

**Aus dem Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

***In-vitro*-Fütterung von *Dermacentor reticulatus* und *Ixodes ricinus*
und Entwicklung eines teilautomatisierten Fütterungssystems für
Schildzecken**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Veterinärmedizin

an der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Bettina Böhme

Tierärztin

aus Waren (Müritz)

Berlin 2016

Journal-Nr.: 3870

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Prof. Dr. Peter-Henning Clausen
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Stefanie Becker
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jörg Aschenbach

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Dermacentor reticulatus, Ixodes ricinus, feeding, in vitro, membrane feeding, membranes, automation, blood meal, life cycle, irradiation, blood, mouthparts, diurnal activity

Tag der Promotion: 15.06.2016

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-772-9

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2016

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2016

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

*Für Sebastian
und
meine Familie*

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
TABELLENVERZEICHNIS	VIII
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATURÜBERSICHT	3
2.1 <i>Dermacentor reticulatus</i>	3
2.1.1 Systematische Einordnung	3
2.1.2 Vorkommen	3
2.1.3 Morphologie	5
2.1.4 Entwicklung	7
2.1.5 Veterinärmedizinische Bedeutung	11
2.2 <i>Ixodes ricinus</i>	12
2.2.1 Systematische Einordnung	12
2.2.2 Vorkommen	12
2.2.3 Morphologie	12
2.2.4 Entwicklung	13
2.2.5 Veterinärmedizinische Bedeutung	14
2.3 <i>In-vitro</i>-Fütterung	15
2.3.1 Geschichte der <i>In-vitro</i> -Fütterung	15
2.3.2 Anwendungen der <i>In-vitro</i> -Fütterung	23
3. MATERIAL UND METHODEN	25
3.1 Herkunft der Zecken	25
3.2 Längenmessung der Mundwerkzeuge von <i>I. ricinus</i> und <i>D. reticulatus</i>	26
3.3 <i>In-vitro</i>-Fütterungssysteme mit Silikonmembranen	27
3.3.1 Herstellung der Silikonmembranen	27
3.3.2 Fütterungssystem mit Zeckenkammern aus Plexiglas [®] , nach Kröber und Guerin (K+G Plexi)	29
3.3.3 Fütterungssystem mit Zeckenkammern aus Glas, modifiziert nach Kröber und Guerin (K+G Glas)	31

3.3.4 Durchfluss-Fütterungssystem aus Polystyrol (DFS PS)	32
3.3.5 Durchfluss-Fütterungssystem aus Glas (DFS Glas)	36
3.3.6 Fixierungsstimuli für Zeckenkammern mit Silikonmembranen	39
3.3.7 Versuchsdurchführung und Blutwechsel	41
3.4 <i>In-vitro</i>-Fütterungssystem mit Tierhäuten, nach Bonnet (FSB)	43
3.4.1 Präparation der Tierhäute	43
3.4.2 Aufbau des Fütterungssystems	44
3.4.3 Versuchsdurchführung und Blutwechsel	45
3.5 Futterblut	47
3.5.1 Rinderblut	47
3.5.2 Kaninchenblut	47
3.5.3 Transport, Lagerung, Blutzusätze und Bestrahlung	48
3.6 Aufbewahrung der Zecken nach der Fütterung und Überwachung ihrer Weiterentwicklung	49
3.7 Versuche zur <i>In-vitro</i>-Fütterung von <i>I. ricinus</i>	50
3.7.1 Versuche mit <i>I. ricinus</i> -Adulten	50
3.7.2 Versuche mit <i>I. ricinus</i> -Nymphen und -Larven	50
3.8 Versuche zur <i>In-vitro</i>-Fütterung von <i>D. reticulatus</i>	53
3.8.1 Versuche mit <i>D. reticulatus</i> -Adulten	53
3.8.2 Versuche mit <i>D. reticulatus</i> -Nymphen	56
3.8.3 Versuche mit <i>D. reticulatus</i> -Larven	56
3.9 <i>In-vivo</i>-Versuche mit <i>D. reticulatus</i>	60
3.10 Ermittlung des ungesogenen Gewichtes und des Critical Weight von <i>I. ricinus</i>- und <i>D. reticulatus</i>-Weibchen	60
3.11 Ermittlung von Eigewichten von <i>D. reticulatus</i>	61
3.12 Auswertung der Daten	61
4. ERGEBNISSE	63
4.1 Mundwerkzeu glängen	63
4.2 Ungesogenes Gewicht und Critical Weight von <i>I. ricinus</i>- und <i>D. reticulatus</i>-Weibchen	64
4.3 Versuche zur <i>In-vitro</i>-Fütterung von <i>I. ricinus</i>	64
4.3.1 Versuche mit <i>I. ricinus</i> -Adulten	64
4.3.2 Versuche mit <i>I. ricinus</i> -Nymphen und -Larven	67

4.4 Versuche zur <i>In-vitro</i>-Fütterung von <i>D. reticulatus</i>	68
4.4.1 Versuche mit <i>D. reticulatus</i> -Adulten	68
4.4.2 Versuche mit <i>D. reticulatus</i> -Nymphen	81
4.4.3 Versuche mit <i>D. reticulatus</i> -Larven	82
4.5 Tageszeiten des Vollsaugens und Ablösens von <i>I. ricinus</i> und <i>D. reticulatus</i>	83
4.6 Zusammenhang von Vollsauggewicht und Gelegegewicht von <i>D. reticulatus in vivo</i> und <i>in vitro</i>	84
4.7 Eigewichte von <i>D. reticulatus</i>	85
5. DISKUSSION	86
5.1 Zecken	86
5.2 Silikonmembranen	86
5.3 Futterblut	87
5.4 Fixierungsstimuli	87
5.5 Critical Weight	88
5.6 Versuche zur <i>In-vitro</i>-Fütterung von <i>I. ricinus</i>	89
5.6.1 <i>I. ricinus</i> -Adulte	89
5.6.2 <i>I. ricinus</i> -Juvenile	90
5.7 Versuche zur <i>In-vitro</i>-Fütterung von <i>D. reticulatus</i>	91
5.7.1 <i>D. reticulatus</i> -Adulte	91
5.7.2 <i>D. reticulatus</i> -Juvenile	96
5.8 Tageszeiten des Vollsaugens und Ablösens von <i>I. ricinus</i> und <i>D. reticulatus</i>	98
5.9 Zusammenhang von Vollsauggewicht und Gelegegewicht von <i>D. reticulatus in vivo</i> und <i>in vitro</i>	98
5.10 Eigewichte von <i>D. reticulatus</i>	99
5.11 Schlussfolgerung	99
6. ZUSAMMENFASSUNG	102
7. SUMMARY	104

8. LITERATURVERZEICHNIS	106
PUBLIKATIONEN	125
DANKSAGUNG	126
SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	127

Abkürzungsverzeichnis

σ	Standardabweichung
^{60}Co	Kobalt-60
<i>A.</i>	<i>Amblyomma</i>
Abb.	Abbildung
AD	Außendurchmesser
bzw.	beziehungsweise
CFU	keimbildende Einheiten (englisch: colony forming units)
CW	Critical Weight (siehe 3.10)
d	Tage
<i>D.</i>	<i>Dermacentor</i>
DCM	Dichlormethan
DFS Glas	Durchfluss-Fütterungssystem aus Glas
DFS PS	Durchfluss-Fütterungssystem aus Polystyrol
Dr-1A	1. Versuch mit <i>D. reticulatus</i> -Adulten
Dr-1N	1. Versuch mit <i>D. reticulatus</i> -Nymphen
Dr-1L	1. Versuch mit <i>D. reticulatus</i> -Larven
EKF	Eikonversionsfaktor
FSB	Fütterungssystem mit Tierhäuten, nach Bonnet
FU Berlin	Freie Universität Berlin
<i>I.</i>	<i>Ixodes</i>
ID	Innendurchmesser
Ir-1A	1. Versuch mit <i>I. ricinus</i> -Adulten
Ir-1N	1. Versuch mit <i>I. ricinus</i> -Nymphen
Ir-1L	1. Versuch mit <i>I. ricinus</i> -Larven
K+G Glas	Fütterungssystem nach Kröber und Guerin, mit Zeckenkammern aus Glas
K+G Plexi	Fütterungssystem nach Kröber und Guerin, mit Zeckenkammern aus Plexiglas®
NaCl	Natriumchlorid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (englisch: phosphate buffered saline)
PE	Polyethylen
PS	Polystyrol
<i>R.</i>	<i>Rhipicephalus</i>
rH	relative Luftfeuchtigkeit (englisch: relative humidity)
Tab.	Tabelle
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Adulte <i>D. reticulatus</i>	6
Abb. 2: Adulte <i>I. ricinus</i>	13
Abb. 3: Gatower Heide, Fangort für adulte <i>D. reticulatus</i>	25
Abb. 4: Mundwerkzeuglängenmessung von <i>I. ricinus</i>	27
Abb. 5: a: Zeckenkammer nach Kröber und Guerin, aus Plexiglas, mit Rinderhaaren und mit perforiertem Deckel; b: Zeckenkammer in 6-Well-Platte.....	30
Abb. 6: a: Zeckenkammer aus Glas; b: Zeckenkammer eingehängt in ein 50-ml-Becherglas	32
Abb. 7 a und b: Deckel, der bis 5–10 mm über die Membran geschoben wird	32
Abb. 8: Durchflusskammer aus Polystyrol; a: Schrägaufsicht; b: Detailansicht des Deckels; c: Durchflusskammer mit eingehängten Zeckenkammern aus Glas.....	33
Abb. 9: a: gekühlter Blutvorrat in der Flasche; b: Detailaufnahme der Glasflasche mit 2 Oliven und Silikonschläuchen	34
Abb. 10: a: Versuchsaufbau mit Durchflusskammer aus Polystyrol; b: Durchflusskammer aus Polystyrol, Erwärmung durch Heizplatte; mit 2 eingehängten Zeckenkammern aus Glas	35
Abb. 11 a und b: Glasdurchflusskammer aus Borosilikatglas mit abnehmbarem Deckel; zum Einhängen von 6 Zeckenkammern.....	37
Abb. 12: Schematischer Versuchsaufbau des Durchfluss-Fütterungssystems aus Glas (DFS Glas)	38
Abb. 13: Versuchsaufbau des Durchfluss-Fütterungssystems aus Glas (DFS Glas)	38
Abb. 14: Versuchsaufbau des <i>In-vitro</i> -Fütterungssystems mit Tierhäuten, nach Bonnet et al. (2007)	45
Abb. 15: Fütterungskammer nach Bonnet; a: große Kammer für adulte Zecken mit Kaninchenhaut; b: kleine Kammern für juvenile Zecken mit Mäusehaut.....	45
Abb. 16: Auswahl der statistischen Tests bei metrischen Daten.....	62
Abb. 17: Mittlere Hypostomlängen von <i>D. reticulatus</i> und <i>I. ricinus</i>	63
Abb. 18: Fixierungs- und Vollsaugraten von <i>I. ricinus</i> -Weibchen in <i>In-vitro</i> -Fütterungssystemen mit Silikonmembranen (K+G Plexi und K+G Glas).....	66
Abb. 19: Mittlere Vollsaug- und Gelegegewichte von <i>I. ricinus</i> -Weibchen in <i>In-vitro</i> -Fütterungssystemen mit Silikonmembranen (K+G Plexi und K+G Glas).....	66

Abb. 20: Fixierungs- und Vollsaugraten von <i>I. ricinus</i> -Juvenilen in <i>In-vitro</i> -Fütterungssystemen mit Silikonmembranen (K+G Plexi und K+G Glas), mit und ohne Moskitonetz als Fixierungsstimulus.....	67
Abb. 21: Verteilung der Vollsauggewichte von <i>I. ricinus</i> -Nymphen unter Berücksichtigung des Geschlechtes nach der Häutung.....	68
Abb. 22: Mittlere Vollsaugraten von <i>D. reticulatus</i> -Weibchen in der <i>In-vivo</i> - und <i>In-vitro</i> -Fütterung	70
Abb. 23: Mittlere Vollsaug-, Gelege- und Larvengewichte von <i>D. reticulatus</i> -Adulten in der <i>In-vivo</i> - und <i>In-vitro</i> -Fütterung.....	71
Abb. 24: Mittlere Vollsaug- und Gelege- und Larvengewichte unter Verwendung von frischem und zuvor tiefkühlgelagertem Futterblut in der <i>In-vitro</i> -Fütterung von <i>D. reticulatus</i> -Adulten	72
Abb. 25: Fixierungs- und Vollsaugraten von <i>D. reticulatus</i> -Weibchen bei den vier getesteten <i>In-vitro</i> -Fütterungssystemen	75
Abb. 26: Mittlere Vollsaug-, Gelege- und Larvengewichte der vier <i>In-vitro</i> -Fütterungssysteme für <i>D. reticulatus</i>	75
Abb. 27: Eikonversionsfaktor (EKF) und mittlere Larvenschlupfrate je Gelege der vier <i>In-vitro</i> -Fütterungssysteme für <i>D. reticulatus</i>	76
Abb. 28: Durchschnittliche Entwicklung der Keimzahl im verfütterten Blut in den drei Versuchsgruppen Futterblut mit Antibiotikum, Futterblut ohne Antibiotikum und Futterblut ohne Antibiotikum mit Gamma-Bestrahlung.....	78
Abb. 29: Eiablagerrate und Rate an larvenproduzierenden Weibchen bei <i>In-vitro</i> -Fütterungsversuchen mit <i>D. reticulatus</i> -Adulten zur Verfütterung von Blut ohne Antibiotikazugabe und mit Gamma-Bestrahlung.....	80
Abb. 30: Mittlere Vollsaug-, Gelege- und Larvengewichte der <i>In-vitro</i> -Fütterungsversuche mit <i>D. reticulatus</i> -Adulten zur Verfütterung von Blut ohne Antibiotikazugabe und mit Gamma-Bestrahlung	80
Abb. 31: Eikonversionsfaktor und mittlere Larvenschlupfrate je Gelege der <i>In-vitro</i> -Fütterungsversuche mit <i>D. reticulatus</i> -Adulten zur Verfütterung von Blut ohne Antibiotikazugabe und mit Gamma-Bestrahlung	81
Abb. 32: Zeitpunkt des Ablösens vollgesaugter Zecken von der Silikonmembran in der <i>In-vitro</i> -Fütterung.....	83
Abb. 33: Zusammenhang von Vollsauggewicht und Gelegegewicht in der <i>In-vivo</i> -Fütterung von <i>D. reticulatus</i>	84
Abb. 34: Zusammenhang von Vollsauggewicht und Gelegegewicht in der <i>In-vitro</i> -Fütterung von <i>D. reticulatus</i> (K+G Glas)	84

