	0,113	n.a.	n.a.	n.a.	35,820	0,480	0,340
OB8	2	0,637	0,047	0,033	n.a.	n.a.	n.a.	35,410	0,106	0,075
OB9	2	0,140	0,038	0,027	n.a.	n.a.	n.a.	37,600	0,392	0,277
OB10	2	0,301	0,033	0,024	n.a.	n.a.	n.a.	36,500	0,160	0,113
SK1	2	0,427	0,037	0,026	n.a.	n.a.	n.a.	35,990	0,126	0,089
SK2	2	0,089	0,004	0,003	n.a.	n.a.	n.a.	38,250	0,064	0,045
SK3	2	0,919	0,185	0,131	n.a.	n.a.	n.a.	34,890	0,290	0,205
SK4	2	1,437	0,086	0,061	n.a.	n.a.	n.a.	34,240	0,086	0,061
SK5	2	0,455	0,027	0,019	n.a.	n.a.	n.a.	35,900	0,086	0,061
SK6	2	0,464	0,021	0,015	n.a.	n.a.	n.a.	35,870	0,067	0,047
SK7	2	1,544	0,143	0,101	n.a.	n.a.	n.a.	34,140	0,134	0,095
SK8	2	1,181	0,064	0,045	n.a.	n.a.	n.a.	34,520	0,078	0,055
SK9	2	0,504	0,045	0,032	n.a.	n.a.	n.a.	35,750	0,130	0,092
SK10	2	1,620	0,035	0,025	n.a.	n.a.	n.a.	34,070	0,031	0,022
T1	2	0,229	0,014	0,010	n.a.	n.a.	n.a.	36,890	0,088	0,062
T2	2	0,406	0,012	0,009	n.a.	n.a.	n.a.	36,060	0,044	0,031
T3	2	0,426	0,004	0,003	n.a.	n.a.	n.a.	36,000	0,015	0,010
T4	2	0,518	0,043	0,031	n.a.	n.a.	n.a.	35,710	0,121	0,086
T5	2	0,642	0,051	0,036	n.a.	n.a.	n.a.	35,400	0,114	0,081
T6	2	0,942	0,194	0,137	n.a.	n.a.	n.a.	34,850	0,297	0,210
T7	2	0,296	0,110	0,078	n.a.	n.a.	n.a.	36,520	0,539	0,381
T8	2	0,143	0,007	0,005	n.a.	n.a.	n.a.	37,570	0,066	0,047
T9	2	0,225	0,017	0,012	n.a.	n.a.	n.a.	36,920	0,107	0,075
T10	2	0,235	0,010	0,007	n.a.	n.a.	n.a.	36,850	0,061	0,043

Erläuterungen: Cq: Quantifikationszyklus; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; SEM: Standardfehler.

Tab. 19: mRNA-Expressionsanalyse von *rpl8*.

Proben und Replikate		<i>rpl8</i>								
		Relative Quantität	Relative Quantität SD	Relative Quantität SEM	Unskalierte Expression	Unskalierte Expression SD	Unskalierte Expression SEM	Cq MW	Cq SD	Cq SEM
REF*	12	1,000	0,057	0,016	n.a.	n.a.	n.a.	25,050	0,082	0,024
UBA1	2	1,048	0,068	0,048	n.a.	n.a.	n.a.	24,980	0,094	0,066
UBA2	2	0,635	0,037	0,026	n.a.	n.a.	n.a.	25,700	0,084	0,059
UBA3	2	0,184	0,007	0,005	n.a.	n.a.	n.a.	27,490	0,054	0,038
UBA4	2	0,373	0,005	0,003	n.a.	n.a.	n.a.	26,470	0,019	0,013
UBA5	2	0,594	0,007	0,005	n.a.	n.a.	n.a.	25,800	0,018	0,013
UBA6	2	0,566	0,028	0,020	n.a.	n.a.	n.a.	25,870	0,071	0,050
UBA7	2	0,574	0,017	0,012	n.a.	n.a.	n.a.	25,850	0,042	0,030
UBA8	2	0,474	0,019	0,013	n.a.	n.a.	n.a.	26,120	0,057	0,041
UBA9	2	1,595	0,091	0,065	n.a.	n.a.	n.a.	24,370	0,083	0,058
UBA10	2	1,902	0,119	0,084	n.a.	n.a.	n.a.	24,120	0,090	0,064
AS1	2	1,968	0,070	0,050	n.a.	n.a.	n.a.	24,070	0,052	0,036
AS2	2	1,565	0,219	0,155	n.a.	n.a.	n.a.	24,400	0,202	0,143
AS3	2	0,940	0,058	0,041	n.a.	n.a.	n.a.	25,140	0,089	0,063
AS4	2	2,253	0,012	0,009	n.a.	n.a.	n.a.	23,880	0,008	0,005
AS5	2	1,132	0,039	0,028	n.a.	n.a.	n.a.	24,870	0,050	0,035
AS6	2	3,521	0,284	0,200	n.a.	n.a.	n.a.	23,230	0,116	0,082
AS7	2	1,868	0,014	0,010	n.a.	n.a.	n.a.	24,150	0,010	0,007
AS8	2	1,387	0,032	0,022	n.a.	n.a.	n.a.	24,580	0,033	0,023
AS9	2	2,909	0,139	0,099	n.a.	n.a.	n.a.	23,510	0,069	0,049
AS10	2	1,485	0,066	0,047	n.a.	n.a.	n.a.	24,480	0,064	0,045
CC1	2	0,867	0,052	0,037	n.a.	n.a.	n.a.	25,250	0,086	0,061
CC2	2	0,390	0,017	0,012	n.a.	n.a.	n.a.	26,400	0,064	0,045
CC3	2	0,426	0,011	0,008	n.a.	n.a.	n.a.	26,280	0,038	0,027
CC4	2	0,914	0,016	0,011	n.a.	n.a.	n.a.	25,180	0,025	0,018
CC5	2	0,398	0,006	0,004	n.a.	n.a.	n.a.	26,380	0,020	0,014
CC6	2	0,867	0,026	0,018	n.a.	n.a.	n.a.	25,250	0,043	0,031
CC7	2	0,898	0,016	0,011	n.a.	n.a.	n.a.	25,200	0,026	0,018
CC8	2	0,955	0,006	0,004	n.a.	n.a.	n.a.	25,110	0,009	0,006
CC9	2	1,081	0,041	0,029	n.a.	n.a.	n.a.	24,930	0,055	0,039
CC10	2	1,310	0,050	0,035	n.a.	n.a.	n.a.	24,660	0,055	0,039
GW1	2	1,214	0,099	0,070	n.a.	n.a.	n.a.	24,770	0,118	0,084
GW2	2	0,486	0,036	0,025	n.a.	n.a.	n.a.	26,090	0,107	0,075
GW3	2	0,284	0,023	0,016	n.a.	n.a.	n.a.	26,860	0,117	0,083
GW4	2	1,346	0,004	0,003	n.a.	n.a.	n.a.	24,620	0,004	0,003
GW5	2	0,224	0,008	0,006	n.a.	n.a.	n.a.	27,200	0,051	0,036
GW6	2	0,221	0,018	0,013	n.a.	n.a.	n.a.	27,220	0,118	0,083
GW7	2	1,041	0,019	0,014	n.a.	n.a.	n.a.	24,990	0,027	0,019
GW8	2	0,335	0,001	0,001	n.a.	n.a.	n.a.	26,630	0,004	0,003
GW9	2	0,646	0,038	0,027	n.a.	n.a.	n.a.	25,680	0,085	0,060
GW10	2	1,039	0,006	0,004	n.a.	n.a.	n.a.	24,990	0,008	0,006
HO1	2	1,294	0,051	0,036	n.a.	n.a.	n.a.	24,680	0,057	0,040
HO2	2	0,897	0,063	0,044	n.a.	n.a.	n.a.	25,200	0,101	0,071
HO3	2	0,633	0,069	0,049	n.a.	n.a.	n.a.	25,710	0,157	0,111
HO4	2	0,225	0,005	0,003	n.a.	n.a.	n.a.	27,200	0,031	0,022
HO5	2	0,314	0,030	0,021	n.a.	n.a.	n.a.	26,720	0,136	0,096

Erläuterungen: REF*: Kalibrator; Cq: Quantifikationszyklus; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; SEM: Standardfehler.

Fortsetzung Tab. 19: mRNA-Expressionsanalyse von *rpl8*.