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: <i>In-vitro</i> -Fütterungsmethoden mit Ixodiden, bei denen sich mindestens ein Entwicklungsstadium ohne <i>In-vivo</i> -Vor- oder -Nachfütterung vollgesaugt hat	18
Tab. 2: Teilautomatisierte <i>In-vitro</i> -Fütterungssysteme für Schildzecken	21
Tab. 3: Fangorte von <i>I. ricinus</i> und <i>D. reticulatus</i> im Berliner Umland	26
Tab. 4: Versuche zur <i>In-vitro</i> -Fütterung von <i>I. ricinus</i> -Adulten mit Fütterungssystemen nach Kröber und Guerin aus Plexiglas (K+G Plexi) und aus Glas (K+G Glas)	51
Tab. 5: Versuche zur <i>In-vitro</i> -Fütterung von <i>I. ricinus</i> -Nymphen und -Larven mit Fütterungssystemen nach Kröber und Guerin aus Plexiglas (K+G Plexi) und aus Glas (K+G Glas)	52
Tab. 6: Versuche zur Verfütterung von tiefkühlgelagertem Blut in Fütterungssystemen nach Kröber und Guerin aus Plexiglas (K+G Plexi) und aus Glas (K+G Glas) mit <i>D. reticulatus</i> -Adulten	53
Tab. 7: Versuche zum Vergleich verschiedener Fütterungssysteme: K+G Glas (Fütterungssystem nach Kröber und Guerin, aus Glas), DFS PS (Durchfluss-Fütterungssystem aus Polystyrol), DFS Glas (Durchfluss-Fütterungssystem aus Glas), FSB (Fütterungssystem nach Bonnet) mit <i>D. reticulatus</i> -Adulten	54
Tab. 8: Versuche zur Verfütterung von Blut ohne Antibiotikazugabe und mit Gamma-Bestrahlung im Glas-Fütterungssystem nach Kröber und Guerin (K+G Glas) mit <i>D. reticulatus</i> -Adulten	55
Tab. 9: Versuche zur <i>In-vitro</i> -Fütterung von <i>D. reticulatus</i> -Nymphen mit den Fütterungssystemen nach Kröber und Guerin aus Glas (K+G Glas) und nach Bonnet (FSB)	57
Tab. 10: Versuche zur <i>In-vitro</i> -Fütterung von <i>D. reticulatus</i> -Larven mit den Fütterungssystemen nach Kröber und Guerin aus Glas (K+G Glas) und nach Bonnet (FSB)	58
Tab. 11: Mittlere Hypostomlängen von <i>D. reticulatus</i> und <i>I. ricinus</i>	63
Tab. 12: Ergebnisse der <i>In-vivo</i> - und <i>In-vitro</i> -Fütterungsversuche mit <i>D. reticulatus</i> -Adulten	70
Tab. 13: Ergebnisse der <i>In-vitro</i> -Fütterung von <i>D. reticulatus</i> -Adulten unter Verwendung von frischem und zuvor tiefkühlgelagertem Futterblut	72
Tab. 14: Ergebnisse der <i>In-vitro</i> -Fütterung von <i>D. reticulatus</i> -Adulten in vier verschiedenen Fütterungssystemen	74
Tab. 15: Ergebnisse der <i>In-vitro</i> -Fütterungsversuche mit <i>D. reticulatus</i> -Adulten zur Verfütterung von Blut ohne Antibiotikazugabe und mit Gamma-Bestrahlung	79

Tab. 16: Ergebnisse der <i>In-vitro</i> -Fütterung von <i>D. reticulatus</i> -Nymphen im Fütterungssystem mit Silikonmembranen (K+G Glas) und mit Tierhäuten (FSB).....	82
Tab. 17: Ergebnisse der <i>In-vitro</i> -Fütterung von <i>D. reticulatus</i> -Larven im Fütterungssystem mit Silikonmembranen (K+G Glas) und mit Tierhäuten (FSB).....	82

1. Einleitung

Schildzecken gehören weltweit zu den wichtigsten Vektoren für Pathogene von Menschen und Tieren. Sie übertragen unter anderem eine Vielzahl an Bakterien-, Viren- und Protozoenspezies (Jongejan et Uilenberg, 2004). Darüber hinaus können dem Wirtstier durch den Saugakt selbst direkte Schäden zugefügt werden, wie Anämie, Toxikosen oder Entzündungsreaktionen in der Haut bis hin zu Nekrosen (Uilenberg, 1992). Die Schwächung der Wirtstiere kann zu Gewichtsverlusten und verringerter Milchleistung führen; insbesondere bei einem massiven Befall können Tiere verenden. Schäden in der Haut reduzieren die Erträge aus der Lederverarbeitung. Ältere Schätzungen der durch Zecken weltweit verursachten wirtschaftlichen Verluste belaufen sich auf mehrere Milliarden US-Dollar jährlich (McCosker, 1979).

In Mitteleuropa gilt *Ixodes ricinus* als wichtigste und häufigste Zeckenspezies, gefolgt von *Dermacentor reticulatus*, bei der in den vergangenen Jahrzehnten eine starke Ausbreitung beobachtet wurde (Dautel et al., 2006; Karbowskiak, 2014). Die beiden Zeckenspezies stellen in Europa vor allem aufgrund ihres Vektorpotenzials eine Gefahr dar: Die Übertragung des Frühsommer-Meningoencephalitis-Virus, von verschiedenen Babesien- und Rickettsien-Spezies, von *Borrelia burgdorferi* und einer Reihe weiterer Erreger ist durch *I. ricinus* möglich (Petney et al., 2012).

Angesichts der Ausbreitung von Resistenzen gegenüber bisher gebräuchlichen Akariziden ist die Entwicklung und Testung neuer Akarizide oder potenzieller Impfstoff-Kandidaten unerlässlich (Kröber et Guerin, 2007a). Dafür wird eine große Anzahl an Zecken benötigt, die sich nur durch systematische Zucht im Labor erzielen lässt. Da es sich bei Ixodiden jedoch um obligat blutsaugende Parasiten handelt, ist eine dementsprechend große Zahl an Labortieren für deren Fütterung nötig. Kröber und Guerin (2007b) gehen von mehreren Zehntausend Versuchstieren aus, die jährlich in der Akarizidforschung verwendet werden. Eine erfolgreiche *In-vitro*-Fütterung von Zecken könnte den Verbrauch von Labortieren für die Zeckenzucht und Akarizidtestung erheblich reduzieren. Außerdem bietet die *In-vitro*-Fütterung mehrere potenzielle Vorteile. Sie ermöglicht unter anderem die Untersuchung des Saugaktes und dessen Beeinflussung. So können beim Saugakt an das Nährmedium abgegebene Substanzen oder Pathogene untersucht werden. Und nicht zuletzt erlaubt die *In-vitro*-Fütterung Infektionsversuche zum Aufklären von Vektorkompetenzen und Vorgängen der Pathogenübertragung oder die Untersuchung der Rolle von Zeckensymbionten.

Erste Versuche zur *In-vitro*-Fütterung von Schildzecken liegen bereits über 100 Jahre zurück (Hindle et Merriman, 1912). Seitdem gab es eine Reihe an Versuchen mit verschiedenen Fütterungssystemen und Schildzeckenspezies, die teilweise erfolgreich waren, aber sich bisher nie für den standardmäßigen Einsatz in der Laborzucht durchsetzen konnten. Eine Ursache dafür ist, dass die *In-vitro*-Fütterung von Schildzecken aufgrund der langen Saugdauer schwieriger ist als die Fütterung anderer hämatophager Arthropoden,

einschließlich Lederzecken, für die bereits zuverlässig funktionierende künstliche Fütterungssysteme existieren (Klunker, 1979).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ausgehend von einem der bisher erfolgreichsten *In-vitro*-Fütterungssysteme für Schildzecken (Kröber et Guerin, 2007a), erstmals die *In-vitro*-Fütterung aller drei Entwicklungsstadien von *D. reticulatus* zu realisieren. Dazu wurde zunächst die künstliche Fütterung aller Stadien von *I. ricinus* über eine Silikonmembran in unserem Labor etabliert und optimiert, da diese Spezies als wichtigste in Mitteleuropa gilt und sich durch ein breites Wirtsspektrum und lange Mundwerkzeuge für die *In-vitro*-Fütterung eignet. Im Folgenden sollten Parameter der *In-vitro*-Fütterung so angepasst werden, dass Larven, Nymphen und Adulte von *D. reticulatus* zur erfolgreichen Blutaufnahme gebracht werden. Getestete Parameter waren die Art der Membranen (Silikonmembranen oder Tierhäute), die Zusammensetzung und Dicke der Silikonmembranen, olfaktorische und mechanische Fixierungsstimuli, Spezies der Futterblutgewinnung sowie Zusätze zum Futterblut.

Anschließend wurden mit *D. reticulatus*-Adulten weitere Parameter systematisch getestet, um die *In-vitro*-Fütterung von Schildzecken zu optimieren und die Fütterung effizienter und weniger arbeitsintensiv zu gestalten, was als essenzielle Voraussetzung für deren routinemäßigen Einsatz in anderen Laboren anzusehen ist. In diesem Rahmen wurden die Verfütterung von gefrorenem und gammabestrahlttem Blut sowie die Verfütterung von Blut ohne Antibiotikazugabe und die Verwendung verschiedener Fütterungssysteme, einschließlich wartungsärmerer Durchflusskammern, untersucht.

2. Literaturübersicht

Im Folgenden wird zunächst die Biologie und die Bedeutung der beiden Schildzeckenspezies *Dermacentor reticulatus* und *Ixodes ricinus* dargestellt, wobei auf *Dermacentor reticulatus* detaillierter eingegangen wird, da in den eigenen Untersuchungen der Schwerpunkt auf diese Spezies gelegt wurde. Anschließend werden die bisherige Entwicklung der *In-vitro*-Fütterung sowie deren mögliche Anwendungen erörtert.

2.1 *Dermacentor reticulatus*

2.1.1 Systematische Einordnung

Zecken sind obligat blutsaugende Parasiten, die dem Stamm der Arthropoda (Gliederfüßer), der Klasse der Arachnida (Spinnentiere) und der Unterklasse der Acari (Milben im weiteren Sinne) angehören, wobei letztere die Milben im engeren Sinne und die Zecken umfasst. Sie gehören ferner zur Ordnung der Ixodida (Metastigmata), die drei Familien beinhaltet: die Argasidae (Lederzecken), die Nuttalliellidae (mit nur einer Spezies) und die Ixodidae (Schildzecken). Ein dorsales Schild (Scutum) ist kennzeichnend für die Ixodidae. Diese Zeckenfamilie unterteilt sich wiederum in 12 Gattungen, wovon eine – die Gattung *Ixodes* – zur Gruppe der Prostriata (Analfurche liegt vor dem Anus) und die restlichen 11 Gattungen zur Gruppe der Metastriata (Analfurche liegt hinter dem Anus oder ist nicht erkennbar) gehören (Keirans, 2009; Sonenshine, 2014). *Dermacentor reticulatus* trägt, Bezug nehmend auf ursprüngliche Fundorte, den Trivialnamen Auwaldzecke und gehört der Gattung *Dermacentor* und somit der Gruppe der Metastriata an.

2.1.2 Vorkommen

Geografische Verbreitung

Dermacentor reticulatus ist eine kältetolerante Zeckenspezies und kommt herdförmig in den gemäßigten und kühlen Klimazonen Europas und Asiens mit mittleren Jahresniederschlagsmengen von 400–1000 mm vor (Immler, 1973). Das Verbreitungsgebiet erstreckt sich dabei über einen Großteil der Länder von der Atlantikküste bis nach Sibirien, unter Auslassung Skandinaviens und des Mittelmeerraumes (Dautel et al., 2006). So wurde von Vorkommen in Großbritannien, Frankreich, Portugal, Spanien, Belgien, den Niederlanden, Deutschland, Schweiz, Österreich, Italien, Polen, der Tschechischen Republik,

der Slowakei, Ungarn, Kroatien, Serbien, Rumänien, der Republik Moldau, der Ukraine, Weißrussland, Litauen, Russland, Armenien und Kasachstan berichtet (Zahler, 1994; Meyer-König, 1999; Weis, 2014).

Ein Vorkommen von *D. reticulatus* in Deutschland wurde erstmals 1882 durch Haller erwähnt. Er beschreibt den Fund einer Zeckenspezies auf Pferd, Wolf und anderen Wirtstieren in Württemberg, die er *Pseudixodes holsatus* F. nennt und die einen deutlichen nach hinten gerichteten Sporn an den Palpen aufweist, sodass es sich hierbei um *D. reticulatus* handeln muss (Liebisch et Rahman, 1976). Das Vorkommen wurde später durch den Fund eines *D. reticulatus*-Weibchens im Schönbuch bei Tübingen bestätigt (Vogel, 1924). Bei Berichten von *D. reticulatus* im Maintal (Schulze, 1925) handelt es sich laut Immler (1973) hingegen um *D. marginatus*. Es ist anzumerken, dass die Taxonomie der heutigen *Dermacentor*-Spezies bis in die erste Hälfte des vergangenen Jahrhunderts uneinheitlich war und es zu Verwechslungen der Spezies oder fehlerhaften Artzuweisungen in der Literatur kam (Schulze, 1933; Enigk, 1958; Immler, 1973). Einige Autoren verwendeten synonym für *D. reticulatus* unter anderem die Artbezeichnung *Dermacentor pictus* (Hermann, 1804) (Enigk, 1958; Arthur, 1960). Es folgten Funde von *D. reticulatus* an der Elbe bei Dessau (Eichler, 1959), in Lehnin bei Potsdam (Negrobov et Borodin, 1964), am Rheinufer bei Basel (Immler et al., 1970; Immler, 1973) und erneut im Schönbuch bei Tübingen (Liebisch et Rahman, 1976). Daraus ist ersichtlich, dass es im Verlauf der hundert Jahre nach der ersten Erwähnung 1882 wiederholt, wenngleich vereinzelt, Berichte über *D. reticulatus*-Funde in Deutschland gab. In den folgenden Jahrzehnten kamen neue lokal abgegrenzte Vorkommen hinzu: bei München und Regensburg (Dennig et al., 1980; Zahler et al., 2000a; Zahler et al., 2000b), im Rheintal bei Breisach (Walter et al., 1986) und im Gebiet Offenburg/Lahr/Freiburg (Gothe et al., 1989; Gothe et Wegerdt, 1991; Gothe et Schmid, 1995), in der Düben-Dahlener und Annaburger Heide im Länderdreieck Brandenburg/Sachsen-Anhalt/Sachsen (Bauch et Danner, 1988; Bauch, 1990; Cornely et Schultz, 1992), bei Karlsruhe, Heidelberg und Braunschweig (Gothe et Schmid, 1995), in Berlin und Brandenburg, bei Magdeburg, bei Frankfurt am Main (Dautel et al., 2006; Menn, 2006), in der Umgebung von Erlangen (Dautel et al., 2006) und im Gebiet südwestlich von Saarbrücken (Beelitz et al., 2012). Inzwischen gibt es endemische Vorkommensgebiete der Zeckenspezies in den meisten Bundesländern Deutschlands (Rubel et al., 2014); lediglich in Mecklenburg-Vorpommern, Schleswig-Holstein, Nordrhein-Westfalen und den Stadtstaaten Hamburg und Freie Hansestadt Bremen fehlen bisher gesicherte Nachweise.

In den vergangenen Jahrzehnten hat demnach eine starke Ausbreitung der Zeckenspezies in Deutschland stattgefunden (Dautel et al., 2006; Petney et al., 2012; Karbowiak, 2014). Und dieser Trend, den Zahler und Gothe (1997b) und Gray et al. (2009) bereits voraussagten, lässt sich auch in anderen europäischen Ländern beobachten (Petney et al., 2012). So wurden ebenso in Polen, der Tschechischen Republik, der Slowakei und Ungarn neue endemische Vorkommensgebiete bekannt, sodass sich *D. reticulatus*, nach *I. ricinus*, in Zentraleuropa mittlerweile zur zweithäufigsten und -wichtigsten Zeckenspezies entwickelt hat (Karbowiak, 2014). Als möglicher Grund wurde neben der Zunahme des internationalen Reiseverkehrs von

Personen mit ihren Begleittieren, insbesondere Hunden, die globale Klimaerwärmung diskutiert (Dautel et al., 2006; Gray et al., 2009; Karbowiak, 2014): Ein Anstieg der Jahresdurchschnitts- und der mittleren Wintertemperatur sowie eine Verringerung der Anzahl an Frosttagen kann eine Überwinterung von Zecken und eine Verlängerung der Aktivitätsperiode von Adulten begünstigen. Ein weiterer Faktor könnte die in den 1990er Jahren beginnende Änderung in der Landnutzung gewesen sein; dabei kam es zu Fragmentierungen und Stilllegungen von großen zusammenhängenden Agrarflächen, zur Zunahme an Brachland, zu Aufforstungs- und Renaturierungsmaßnahmen, zur Einrichtung von Schutzgebieten und infolgedessen zur Zunahme an geeigneten Wirtstierpopulationen (Dautel et al., 2006; Karbowiak, 2014).

Habitate

Bei *D. reticulatus* handelt es sich um eine Zeckenspezies, die unberührte Biotope und feuchte Habitate bevorzugt. Sie kann in lichten Laubwäldern, auf mit Sträuchern oder Bäumen durchsetzten Wiesen, in Auwäldern und Sumpf- oder Ufergebieten vorkommen (Immler, 1973; Menn, 2006; Karbowiak, 2014). Dabei ist sie besonders häufig an Rändern von Wäldern, Wiesen, Wegen oder Gräben oder auf Waldlichtungen anzutreffen (Nosek, 1972; Szymanski, 1986; Hornok et Farkas, 2009).

Sie kann dennoch auch in trockenen und in anthropogen stark beeinflussten Gebieten, wie Kieferschonungen mit Land-Reitgras-Bewuchs (*Calamagrostis epigejos*) (Bauch et Danner, 1988; Cornely et Schultz, 1992), auf trockenen Weiden (Hornok et Farkas, 2009) oder in Parks (Zahler et al., 2000b; Karbowiak, 2014), auftreten. Wichtig für das Vorkommen der trockenheitsempfindlichen Spezies in einem Habitat ist das Vorhandensein einer bodenbedeckenden Kraut-, Moos- oder Streuschicht, die ein feuchtes und kühles Mikroklima gewährleistet, in das sich die Zecken bei ungünstigen Bedingungen zurückziehen können (Immler, 1973).

2.1.3 Morphologie

Als Vertreter der Ixodidae hat *D. reticulatus* den charakteristischen dorsoventral abgeplatteten, länglichen, ungegliederten Körper (Idiosoma) mit vier – und bei den Larven drei – Beinpaaren. Das Cuticularskelett ist auf der Dorsalfläche zu einem festen Rückenschild aus Chitin (Scutum) verstärkt, das bei den Männchen die gesamte Dorsalfläche und bei den Weibchen und Juvenilen etwa das vordere Drittel bedeckt und netzartig silbrig marmoriert ist (Abb. 1). Am Kaudalrand des Körpers weist *D. reticulatus* Einkerbungen (Festons) auf und lateral auf der Dorsalfläche, etwa auf Höhe der Coxae II, liegen die Augen (Arthur, 1960; Immler, 1973). Der Körper lässt sich in einen rostralen Bereich (Podosoma) mit Extremitäten und Genitalporus, der ventral auf Höhe der Coxae II liegt, und einen kaudalen Bereich (Opisthosoma) mit Stigmenplatten und Anus unterteilen. Die Stigmen liegen bei Adulten und Nymphen beidseitig hinter dem vierten Beinpaar und sind verbunden mit den Tracheen. Bei

Larven fehlen Stigmen und Tracheensystem; ihre Atmung erfolgt durch die Cuticula. Der Anus liegt ebenfalls ventral und wird kaudal durch die Analfurche flankiert (Deplazes et al., 2013; Sonenshine, 2014). Die Versorgung des Körpers erfolgt durch frei zirkulierende Hämolymphe (Sonenshine, 2014). Ungesogene Adulte können in Körpergröße und Gewicht erheblich variieren, liegen aber überwiegend zwischen 3 und 5 mm Körperlänge (Immler, 1973; Deplazes et al., 2013) und 3,5 und 5,5 mg (Zahler, 1994; Meyer-König, 1999). Nymphen von *D. reticulatus* sind etwa einen, Larven etwa einen halben Millimeter groß (Immler, 1973). Die gegliederten Extremitäten sind lang und kräftig und die Tarsen sind mit Doppelkrallen und Haftlappen (Pulvillen) ausgestattet (Arthur, 1960). An den Tarsen des ersten Beinpaars befindet sich darüber hinaus das Hallersche Organ – das für Wirtssuche und Pheromon- und Kairomonwahrnehmung essenzielle sensorische Organ der Ixodidae (Sonenshine, 2014).

Das Capitulum (Gnathosoma) setzt sich aus Basis capituli und den Mundwerkzeugen zusammen. Die Mundwerkzeuge von *D. reticulatus* sind verhältnismäßig kurz: Ventral liegt mittig das bezahnte Hypostom, welches dorsal von den paarig angelegten Chelizeren flankiert wird, die unter anderem mit Sensillen für die Wahrnehmung von Gewebsflüssigkeiten ausgestattet sind. Lateral schließen sich die beiden viergliedrigen und ebenfalls mit Sensillen versehenen Palpen an (Deplazes et al., 2013; Sonenshine, 2014).

Charakteristisch für die Spezies *D. reticulatus* ist, dass die Coxae I der Adulten jeweils einen langen internen und externen Sporn aufweisen und dadurch gespalten wirken. Außerdem weisen die zweiten Palpenglieder dorsolateral einen kaudal gerichteten Sporn auf (Immler, 1973; Zahler et Gothe, 1997a).



Abb. 1: Adulte *D. reticulatus*, Weibchen (links) und Männchen (rechts); © Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin, FU Berlin

2.1.4 Entwicklung

Lebenszyklus

Die Entwicklung der 3-wirtigen Zeckenspezies *D. reticulatus* verläuft über 4 Stadien: vom Adultenstadium über ein Eigelege und über ein Larven- und Nymphenstadium erneut zum Adultenstadium (Sonenshine, 2014). Dabei sind für jedes der drei aktiven Stadien Wirtssuche und Blutaufnahme für die Weiterentwicklung unerlässlich (Immler, 1973). Zwischen den parasitischen Phasen am Wirtstier erfolgt die Weiterentwicklung in Form von Häutung zum nächsten Stadium oder Eiablage in Bodennähe in der Vegetation (Immler, 1973).

Um einen Wirt zu finden, zeigen nüchterne *D. reticulatus*-Adulte ein exophiles Verhalten: Sie verlassen die schützende bodennahe Vegetations- oder Streuschicht und klettern an der Vegetation empor, um sich an der Spitze von Pflanzen oder kurz unterhalb der Spitze festzusetzen (Immler, 1973). Sie erreichen dabei eine Höhe von durchschnittlich 55 cm über dem Boden, was auch der Höhe potenzieller Wirtstiere entspricht (siehe 2.1.4, Wirtstiere) (Immler, 1973). Im Gegensatz zu „Jägern“ wie *Amblyomma*- oder *Hyalomma*-Spezies nehmen die Adulten von *D. reticulatus* als „Wegelagerer“ eine senkrechte Warteposition ein, wobei ihr Capitulum nach unten gerichtet ist und die Zecken mit allen vier oder den hinteren drei Beinpaaren die Pflanze umklammern (Immler, 1973). Tritt ein potenzieller Wirtsreiz auf – wie Erschütterung, ein plötzlicher Abfall der Lichtintensität (Schatten), CO₂, Wirtstiergeruch oder Wärme –, nimmt die Zecke eine Bereitschaftsstellung ein, bei der sie sich nur noch mit dem dritten Beinpaar festhält und die übrigen Beine vom Körper nach dorsal abspreizt, mit denen sie sich schließlich beim Vorbeistreichen eines Wirtes an diesem festhält (Lees, 1948; Immler, 1973; Waladde et Rice, 1982).

Auf dem Wirt sucht die Zecke nach einer geeigneten Fixierungsstelle, wobei thermische, olfaktorische, chemische und mechanische Stimuli bei der Wahl entscheidend sind (Lees, 1948; Waladde et Rice, 1982). Aggregations- und Fixierungspheromone, wie sie bei diversen *Amblyomma*-Spezies bekannt sind (Sonenshine et al., 1982; Sonenshine, 2004), wurden für *D. reticulatus* bisher nicht nachgewiesen, obgleich Nosek (1972) Clustern auf Wirtstieren beobachtet hat. Dongus (1994) schlussfolgerte aus ihren Untersuchungen, dass auch *D. reticulatus* spezies-spezifische Pheromone emittiert und isolierte die Substanz Isononylbenzol, deren Rolle jedoch noch unklar ist.

An einer geeigneten Stelle auf dem Wirt beginnt die Zecke, ihre Mundwerkzeuge in die Haut einzustechen und sich dort zu fixieren. Dazu werden mit den Chelizeren Schneidebewegungen ausgeführt und das Hypostom wird sukzessive in die Epidermis vorgeschoben. Dessen rückwärtsgerichtete Zähne und die Absonderung von Zement gewährleisten die Verankerung der Zecke. Die Palpen verbleiben abgespreizt auf der Hautoberfläche (Gregson, 1967; Kemp et al., 1982; Deplazes et al., 2013). Bereits kurze Zeit nach der Anheftung werden Sekrete aus den Speicheldrüsen abgegeben, die das Wirtsgewebe auflösen und die Blutgerinnung unterbinden, sodass eine blutgefüllte Lakune entsteht, aus der die Zecke Flüssigkeiten und Gewebsbestandteile aufnimmt. Saug- und Sekretionsphasen wechseln sich dabei ab (Gregson, 1967). Die Gewichtszunahme erfolgt zunächst langsam.

Diese erste Saugphase dauert mehrere Tage und es wird bei Weibchen etwa das 10- bis 13-Fache des ungesogenen Gewichtes zugenommen. In dieser Phase bereitet sich die Zecke durch Reifung der Speicheldrüsen und Zuwachs an Prokutikula auf die folgende starke Größenzunahme vor (Waladde et Rice, 1982; Kaufman, 2007; Deplazes et al., 2013). In der zweiten Saugphase, die 12–24 h dauert, werden große Mengen an Blut aufgenommen, das durch Ausscheidung von Flüssigkeit und Ionen über die Speicheldrüsen in der Zecke eingedickt wird. Die Gewichtszunahme der Weibchen kann mehr als das 100-Fache des ursprünglichen Körpergewichtes betragen (Kemp et al., 1982; Deplazes et al., 2013; Sonenshine, 2014).

Um sich vollzusaugen, benötigt ein *D. reticulatus*-Weibchen bei 20–28°C Umgebungstemperatur 7–15 Tage (Arthur, 1960; Honzakova, 1971; Nosek, 1972; Immler, 1973; Slovak et al., 2002; Simo et al., 2004). In dieser Zeit nehmen Weibchen eine Blutmenge von durchschnittlich 431 mg (332–530 mg) auf (Immler, 1973) und erreichen ein Repletionsgewicht von 250–476 mg (Sieberz et Gothe, 2000; Simo et al., 2004; Bartosik et Buczek, 2012).

Bei *D. reticulatus* nehmen sowohl Männchen als auch Weibchen Blut auf, wobei Männchen erheblich geringere Mengen saugen (Immler, 1973). Erst nach der Blutaufnahme sind die Männchen kopulationsfähig und können sich mit mehreren Weibchen paaren (Arthur, 1960; Nosek, 1972; Immler, 1973; Dongus, 1994). Die Paarung findet auf dem Wirt statt und ist Voraussetzung für das Vollsaugen der Weibchen. Saugt sich ein Weibchen nicht voll, kommt es in den meisten Fällen nicht zur Eiablage. Werden doch Eier abgelegt, geschieht dies oft verzögert und es werden geringe Mengen an unfruchtbaren Eiern abgelegt, aus denen folglich keine Larven schlüpfen (Enigk et Grittner, 1953; Immler, 1973).

Vollgesogene Weibchen fallen nach dem Ablösen vom Wirt in die Vegetation ab. Dort zeigen sie eine negative Phototaxis und suchen für die Eiablage bodennahe Vegetationsschichten auf (Lees, 1948; Immler, 1973). Präovipositions- und Ovipositionsdauer werden dabei wesentlich von der Umgebungstemperatur beeinflusst und verringern sich mit steigender Temperatur (Zahler, 1994). Die Angaben für Präovipositionszeiten liegen, je nach Temperatur, Jahreszeit und anderen Umgebungsbedingungen, zwischen 1 und 126 d (Metianu, 1951; Honzakova, 1971; Immler, 1973; Dusbábek et al., 1979; Slovak et al., 2002) (siehe auch 5.7.1), die Angaben der Ovipositionsdauern zwischen 6 und 25 d (Metianu, 1951; Arthur, 1960; Nosek, 1972; Immler, 1973), bzw. durchschnittlich 31,6 d (Sieberz et Gothe, 2000). Die Weibchen legen Gelege von 1500–6000 Eiern ab (Metianu, 1951; Arthur, 1960; Nosek, 1972; Immler, 1973; Sieberz et Gothe, 2000; Simo et al., 2004; Buczek et al., 2014) (siehe auch 5.7.1). Dabei werden im Mittel deutlich mehr als 50 % der Eier im ersten Ovipositionsdrittel abgelegt (Immler, 1973; Zahler, 1994; Zahler et Gothe, 1995b; Sieberz et Gothe, 2000).

In den Eiern findet anschließend eine Embryonalentwicklung statt, die bei 20–28°C und 90–100 % rH 10–38 d (Metianu, 1951; Arthur, 1960; Honzakova, 1971; Nosek, 1972; Immler, 1973; Slovak et al., 2002; Buczek et al., 2014) und in der Natur 47–80 d (Dusbábek et al., 1979) dauert. Bei 20–25°C und 90 % rH wird von Larvenschlupfraten von über 94 % berichtet (Immler, 1973; Zahler et Gothe, 1995a; Buczek et al., 2014).

Nach dem Schlupf der Larven vergehen zunächst 2–4 Tage, in denen ein Aushärten ihrer Kutikula stattfindet, bevor sie Wirtssuchverhalten zeigen (Metianu, 1951; Enigk et Grittner, 1953; Immler, 1973). Nüchterne Larven sind das Stadium, das am empfindlichsten für geringe Luftfeuchtigkeiten ist (Zahler, 1994; Zahler et Gothe, 1995a). Ihre Anpassung zeigt sich darin, dass sie, wie auch die Nymphen, und im Gegensatz zu den die Vegetation erklimmenden Adulten, endophil leben. Das heißt, dass sie sich in Bodennähe oder in den Höhlen ihrer Wirte – höhlenbewohnende Kleinsäuger – aufhalten, wo sie ein feuchteres und kühleres Mikroklima vorfinden (Immler, 1973). Haben die Larven ein Wirtstier gefunden, fixieren sie sich an ihm für 3–6 d zur Blutaufnahme (Nosek, 1972; Immler, 1973; Zahler et Gothe, 1995a; Slovak et al., 2002).

Nach dem Abfallen der vollgesaugten Larven durchlaufen diese am Boden eine Häutung zur Nymphe. Bis zur Häutung vergehen bei 20–28°C und 90–100 % rH 5–29 d (Metianu, 1951; Arthur, 1960; Honzakova, 1971; Nosek, 1972; Immler, 1973; Slovak et al., 2002) und in der Natur 10–23 d (Dusbábek et al., 1979). Laut Immler (1973) entwickelten sich unter diesen Bedingungen 98,6 % der vollgesogenen Larven zu Nymphen.

Die frisch geschlüpften *D. reticulatus*-Nymphen durchlaufen, wie die Larven, zunächst eine immobile Reifephase, in der die Kutikula aushärtet und die 3–7 d dauert (Metianu, 1951; Immler, 1973). Nach Finden eines geeigneten Wirtes beträgt die Saugdauer 3–12 d (Metianu, 1951; Arthur, 1960; Honzakova, 1971; Nosek, 1972; Immler, 1973; Slovak et al., 2002).

Vollgesogene Nymphen lösen sich vom Wirt ab und häuten sich in bodennaher Vegetation zu Adulten. Dies dauert unter oben genannten Laborbedingungen 10–31 d (Metianu, 1951; Arthur, 1960; Honzakova, 1971; Nosek, 1972; Immler, 1973; Slovak et al., 2002) und laut Dusbábek et al. (1979) in der Natur 26–47 d. Von den vollgesogenen Nymphen entwickelten sich bei Versuchen von Immler (1973) 97,9 % zu Adulten. 8–12 d nach der Häutung beginnen die Männchen und Weibchen, Wirtssuchverhalten zu zeigen (Metianu, 1951; Immler, 1973).

Für das Durchlaufen eines vollständigen Lebenszyklus von *D. reticulatus* im Labor bei 20–28°C und 90–100 % rH werden Zeitspannen von 97–505 d (Metianu, 1951), 80–125 d (Nosek, 1972), 95–129 d (Immler, 1973) und 63–305 d (Slovak et al., 2002) angegeben. In der Natur wird hingegen von Dauern von 1–2 Jahren für das Vollenden eines Generationszyklus ausgegangen (Nosek, 1972; Deplazes et al., 2013).