<i>rpl8</i>										
Proben und Replikate	Relative Quantität	Relative Quantität SD	Relative Quantität SEM	Unskalierte Expression	Unskalierte Expression SD	Unskalierte Expression SEM	Cq MW	Cq SD	Cq SEM	
HO6	2	0,191	0,005	0,004	n.a.	n.a.	n.a.	27,440	0,039	0,027
HO7	2	0,254	0,005	0,003	n.a.	n.a.	n.a.	27,030	0,028	0,020
HO8	2	0,321	0,021	0,015	n.a.	n.a.	n.a.	26,690	0,093	0,065
HO9	2	0,453	0,035	0,025	n.a.	n.a.	n.a.	26,190	0,113	0,080
HO10	2	0,679	0,002	0,002	n.a.	n.a.	n.a.	25,610	0,005	0,003
LB1	2	0,904	0,008	0,006	n.a.	n.a.	n.a.	25,190	0,013	0,009
LB2	2	1,140	0,055	0,039	n.a.	n.a.	n.a.	24,860	0,069	0,049
LB3	2	1,637	0,030	0,021	n.a.	n.a.	n.a.	24,340	0,027	0,019
LB4	2	0,994	0,240	0,170	n.a.	n.a.	n.a.	25,060	0,349	0,247
LB5	2	1,015	0,014	0,010	n.a.	n.a.	n.a.	25,030	0,020	0,014
LB6	2	0,910	0,044	0,031	n.a.	n.a.	n.a.	25,180	0,070	0,050
LB7	2	0,522	0,008	0,006	n.a.	n.a.	n.a.	25,990	0,023	0,016
LB8	2	0,651	0,003	0,002	n.a.	n.a.	n.a.	25,670	0,007	0,005
LB9	2	1,145	0,035	0,025	n.a.	n.a.	n.a.	24,850	0,044	0,031
LB10	2	0,766	0,064	0,045	n.a.	n.a.	n.a.	25,430	0,120	0,085
OB1	2	0,759	0,016	0,012	n.a.	n.a.	n.a.	25,440	0,031	0,022
OB2	2	0,121	0,008	0,006	n.a.	n.a.	n.a.	28,090	0,096	0,068
OB3	2	0,142	0,014	0,010	n.a.	n.a.	n.a.	27,860	0,142	0,101
OB4	2	0,126	0,020	0,014	n.a.	n.a.	n.a.	28,040	0,233	0,165
OB5	2	0,250	0,009	0,007	n.a.	n.a.	n.a.	27,050	0,054	0,038
OB6	2	0,888	0,027	0,019	n.a.	n.a.	n.a.	25,220	0,044	0,031
OB7	2	0,728	0,070	0,050	n.a.	n.a.	n.a.	25,500	0,139	0,098
OB8	2	0,598	0,012	0,008	n.a.	n.a.	n.a.	25,790	0,029	0,020
OB9	2	0,233	0,001	0,001	n.a.	n.a.	n.a.	27,150	0,005	0,003
OB10	2	0,382	0,022	0,015	n.a.	n.a.	n.a.	26,430	0,082	0,058
SK1	2	0,501	0,037	0,027	n.a.	n.a.	n.a.	26,040	0,108	0,076
SK2	2	0,232	0,019	0,013	n.a.	n.a.	n.a.	27,160	0,117	0,083
SK3	2	1,161	0,012	0,009	n.a.	n.a.	n.a.	24,830	0,015	0,011
SK4	2	1,345	0,037	0,026	n.a.	n.a.	n.a.	24,620	0,039	0,028
SK5	2	0,697	0,022	0,016	n.a.	n.a.	n.a.	25,570	0,046	0,032
SK6	2	0,485	0,034	0,024	n.a.	n.a.	n.a.	26,090	0,101	0,072
SK7	2	1,545	0,020	0,014	n.a.	n.a.	n.a.	24,420	0,019	0,013
SK8	2	1,198	0,040	0,028	n.a.	n.a.	n.a.	24,790	0,048	0,034
SK9	2	0,643	0,024	0,017	n.a.	n.a.	n.a.	25,680	0,055	0,039
SK10	2	1,467	0,039	0,027	n.a.	n.a.	n.a.	24,490	0,038	0,027
T1	2	0,628	0,010	0,007	n.a.	n.a.	n.a.	25,720	0,022	0,016
T2	2	0,568	0,023	0,016	n.a.	n.a.	n.a.	25,860	0,058	0,041
T3	2	0,571	0,017	0,012	n.a.	n.a.	n.a.	25,860	0,042	0,030
T4	2	0,723	0,018	0,013	n.a.	n.a.	n.a.	25,510	0,037	0,026
T5	2	0,866	0,034	0,024	n.a.	n.a.	n.a.	25,250	0,056	0,040
T6	2	0,984	0,001	0,001	n.a.	n.a.	n.a.	25,070	0,002	0,001
T7	2	0,531	0,010	0,007	n.a.	n.a.	n.a.	25,960	0,026	0,018
T8	2	0,452	0,003	0,002	n.a.	n.a.	n.a.	26,190	0,008	0,006
T9	2	0,406	0,010	0,007	n.a.	n.a.	n.a.	26,350	0,034	0,024
T10	2	0,425	0,010	0,007	n.a.	n.a.	n.a.	26,280	0,032	0,023

Erläuterungen: Cq: Quantifikationszyklus; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; SEM: Standardfehler.

Tab. 20: mRNA-Expressionsanalyse von *rps16*.

Proben und Replikate	Relative Quantität	<i>rps16</i>		Unskalierte Expression	Unskalierte Expression SD	Unskalierte Expression SEM	Cq MW	Cq SD	Cq SEM	
		Relative Quantität SD	Relative Quantität SEM							
REF*	10	1,000	0,107	0,034	n.a.	n.a.	n.a.	28,590	0,155	0,049
UBA1	2	0,777	0,070	0,049	n.a.	n.a.	n.a.	28,950	0,129	0,092
UBA2	2	0,310	0,016	0,011	n.a.	n.a.	n.a.	30,280	0,075	0,053
UBA3	2	0,194	0,017	0,012	n.a.	n.a.	n.a.	30,960	0,129	0,091
UBA4	2	0,228	0,052	0,037	n.a.	n.a.	n.a.	30,720	0,330	0,234
UBA5	2	0,327	0,069	0,049	n.a.	n.a.	n.a.	30,200	0,305	0,216
UBA6	2	0,384	0,106	0,075	n.a.	n.a.	n.a.	29,970	0,397	0,281
UBA7	2	0,470	0,115	0,082	n.a.	n.a.	n.a.	29,680	0,354	0,251
UBA8	2	0,295	0,074	0,052	n.a.	n.a.	n.a.	30,350	0,361	0,256
UBA9	2	1,036	0,084	0,060	n.a.	n.a.	n.a.	28,540	0,118	0,083
UBA10	2	1,312	0,069	0,049	n.a.	n.a.	n.a.	28,200	0,076	0,054
AS1	2	2,694	0,313	0,221	n.a.	n.a.	n.a.	27,160	0,168	0,118
AS2	2	1,597	0,308	0,218	n.a.	n.a.	n.a.	27,910	0,278	0,197
AS3	2	0,957	0,108	0,076	n.a.	n.a.	n.a.	28,650	0,163	0,115
AS4	2	2,923	0,230	0,163	n.a.	n.a.	n.a.	27,040	0,114	0,080
AS5	2	1,376	0,076	0,054	n.a.	n.a.	n.a.	28,130	0,080	0,057
AS6	2	5,109	0,134	0,095	n.a.	n.a.	n.a.	26,230	0,038	0,027
AS7	2	2,522	0,149	0,105	n.a.	n.a.	n.a.	27,250	0,085	0,060
AS8	2	1,352	0,115	0,082	n.a.	n.a.	n.a.	28,150	0,123	0,087
AS9	2	2,995	0,357	0,253	n.a.	n.a.	n.a.	27,000	0,172	0,122
AS10	2	1,375	0,068	0,048	n.a.	n.a.	n.a.	28,130	0,072	0,051
CC1	2	0,899	0,006	0,004	n.a.	n.a.	n.a.	28,740	0,010	0,007
CC2	2	0,375	0,039	0,027	n.a.	n.a.	n.a.	30,000	0,149	0,106
CC3	2	0,521	0,088	0,062	n.a.	n.a.	n.a.	29,530	0,245	0,173
CC4	2	1,047	0,153	0,108	n.a.	n.a.	n.a.	28,520	0,210	0,149
CC5	2	0,419	0,073	0,051	n.a.	n.a.	n.a.	29,840	0,251	0,177
CC6	2	0,914	0,170	0,120	n.a.	n.a.	n.a.	28,720	0,268	0,189
CC7	2	0,950	0,063	0,045	n.a.	n.a.	n.a.	28,660	0,096	0,068
CC8	2	1,064	0,001	0,001	n.a.	n.a.	n.a.	28,500	0,001	0,001
CC9	2	1,000	0,019	0,014	n.a.	n.a.	n.a.	28,590	0,028	0,020
CC10	2	0,948	0,008	0,005	n.a.	n.a.	n.a.	28,660	0,011	0,008
GW1	2	1,475	0,124	0,088	n.a.	n.a.	n.a.	28,030	0,122	0,086
GW2	2	0,316	0,089	0,063	n.a.	n.a.	n.a.	30,250	0,405	0,286
GW3	2	0,200	0,032	0,023	n.a.	n.a.	n.a.	30,910	0,232	0,164
GW4	2	1,404	0,117	0,083	n.a.	n.a.	n.a.	28,100	0,120	0,085
GW5	2	0,157	0,001	0,001	n.a.	n.a.	n.a.	31,260	0,013	0,009
GW6	2	0,278	0,001	0,000	n.a.	n.a.	n.a.	30,440	0,003	0,002
GW7	2	1,043	0,021	0,015	n.a.	n.a.	n.a.	28,530	0,029	0,020
GW8	2	0,467	0,040	0,028	n.a.	n.a.	n.a.	29,690	0,123	0,087
GW9	2	0,661	0,106	0,075	n.a.	n.a.	n.a.	29,180	0,232	0,164
GW10	2	0,586	0,029	0,021	n.a.	n.a.	n.a.	29,360	0,072	0,051
HO1	2	0,765	0,002	0,001	n.a.	n.a.	n.a.	28,970	0,004	0,003
HO2	2	0,415	0,023	0,016	n.a.	n.a.	n.a.	29,860	0,079	0,056
HO3	2	0,251	0,002	0,002	n.a.	n.a.	n.a.	30,580	0,014	0,010
HO4	2	0,120	0,023	0,016	n.a.	n.a.	n.a.	31,650	0,280	0,198
HO5	2	0,185	0,016	0,012	n.a.	n.a.	n.a.	31,020	0,127	0,090

Erläuterungen: REF*: Kalibrator; Cq: Quantifikationszyklus; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; SEM: Standardfehler.

Fortsetzung Tab. 20: mRNA-Expressionsanalyse von *rps16*.