Wirtstiere

Als ditrope Zeckenspezies mit unterschiedlichen Aufenthaltsorten befallen Adulte und Juvenile von *D. reticulatus* verschiedene Wirtstierarten (Immler, 1973; Zahler et Gothe, 1995a). Das Spektrum der Wirte ist dabei jeweils sehr breit.

Adulte befallen mittelgroße und große pflanzen- und fleischfressende Haus- und Wildtiere, wie Rinder, Schafe, Pferde, Ziegen oder Hunde und Cerviden wie Rehe, Rothirsche oder Elche, sowie Wildschweine, Füchse, Feldhasen oder Igel (Arthur, 1963; Nosek, 1972; Immler, 1973; Liebisch et Rahman, 1976; Zahler, 1994; Deplazes et al., 2013).

Larven und Nymphen von *D. reticulatus* sind hingegen überwiegend an höhlen- oder bodenbewohnenden Kleinsäugetern und selten auch an Vögeln zu finden. So befallen sie kleine Raubtiere (Carnivora) wie Mauswiesel und Iltis, Hasenartige (Lagomorpha) wie Feldhase und Wildkaninchen, Insektenfresser (Eulipotyphla) wie Igel, Maulwurf oder verschiedene Spitzmäuse (Soricidae), und eine Vielzahl an Nagetieren (Rodentia) wie Feldmaus, Rötelmaus, Gelbhalsmaus, Waldmaus oder Brandmaus (Arthur, 1963; Nosek, 1972; Immler, 1973; Zahler, 1994).

Gelegentlich gibt es auch Berichte von *D. reticulatus*-Adulten (und seltener von Juvenilen) am Menschen, bei denen es sich häufig um unfixierte und auf der Haut oder der Kleidung umher laufende Exemplare handelt (Lamontellerie, 1965; Gilot et Marjolet, 1982; Bauch et Danner, 1988; Estrada-Pena et Jongejan, 1999).

Saisonale Aktivität, Überwinterung und maximale Überlebenszeiten

Die Aktivitätsmuster innerhalb eines Jahres sind für adulte und juvenile *D. reticulatus* deutlich voneinander abgegrenzt.

Adulte weisen eine lange Aktivitätsperiode mit zwei Peaks auf. In Zentraleuropa findet die stärkste Aktivität im Frühjahr zwischen März und Mai statt (Arthur, 1960; Nosek, 1972; Immler, 1973). Im Hochsommer kommt die Aktivität, mit Ausnahme von einzelnen Exemplaren an schattigen und kühlen Standorten, zum Erliegen (Immler, 1973; Gothe et Wegerdt, 1991; Bartosik et al., 2011). Adulte, die im Frühjahr keinen Wirt gefunden haben, überdauern in Bodennähe, vor Wärme und Trockenheit geschützt, die ungünstigen Bedingungen und klettern laut Immler (1973) im Spätsommer oder Herbst zur erneuten Wirtssuche die Vegetation empor. Im Herbst liegt das zweite und meist schwächer ausfallende Aktivitätsmaximum der Adulten, das im September beginnt und bis November andauert (Nosek, 1972; Immler, 1973). Doch auch den Winter über können in Westeuropa die kältetoleranten Adulten auf Wirtssuche angetroffen werden, sofern keine geschlossene Schneedecke vorhanden ist und nicht anhaltend Temperaturen unter 0°C vorherrschen (Immler, 1973; Gothe et Wegerdt, 1991; Martinod et Gilot, 1991; Hubalek et al., 2003). Laut Zahler (1994) und Zahler und Gothe (1995b) handelt es sich beim Aktivitätsabfall im Winter um keine Diapause im engeren Sinne, da diese an die Photoperiode gekoppelt ist und eine Inaktivität der Zecken bereits vor dem Absinken der Temperatur oder dem Vorhandensein einer Schneedecke auslösen würde. Da aber die Adulten an milden Wintertagen oder wenn sie ins warme Labor gebracht werden spontan Aktivität zeigen (Immler, 1973) und in der Natur erst immobil werden, sobald die makroklimatischen Bedingungen zu ungünstig werden, ist der Begriff Quieszenz zu bevorzugen (Zahler, 1994; Zahler et Gothe, 1995b).

Im Gegensatz zu den Adulten sind die Juvenilen nur kurzzeitig im Sommer aktiv. Larven sind im Juni und Juli, mit einem Aktivitätsmaximum Anfang Juli, und Nymphen von Juli bis August, mit einem Maximum Anfang August, auf Wirtssuche (Arthur, 1960; Nosek, 1972; Immler, 1973; Bauch et Danner, 1988). Zahler (1994) und Zahler und Gothe (1995b; 1995a) ermittelten Mindesttemperaturen für den Larvenschlupf von 14,2°C und für die Häutung von

vollgesogenen Larven und Nymphen von 10°C, mit wesentlich höheren Häutungsraten bei 20°C und 27°C Umgebungstemperatur.

Dass sowohl nüchterne als auch gesogene Adulte fähig sind, in der Natur – bei ungünstigen makroklimatischen Bedingungen in Bodennähe, durch Vegetations- und Streuschicht geschützt – zu überwintern, gilt als gesichert (Immler, 1973; Nosek, 1979; Zahler, 1994; Zahler et Gothe, 1995b). So zeigten vollgesaugte Weibchen auch nach mehrwöchiger Lagerung bei -10°C noch Oviposition (Zahler, 1994). Juvenile *D. reticulatus* sind empfindlicher gegenüber niedrigen Temperaturen (Zahler, 1994). Dennoch wird bei nüchternen und gesogenen Nymphen ebenfalls ein Überwinterungspotenzial vermutet (Nosek, 1979; Zahler et Gothe, 1995a), während Larven keine Lagerung bei Temperaturen unter 0°C überstehen und dementsprechend nicht zur Überwinterung fähig sind (Zahler, 1994).

Zu den Überlebenszeiten nüchterner *D. reticulatus* gibt es je nach Stadium sehr unterschiedliche Angaben. Für Adulte reichen diese von 400 Tagen bis 2 Jahre unter Laborbedingungen und in der Natur (Arthur, 1960; Nosek, 1972; Immler, 1973; Cerny et al., 1982; Zahler, 1994). Juvenile sind wesentlich kurzlebiger. Ungesogene Nymphen überlebten unter Laborbedingungen 5 bis 12 Wochen (Metianu, 1951; Arthur, 1960; Honzakova, 1971; Nosek, 1972; Immler, 1973) und laut Zahler und Gothe (1995a) sogar bis zu 22 Wochen. In der Natur sind Überlebenszeiten nüchterner Nymphen von durchschnittlich 7 bis 8 Wochen und bis zu 40 Wochen angegeben (Dusbábek et al., 1979). Für Larven sind hingegen Überlebenszeiten von 4 bis 8 Wochen (Arthur, 1960; Honzakova, 1971; Nosek, 1972) und bei Immler (1973) bis zu 11, bei Zahler und Gothe (1995a) bis zu 15 Wochen angegeben. Laut Dusbábek et al. (1979) überlebten ungesogene Larven in der Natur im Mittel 6 bis 8 und maximal 9 Wochen.

Bei der Haltung im Labor sind für das Überleben der Zecken, insbesondere der juvenilen Stadien, hohe relative Luftfeuchtigkeiten entscheidend (Gregson, 1942; Immler, 1973; Zahler, 1994). Außerdem wird für lange Überlebenszeiten aller Stadien eine Lagertemperatur von 5°C empfohlen (Gregson, 1942; Loomis, 1961; Zahler, 1994).

2.1.5 Veterinärmedizinische Bedeutung

D. reticulatus fungiert als Vektor für zahlreiche Erreger, wie die der viralen Zoonosen Omsk-hämorrhagisches Fieber und Frühsommer-Meningoencephalitis, sowie der Protozoen *Babesia canis*, *Babesia caballi* und *Theileria equi*. Eine Vektorkompetenz besteht auch für die folgenden bakteriellen Erreger, die alle ein zoonotisches Potenzial aufweisen: *Rickettsia slovaca* und andere Rickettsien wie *R. conorii*, *R. sibirica* und *R. raoultii*, sowie *Francisella tularensis* und *Coxiella burnetii* (Arthur, 1960; Nosek, 1972; Immler, 1973; Liebisch et Rahman, 1976; Zahler, 1994; Petney et al., 2012; Deplazes et al., 2013; Weis, 2014).

2.2 *Ixodes ricinus*

2.2.1 Systematische Einordnung

Die Zeckenspezies *Ixodes ricinus* ist unter dem Trivialnamen Gemeiner Holzbock bekannt und gehört der Schildzeckengattung *Ixodes* an. Diese Gattung zeichnet sich durch eine deutliche Analfurche vor dem Anus aus und gehört folglich zur Gruppe der Prostriata (Sonenshine, 2014).

2.2.2 Vorkommen

Geographische Verbreitung

Das Vorkommen von *I. ricinus* erstreckt sich über weite Teile Europas: von Skandinavien bis Nord-Afrika und von der Atlantikküste bis an das Kaspische Meer (Arthur, 1963; Gray, 1991; Deplazes et al., 2013; Porretta et al., 2013). Sie ist die häufigste und wichtigste Zeckenart in Zentraleuropa (Karbowiak, 2014). Auch bei dieser Spezies wurde in den vergangenen Jahren die Tendenz beobachtet, sich in Europa weiter auszubreiten, nämlich insbesondere weiter nordwärts und in Höhenlagen (Lindgren et al., 2000; Materna et al., 2008; Gray et al., 2009).

Auch in Deutschland ist *I. ricinus* die dominierende Zeckenspezies und kommt diffus im gesamten Bundesgebiet vor (Liebisch et al., 1985; Cornely et Schultz, 1992; Rubel et al., 2014; GBIF, 2015).

Habitate

I. ricinus bevorzugt humide schattige Habitate mit Unterwuchs und mit einer bodenbedeckenden Laub-, Gras-, Kraut- oder Moosschicht, die ein feuchtes Mikroklima begünstigt (Milne, 1944; 1950; Arthur, 1963). Sie ist in Laub- oder Mischwäldern, auf Wiesen oder Weiden mit Strauch- oder Baumbewuchs, in Parks, Gärten und häufig auch an Wegrändern anzutreffen (Kahl, 1982; Cornely et Schultz, 1992; Deplazes et al., 2013).

2.2.3 Morphologie

Nüchterne Adulte von *I. ricinus* (Abb. 2) sind mit circa 2,5–4,0 mm etwas kleiner als *D. reticulatus*-Zecken; Nymphen sind bis 1,5 mm und Larven etwa 0,5 mm groß (Deplazes et al., 2013). Scutum und Extremitäten sind dunkelbraun bis schwarz und ungemustert, während das Alloscutum der Adulten ziegelrot bis rotbraun gefärbt ist (Tovornik et Soos, 1976; Deplazes et al., 2013). Festons und Augen sind nicht vorhanden (Arthur, 1963). An ihrer Stelle befinden sich bei allen Stadien dorsolateral, etwa auf Höhe der Coxae II,

Photorezeptoren (Perret et al., 2003). Die Mundwerkzeuge von *I. ricinus* sind lang, sodass für die Verankerung im Wirt eine wesentlich geringere Zementbildung nötig ist. Das Hypostom der Männchen ist, entsprechend der fehlenden oder verringerten Blutaufnahme, kürzer und weniger bezahnt als das der Weibchen (Arthur, 1963; Deplazes et al., 2013).



Abb. 2: Adulte *I. ricinus*, Weibchen (links) und Männchen (rechts); © Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin, FU Berlin

2.2.4 Entwicklung

Lebenszyklus

I. ricinus ist ebenfalls eine 3-wirtige Zeckenspezies. Demzufolge muss jedes aktive Stadium – Larve, Nymphe und Adulte – für die Weiterentwicklung Blut aufnehmen. Zwischen den parasitischen Phasen erfolgen Eiablage bzw. Häutung in der Vegetation (Sonenshine, 2014).

Wie bei *D. reticulatus* sind alle wirtssuchenden Stadien von *I. ricinus* „Wegelagerer“ und klettern auf Pflanzen, um sich dort, mit dem Capitulum nach oben zeigend, festzusetzen und auf das Vorbeikommen eines Wirtstieres zu warten (Lees, 1948). Bei Auftreten eines geeigneten Reizes, der auf ein mögliches Wirtstier hindeutet, wird eine Bereitschaftsstellung eingenommen, bei der mit dem ersten Beinpaar suchende Bewegungen ausgeführt werden (Lees, 1948). Auf dem Wirtstier wird nach Aufsuchen einer geeigneten Stelle mit dem Saugakt begonnen. Eine Besonderheit bei *I. ricinus*, wie bei den meisten Prostriata, ist, dass die Kopulation ohne Blutaufnahme der Männchen erfolgen kann und auch nicht zwingend auf dem Wirt erfolgen muss (Immler, 1973; Graf, 1974; Gray, 1987; Sonenshine, 2014). Weibchen saugen 6–13 d (Lees, 1948; Metianu, 1951; Arthur, 1963; Graf, 1978b), lassen sich vom Wirtstier fallen und legen nach 7–24 d etwa 500–3200 Eier ab (Nuttall, 1913; Metianu, 1951). 17–62 d nach Beginn der Eiablage schlüpfen die ersten Larven (Nuttall, 1913; Metianu, 1951; Lamontellerie, 1965). Ihre Blutmahlzeit dauert 2–9 d (Lees, 1948; Metianu, 1951; Lamontellerie, 1965) und wird gefolgt von der Häutung zu Nymphen, deren Saugdauer 3–6 d beträgt (Nuttall, 1913; Lees, 1948; Metianu, 1951). Die vollgesaugten Nymphen häuten sich zu Männchen und Weibchen.

In der Natur kann das Durchlaufen des vollständigen Lebenszyklus bei *I. ricinus* mehrere Jahre dauern (Metianu, 1951; Lamontellerie, 1965); Chmela (1969) und Gray (1991) kommen zu dem Schluss, dass die Dauer 2–6 Jahre, meist jedoch 3 Jahre beträgt.

Wirtstiere

Für *I. ricinus* kommt ein breites Spektrum an Haus- und Wildsäugetieren, Vögeln und seltener auch Reptilien als Wirtstiere infrage. Adulte befallen hauptsächlich größere Säugetiere, wie Rinder, Schafe, Ziegen, Pferde, Hunde, Katzen, Rot- und Rehwild, Füchse, Feldhasen, Wildkaninchen oder Igel, während Juvenile überwiegend auf kleineren Säugetieren, wie Igel, Feldhasen, Wildkaninchen, einer Vielzahl an Nagetieren (Rodentia) und Spitzmäusen (Soricidae) und auch auf zahlreichen Vogelspezies zu finden sind. Auch der Mensch dient häufig, insbesondere für Nymphen und Adulte, als Wirt (Milne, 1949; Arthur, 1963; Estrada-Pena et Jongejan, 1999).

Saisonale Aktivität

Im Gegensatz zu *D. reticulatus* sind Adulte und Juvenile von *I. ricinus* in Mitteleuropa gleichzeitig und die meiste Zeit des Jahres über aktiv. Lediglich bei ungünstigen Umweltbedingungen, wie Hitze und Trockenheit im Sommer (Gray, 1991) oder Temperaturen unter +6°C im Winter (Kahl, 1982), kommt ihre Aktivität zum Erliegen. So lassen sich alle Stadien, je nach Witterung, von Februar bis November auf Wirtssuche antreffen (Gray, 1991; Schulz et al., 2014). Häufig zeigen sie ein bimodales Aktivitätsmuster mit einem Peak im Frühling und einem schwächeren Peak im Herbst; besonders an schattigen, kühlen und feuchten Standorten kann die Aktivität aber auch den Sommer über bestehen bleiben und zu einem unimodalen Muster mit allmählichem Aktivitätsabfall zum Herbst hin verändert sein (Milne, 1945; Immler, 1973; Kahl, 1982; Gray, 1991; Schulz et al., 2014).

2.2.5 Veterinärmedizinische Bedeutung

Lediglich ein starker Befall mit *I. ricinus* kann bei den Wirten zu Hautreaktionen und bei Wiederkäuern zu einem Leistungsabfall führen (Deplazes et al., 2013). Ob die Spezies Zeckenparalysen auslösen kann, ist fraglich; zwar gibt es immer wieder Berichte von Fällen, doch sind diese meist unzureichend belegt (Gothe, 1999).

Eine größere Bedeutung muss der Vektorkompetenz von *I. ricinus* beigemessen werden. So überträgt sie unter anderem das Frühsommer-Meningoencephalitis-Virus, das Louping-ill-Virus und die Protozoen *Babesia divergens*, *B. microti*, *B. venatorum* und *B. capreoli*, von denen alle, mit Ausnahme des letzten Erregers, ein zoonotisches Potenzial haben. Darüber hinaus ist die Übertragung einer Vielzahl von zoonotischen bakteriellen Erregern möglich, wie des Erreger-Komplexes der Lyme-Borreliose *Borrelia burgdorferi* sensu lato sowie

Anaplasma phagocytophilum, *Rickettsia helvetica*, *Francisella tularensis* und *Neoehrlichia mikurensis* (Estrada-Pena et Jongejan, 1999; Petney et al., 2012; Deplazes et al., 2013).

2.3 *In-vitro*-Fütterung

2.3.1 Geschichte der *In-vitro*-Fütterung

Für das Untersuchen der Biologie von Zecken sowie für das Testen von Bekämpfungsmethoden wird eine erhebliche Anzahl an Zecken benötigt. Deren Zucht im Labor ist folglich unerlässlich. Geschuldet ihrem obligat hämatophagen Verhalten ist dafür die Verwendung einer großen Zahl an Labortieren nötig (Kröber et Guerin, 2007). Dies ist sowohl aus ökonomischer und administrativer als auch zunehmend aus ethischer Sicht problematisch. So geben Slovak et al. (2002) beispielsweise für die Erzeugung von 20.000 *D. reticulatus*-Adulten innerhalb von 3,5 Monaten den Verbrauch von 15 Kaninchen und 20 Meerschweinchen an. Hinzu kommt, dass die Versuchstiere, aufgrund der Ausbildung einer Immunität, häufig nur einmal für die Fütterung der Zecken verwendet werden können (Enigk et Grittner, 1953; Zahler et Gothe, 1995a).

Mit einer Reihe hämatophager Arthropoden wurden bereits erfolgreich *In-vitro*-Fütterungen durchgeführt: so für diverse Culiciden (Yoeli, 1938; Bishop et Gilchrist, 1946; Rutledge et al., 1964), Tsetsefliegen (Bauer et Wetzel, 1976; Mews et al., 1976), Läuse (Haddon jr, 1956; Häfner et Ludwig, 1969; Takano-Lee et al., 2003), Flöhe (Wade et Georgi, 1988), Raubwanzen (Nicolle, 1941; Kloft et Schlagbauer, 1965) und Bettwanzen (Montes et al., 2002), Simuliiden (Mokry, 1976), Gnitzen (Fahrner et Barthelmess, 1988; Hunt et McKinnon, 1990) und Phlebotomiden (Maroli, 1985; Elkins et Lane, 1988). Einen Überblick gibt Klunker (1979).

Und auch für Lederzecken wurden *In-vitro*-Fütterungssysteme entwickelt, wobei als Membranen unter anderem Tierhäute (Gregson, 1942; Tarshis, 1958), Fledermausflügel (Mango et Galun, 1977), Parafilmmembranen (Galun et Kindler, 1965; Howarth et Hokama, 1978) und Silikonmembranen (Osborne et Mellor, 1985) verwendet wurden.

Die künstliche Fütterung von Schildzecken gestaltet sich insofern schwieriger, als dass diese eine erheblich längere Saugdauer von mehreren Tagen bis Wochen aufweisen. Während dieser Zeit nehmen sie große Mengen an Blut auf, und das dargebotene Nährmedium muss frisch und weitestgehend kontaminationsfrei sein. Das Fütterungssystem muss also darauf ausgelegt sein, über diesen Zeitraum unter konstanten Bedingungen zu funktionieren.

Wenige Versuche wurden unternommen, die obligat blutsaugenden Schildzecken über die Chorioallantoismembran embryonierter Hühnereier zu füttern. Pierce und Pierce (1956)

brachten Exemplare aller drei Stadien von *Rhipicephalus microplus* (ehemals *Boophilus microplus*) zum Fixieren an der Membran; jedoch nahmen nur Larven und Nymphen Medium auf. Bei Kemp et al. (1975) fixierten sich maximal 5 % der Larven von *R. microplus*.

Einen gänzlich anderen Ansatz verfolgte Chabaud (1950). Er brachte Ixodiden zum Saugen, indem er feine, mit Nährmedium gefüllte Glaskapillaren über die Mundwerkzeuge der Zecken stülpte. Burgdorfer (1957) nutzte diese Fütterungstechnik, um adulte Schildzecken mit *Leptospira pomona* und Tollwutvirus zu infizieren. Purnell und Joyner (1967) verwendeten auf dem Wirtstier vorgefütterte *Rhipicephalus appendiculatus* für die Kapillarfütterung und erhielten ein vollgesogenes Weibchen, das fruchtbare Eier ablegte. Außerdem gewannen sie – nach der Fütterung von infizierten Zecken an uninfiziertem Blut – *Theileria parva* aus dem Restblut in der Kapillare und infizierten damit gesunde Rinder. Die Kapillarfütterung entspricht am wenigsten dem natürlichen Fütterungsvorgang, weshalb die Zecken nur geringe Mengen des Nährmediums aufnehmen. Ein Vollsaugen wird, wenn überhaupt, nur mit einer Vor- oder Nachfütterung auf einem Wirtstier erreicht (Willadsen et al., 1984; Vega et al., 2000). Hinzu kommt, dass diese Technik für die Fütterung von Juvenilen, aufgrund ihrer kleinen Mundwerkzeuge, und für die Fütterung von einer großen Anzahl an Zecken, aufgrund des Aufwandes, ungeeignet ist. Auch gestaltet sich die Fütterung über mehrere Tage oder Wochen als schwierig, da das Nährmedium und damit auch die Kapillaren regelmäßig erneuert werden müssen. Demzufolge fand diese Methode weniger für die Zeckenzucht im Labor als für zahlreiche Versuche zur Übertragung von Pathogenen vom Nährmedium auf die Zecke, oder umgekehrt, Anwendung (Stender-Seidel et Böckeler, 1989; Rechav et al., 1999; Broadwater et al., 2002; Kocan et al., 2005; Bouwknecht et al., 2010). Im Rahmen der Entwicklung von Anti-Zecken-Vakzinen wurden auch Antikörper per Kapillare verfüttert (Gonsioroski et al., 2012; Antunes et al., 2014).

Deutlich häufiger wurden Fütterungsversuche an Membranen durchgeführt, was dem natürlichen Saugverhalten der Zecken am stärksten entspricht. Die ersten Versuche mit Schildzecken liegen bereits über hundert Jahre zurück. Hindle und Merriman (1912) brachten adulte *Hyalomma aegyptium* nach der Amputation des Hallerschen Organs zur Fixierung und Mediumsaufnahme an Rattenhaut über warmer NaCl-Lösung. Ebenfalls nach Amputation des Hallerschen Organs nahmen bei Totze (1933) *Ixodes ricinus*-Nymphen und -Adulte verschiedene erwärmte Nährlösungen durch Meerschweinchen-Zwerchfell und 20–30 µm dicke Zellophan-Membranen auf. Lees (1948) konnte einen möglichen Vorteil von Amputationen nicht bestätigen und brachte adulte *I. ricinus* zur Aufnahme von Citrat-Humanblut durch warme Lammhaut. Bei Gregson (1962) saugten sich erstmals Schildzecken – hier *Dermacentor andersoni*-Weibchen – *in vitro* voll, jedoch nur nach einer mehrtägigen Vorfütterung auf dem Schaf. Und erst 1975 gelang es, ein Vollsaugen von Ixodiden ohne *In-vivo*-Vor- oder Nachfütterung zu erreichen: *R. microplus*-Larven und *Haemaphysalis longicornis*-Nymphen nahmen genügend Nährmedium auf, um sich anschließend zu häuten (Kemp et al., 1975) (siehe auch Tab. 2).

Inzwischen wurden mit zahlreichen Schildzeckenspezies Membran-Fütterungsversuche durchgeführt. Tabelle 1 gibt eine Übersicht der Fütterungsmethoden, bei denen sich mindestens ein Entwicklungsstadium ohne *In-vivo*-Vor- oder Nachfütterung vollgesaugt hat.

Bei der *In-vitro*-Fütterung von Schildzecken ist mindestens einmal, meist sogar mehrmals, täglich über einen verhältnismäßig langen Versuchszeitraum der Austausch des Futterblutes nötig, um frische Nährstoffe bereitzustellen und Kontaminationen vorzubeugen. In Anbetracht der Tatsache, dass die häufigen Blutwechsel die *In-vitro*-Fütterung von Schildzecken sehr arbeitsintensiv machen, gab es mehrere Versuche, die Fütterungssysteme mit einem kontinuierlichen oder intervallartigen Mediums- oder Blutfluss auszustatten und somit teilweise zu automatisieren. Bisher gelang es nur Kemp et al. (1975), Kuhnert (1995) und Kuhnert et al. (1998), vollgesaugte Stadien zu erhalten. Eine Übersicht über die bisherigen Ansätze zur teilautomatisierten *In-vitro*-Fütterung von Schildzecken gibt Tab. 2.

Bei der Auswahl einer Membran sollte berücksichtigt werden, dass sie gleichzeitig stabil und elastisch ist, um Perforationen und Lecks beim Einstechen oder Herausziehen der Mundwerkzeuge zu verhindern. Außerdem muss ihre Dicke auf die Mundwerkzeug-Länge der Zecken abgestimmt sein, und sie sollte hygienisch bzw. leicht zu reinigen sein, um Kontaminationen während der langen Fütterungsdauer vorzubeugen.

Ein breites Spektrum an natürlichen Membranen wurde bisher für Fütterungsversuche genutzt, wie Häute oder Hautschichten von Mäusen (Doube et Kemp, 1979), Ratten (Hindle et Merriman, 1912), Gerbilen (Bonnet et al., 2007), Kaninchen (Howarth et Hokama, 1983), Lämmern (Lees, 1948) oder Rindern (Kemp et al., 1975), wobei das Fell teilweise auf wenige Millimeter gekürzt wurde (Kemp et al., 1975; Howarth et Hokama, 1983). Verwendet wurden auch Anteile vom Kaninchen- oder Meerschweinchen-Diaphragma (Totze, 1933; Lees, 1948), vom Kalbsmesenterium und besonders häufig vom Rinderdarm, in Form der Baudruchemembran oder Goldschlägerhaut (Kemp et al., 1975). Um deren Eigenschaften zu verbessern, imprägnierten einige Autoren die Baudruchemembran zusätzlich mit Klebstoff (Waladde et al., 1979; Kemp et al., 1986; Waladde et al., 1991; Kuhnert, 1995). Der Nachteil dieser Membranen ist, dass zwar eine Reinigung, z. B. über antibiotische Waschschriffe (Voigt et al., 1993; Musyoki et al., 2004; Bonnet et al., 2007), aber keine Sterilisierung möglich ist, wodurch Kontaminationen und Fäulnis der Häute begünstigt werden können (Totze, 1933; Howarth et Hokama, 1983).

Dem gegenüber stehen eine Reihe von künstlichen Membranen, die in der Regel hygienischer, leichter zu standardisieren und individuell abstimmbare auf die Hypostomlängen von unterschiedlichen Zeckenspezies und -stadien sind. Getestet wurden Membranen aus Zellophan (Totze, 1933), aus Parafilm M, die jedoch innerhalb kürzester Zeit stets perforierte, (Habadank et Hiepe, 1993), aus Teflon (Kuhnert, 1995) und aus Silikon. Ohne Erfolg wurde außerdem die Verwendung von Latex, Polyurethan, Glasfaser- und Membranfiltern, Reinigungstüchern, Kollagen-Glykosaminoglykan, Polyamid, Polypropylen, Schlangenhaut und Kunststoff-Wurstpelle, teilweise mit Beschichtungen aus Acryl, diversen Klebstoffen, Teflon oder Silikon, als Membranmaterialien durch (Kuhnert, 1995) getestet. Eine

LITERATURÜBERSICHT

Tab. 1: *In-vitro*-Fütterungsmethoden mit Ixodiden, bei denen sich mindestens ein Entwicklungsstadium ohne *In-vivo*-Vor- oder Nachfütterung vollgesaugt hat; wenn nichts anderes erwähnt ist, erfolgte die Blutlagerung bei +4°C

Autoren	Zecken	Membran	Fixierungsstimuli	Versuchsaufbau	Nährmedium und Zusätze	Medium- wechsel pro Tag	Umgebungs- bedingungen	Ergebnisse
WALADDE et al. 1991	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i> Adulte	Baudruchemembran, mit Klebstoff bestrichen	NaCl, Zeckenfaeces, Rinderhaare, Rinderrohr-Extrakt	Glaskammern auf Heizplatte; Blut unter Zecken	defibriniertes Rinderblut, 37°C, 50 I.E./ml Pen. und Strept.	3	26–27°C, 70–80 % rH	VR ≤ 63 % (erstmal Adulte vollgesaugt); VG 65 % und EKF 82 % im Vergleich zur <i>In-vivo</i> -Fütterung; E und L
WALADDE et al. 1993	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i> Nymphen	Baudruchemembran, mit Klebstoff bestrichen	NaCl, Zeckenfaeces, Rinderhaare, Rinderrohr-Extrakt	Glaskammern im Wasserbad; Blut unter Zecken	Rinderblut, 35–37°C, 50 I.E./ml Heparin	6	26–27°C, 70–80 % rH	VR 30–35 %; VG 50 % im Vergleich zur <i>In-vivo</i> -Fütterung; H
VOIGT et al. 1993	<i>Amblyomma variegatum</i> alle Stadien	Kaninchenhaut (für Juvenile) und Rinderhaut (für Adulte)	keine	Kunststoffkammer im Inkubator; Blut über Zecken	Rinderblut, 35–39°C, 50 I.E./ml Heparin, 100 I.E./ml Pen., 100 µg/ml Strept., 100 I.E./ml Genta.	k.a.	35–39°C, 90–95 % rH, 0–10 % CO ₂	Mit 5–10 % CO ₂ sehr gute Ergebnisse; Larven und Nymphen: V und H; Adulte: VG = 38 % im Vergleich zur <i>In-vivo</i> -Fütterung
HABEDANK 1995 (siehe auch HABEDANK et al. 1993, HABEDANK et al. 1994)	<i>Dermacentor nuttalli</i> und <i>Hyalomma anatolicum excavatum</i> Adulte	Silikonmembran (160–200 µm)	Watte mit Rindergeruch, Rinderhaare, Zeckenfaeces	Fütterungskammern im Inkubator; Blut unter Zecken	Rinderblut, 36,7°C, 1,5–2,0 I.E./ml Heparin, 100 I.E./ml Pen., 100 µg/ml Strept., 50 I.E./ml Nyst., 1–2 mM/1 ATP, 1 mM/1 Glutathion, Lagerung z. T. bei -20°C	2–3	36,7°C, 90 % rH, 3,9–4,5 % CO ₂	<i>D. nuttalli</i> : FR 13–76 %; VR 21–38 %; VG 293 mg (σ = 72 mg); ER 93 %; GG 140mg (σ = 66 mg); EKF 0,46; LR 46 %; <i>H. anatolicum excavatum</i> : FR ≤ 78 %; VR 53 %; VG 266 mg (σ = 115 mg); ER 89 %; GG 124 mg (σ = 69 mg); EKF 0,42; LR 40 %
KUHNERT 1995 (siehe auch KUHNERT et al. 1995 und 1996)	<i>Amblyomma hebraeum</i> alle Stadien	Silikonmembran, mit Linspapier als Matrix bei Larven (10–40 µm Dicke) und Nymphen (50–90 µm), mit Terylnetz bei Adulten (500 µm)	Rinder- und Kaninchenhaare, Rinderhaarextrakt, Ortho-Nitrophenol, Iso-Buttersäure, Benzaldehyd, Zeckenfaeces	Fütterungskammer im Schüttelwasserbad im Inkubator	defibriniertes Rinderblut, 38°C, 2 g/l Glukose, 10 ⁻³ mol/l ATP und Glutathion, 5 µg/ml Genta., 100 I.E./ml Nyst.	2–3	23°C, 80 % rH	erstmal alle Stadien einer Schildzeckenspezies <i>in vitro</i> vollgesaugt; Larven: FR 30–90 %; V; HR 84–85 %; Nymphen: FR 81–97 %; V; HR 96–98 %; Adulte: FR ca. 70 %; V; VG 38 % im Vergleich zur <i>In-vivo</i> -Fütterung; E mit L
	<i>Amblyomma variegatum</i> Nymphen und Adulte	Nymphen: Baudruchemembran, mit Klebstoff bestrichen; Adulte: Silikonmembran, 500 µm, mit Terylnetz	Ortho-Nitrophenol, Methylsalicylat, Rinderhaarextrakt, Saline, z. T. Pelargonsäure	Fütterungskammer im Schüttelwasserbad im Inkubator	defibriniertes Rinderblut, 38°C, 2 g/l Glukose, 10 ⁻³ mol/l ATP und Glutathion, 100 I.E./ml Pen., 100 µg/ml Strept., Hct 30% erhöht, Nymphen 100 I.E./ml und Adulte 1000 I.E./ml Nyst.	1	Nymphen 23°C, Adulte 33°C, 80 % rH	Nymphen: FR 39 %; VR 22 %; HR 100 %; Adulte: FR 67 %; V; ER 60 %; EKF 0,2
	<i>Rhipicephalus microplus</i> alle Stadien	Teflonmembran (Larven und Adulte), Baudruchemembran, mit Klebstoff bestrichen (alle Stadien), Silikonmembran (Adulte)	Rinderhaare, Rinderhaarextrakt, Saline, Zeckenfaeces	Fütterungskammer im Schüttelwasserbad im Inkubator	defibriniertes Rinderblut, 38°C; Juvenile: 100 I.E./ml Pen., 100 µg/ml Strept., 0,25 µg/ml Amphotericin B; Adulte: 5 µg/ml Genta., 100 I.E./ml Nyst.	1–2	23°C, 80 % rH	Larven: FR 50–70 %; wenige Larven: V; Nymphen: FR 74 %; VR und HR 0–21 %; Adulte: FR 34–62 %; wenige Adulte Blutaufnahme (VG 58–152 mg) und E