<i>rps16</i>										
Proben und Replikate	Relative Quantität	Relative Quantität SD	Relative Quantität SEM	Unskalierte Expression	Unskalierte Expression SD	Unskalierte Expression SEM	Cq MW	Cq SD	Cq SEM	
HO6	2	0,131	0,003	0,002	n.a.	n.a.	n.a.	31,520	0,035	0,024
HO7	2	0,168	0,008	0,006	n.a.	n.a.	n.a.	31,160	0,069	0,049
HO8	2	0,161	0,009	0,006	n.a.	n.a.	n.a.	31,230	0,078	0,055
HO9	2	0,256	0,099	0,070	n.a.	n.a.	n.a.	30,550	0,560	0,396
HO10	2	0,317	0,016	0,011	n.a.	n.a.	n.a.	30,240	0,071	0,050
LB1	2	0,902	0,058	0,041	n.a.	n.a.	n.a.	28,740	0,093	0,066
LB2	2	1,601	0,018	0,012	n.a.	n.a.	n.a.	27,910	0,016	0,011
LB3	2	1,984	0,273	0,193	n.a.	n.a.	n.a.	27,600	0,199	0,140
LB4	2	1,339	0,086	0,060	n.a.	n.a.	n.a.	28,170	0,092	0,065
LB5	2	0,930	0,047	0,033	n.a.	n.a.	n.a.	28,690	0,073	0,052
LB6	2	0,816	0,076	0,054	n.a.	n.a.	n.a.	28,880	0,134	0,095
LB7	2	0,381	0,140	0,099	n.a.	n.a.	n.a.	29,980	0,531	0,376
LB8	2	0,735	0,041	0,029	n.a.	n.a.	n.a.	29,030	0,081	0,057
LB9	2	1,150	0,004	0,003	n.a.	n.a.	n.a.	28,390	0,005	0,004
LB10	2	0,814	0,057	0,040	n.a.	n.a.	n.a.	28,880	0,101	0,072
OB1	2	0,820	0,021	0,015	n.a.	n.a.	n.a.	28,870	0,037	0,026
OB2	2	0,112	0,010	0,007	n.a.	n.a.	n.a.	31,740	0,129	0,091
OB3	2	0,134	0,009	0,006	n.a.	n.a.	n.a.	31,490	0,095	0,067
OB4	2	0,047	0,003	0,002	n.a.	n.a.	n.a.	32,990	0,104	0,073
OB5	2	0,173	0,002	0,002	n.a.	n.a.	n.a.	31,120	0,019	0,013
OB6	2	0,925	0,006	0,004	n.a.	n.a.	n.a.	28,700	0,010	0,007
OB7	2	0,892	0,023	0,016	n.a.	n.a.	n.a.	28,750	0,037	0,026
OB8	2	0,748	0,026	0,019	n.a.	n.a.	n.a.	29,010	0,051	0,036
OB9	2	0,242	0,010	0,007	n.a.	n.a.	n.a.	30,640	0,061	0,043
OB10	2	0,332	0,037	0,026	n.a.	n.a.	n.a.	30,180	0,163	0,115
SK1	2	0,753	0,031	0,022	n.a.	n.a.	n.a.	29,000	0,059	0,042
SK2	2	0,263	0,018	0,012	n.a.	n.a.	n.a.	30,520	0,097	0,068
SK3	2	0,942	0,072	0,051	n.a.	n.a.	n.a.	28,670	0,111	0,078
SK4	2	3,842	0,111	0,079	n.a.	n.a.	n.a.	26,650	0,042	0,029
SK5	2	0,724	0,026	0,019	n.a.	n.a.	n.a.	29,050	0,053	0,037
SK6	2	0,628	0,101	0,071	n.a.	n.a.	n.a.	29,260	0,231	0,164
SK7	2	1,683	0,167	0,118	n.a.	n.a.	n.a.	27,840	0,143	0,101
SK8	2	1,535	0,114	0,081	n.a.	n.a.	n.a.	27,970	0,107	0,076
SK9	2	1,205	0,141	0,100	n.a.	n.a.	n.a.	28,320	0,169	0,119
SK10	2	0,117	0,008	0,006	n.a.	n.a.	n.a.	31,680	0,102	0,072
T1	2	0,382	0,003	0,002	n.a.	n.a.	n.a.	29,970	0,012	0,008
T2	2	0,406	0,010	0,007	n.a.	n.a.	n.a.	29,890	0,034	0,024
T3	2	0,425	0,022	0,016	n.a.	n.a.	n.a.	29,820	0,076	0,054
T4	2	0,481	0,042	0,030	n.a.	n.a.	n.a.	29,640	0,125	0,089
T5	2	0,722	0,050	0,036	n.a.	n.a.	n.a.	29,060	0,100	0,071
T6	2	0,804	0,036	0,026	n.a.	n.a.	n.a.	28,900	0,065	0,046
T7	2	0,462	0,018	0,013	n.a.	n.a.	n.a.	29,700	0,057	0,041
T8	2	0,221	0,004	0,003	n.a.	n.a.	n.a.	30,770	0,027	0,019
T9	2	0,389	0,073	0,052	n.a.	n.a.	n.a.	29,950	0,271	0,192
T10	2	0,373	0,026	0,019	n.a.	n.a.	n.a.	30,010	0,102	0,072

Erläuterungen: Cq: Quantifikationszyklus; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; SEM: Standardfehler.

8.4 Ergebnisse der Wirksamkeitsprüfung der Insektizide A und B im Wahlversuch

8.4.1 p-Werte aus der Berechnung mittels mid-p-Variante

Tab. 21: Statistische Unterschiede innerhalb der Wahlversuche zwischen den Prüfoberflächen und den Belagsalterungen. Berechnet mittels der mid-p-Variante des Exakten Vierfeldertafeltests nach Fisher ($\alpha = 0,05$), Korrektur mittels Bonferroni-Holm-Prozedur.

Wahlversuche UBA-Stamm	Korrigierte p-Werte					
	Tapete Teppich	Tapete Hornitex®	Tapete Sperrholz	Teppich Hornitex®	Teppich Sperrholz	Hornitex® Sperrholz
UBA Insektizid A kB	11,858000	13,785800	14,410500	2,504180	3,712870	5,901500
UBA Insektizid A 1WB	0,103378	2,263590	0,562888	12,550500	16,670200	16,670200
UBA Insektizid A 2WB	3,194400	16,670200	0,030693	0,992910	5,457200	0,024752
UBA Insektizid B kB	0,000012	0,000012	0,000255	0,000012	0,000012	0,000012
UBA Insektizid B 1WB	0,000012	0,111179	0,020164	0,000012	0,000018	0,000012
UBA Insektizid B 2WB	0,000076	0,000012	0,000258	0,000012	16,670200	0,000012

Wahlversuche UBA-Stamm	Korrigierte p-Werte		
	kB 1WB	kB 2WB	1WB 2WB
UBA Insektizid A TA	13,472800	14,028000	16,670200
UBA Insektizid A TE	5,258250	16,670200	11,858000
UBA Insektizid A H	2,538820	16,670200	0,879900
UBA Insektizid A SH	1,387570	0,073796	11,605000
UBA Insektizid B TA	16,670200	0,073796	0,032240
UBA Insektizid B TE	0,000012	0,000012	16,670200
UBA Insektizid B SH	11,858000	0,013742	0,000130
UBA Insektizid B H	0,000143	16,670200	0,013742

Insektizid A	
Insektizid B	
UBA-Alle Oberflächen-Alle BA	0,000012

Erläuterungen: **BA:** Belagsalterung, **kB:** keine Belagsalterung, **1WB:** eine Woche Belagsalterung, **2WB:** zwei Wochen Belagsalterung; **TA:** Tapete, **TE:** Teppich, **H:** Hornitex®, **SH:** Sperrholz.

Tab. 22: Statistische Unterschiede innerhalb der Wahlversuche zwischen den Wirksamkeitskontrollen zu den Zeitpunkten 24 h p.a. und 7 d p.a. Berechnet mittels der mid-p-Variante des Exakten Vierfeldertafeltests nach Fisher ($\alpha = 0,05$), Korrektur mittels Bonferroni-Holm-Prozedur.

	Weibchen	24 h p.a
	Männchen	7 d p.a
UBA-Insektizid A-TA-kB	16,670200	16,670200
UBA-Insektizid A-TA-1WB	16,670200	16,670200
UBA-Insektizid A-TA-2WB	16,670200	0,024470
UBA-Insektizid A-TE-kB	16,670200	11,061900
UBA-Insektizid A-TE-1WB	8,527700	0,352728
UBA-Insektizid A-TE-2WB	4,833140	15,181100
UBA-Insektizid A-H-kB	16,670200	14,028000
UBA-Insektizid A-H-1WB	1,703460	7,376400
UBA-Insektizid A-H-2WB	16,670200	9,089600
UBA-Insektizid A-SH-kB	16,670200	0,000038
UBA-Insektizid A-SH-1WB	1,713400	0,005295
UBA-Insektizid A-SH-2WB	16,670200	0,000064
UBA-Insektizid B-TA-kB	0,002691	16,670200
UBA-Insektizid B-TA-1WB	0,000012	16,670200
UBA-Insektizid B-TA-2WB	0,026236	16,670200
UBA-Insektizid B-TE-kB	2,145280	16,670200
UBA-Insektizid B-TE-1WB	11,960000	16,670200
UBA-Insektizid B-TE-2WB	16,670200	16,670200
UBA-Insektizid B-H-kB	16,670200	14,028000
UBA-Insektizid B-H-1WB	14,410500	16,670200
UBA-Insektizid B-H-2WB	16,670200	16,670200
UBA-Insektizid B-SH-kB	15,181100	16,509500
UBA-Insektizid B-SH-1WB	1,165520	16,670200
UBA-Insektizid B-SH-2WB	16,670200	16,670200

Erläuterungen: BA: Belagsalterung, kB: keine Belagsalterung, 1WB: eine Woche Belagsalterung, 2WB: zwei Wochen Belagsalterung; TA: Tapete, TE: Teppich, H: Hornitex®, SH: Sperrholz; SG: schwer geschädigt; p.a.: post Applikation.

Tab. 23: Statistische Unterschiede zwischen dem sensiblen UBA-Stamm und dem AS-Feldstamm innerhalb der Wahlversuche mit Insektizid A auf der Prüfoberfläche Tapete. Berechnet mittels mid-p-Variante des Exakten Vierfeldertafeltests nach Fisher ($\alpha = 0,05$), Korrektur mittels Bonferroni-Holm-Prozedur.

Wahlversuche	Korrigierte p-Werte		
	kB	kB	1WB
UBA-Stamm vs AS-Feldstamm	1WB	2WB	2WB
AS Insektizid A TA	0,0002581	0,0124192	2,0670000
UBA Insektizid A TA	3,5052000	3,5052000	4,5000000
	Weibchen	24 h p.a	
	Männchen	7 d p.a	
AS-Insektizid A-TA-kB	4,5000000	4,5000000	
AS-Insektizid A-TA-1WB	4,5000000	1,1710500	
AS-Insektizid A-TA-2WB	4,5000000	4,5000000	
UBA-Insektizid A-TA-kB	4,5000000	4,5000000	
UBA-Insektizid A-TA-1WB	3,5052000	4,5000000	
UBA-Insektizid A-TA-2WB	1,2905200	0,0051357	
	UBA		
	AS		
Insektizid A-TA-kB	0,0000021		
Insektizid A-TA-1WB	0,0000021		
Insektizid A-TA-2WB	0,0000021		

Erläuterungen: BA: Belagsalterung, kB: keine Belagsalterung, 1WB: eine Woche Belagsalterung, 2WB: zwei Wochen Belagsalterung; TA: Tapete, TE: Teppich, H: Hornitex®, SH: Sperrholz.

8.4.2 Berechnung mittels binärer logistischer Regression

Tab. 24: Berechnung eines Generalisierten Logistischen Modells (GLM) mit Interaktionen im Wahlversuch. Die Einflüsse der erklärenden Variablen auf die Zielvariable (schwere Schädigung von *Cimex lectularius*) in den Wahlversuchen wurden mittels binärer logistischer Regression mit der freien Statistiksoftware R berechnet. Interaktionen sind mit einem „:“ gekennzeichnet.

Call:
 glm(formula = E ~ G + BAf + Df + M + PO + BAf * PO + M * PO + BAf * PO + BAf * M * PO, family = binomial(link = logit))

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-3,5983	-0,3919	0,1312	0,3616	2,3664

Coefficients:

Variablen	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)	Odds Ratio	2,5 %	97,5 %
(Intercept)	6,47230	1,00220	6,458	1,06e-10	6,469671e+02	1,459745e+02	1,136816e+04
GW	-0,52838	0,06389	-8,270	< 2e-16	5,895570e-01	5,200020e-01	6,680250e-01
BAf1	-3,02840	1,03303	-2,932	0,003373	4,839302e-02	2,675370e-03	2,386033e-01
BAf2	-0,70364	1,22641	-0,574	0,566144	4,947799e-01	2,294857e-02	5,181740e+00
Df7	0,20904	0,06335	3,300	0,000967	1,232494e+00	1,088706e+00	1,395627e+00
IB	-4,73228	1,00827	-4,693	2,69e-06	8,806404e-03	4,982874e-04	3,985250e-02
POS	-3,24018	1,02695	-3,155	0,001604	3,915668e-02	2,177006e-03	1,890387e-01
POTA	-1,19259	1,15655	-1,031	0,302465	3,034339e-01	1,497958e-02	2,379615e+00
POTE	-1,64266	1,09733	-1,497	0,134404	1,934641e-01	1,007775e-02	1,205348e+00
BAf1:POS	2,49092	1,07095	2,326	0,020024	1,207240e+01	2,184182e+00	2,265490e+02
BAf2:POS	-0,42453	1,25550	-0,338	0,735261	6,540771e-01	5,910457e-02	1,458015e+01
BAf1:POTA	15,52649	165,97577	0,094	0,925469	5,534384e+06	6,164727e+71	6,376385e+84
BAf2:POTA	-0,55020	1,39023	-0,396	0,692280	5,768331e-01	3,863508e-02	1,497650e+01
BAf1:POTE	2,22148	1,17598	1,889	0,058886	9,220998e+00	1,224027e+00	1,926625e+02
BAf2:POTE	-0,40799	1,33624	-0,305	0,760119	6,649866e-01	5,088972e-02	1,625389e+01
IB:POS	0,38472	1,04121	0,369	0,711763	1,469197e+00	2,912486e-01	2,679356e+01
IB:POTA	-0,59808	1,16703	-0,512	0,608316	5,498673e-01	6,852710e-02	1,126364e+01
IB:POTE	0,32096	1,10749	0,290	0,771960	1,378457e+00	2,156077e-01	2,674448e+01
BAf1:IB	2,01099	1,04611	1,922	0,054562	7,470727e+00	1,456498e+00	1,368699e+02
BAf2:IB	0,72877	1,24118	0,587	0,557099	2,072521e+00	1,925456e-01	4,544955e+01
BAf1:IB:POS	-1,09479	1,09646	-0,998	0,318051	3,346104e-01	1,736801e-02	1,986485e+00
BAf2:IB:POS	-0,62088	1,28925	-0,482	0,630103	5,374725e-01	2,316902e-02	6,337252e+00
BAf1:IB:POTA	-14,38703	165,97591	-0,087	0,930925	5,646680e-07	2,096842e-81	6,737931e-70
BAf2:IB:POTA	-0,20466	1,41219	-0,145	0,884772	8,149261e-01	3,050811e-02	1,267878e+01
BAf1:IB:POTE	-3,83107	1,20358	-3,183	0,001457	2,168629e-02	1,006449e-03	1,745419e-01
BAf2:IB:POTE	-2,06215	1,36273	-1,513	0,130217	1,271802e-01	5,032168e-03	1,747535e+00

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

Null deviance: 12695,2 on 10671 degrees of freedom

Residual deviance: 6383,8 on 10646 degrees of freedom

AIC (Akaike Informationskriterium): 6435,8

Number of Fisher Scoring iterations: 16

Erläuterungen: **Intercept:** Achsenabschnitt; **E:** Zielvariable; **G:** Geschlecht (**M:** Männchen, **W:** Weibchen); **BAf:** Belagsalterung (1 oder 2 Wochen); **Df:** Tag der Wirksamkeitskontrolle (1. Oder 7. d p.a.); **M:** Mittel (**IB:** Insektizid B); **PO:** Prüfoberflächen (**S:** Sperrholz, **TA:** Tapete, **TE:** Teppich). **Ergebnisse:** **Min:** Minimum; **Max:** Maximum; **1Q:** 1. Quartil; **3Q:** 3. Quartil; **Estimate:** Interaktionskoeffizient; **Std. Error:** Standardabweichung; **z value:** Ergebnisse des Wald-Ttests (hier dem T-Test äquivalent); **Pr(>|z|):** p-Wert des Wald-Tests; **2,5 %** und **97,5 %:** 95 % Konfidenzintervalle.

Tab. 25: Vergleich von verschiedenen logistischen Regressionsmodellen mit Interaktionen zur Berechnung der Einflüsse der erklärenden Variablen auf die Zielvariable in den Wahlversuchen mit dem „likelihood ratio“ Test durch Deletion einzelner Variablen (single term deletion). Die binären logistischen Regressionen wurden mit der freien Statistiksoftware R berechnet. Interaktionen sind mit einem „:“ gekennzeichnet.

Single term deletions**Model:**

$$E \sim G + \text{BAf} + \text{Df} + M + \text{PO} + \text{BAf} * \text{PO} + M * \text{PO} + \text{BAf} * \text{PO} + \text{BAf} * M * \text{PO}$$

Variablen	df	Deviance	AIC	LRT	Pr(>Chi)
<none>		6383,8	6435,8	-	-
G	1	6453,2	6503,2	69,378	< 2,2e-16
Df	1	6394,7	6444,7	10,918	0,0009525
BAf:M:PO	6	6413,9	6453,9	30,091	3,777e-05

Erläuterungen: none: ohne Restriktionen; E: Zielvariable; G: Geschlecht (M: Männchen, W: Weibchen); BAF: Belagsalterung (1 oder 2 Wochen); Df: Tag der Wirksamkeitskontrolle (1. Oder 7. d p.a.); PO: Prüfoberflächen (Sperrholz, Tapete, Teppich, Hornitex®). **Ergebnisse:** df: data frame, Anzahl der Vektoren; Deviance: Devianz; AIC: Akaikes Informationskriterium; LRT: Likelihood-Quotienten (ratio) Test; Pr(>Chi): p-Wert des LRT (Chi²-verteilt).

Tab. 26: Berechnung eines Generalisierten Logistischen Modells (GLM) ohne Interaktionen im Wahlversuch. Die Einflüsse der erklärenden Variablen auf die Zielvariable (schwere Schädigung von *Cimex lectularius*) in den Wahlversuchen wurden mittels binärer logistischer Regression mit der freien Statistiksoftware R berechnet.

Call:

$$\text{glm}(\text{formula} = E \sim G + \text{BAf} + \text{Df} + M + \text{PO}, \text{family} = \text{binomial}(\text{link} = \text{logit}))$$
Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-3,5475	-0,5251	0,1867	0,3667	2,2344

Coefficients:

Variablen	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)	Odds Ratio	2,5 %	97,5 %
(Intercept)	6,29053	0,13645	46,100	< 2e-16	539,4378852	414,21912613	707,23543442
GW	-0,48824	0,06176	-7,906	2,66e-15	0,61370518	0,54360572	0,69252515
BAf1	-0,76934	0,07428	-10,358	< 2e-16	0,46331683	0,40038242	0,53572340
BAf2	-1,07418	0,07764	-13,835	< 2e-16	0,34157877	0,29317320	0,39748372
Df7	0,19362	0,06148	3,150	0,00164	1,21363513	1,07597517	1,36922160
IB	-4,39392	0,09076	-48,414	< 2e-16	0,01235221	0,01030716	0,01471315
POS	-2,74448	0,09950	-27,582	< 2e-16	0,06428155	0,05280131	0,07799502
POTA	-1,47992	0,09088	-16,284	< 2e-16	0,22765539	0,19030788	0,27176999
POTE	-2,11290	0,09110	-23,194	< 2e-16	0,12088631	0,10098468	0,14433461

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

Null deviance: 12695,2 on 10671 degrees of freedom

Residual deviance: 6775,2 on 10663 degrees of freedom

AIC (Akaikes Informationskriterium): 6793,2

Number of Fisher Scoring iterations: 6

Erläuterungen: Intercept: Achsenabschnitt; E: Zielvariable; G: Geschlecht (M: Männchen, W: Weibchen); BAF: Belagsalterung (1 oder 2 Wochen); Df: Tag der Wirksamkeitskontrolle (1. Oder 7. d p.a.); M: Mittel (IB: Insektizid B); PO: Prüfoberflächen (S: Sperrholz, TA: Tapete, TE: Teppich). **Ergebnisse:** Min: Minimum; Max: Maximum; 1Q: 1. Quartil; 3Q: 3. Quartil; Estimate: Interaktionskoeffizient; Std. Error: Standardabweichung; z value: Ergebnisse des Wald-Ttests (hier dem T-Test äquivalent); Pr(>|z|): p-Wert des Wald-Tests; 2,5 % und 97,5 %: 95 % Konfidenzintervalle.