Fortsetzung Tab. 1

WALADDE et al. 1995	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i> Nymphen	Baudruchemembran, mit Klebstoff bestrichen	NaCl, Zeckenfaeces, Rinderhaare, Rinderrohr-Extrakt	Fütterungskammern im Inkubator; Blut über Zecken	Rinderblut, 37°C, 50 I.E./ml Heparin	2	37°C, 75–80 % rH, 3 % CO ₂	V; VG und HR vergleichbar mit <i>In-vivo</i> -Fütterung
BARRÉ et al. 1998	<i>Amblyomma variegatum</i> Nymphen	Silikonmembran (120–320 µm)	Ziegenhaar, Hautschuppen, Zeckenfaeces, Hautwasch-Lösung, Waschlösung von gesaugten Männchen	Fütterungskammern im Wasserbad; Blut unter Zecken	Ziegenblut im Heparin-Vacutainer, 39°C, oder Rinderblut, 39°C, 20 I.E./ml Heparin, 2g/l Glukose, 50 I.E./ml Pen., 50 µg/ml Strept., 5 µg/ml Amphotericin B, z. T. 0,6 mg/ml ATP, 0,3 mg/ml Glutathion	2	23–25°C, hohe rH in Zeckenkammer durch feuchtes Papier auf Deckel	FR 68 % (σ = 18 %); VR ≤ 48%; VG 31–67 % im Vergleich zur <i>In-vivo</i> -Fütterung
BONNET et al. 2007	<i>Ixodes ricinus</i> alle Stadien	Kaninchen- und Gerbilhaut	keine	Fütterungskammern im Inkubator; Blut über Zecken; Bluterwärmung durch Warmwasserzirkulation	Rinder- oder Schafblut, 37°C, Heparin, Gentamycin und Amphotericin B	2	22°C, 80–90 % rH	FR 90–100 %; Larven: VR 75–86 %; Nymphen: VR 74–100 %; Adulte: VR 67–80 %; VG 161 mg; beides höher als in <i>In-vivo</i> -Fütterung; ER 72 %; LR 77 %
KRÖBER et al. 2007a, b	<i>Ixodes ricinus</i> alle Stadien	Silikonmembran (50–100 µm)	Moskitonetz, Fliesenkreuz, Rinderhaarextrakt, Rinderhaare	Zeckenkammern aus Kunststoff in 6-Well-Platten im Wasserbad; Blut unter Zecken	defibriertes Rinderblut, 37°C, 2 g/l Glukose, 5 µg/ml Genta., 0,001 mM ATP	2	k.a.	Juvenile: V und H; Adulte: FR 60–85 %; VG 160 mg (25–279 mg); ER 75 %; L
TAJERI et al. 2011	<i>Hyalomma anatolicum anatolicum</i> und <i>Hyalomma dromedarii</i> Adulte	Silikonmembran	Moskitonetz, Fliesenkreuz, Rinderhaarextrakt, Rinderhaare	Zeckenkammern aus Kunststoff in 6-Well-Platten im Wasserbad; Blut unter Zecken	defibriertes Rinderblut, 37°C, 2 g/l Glukose, 5 µg/ml Genta.	2	k.a.	FR 55–75 %; V mit E und L
FOURIE et al. 2013	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> Adulte und <i>Ixodes ricinus</i> Larven	Silikonmembran	<i>R. sanguineus</i> : Membranen über Hund gerieben, Hundehaare; <i>I. ricinus</i> : Rindergeruch	Zeckenkammern aus Kunststoff in 6-Well-Platten im Wasserbad; Blut unter Zecken; Zeckenkammern nur wenige Millimeter hoch	defibriertes Rinderblut, 37°C, 2 g/l Glukose, 5 µg/ml Genta.	2	k.a.	<i>R. sanguineus</i> : FR 85 %; wenige: V; <i>I. ricinus</i> : F und V
ANDRADE et al. 2014	<i>Ixodes scapularis</i> Adulte	Silikonmembran (195 µm)	Moskitonetz, Fliesenkreuz, Rinderhaarextrakt, Rinderhaare	Zeckenkammern aus Kunststoff in 6-Well-Platten im Inkubator; Blut unter Zecken	defibriertes Rinderblut, 37°C, 2 g/l Glukose, 5 µg/ml Genta., 1 mM ATP	2	37°C, 93 % rH	FR 45 %; VR 17 %; VG 109 mg; ER und LR 58 %

E = Eiablage; EKF = Eikonversionsfaktor; ER = Eiablagerrate; F = Fixierung; FR = Fixierungsrate (bei Adulten auf ♀ bezogen); Genta. = Gentamycin; GG = mittleres Gelegegengewicht; H = Häutung; Hct = Hämatokrit; HR = Häutungsrate; k.a. = keine Angabe; L = Larvenschlupf; LR = Larvenschlupfrate; NaCl = physiologische Kochsalzlösung; Nyst. = Nystatin; Pen. = Penicillin; Strept. = Streptomycin; V = Vollsaugen; VG = Vollsauggewicht; VR = Vollsaugrate

Silikonmembran wurde erstmals von Stone et al. (1983) in der künstlichen Schildzeckenfütterung verwendet. Dazu kam eine von Bauer und Wetzel (1976) und Wetzel (1979) für die Fütterung von Tsetsefliegen entwickelte Membran mit einem Terylennetz als Matrix und einer Dicke von ca. 500 µm zum Einsatz. Diese wurde im Folgenden auch von anderen Autoren in verschiedenen Dicken für die *In-vitro*-Fütterung von Schildzecken verwendet (Voigt et al., 1993; Habedank, 1995; Kuhnert, 1995). Später fand eine dünnere Silikonmembran mit einem Linsenreinigungspapier als Matrix häufig Verwendung (Kuhnert, 1995; Jöns, 2001; Vega et al., 2004; Kröber et Guerin, 2007a; Tajeri et Razmi, 2011; Fourie et al., 2013). Auch verzichteten einige Autoren auf eine Stabilisierung der Silikonmembran durch eine Matrix (Moura et al., 1997; Barré et al., 1998). Kuhnert (1995) kam nach dem Test einer Reihe von Membranen zu dem Schluss, dass Silikonmembranen die besten Resultate in der künstlichen Schildzeckenfütterung liefern.

Allerdings sind bei künstlichen Membranen zusätzliche olfaktorische und taktile Stimuli nötig, um die Zecken zum Fixieren und zur Blutaufnahme zu bewegen (Habedank, 1995). Unter anderem wurden Waschlösungen oder Geruchsextrakte von Rindern (Waladde et al., 1979; Habedank et Hiepe, 1993; Musyoki et al., 2004; Kröber et Guerin, 2007a), Haare von Wirtstieren (Waladde et al., 1979; Habedank, 1995; Barré et al., 1998), Zeckenfaeces (Waladde et al., 1991; Habedank et Hiepe, 1993; Kuhnert, 1995), isotonische Kochsalzlösung (Waladde et al., 1991; Kuhnert, 1995) und Blut (Moura et al., 1997) verwendet, sowie Ortho-Nitrophenol, Iso-Buttersäure, Benzaldehyd, Methylsalicylat und Pelargonsäure bei der Fütterung von *Amblyomma*-Spezies (Kuhnert, 1995). Auch mechanische Fixierungsstimuli – ein auf die Membran aufgebrachtes Moskitonetz und ein Fliesenkreuz – kamen zum Einsatz (Kröber et Guerin, 2007a), zumal bereits früher beobachtet wurde, dass sich Zecken gerne an mechanischen Barrieren, wie in der Ecke zwischen Membran und Kammerwand, fixieren (Kuhnert, 1995; Barré et al., 1998).

Zum Aufbau der Fütterungssysteme gab es bisher eine Reihe verschiedener Ansätze. In der Regel gibt es ein Gefäß für das Nährmedium (Blutkammer) und eines für die Zecken (Zeckenkammer). Bei der Mehrzahl der Versuchsanordnungen wurde die Zeckenkammer in die Blutkammer eingehängt oder -gesteckt, sodass sich das Blut unter den Zecken befand. Einige Autoren jedoch boten den Zecken das Blut von oben an, um ein Sedimentieren der zellulären Blutbestandteile weg von den Mundwerkzeugen der Zecken zu verhindern (Kemp et al., 1986; Voigt et al., 1993; Waladde et al., 1995; Burkot et al., 2001; Bonnet et al., 2007). Barré et al. (1998) lösten das Problem, indem sie zwar das Blut unter den Zecken anboten, sie die Zeckenkammern jedoch bis zu einer Tiefe von 3 mm über dem Blutgefäßboden eintauchen ließen, sodass sich die Membran und damit die Mundwerkzeuge in der erythrozytenreichen Sedimentschicht des Futterblutes befanden. Sehr rasch wurde festgestellt, dass die Temperatur des Nährmediums ungefähr der der Wirtstiere entsprechen muss und dass zu hohe oder niedrige Temperaturen die Blutaufnahme deutlich hemmen oder gar verhindern (Totze, 1933; Lees, 1948; Voigt et al., 1993). Erfolgreiche Membranfütterungen wurden bei Bluttemperaturen um die 37°C (35–39°C) durchgeführt (siehe Tab. 1). Die Erwärmung

Tab. 2: Teilautomatisierte *In-vitro*-Fütterungssysteme für Schildzecken; die Blutlagerung erfolgte bei +4°C

Autoren	Zecken	Membran	Fixierungsstimuli	Versuchsaufbau	Nährmedium und Zusätze	Umgebungsbedingungen	Ergebnisse
KEMP et al. 1975	<i>Rhipicephalus microplus</i> Larven und Adulte, <i>Haemaphysalis longicornis</i> und <i>Ixodes holocyclus</i> Nymphen	Rinderhaut (300–500 µm)	keine	Nährmedium läuft durch ein Filterpapier (8 ml/h), das sich auf einer Schräge befindet; die Zeckenkammern, mit Rinderhaut bespannt, werden auf das Filterpapier gesetzt; im Inkubator	Gewebskulturmedium TC 199, 35°C, 125 I.E./ml Pen. und Strept., 100 I.E./ml Mykostatin, z. T. mit 7% Rinderserum oder Rinder-Albumin	35°C, 70 % rH	<i>R. microplus</i> : Larven: VR 47–83 %; Entwicklung stark verzögert; HR 51–71 %; Adulte: F, teilweise Blutaufnahme; <i>H. longicornis</i> : wenige V und H; <i>I. holocyclus</i> : F, teilweise Blutaufnahme
STONE et al. 1983	<i>Ixodes holocyclus</i> Adulte (3–4 d auf Mäusen vorgefüttert)	Silikonmembran mit Terylenetz als Matrix (500 µm)	keine	Fütterungskammern auf Heizplatte; Mediumsfluss kontinuierlich durch Silikonschläuche über Peristaltikpumpe; im UV-Kabinett; Mundwerkzeuge manuell durch Membran gestochen und festgeklebt	Gewebskulturmedium TC 199 mit 10%iger Glukose-Lösung, 37°C, 650 I.E./ml Benzyl-Pen., 650 mg/l Strept., z. T. mit 1–50 % fetalem Kälberserum oder defibriniertem Hundeblood oder bovinem Hämoglobin	k.a.	Mediumaufnahme, kein V
KUHNERT 1995	<i>Ixodes ricinus</i> Adulte und <i>Rhipicephalus microplus</i> Larven und Adulte	Teflonmembran	Kaninchenhaare und Rinderohr-Extrakt (<i>I. ricinus</i>), Rinderhaare und Rinderhaarextrakt (<i>R. microplus</i>), Saline, Zeckenkot	Durchflussskammer aus Messing; Erwärmung durch Warmwasserzirkulation; Blutfluss kontinuierlich durch Silikonschläuche über Peristaltikpumpe; ≤ 1 ml/min; im Inkubator	defibriniertes Rinderblut, 37–38°C; <i>I. ricinus</i> : 50 I.E./ml Pen., 50 µg/ml Strept.; <i>R. microplus</i> : 100 I.E./ml Pen., 100 µg/ml Strept., 0,25 µg/ml Amphotericin B	27–34°C, 80 % rH	starke Kontaminationsprobleme, hoher Blutverbrauch; <i>I. ricinus</i> : F, 14 % der ♀ Blutaufnahme, 1 ♀ ohne L; <i>R. microplus</i> Larven: FR 30–50 %, VR 0–5 %; <i>R. microplus</i> Adulte: ≤ 18 % der ♀ Blutaufnahme, VG ≤ 152 mg, 2 ♀ E, 1 ♀ L
KUHNERT et al. 1998	<i>Amblyomma hebraeum</i> Adulte	Silikonmembran mit Kunststoffnetz als Matrix (500 µm)	Salzlösung, Ortho-Nitrophenol, Benzaldehyd, Iso-Buttersäure, Zeckenfaeces, Rinderhaare	Durchflussskammer aus Aluminium mit Magnetrührer; Erwärmung durch Warmwasserzirkulation, Blutfluss intervallartig durch Silikonschläuche über Perfusorspritzen: 4x pro Tag 12 ml je Kammer	Rinderblut, 37,5°C, 10 I.E./ml Heparin, 10 ⁻³ mol/l ATP, 1000 I.E./ml Pen., 100 µg/ml Strept. und/oder 5 oder 100 µg/ml Genta., 100 I.E./ml Nystatin	21–27°C, hohe rH durch feuchte Watte auf Kammer	nur mit Nystatin und hoher Antibiotikakonzentration erfolgreich; FR ≤ 64 %; VR ≤ 15 %; VG 690–1850 mg (<i>in vivo</i> 2330 mg); EKF 0,20–0,37 (<i>in vivo</i> 0,50); LR 75–88 % (<i>in vivo</i> 56 %); larvenproduzierende Weibchen: 25–50 % (<i>in vivo</i> 51 %)
DE LA VEGA et al. 2004	<i>Rhipicephalus microplus</i> und <i>Amblyomma cajennense</i> Adulte	Silikonmembran mit Papier als Matrix	Rinderhaare, Zecken-Exuvien und -Faeces, CO ₂	Durchflussskammer aus Metall mit Magnetrührer; Erwärmung über Heizplatte; Blutfluss intervallartig über Peristaltikpumpe: alle 4–8 h, ≤ 0,5 l in 2 Wochen	Blut, 37–38°C, 10 I.E./ml Heparin, 100 µg/ml Genta. und Nystatin	k.a.	F und Blutaufnahme, kein V

E = Eiablage; EKF = Eikonversionsfaktor; F = Fixierung; FR = Fixierungsrate (bei Adulten auf ♀ bezogen); Genta. = Gentamycin; H = Häutung; HR = Häutungsrate; k.a. = keine Angabe; L = Larvenschlupf; LR = Larvenschlupfrate; Pen. = Penicillin; Strept. = Streptomycin; V = Voltsaugen; VG = Voltsauggewicht; VR = Voltsaugrate

erfolgte meist über eine Heizplatte (Lees, 1948; Waladde et al., 1979; Paine et al., 1983) oder ein Wasserbad (Hindle et Merriman, 1912; Totze, 1933; Waladde et al., 1993), teilweise durch einen Inkubator (Kemp et al., 1975; Habedank et Hiepe, 1993; Voigt et al., 1993) und seltener über einen Warmwasserkreislauf (Kuhnert, 1995; Burkot et al., 2001; Bonnet et al., 2007).