Tab. 27: Vergleich von verschiedenen logistischen Regressionsmodellen ohne Interaktionen zur Berechnung der Einflüsse der erklärenden Variablen auf die Zielvariable in den Wahlversuchen mit dem „likelihood ratio“ Test durch Deletion einzelner Variablen (single term deletion). Die binären logistischen Regressionen wurden mit der freien Statistiksoftware R berechnet.

Single term deletions					
Model:					
E ~ G + BAf + Df + M + PO					
Variablen	df	Deviance	AIC	LRT	Pr(>Chi)
<none>		6775,2	6793,2		
G	1	6838,4	6854,4	63,2	1,881e-15
BAf	2	6994,9	7008,9	219,7	< 2,2e-16
Df	1	6785,2	6801,2	9,9	0,001615
M	1	11839,7	11855,7	5064,5	< 2,2e-16
PO	3	7816,4	7828,4	1041,2	< 2,2e-16

Erläuterungen: none: ohne Restriktionen; E: Zielvariable; G: Geschlecht (M: Männchen, W: Weibchen); BAf: Belagsalterung (1 oder 2 Wochen); Df: Tag der Wirksamkeitskontrolle (1. Oder 7. d p.a.); PO: Prüfoberflächen (Sperrholz, Tapete, Teppich, Hornitex®). **Ergebnisse:** df: data frame, Anzahl der Vektoren; Deviance: Devianz; AIC: Akaikes Informationskriterium; LRT: Likelihood Quotienten (ratio) Test; Pr(>Chi): p-Wert des LRT (Chi²-verteilt).

Tab. 28: Berechnung eines Generalisierten Logistischen Modells (GLM) ohne Interaktionen mit allen Variablen im Wahlversuch. Die Einflüsse der erklärenden Variablen auf die Zielvariable (schwere Schädigung von *Cimex lectularius*) in den Wahlversuchen zwischen dem wirkstoffsensiblen UBA-Stamm und dem AS Feldstamm auf der Prüfoberfläche Tapete mit Insektizid A wurden mittels binärer logistischer Regression mit der freien Statistiksoftware R berechnet.

Call:							
glm(formula = E ~ AS + G + BAf + Df, family = binomial(link = logit))							
Deviance Residuals:							
Min	1Q	Median	3Q	Max			
-3,2997	0,1036	0,1426	0,7167	1,1112			
Coefficients:							
Variablen	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)	Odds Ratio	2,5 %	97,5 %
(Intercept)	5,43959	0,30593	17,780	< 2e-16	230,3469853	1,308062e+02	437,05769284
AS-Samm	-4,21128	0,27776	-15,162	< 2e-16	0,01482736	8,209014e-03	0,02458663
GW	-0,21448	0,12520	-1,713	0,0867	0,80696279	6,311080e-01	1,03120357
BAf1	-0,75788	0,16517	-4,588	4,47e-06	0,46865875	3,386678e-01	0,64740684
BAf2	-0,76290	0,14695	-5,192	2,08e-07	0,46631397	3,489439e-01	0,62097768
Df7	-0,09316	0,12504	-0,745	0,4563	0,91104838	7,128524e-01	1,16404189

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

Null deviance: 2256,0 on 2639 degrees of freedom

Residual deviance: 1542,3 on 2634 degrees of freedom

(1 observation deleted due to missingness)

AIC (Akaikes Informationskriterium): 1554,3

Number of Fisher Scoring iterations: 7

Erläuterungen: Intercept: Achsenabschnitt; E: Zielvariable; G: Geschlecht (M: Männchen, W: Weibchen); BAf: Belagsalterung (1 oder 2 Wochen); Df: Tag der Wirksamkeitskontrolle (1. Oder 7. d p.a.); AS: AS-Feldstamm. **Ergebnisse:** Min: Minimum; Max: Maximum; 1Q: 1. Quartil; 3Q: 3. Quartil; Estimate: Interaktionskoeffizient; Std. Error: Standardabweichung; z value: Ergebnisse des Wald-Ttests (hier dem T-Test äquivalent); Pr(>|z|): p-Wert des Wald-Tests; 2,5 % und 97,5 %: 95 % Konfidenzintervalle.

Tab. 29: Berechnung eines Generalisierten Logistischen Modells (GLM) ohne Interaktionen im Wahlversuch, ohne die Variable 7 Tage post Applikation. Die Einflüsse der erklärenden Variablen auf die Zielvariable (schwere Schädigung von *Cimex lectularius*) in den Wahlversuchen zwischen dem wirkstoffsensiblen UBA-Stamm und dem AS Feldstamm auf der Prüfoberfläche Tapete mit Insektizid A wurden mittels binärer logistischer Regression mit der freien Statistiksoftware R berechnet.

Call:

```
glm(formula = E ~ AS + G + BAf, family = binomial(link = logit))
```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-3,2861	0,1059	0,1392	0,7361	1,0921

Coefficients:

Variablen	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)	Odds Ratio	2,5 %	97,5 %
(Intercept)	5,3947	0,2995	18,010	< 2e-16	220,23767675	1,267728e+02	413,17988969
AS-Stamm	-4,2135	0,2778	-15,170	< 2e-16	0,01479511	8,191177e-03	0,02453307
GW	-0,2148	0,1252	-1,716	0,0862	0,80674009	6,309739e-01	1,03085414
BAf1	-0,7571	0,1651	-4,585	4,54e-06	0,46903442	3,389694e-01	0,64787146
BAf2	-0,7626	0,1469	-5,191	2,10e-07	0,46645434	3,490699e-01	0,62112903

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

Null deviance: 2256,0 on 2639 degrees of freedom

Residual deviance: 1542,8 on 2635 degrees of freedom

(1 observation deleted due to missingness)

AIC (Akaike Informationskriterium): 1552,8

Number of Fisher Scoring iterations: 7

Erläuterungen: **Intercept:** Achsenabschnitt; **E:** Zielvariable; **G:** Geschlecht (**M:** Männchen, **W:** Weibchen); **BAf:** Belagsalterung (1 oder 2 Wochen); **Df:** Tag der Wirksamkeitskontrolle (1. Oder 7. d p.a.); **AS:** AS-Feldstamm. **Ergebnisse:** **Min:** Minimum; **Max:** Maximum; **1Q:** 1. Quartil; **3Q:** 3. Quartil; **Estimate:** Interaktionskoeffizient; **Std. Error:** Standardabweichung; **z value:** Ergebnisse des Wald-Ttests (hier dem T-Test äquivalent); **Pr(>|z|):** p-Wert des Wald-Tests; **2,5 %** und **97,5 %:** 95 % Konfidenzintervalle.

8.5 Wirksamkeitsprüfung des Insektizids A im UBA-Zwangversuch

8.5.1 p-Werte aus der Berechnung mittels mid-p-Variante

Tab. 30: Statistische Unterschiede zwischen dem sensiblen UBA-Stamm und dem AS-Feldstamm innerhalb der UBA-Zwangversuche mit Insektizid A auf Tapete. Berechnet mittels mid-p-Variante des Exakten Vierfeldertafeltests nach Fisher ($\alpha = 0,05$), Korrektur mittels Bonferroni-Holm-Prozedur.

Korrigierte p-Werte	
Zwangversuch AS vs UBA	UBA AS
Insektizid A TA kB 2 h	16,156800
Insektizid A TA 1WB 2 h	1,889620
Insektizid A TA 2WB 2 h	7,771950
Insektizid A TA kB 4 h	4,038600
Insektizid A TA 1WB 4 h	16,156800
Insektizid A TA 2WB 4 h	7,771950
Insektizid A TA kB 24 h	8,000190
Insektizid A TA 1WB 24 h	16,156800
Insektizid A TA 2WB 24 h	4,038600

Erläuterungen: **BA:** Belagsalterung, **kB:** keine Belagsalterung, **1WB:** eine Woche Belagsalterung, **2WB:** zwei Wochen Belagsalterung; **TA:** Tapete.

Tab. 31: Statistische Unterschiede zwischen der Wirksamkeit von Insektizid A im UBA-Zwangsversuch gegen den sensiblen UBA-Stamm und den AS-Feldstamm nach den verschiedenen Einwirkzeiten und Belagsalterungen. Berechnet mit der mid-p-Variante des Exakten Vierfeldertafeltests nach Fisher ($\alpha = 0,05$). Korrektur mittels Bonferroni-Holm-Prozedur.

Zwangsversuch UBA vs AS	Korrigierte p-Werte		
	kB	kB	1WB
	1WB	2WB	2WB
AS Insektizid A TA 2 h	24,102000	37,483200	37,360400
AS Insektizid A TA 4 h	35,332200	37,483200	37,483200
AS Insektizid A TA 24 h	37,483200	37,483200	35,332200
UBA Insektizid A TA 2 h	37,483200	37,483200	37,483200
UBA Insektizid A TA 4 h	37,483200	37,483200	37,483200
UBA Insektizid A TA 24 h	37,483200	37,483200	37,483200
	2 h	2 h	4 h
	4 h	24 h	24 h
AS Insektizid A TA kB	35,332200	37,483200	37,483200
AS Insektizid A TA 1WB	24,102000	24,102000	37,483200
AS Insektizid A TA 2WB	37,483200	37,483200	37,483200
UBA Insektizid A TA kB	37,483200	37,483200	37,483200
UBA Insektizid A TA 1WB	37,483200	37,483200	37,483200
UBA Insektizid A TA 2WB	37,483200	37,483200	37,483200

Erläuterungen: **BA:** Belagsalterung, **kB:** keine Belagsalterung, **1WB:** eine Woche Belagsalterung, **2WB:** zwei Wochen Belagsalterung; **TA:** Tapete.

Tab. 32: Statistische Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen *Cimex lectularius* sowie zwischen der Wirksamkeitskontrolle zu den Zeitpunkten 24 h p.a. und 7 d p.a. innerhalb der UBA-Zwangsversuche mit Insektizid A auf Tapete. Berechnet mit der mid-p-Variante des Exakten Vierfeldertafeltests nach Fisher ($\alpha = 0,05$). Korrektur mittels Bonferroni-Holm-Prozedur.

Zwangsversuch AS vs UBA	Korrigierte p-Werte	
	Weibchen	24 h p.a.
	Männchen	7 d p.a.
AS Insektizid A TA kB 2 h	34,453300	1,447200
AS Insektizid A TA kB 4 h	29,668800	37,483200
AS Insektizid A TA kB 24 h	37,483200	37,483200
UBA Insektizid A TA kB 2 h	37,483200	37,483200
UBA Insektizid A TA kB 4 h	37,483200	37,483200
UBA Insektizid A TA kB 24 h	22,750000	37,483200

Erläuterungen: **BA:** Belagsalterung, **kB:** keine Belagsalterung, **1WB:** eine Woche Belagsalterung, **2WB:** zwei Wochen Belagsalterung; **TA:** Tapete; **p.a.:** post Applikation.

8.5.2 Berechnung mittels binärer logistischer Regression

Tab. 33: Berechnung eines Generalisierten Logistischen Modells (GLM) ohne Interaktionen im Zwangsversuch. Die Einflüsse der erklärenden Variablen auf die Zielvariable (schwere Schädigung von *Cimex lectularius*) in den UBA-Zwangsversuchen zwischen dem wirkstoffsensiblen UBA-Stamm und dem AS Feldstamm auf der Prüfoberfläche Tapete mit Insektizid A wurden mittels binärer logistischer Regression mit der freien Statistiksoftware R berechnet.

Call:							
glm(formula = E ~ relevel(S, 2) + Df + EWZ, family = binomial(link = logit))							
Deviance Residuals:							
Min	1Q	Median	3Q	Max			
-2,48515	0,00004	0,00007	0,47337	0,73798			
Coefficients:							
Variablen	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)	Odds Ratio	2,5 %	97,5 %
Intercept	19,80755	678,59773	0,029	0,97671	4,002319e+08	1,904791e-02	1,406664e+11
AS-Stamm	-18,72861	678,59773	-0,028	0,97798	7,349706e-09	2,091179e-118	1,544309e+02
Df7	0,97076	0,24742	3,924	8,72e-05	2,639951e+00	1,642077e+00	4,346154e+00
EWZ	0,04132	0,01355	3,049	0,00229	1,042182e+00	1,015924e+00	1,071656e+00

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

Null deviance: 648,78 on 1297 degrees of freedom

Residual deviance: 491,70 on 1294 degrees of freedom

AIC (Akaike Informationskriterium): 499,7

Number of Fisher Scoring iterations: 19

Erläuterungen: **Intercept:** Achsenabschnitt; **E:** Zielvariable; **Df:** Tag der Wirksamkeitskontrolle (1. Oder 7. d p.a.); **relevel(S, 3)A:** AS-Feldstamm; **EWZ:** Einwirkzeit. Ergebnisse: **Min:** Minimum; **Max:** Maximum; **1Q:** 1. Quartil; **3Q:** 3. Quartil; **Estimate:** Interaktionskoeffizient; **Std. Error:** Standardabweichung; **z value:** Ergebnisse des Wald-Ttests (hier dem T-Test äquivalent); **Pr(>|z|):** p-Wert des Wald-Tests; **2,5 %** und **97,5 %:** 95 % Konfidenzintervalle.

Tab. 34: Vergleich von verschiedenen logistischen Regressionsmodellen ohne Interaktionen zur Berechnung der Einflüsse der erklärenden Variablen auf die Zielvariable in den UBA-Zwangsversuchen mit dem „likelihood ratio“ Test, durch Deletion einzelner Variablen (single term deletion). Die binären logistischen Regressionen wurden mit der freien Statistiksoftware R berechnet.

Single term deletions					
Model:					
E ~ relevel(S, 2) + G + BAf + Df + EWZ					
Variablen	df	Deviance	AIC	LRT	Pr(>Chi)
none		488.86	502.86		
AS-Stamm	1	621.68	633.68	132.813	< 2.2e-16
G	1	489.20	501.20	0.341	0.559091
BAf	2	491.36	501.36	2.497	0.286882
Df	1	505.52	517.52	16.653	4.487e-05
EWZ	1	499.43	511.43	10.563	0.001154

Erläuterungen: **none:** ohne Restriktionen; **E:** Zielvariable; **G:** Geschlecht (**M:** Männchen, **W:** Weibchen); **BAf:** Belagsalterung (1 oder 2 Wochen); **Df:** Tag der Wirksamkeitskontrolle (1. Oder 7. d p.a.). **Ergebnisse:** **df:** data frame, Anzahl der Vektoren; **Deviance:** Devianz; **AIC:** Akaike Informationskriterium; **LRT:** Likelihood Quotienten (ratio) Test; **Pr(>Chi):** p-Wert des LRT (Chi²-verteilt).

8.6 Vergleich der Schädigungsrate von männlichen und weiblichen *C. lectularius* des AS-Stamms im Wahl- und Zwangsversuch

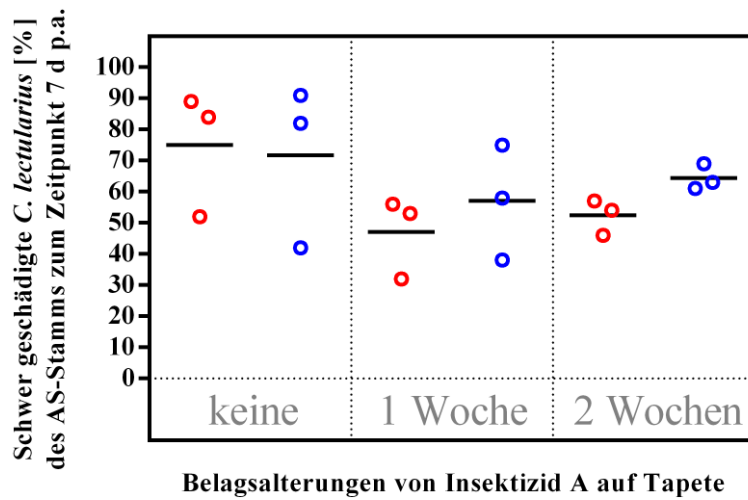


Abb. 64: Vergleich der Schädigungsrate männlicher und weiblicher *Cimex lectularius* des AS-Stamms im Wahlversuch unter der Verwendung von Insektizid A auf Tapete.

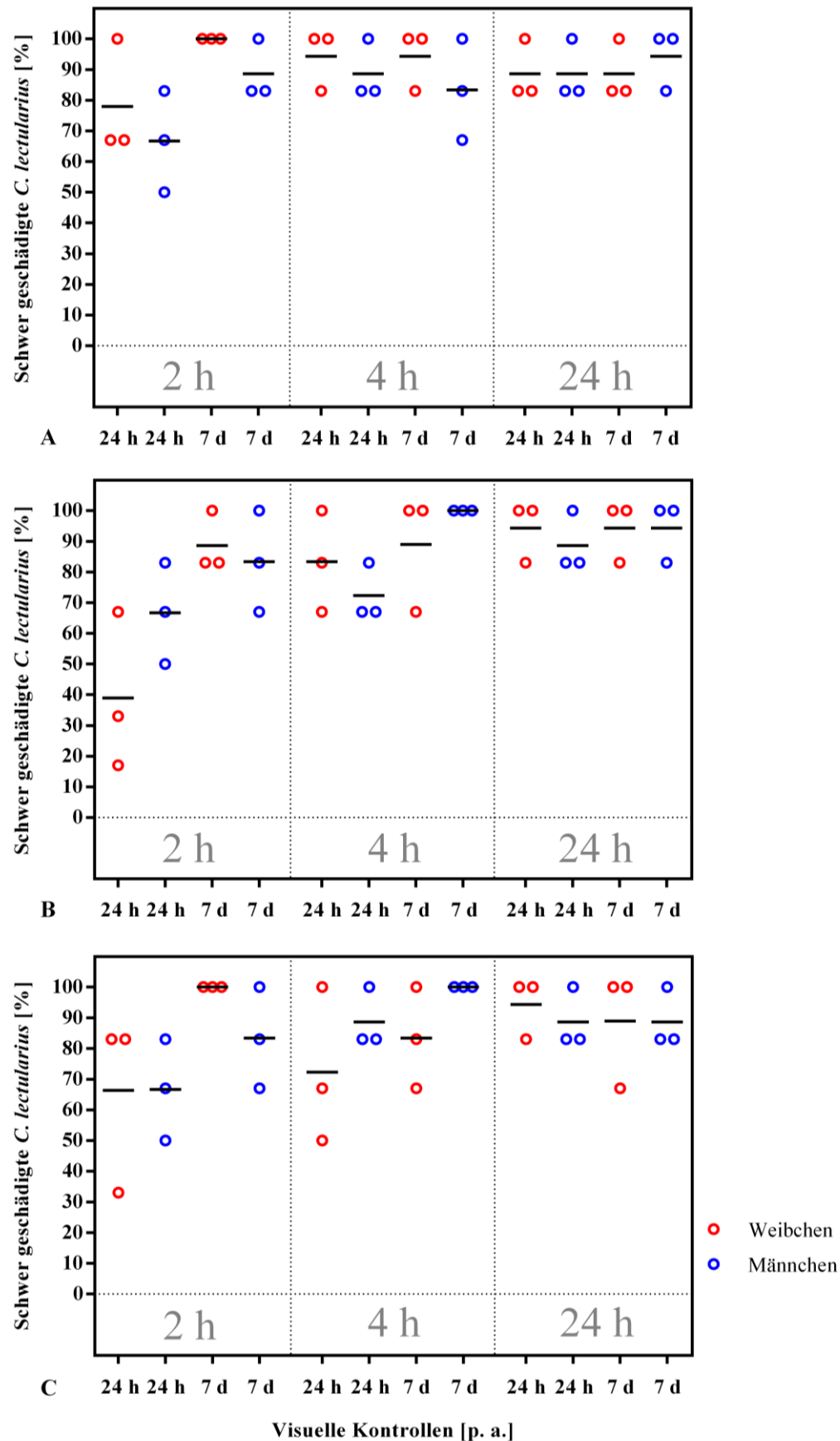
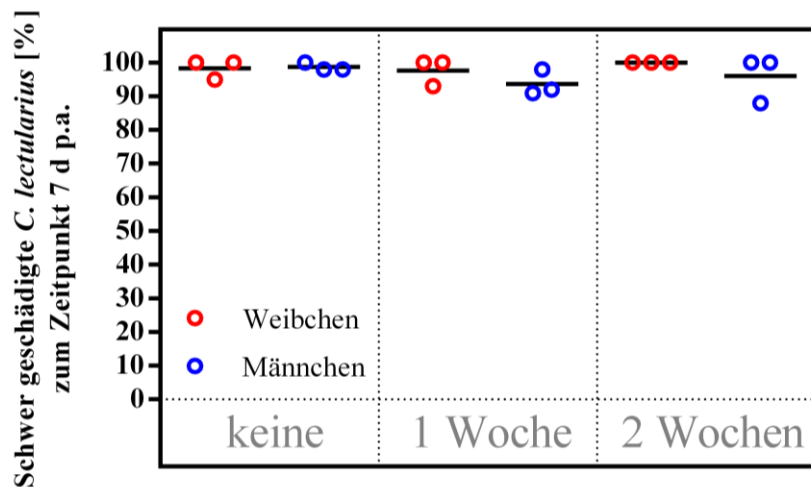
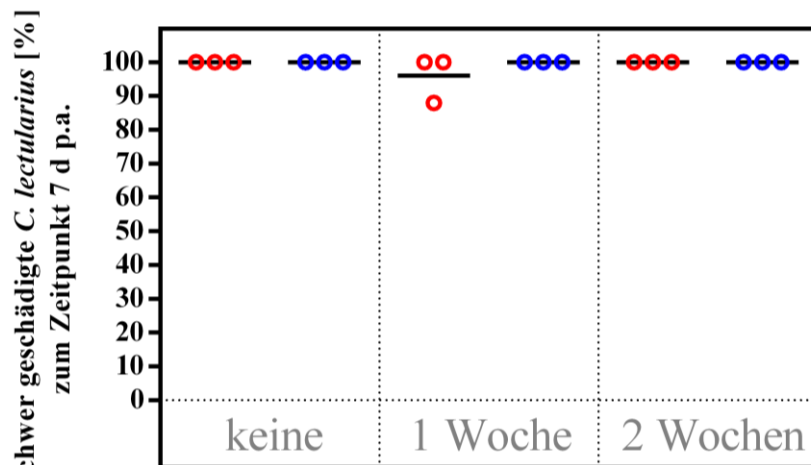