Alle *In-vitro*-Fütterungsversuche, bei denen sich mindestens ein Schildzecken-Stadium vollgesaugt hat (Tab. 1), verwendeten Blut als Nährmedium – und dabei fast ausschließlich Rinderblut, was jedoch auch auf die leichtere Verfügbarkeit, z. B. über Schlachthöfe, zurückzuführen sein kann. Nur Kemp et al. (1975) gelang es, *R. microplus*-Larven und *Haemaphysalis longicornis*-Nymphen zum Vollsaugen auf Gewebeskulturmedium TC 199 mit zugesetztem Rinderserum oder -albumin zu bewegen. Außerdem wurde die Verfütterung von Gewebeskulturmedium TC 199 mit Zusatz von Glukose-Lösung oder Blutbestandteilen (Stone et al., 1983), von Plasma oder Serum (Doube et Kemp, 1979; Waladde et al., 1979), Rinder-Erythrozyten (Howarth et Hokama, 1983), Leibovitz's L15Medium mit Kälberserum (Voigt et al., 1993) und PBS (Doube et Kemp, 1979; Kemp et Bourne, 1980) getestet. Um die Gerinnung des Futterblutes zu verhindern, wurde es manuell defibriniert (Totze, 1933; Paine et al., 1983; Waladde et al., 1991) oder mit Heparin (Waladde et al., 1979; Kemp et al., 1986; Habedank et Hiepe, 1993), EDTA (Ethylendiamintetraacetat) (Voigt et al., 1993; Waladde et al., 1993) oder Citrat (Totze, 1933; Lees, 1948; Gregson, 1962) versetzt. Beim direkten Vergleich der Fütterungsergebnisse unter Verwendung verschiedener Methoden zur Gerinnungshemmung schnitt Heparin am besten ab, gefolgt von der manuellen Defibrinierung, während EDTA und Citrat wenig überzeugende Resultate lieferten (Voigt et al., 1993; Waladde et al., 1993; Kuhnert, 1995). Es ist anzumerken, dass bei der manuellen Defibrinierung eine nicht unerhebliche Menge an Protein aus dem Futterblut entfernt wird, welches der Zecke somit nicht mehr als Nährstoff zur Verfügung steht. Die bei erfolgreichen Membranfütterungen (Tab. 1) verwendeten Heparin-Mengen liegen zwischen 1,5 und 50 I.E./ml (Waladde et al., 1993; Habedank, 1995).

Um Keimwachstum im Nährmedium und an der Membran einzudämmen, wurde bei der Mehrheit der *In-vitro*-Fütterungsversuche mit Schildzecken dem Nährmedium mindestens ein Antibiotikum und z. T. auch ein Antimykotikum zugesetzt. In den Schildzeckenfütterungen, die zum Vollsaugen führten (siehe Tab. 1 und 2), kamen verschiedene Kombinationen von 50–100 I.E./ml Penicillin (bei den teilautomatisierten Fütterungssystemen bis zu 1000 I.E./ml), 50–100 µg/ml Streptomycin, 100 I.E./ml bzw. 5 µg/ml Gentamycin (bei den teilautomatisierten Fütterungssystemen bis zu 100 µg/ml), 50–1000 I.E./ml Nystatin und 0,25–5,00 µg/ml Amphotericin B zum Einsatz.

Außerdem verwendeten eine Reihe von Autoren $1-2 \times 10^{-3}$ mol/l ATP oder 10^{-3} mol/l Glutathion als Phagostimulanzen, die in das Nährmedium gegeben wurden (Waladde et al., 1979; Habedank et al., 1994; Kuhnert, 1995; Kröber et Guerin, 2007a). Glukose in einer Konzentration von 2 g/l diente der Stabilisierung der Erythrozyten (Kuhnert, 1995; Barré et al., 1998; Kröber et Guerin, 2007a; Lemos et al., 2011).

Die Umgebungsbedingungen waren in den bisherigen Versuchsansätzen sehr verschieden, da die Versuche z. T. im Inkubator, häufig jedoch auch im Raum und teilweise im Wasserbad durchgeführt wurden. Besonders die Umgebungstemperaturen variierten stark und lagen zwischen 21 und 39°C (Tab. 1 und 2). Die Luftfeuchtigkeit wurde mit 70–95 % rH in der Regel sehr hoch eingestellt, um die Fitness der Zecken möglichst lange aufrecht zu erhalten (Doube et Kemp, 1979; Kuhnert, 1995). Die Einstellung erfolgte über den Inkubator (Voigt et al., 1993; Habedank, 1995), einen Exsikkator (Doube et Kemp, 1979), durch den Wasserdampf über dem Wasserbad (Waladde et al., 1993) oder bei Versuchen im Raum durch das Auflegen eines feuchten Papiers oder Wattestückes auf die Zeckenkammer (Barré et al., 1998; Kuhnert et al., 1998). Gute Fütterungsergebnisse erzielten Voigt et al. (1993), Habedank (1995) und Waladde et al. (1995) außerdem mit einer erhöhten CO₂-Atmosphäre von 3–10 %.

2.3.2 Anwendungen der *In-vitro*-Fütterung

Die künstliche Schildzeckenfütterung kann zum einen genutzt werden, um die Biologie der Zecken, einschließlich ihres Saugaktes, weiter zu untersuchen, zum anderen jedoch auch, um neue Bekämpfungsmethoden zu entwickeln und zu testen. Insbesondere lassen sich Speichel, Zement und andere beim Saugakt abgegebene Stoffe für Untersuchungszwecke isolieren, wodurch neue Angriffspunkte für Bekämpfungsstrategien identifiziert werden könnten. Weiterhin ist es denkbar, die Übertragung von Pathogenen von der Zecke auf das Wirtstier, oder umgekehrt, zu untersuchen und durch Verfütterung von infiziertem Blut mögliche Vektorkompetenzen abzuklären (Kröber et Guerin, 2007b). Durch die Zugabe bestimmter Stoffe zum Futterblut lassen sich weitere Informationen gewinnen: z. B. über welche Mediatoren Wirtstierresistenzen vermittelt werden (Kemp et Bourne, 1980; Paine et al., 1983) oder über die Rolle von Symbionten bei Zecken, durch die Zugabe von Antibiotika zum Futterblut (Kröber et Guerin, 2007b). Potenzielle Akarizide können systemisch – über das Futterblut – oder lokal – durch Auftragen auf Membran und Zecken – auf ihre Wirksamkeit hin untersucht werden, wobei standardisierte Versuchsbedingungen vorliegen und lediglich kleine Mengen an Akariziden und zunächst keine Versuchstiere benötigt werden. So lassen sich auch RNA-Interferenz-Tests (RNAi) durchführen und durch Zugabe von Antiseren zum Futterblut Impfstoff-Kandidaten testen (Kröber et Guerin, 2007a).

Vielfach wurde die *In-vitro*-Fütterung von Schildzecken bereits erfolgreich angewendet. Gregson (1973) beobachtete so den Saugvorgang von *Dermacentor andersoni* optisch und mithilfe elektrischer Messungen. Das Saugverhalten von *R. microplus* untersuchten Waladde et al. (1979) durch die Anfertigung von Elektrogrammen und stellten eine erhöhte Saugfrequenz bei der Zugabe von ATP oder Glutathion zum Futterblut fest. Paine et al. (1983) fanden auf diese Weise heraus, dass das Saugverhalten von *D. andersoni* gehemmt wurde, wenn Histamin und Serotonin dem Blut zugesetzt wurden, und bestätigten dadurch die Vermutung, dass diese Stoffe mögliche Mediatoren von Wirtstierresistenzen sind. Auch Kemp und Bourne (1980) hatten bereits beobachtet, dass sich *R. microplus*-Larven teilweise

nach Zugabe von Histamin zum Nährmedium von der Membran ablösen. Und Stone et al. (1983) gelang es, nach der Fütterung von *Ixodes holocyclus*-Adulten, kleine Mengen Zeckentoxin aus dem Nährmedium zu isolieren.

Außerdem wurden eine Reihe an Infektionsversuchen mit verschiedenen Pathogenen, die in das Nährmedium gegeben wurden, erfolgreich durchgeführt: *Anaplasma marginale* (Howarth et Hokama, 1983), *Theileria parva* (Waladde et al., 1993; Waladde et al., 1995; Musyoki et al., 2004), *Theileria mutans* und *Ehrlichia ruminantium* (Voigt et al., 1993), *Borrelia burgdorferi* (Burkot et al., 2001), *Babesia divergens* (Bonnet et al., 2007), *Bartonella henselae* (Cotte et al., 2008), *Ehrlichia canis* (Fourie et al., 2013) und Bluetongue-Virus (Bouwknegt et al., 2010).

Kemp et al. (1986) verfütterten das Blut vakzinierter Rinder, das Antikörper gegen Zeckendarm-Zellen enthielt, an *R. microplus*, was partiell zur Darmschädigung der Zecken führte. Auch waren Versuche zum Knockdown von Genen in adulten *I. ricinus* mittels RNA-Interferenz erfolgreich (Campbell et al., 2010).

Darüber hinaus wurden wiederholt systemisch Akarizide per *In-vitro*-Fütterung getestet (Kuhnert, 1995; Jöns, 2001; Kröber et Guerin, 2007a) und auch topikal auf die Membran appliziert (Kröber et Guerin, 2007a).

3. Material und Methoden

3.1 Herkunft der Zecken

Für die durchgeführten *In-vitro*- und *In-vivo*-Fütterungsversuche kamen alle Stadien von *I. ricinus* und *D. reticulatus* zum Einsatz. Adulte *D. reticulatus* stammten stets aus Wildfang. Sie wurden im Berliner Umland an verschiedenen Standorten geflaggt (Tab. 3). Dazu wurde ein an einem Stab befestigtes 1–2 m² großes helles Fleece- oder Flanell-Tuch bis zu einer Höhe von maximal 80 cm über dem Boden über Vegetation gezogen. Die Zecken, die sich an der Flagge festhielten, wurden mit einer Pinzette abgesammelt. In großer Zahl konnten adulte *D. reticulatus* in der Gatower Heide (Abb. 3) und auf den Rieselfeldern bei Güterfelde sowie vereinzelt auf der Pfaueninsel geflaggt werden.



Abb. 3: Gatower Heide (Berlin-Gatow, im März 2014), Fangort für adulte *D. reticulatus*

Für Versuche mit juvenilen *D. reticulatus* wurden Larven und Nymphen aus der *In-vitro*- sowie der *In-vivo*-Laborzucht des Institutes für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin, FU Berlin, verwendet.

I. ricinus-Adulte und -Nymphen wurden ebenfalls im Berliner Umland geflaggt. Sie wurden vor allem auf der Pfaueninsel, in geringerer Zahl auch im Düppeler Forst, in der Gatower Heide, im Großen Fenn in Berlin und in Güterfelde gefangen. Larven von *I. ricinus*, sowie für je einen Versuch auch Nymphen und Adulte, stammten aus der *In-vitro*-Laborzucht.

Tab. 3: Fangorte von *I. ricinus* und *D. reticulatus* im Berliner Umland

Standort (Koordinaten)	Charakterisierung
Gatower Heide, Berlin-Gatow (52° 28' 36" N 13° 08' 07" E)	Wiesenbrache ohne Mahd, nur vereinzelt Bewuchs mit kleinen Bäumen und Sträuchern
Rieselfelder Güterfelde, Potsdam-Mittelmark (52° 21' 02" N 13° 11' 40" E)	Wiesenbrache, 1–2x jährlich Mahd, Grasschnitt verbleibt auf der Fläche, Baumbewuchs am Rand und zwischen verschiedenen Wiesenabschnitten
Pfaueninsel, Berlin-Wannsee (52° 26' 02" N 13° 07' 42" E)	Landschaftspark mit Laubmischwald und Unterwuchs
Düppeler Forst, Berlin-Wannsee (52° 25' 12" N 13° 06' 27" E)	Laubmischwald mit Unterwuchs
Großes Fenn, Berlin-Wannsee (52° 24' 14" N 13° 09' 05" E)	Moor, umgeben von Kiefernwald mit Unterwuchs

Die Aufbewahrung der Zecken bis zur Verwendung in den Fütterungsversuchen erfolgte im mit gesättigter MgSO₄-Lösung befüllten Exsikkator bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 80–90 % (Winston et Bates, 1960) und einer mittleren Temperatur von 20–22°C, bei einem 15:9-Hell-Dunkel-Rhythmus.

Für die Versuche wurden stets aktive, umherlaufende Zecken verwendet, die etwa die gleiche Größe hatten.

3.2 Längenmessung der Mundwerkzeuge von *I. ricinus* und *D. reticulatus*

Um in den *In-vitro*-Fütterungssystemen eine passende Membrandicke auswählen zu können, wurde eine Längenmessung der Hypostome aller Entwicklungsstadien durchgeführt. Dazu wurden Zecken verwendet, die in 70%igem Ethanol (vergällt; Berkel AHK, Berlin) gelagert waren. Sie wurden für die Messung auf einen Objektträger gelegt. Um zu gewährleisten, dass die Mundwerkzeuge parallel zu diesem lagen, wurde, wenn nötig, das Capitulum mit den Mundwerkzeugen mit einem Skalpell vom Idiosoma getrennt. Dies war bei adulten Zecken immer der Fall. Bei juvenilen Zecken genügte es durch den geringeren Körperumfang in der Regel, die intakten Zecken auf dem Objektträger zu belassen. Die Messungen erfolgten an einem Durchlichtmikroskop (LEICA DM2500[®], Leica, Wetzlar) mit integrierter Kamera (LEICA DFC425 C[®], Leica, Wetzlar) und Messfunktion (LEICA APPLICATION SUITE[®], Leica, Wetzlar). Gemessen wurde die Länge des Hypostoms von der Spitze bis zum

Übergang in die Basis capituli (Abb. 4). Je Zeckenstadium wurden von *I. ricinus* und *D. reticulatus* von mindestens 30 Individuen Messungen durchgeführt.