Abb. 65: Vergleich der Schädigungsrate männlicher und weiblicher *Cimex lectularius* des AS-Stamms im UBA-Zwangsversuch, unter der Verwendung von Insektizid A auf Tapete. **A** keine, **B** eine Woche und **C** zwei Wochen Belagsalterung.

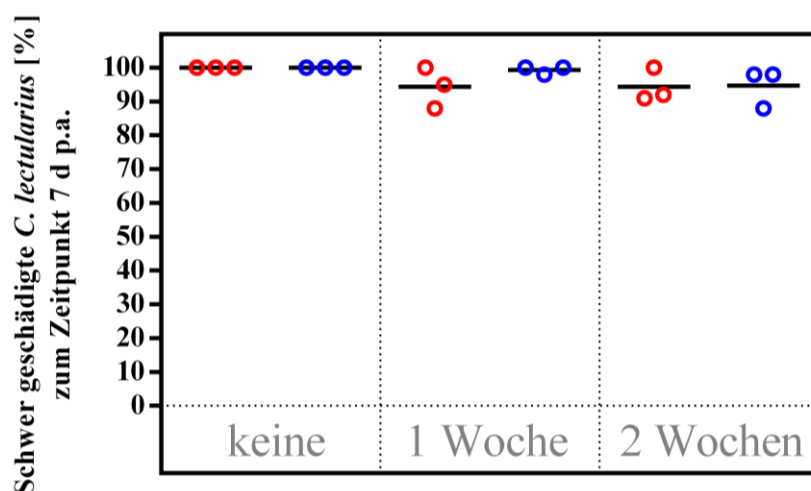
8.7 Vergleich der Schädigungsrate männlicher und weiblicher *C. lectularius* des UBA-Stamms im Wahlversuch



A Belagsalterungen von Insektizid A auf Teppich



B Belagsalterungen von Insektizid A auf Hornitex[®]



C Belagsalterungen von Insektizid A auf Sperrholz

Abb. 66: Vergleich der Schädigungsrate männlicher und weiblicher *Cimex lectularius* im Wahlversuch unter der Verwendung von Insektizid A auf A Teppich, B Hornitex[®], C Sperrholz.

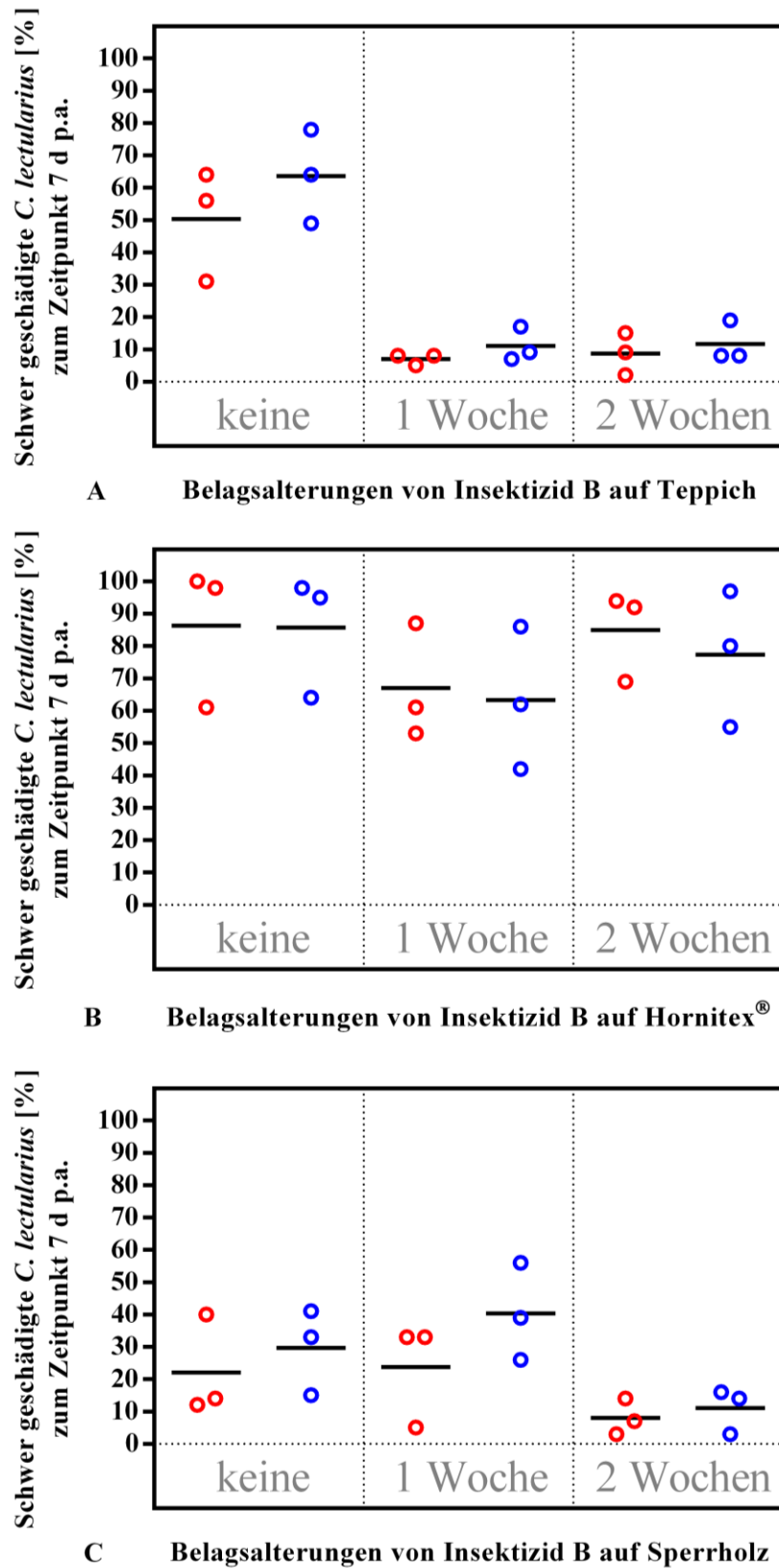


Abb. 67: Vergleich der Schädigungsrate männlicher und weiblicher *Cimex lectularius* im Wahlversuch unter der Verwendung von Insektizid B auf **A** Teppich und **B** Hornitex® und **C** Sperrholz.

8.8 Gesamttierzahl aus der Aufzucht von *C. lectularius* mittels artifizieller Blutfütterung

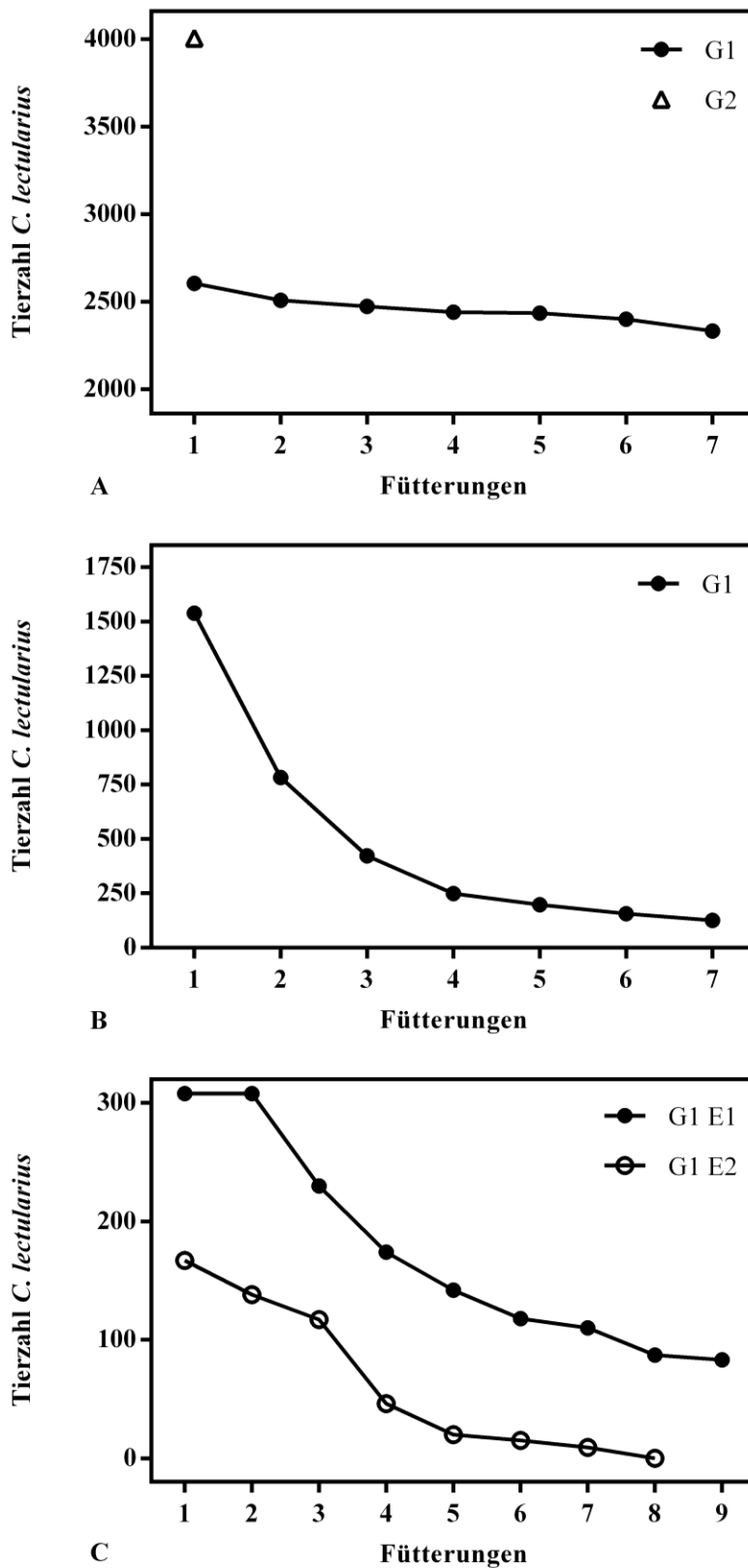


Abb. 68: Gesamttierzahl aus der Aufzucht von *Cimex lectularius* **A** *in vivo* am Kaninchen sowie mittels artifizieller Fütterung mit **B** Rinderblut und **C** Schafsblut.

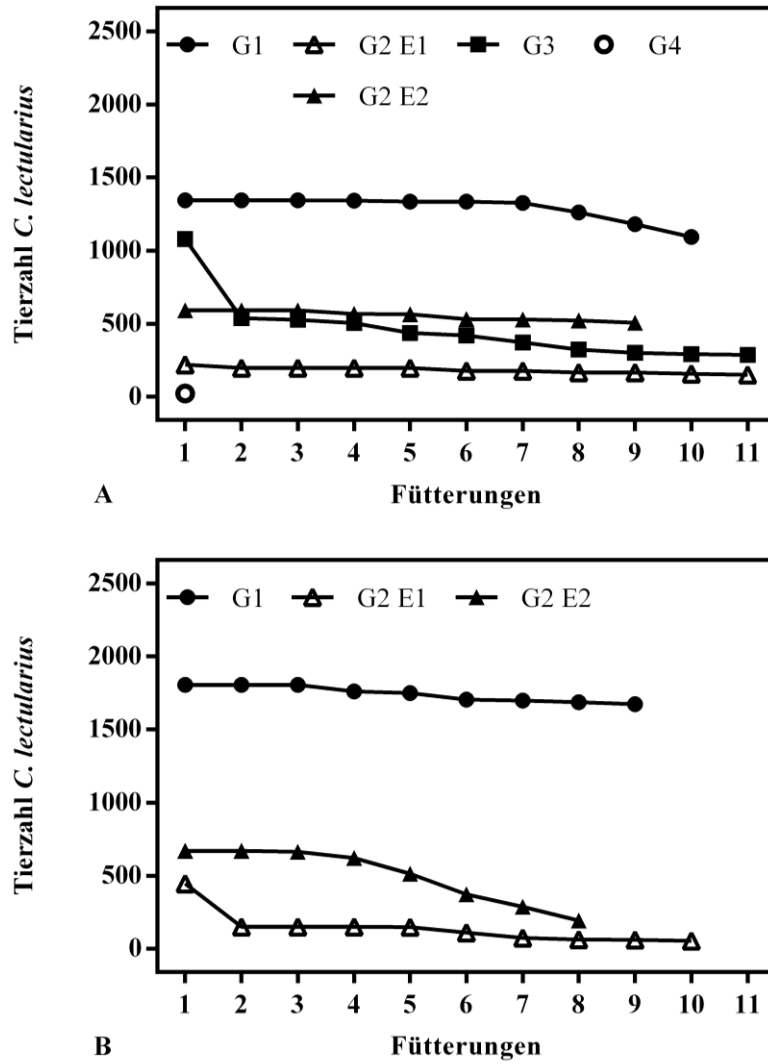




Abb. 69: Gesamtanzahl aus der Aufzucht von *Cimex lectularius* mittels artifizierlicher Fütterung mit Schweineblut, Ansätze A (A) und B (B).

8.9 Fragenkatalog zur aktuellen Bettwanzensituation in Deutschland





**Fragenkatalog zur aktuellen Bettwanzensituation in Deutschland
- Eine Bettwanzenstatistik für Deutschland -**

Im Rahmen eines Forschungsvorhabens hat das Umweltbundesamt 2010 eine Erfassung der Bettwanzenbekämpfungen pro Jahr begonnen, um die Bettwanzensituation in Deutschland darzustellen.

Ich danke den Firmen, die sich schon einmal für unsere Umfrage Zeit genommen haben. Leider haben wir noch nicht genügend Daten um eine statistische Auswertung durchzuführen.

Dies möchte ich zusammen mit Ihrer Hilfe gerne ändern!

Ich bitte Sie deshalb erneut, die folgenden Fragen so detailliert wie möglich zu beantworten und den Fragenkatalog anschließend an mich zurückzusenden! Sie können den Fragebogen direkt am Computer ausfüllen oder ausdrucken, ausfüllen und per Fax zurückschicken. Die Daten werden selbstverständlich in anonymisierter Form dargestellt und Ihnen nach einer Auswertung gerne zur Verfügung gestellt.

Sollten Sie sich von dieser Umfrage nicht angesprochen fühlen, da Sie keine Bettwanzenbekämpfungen durchführen, würde ich Sie bitten das entsprechende Feld auf dem angehängten Fragenkatalog anzukreuzen und an mich zurückzusenden, damit ich Ihnen keine weiteren Exemplare zukommen lasse. Eine kurze Rückmeldung per Mail genügt ebenfalls.

Vielen Dank für Ihre Mühen!

Arlette Vander Pan

Umweltbundesamt (UBA)
 Fachgebiet IV 1.4
 Fon: 030 / 8903 1351
 E-Mail: arlette.boyer@uba.de
www.umweltbundesamt.de

Abb. 70: Fragenkatalog zur aktuellen Bettwanzensituation in Deutschland.

Fragenkatalog – Bettwanzeneinsätze

Die Daten werden selbstverständlich in anonymisierter Form dargestellt. Für die deutschlandweite Auswertung benötige ich aber immer den **Firmennamen**, um die Ergebnisse der jeweiligen Stadt oder dem jeweiligen Bundesland zuordnen zu können. Die Firmen mit verschiedenen Standorten bitte ich zudem ihre Bettwanzenbekämpfungen pro Jahr bundeslandspezifisch anzugeben und nicht für ganz Deutschland zusammenzufassen.

Firma:

- Bettwanzenbekämpfung gehört nicht zu meinem Arbeitsfeld, deshalb kann ich diesen Fragebogen nicht ausfüllen!**

1.) Anzahl der Bettwanzenbekämpfungen ab dem Jahr 2008:

Jahr	Anzahl der durchschnittlich im Jahr getätigten Bekämpfungen		
	Private Haushalte	Gewerbliche Einrichtungen (Hotels, Restaurants, öffentliche Verkehrsmittel, usw.)	Medizinische Einrichtungen (Krankenhäuser, Altersheime, usw.)
2008			
2009			
2010			
2011			
2012			
2013			

2.) Falls vorhanden, Anzahl der Bettwanzenbekämpfungen vor 2008:

Jahr	Anzahl der durchschnittlich im Jahr getätigten Bekämpfungen		
	Private Haushalte	Gewerbliche Einrichtungen (Hotels, Restaurants, öffentliche Verkehrsmittel, usw.)	Medizinische Einrichtungen (Krankenhäuser, Altersheime, usw.)
■			
■			
■			

Seite 1

Fortsetzung Abb. 70: Fragenkatalog zur aktuellen Bettwanzen Situation in Deutschland.

3.) Wie viele Behandlungen mussten im Durchschnitt pro Bekämpfung durchgeführt werden?

Bitte Wählen Sie aus!

4.) Welche Wirkstoffe und Insektizide verwenden Sie?

Welche <u>Wirkstoffe</u> bzw. Verfahren verwenden Sie?		Welche <u>Insektizide</u> bzw. Verfahren verwenden Sie bevorzugt? (Markenname)	Verdacht auf Resistenz?
Pyrethroid	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Carbamat	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Organophosphatverbindung	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Hitze	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Kälte	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Andere Mittel / Methoden	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

Vielen Dank für Ihre Unterstützung!

Seite 2