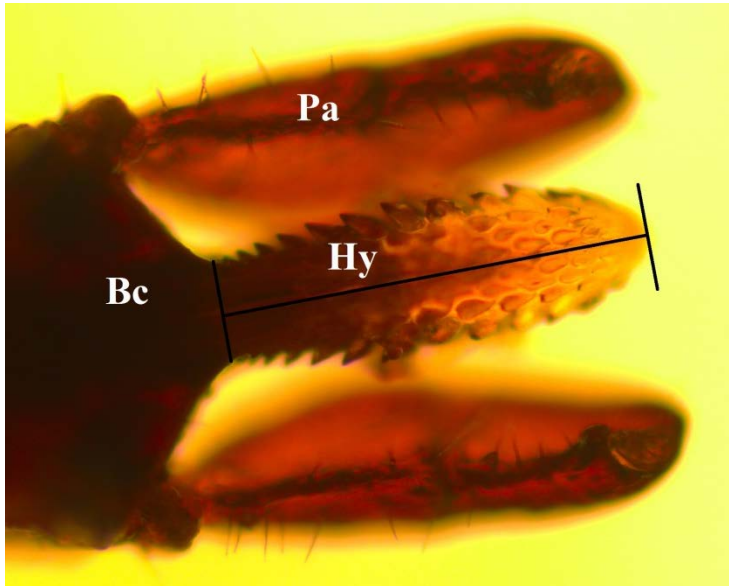


Abb. 4: Mundwerkzeuglängenmessung von *I. ricinus*; Bc = Basis capituli, Pa = Palpen, Hy = Hypostom

3.3 *In-vitro*-Fütterungssysteme mit Silikonmembranen

3.3.1 Herstellung der Silikonmembranen

Die Ergebnisse aus der Längenmessung der Mundwerkzeuge der verschiedenen Zeckenarten und -stadien lieferten Orientierungswerte für die maximalen Dicken der Membranen. Weiterhin sollten die Membranen so dick, reißfest und stabil sein, dass das Risiko der Perforation möglichst gering gehalten wird. Gleichzeitig sollte gewährleistet sein, dass die Membranen so dünn sind, dass thermische und olfaktorische Reize, die vom erwärmten Futterblut ausgehen, durch die Membran nicht vollständig abgeschirmt werden.

Eine Dicke von circa 100 μm (80–120 μm) erwies sich nach ersten orientierenden Versuchen für adulte *I. ricinus* und adulte *D. reticulatus* als geeignet, während für *I. ricinus*-Larven Membrandicken von 50 μm und für Nymphen Membrandicken von 60–70 μm verwendet wurden. Für die juvenilen Stadien von *D. reticulatus* wurden verschiedene Membranstärken zwischen 4 und 109 μm getestet.

Die Herstellung der Silikonmembranen erfolgte nach der durch Kröber und Guerin (2007a) beschriebenen Methode. Dazu wurden 15 g Einkomponentensilikon Elastosil[®] E4 (Wacker Chemie AG, Stuttgart), 0,15 g Elastosil[®] Farbpaste FL weiß RAL 9010 (Wacker Chemie AG, Stuttgart), 4,5 g Silikonöl DC 200[®] (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) und 2,9 g Hexan (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) in einer Kruke abgewogen und mit einem Holzspatel zu einer homogenen Paste verrührt. Auf einer glatten 40 x 55 cm großen Glasplatte wurde mit Klebestreifen möglichst faltenfrei eine 30 cm breite Polyethylen-Küchenfolie (PE-Küchenfolie) befestigt, auf die mit Klebestreifen wiederum 11,6 x 7,0 cm große Linsenpapiere aus Zellulose (Lens Cleaning Paper, Tiffen, New York, USA) geklebt wurden, die als Matrix für die Silikonmischung dienten. Mit dem Holzspatel wurde jeweils etwas von der Silikonmischung auf ein Linsenpapier gesetzt und mit einem 8 cm breiten glatten Metallspachtel (LUX, Wermelskirchen) dünn und gleichmäßig ausgestrichen. Wichtig für ein gutes Ergebnis waren die Winkelung und der Anpressdruck des Spachtels und die Gleichmäßigkeit der Ausstreichbewegung.

Zur Polymerisation wurden die Membranen für mindestens 12 Stunden bei Raumbedingungen offen liegen gelassen.

Nach der Polymerisation erfolgte eine Dickenmessung der Membranen mit einer Mikrometerschraube (Modell Nr. 169-101, Mitutoyo, Neuss). Um Kontaminationen der späteren Blutseite der Membranen zu verhindern, wurden die Messungen mit noch anhaftender Küchenfolie durchgeführt und deren mittlere Dicke von 10 µm anschließend subtrahiert. Membranen, die nicht die gewünschte Dicke hatten, wurden verworfen.

Für mehrere Versuche mit juvenilen *D. reticulatus* und für den Versuch mit Larven von *I. ricinus* wurde von diesem Protokoll der Membranherstellung abgewichen, um dünnere Membranen oder eine veränderte Membrankonsistenz zu erhalten (siehe 3.7.2, Tab. 5; 3.8.2, Tab. 9; 3.8.3 Tab. 10). Aufgrund der kurzen Mundwerkzeuge der juvenilen Stadien wurde teilweise eine Membrandicke von weniger als 50 µm angestrebt, was nicht möglich war, wenn Linsenpapier als Matrix zum Einsatz kam, da dieses bereits eine mittlere Dicke von 51 µm aufwies. Daher wurde bei den entsprechenden Versuchen auf das Linsenpapier verzichtet. Die oben genannte Silikonmischung wurde dazu direkt auf der Küchenfolie ausgestrichen. Um die Membranen weicher und für die Mundwerkzeuge der Larven und Nymphen leichter durchdringbar zu machen, wurden der oben genannten Silikonmischung bei zwei Versuchen mit *D. reticulatus*-Larven (siehe 3.8.3, Tab. 10, Dr-1L und Dr-2L) zusätzlich 5 g Toluol zugesetzt. In anderen Versuchen (siehe 3.7.2, Tab. 5, Ir-1L; 3.8.2, Tab. 9, Dr-1N; 3.8.3, Tab. 10, Dr-4L bis Dr-6L) wurde getestet, den gleichen Effekt statt durch die Zugabe von Toluol durch die Verwendung der doppelten Menge an Silikonöl (9 g) zu erzielen. Darüber hinaus wurde in Anlehnung an die Arbeit von Kuhnert (1995) in einem Versuch mit *D. reticulatus*-Larven (siehe 3.8.3, Tab. 10, Dr-4L) Silikonklebstoff Elastosil[®] E41 (Wacker Chemie AG, Stuttgart) direkt auf dem Linsenpapier ausgestrichen.

3.3.2 Fütterungssystem mit Zeckenkammern aus Plexiglas®, nach Kröber und Guerin (K+G Plexi)

Zunächst wurden die Zeckenkammern nach den Beschreibungen von Kröber und Guerin (2007a) aus Plexiglasröhren (Evonik Industries, Essen) gebaut. Die Röhren hatten einen Innendurchmesser von 26 mm und einen Außendurchmesser von 30 mm und wurden auf eine Länge von 45 mm gesägt. Um die Röhren wurde jeweils ein passender Plexiglasring (H&S Kunststofftechnik GmbH, Siegen) mit einem Innendurchmesser von 30 mm fixiert, um später ein Einhängen der Röhren in die Blutgefäße zu ermöglichen (Abb. 5). Zur Befestigung der Silikonmembranen wurde auf die untere Kante der Röhren Silikonkleber Elastosil® E41 (Wacker Chemie AG, Stuttgart) aufgebracht. Dann wurden die Röhren auf die spätere Zeckenseite der Silikonmembranen gesetzt und leicht angedrückt. Ein Glasfaser-Moskitonetz (grau, 1,4 mm Maschenweite; Drahtwaren Driller GmbH, Freiburg) wurde zu Kreisen mit 25 mm Durchmesser zugeschnitten. Diese wurden mit einer kleinen Menge Silikonkleber auf der mittlerweile in der Röhre liegenden Membranseite (der späteren Zeckenseite) befestigt. Dabei war es wichtig, nur eine möglichst kleine Fläche des Moskitonetzes mit dem Klebstoff zu versehen, um die Membran weitestgehend frei von Klebstoff und somit perforierbar für die Zecken zu halten. Zum Auftragen wurde teilweise ein feiner Pinsel zur Hilfe genommen. Ein Moskitonetz aus Kunststoff wurde nicht verwendet, da später auf die Membran mit dem angeklebten Moskitonetz ein Tierhaarextrakt aufgebracht wurde, das Dichlormethan als Lösungsmittel enthielt, welches verschiedene Kunststoffe auflöst.

Im ersten Versuch mit *I. ricinus*-Adulten (siehe 3.7.1, Tab. 4, Ir-1A) wurden in einigen Kammern anstelle des Moskitonetzes ein kreisförmig zugeschnittenes Stück Metallgitter (4 mm Maschenweite) bzw. ein Fliesenkreuz (1,7 cm, LUX, Wermelskirchen) mit Silikonklebstoff auf die Zeckenseite der Membran geklebt. Des Weiteren wurde in zahlreichen Versuchen mit juvenilen Zecken (siehe 3.7.2, Tab. 5; 3.8.2, Tab. 9; 3.8.3, Tab. 10) aufgrund von Erfahrungen aus vorangegangenen Versuchen auf die Verwendung des Moskitonetzes verzichtet.

Der Silikonkleber wurde für mindestens 3 Stunden trocknen gelassen. Nun wurden die Membranen kreisförmig und bündig mit den darauf fixierten Röhren mit einer feinen Schere ausgeschnitten. Die noch anhaftende Küchenfolie auf der späteren Blutseite der Membranen wurde vorsichtig mit einer Pinzette abgezogen.

Um die Qualität der Membranen und der Verklebungsstellen der hergestellten Zeckenkammern zu beurteilen, wurde eine Dichtigkeitsprüfung durchgeführt. Sterile Petrischalen wurden 2–3 mm hoch mit 70%igem Ethanol gefüllt, in die die Zeckenkammern hineingesetzt wurden. Über einen Zeitraum von 20 Minuten wurde beobachtet, ob Ethanol in die Kammern eindringt. Wurde ein Leck festgestellt, erfolgte nach dem Trocknen der Zeckenkammer eine Reparatur mit Silikonkleber, der unter einer Stereolupe (Stemi DV4, Zeiss, Oberkochen) mit einem sehr feinen Pinsel aufgetragen wurde.

PE-Stopfen (BRIMON Laborbedarf, Hamburg) wurden mittig mit einem Loch versehen, in das ein feines Netz geklebt wurde. Die so präparierten Stopfen erlaubten eine Belüftung der Zeckenkammer, verhinderten jedoch gleichzeitig das Entweichen der Zecken (Abb. 5c).

Als Blutgefäße dienten saubere desinfizierte 6-Well-Platten (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen), in die die Zeckenkammern mithilfe des Plexiglasringes so hineingehängt wurden, dass sich die Membranen 1–2 mm über dem Boden der Wells befanden (Abb. 5b). In jedes Well wurden vorab 3,1 ml Futterblut gegeben. Wurden die Kammern in dieser Weise bis dicht über den Well-Boden gehängt, konnte sichergestellt werden, dass die Membran so tief in das Blut tauchte, dass sie bei einer Sedimentation der zellulären Blutbestandteile bis in die erythrozytenreiche Sedimentationsschicht reichte. Die Well-Platten wurden mehrmals wiederverwendet und vor jeder Benutzung abgewaschen, abgetrocknet und mit 70%igem Ethanol desinfiziert.

Die Well-Platten wurden in ein Wasserbad mit Schüttelvorrichtung (WNE 22, Memmert, Schwabach) gestellt, das mit einem lichtdurchlässigen Plexiglas-Deckel verschlossen war. Das Wasser hatte eine Temperatur von 38,5°C, sodass im Blut eine Temperatur von 37,0–37,7°C erreicht wurde. Die Messung der Bluttemperatur wurde mit einem digitalen Thermometer (Lab Thermometer iP65 LT-102, TFA Dostmann, Wertheim) über einen Zeitraum von mindestens 2 Stunden durchgeführt. Die relative Luftfeuchtigkeit lag in den Zeckenkammern bei 78 %. Um die Luftfeuchtigkeit zu ermitteln, kamen kleine (17 mm Durchmesser, 6 mm Höhe) programmierbare Messsonden zum Einsatz (iButton DS1923, Sunnyvale, USA), die alle 30 Minuten die Messwerte aufzeichneten und mit dem Thermodata Viewer 3.1.23 (Thermodata, Whitewater, USA) ausgelesen wurden. Die Frequenz des horizontalen Schüttelns des Wasserbadeinsatzes war bei den ersten Versuchen 35/min und bei späteren Versuchen stets 50/min.

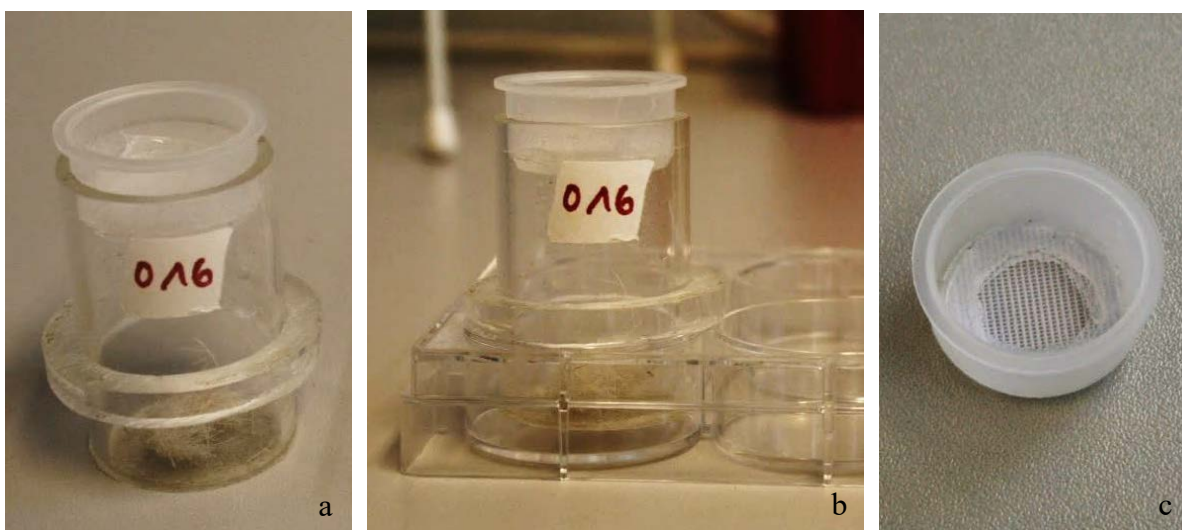


Abb. 5: **a:** Zeckenkammer nach Kröber und Guerin, aus Plexiglas, mit Rinderhaaren und mit perforiertem Deckel; **b:** Zeckenkammer in 6-Well-Platte, zwischen Membran und Well-Boden befindet sich ein Spalt von 1–2 mm Breite (hier ohne Blut); **c:** perforierter Deckel

3.3.3 Fütterungssystem mit Zeckenkammern aus Glas, modifiziert nach Kröber und Guerin (K+G Glas)

Nach den ersten Erfahrungen mit den Plexiglaskammern wurden diese aufgrund hygienischer Probleme durch die besser zu reinigenden Glaskammern ersetzt. Der Bau dieser Zeckenkammern erfolgte analog zu dem Bau der Kammern aus Plexiglas. Jedoch wurden hierfür autoklavierbare Röhren aus Borosilikatglas (Neubert-Glas, Ilmenau) verwendet, die auf eine Länge von 65 mm zugeschnitten waren. Sie hatten einen Innendurchmesser von 28 mm und einen Außendurchmesser von 32 mm.

Nach dem Ankleben von Membran und Moskitonetz, dem Trocknen des Klebstoffes, dem Ausschneiden und dem Abziehen der Küchenfolie, wurde bei diesen Zeckenkammern (Abb. 6a) ein zusätzlicher Schritt durchgeführt: Die Kammern wurden 20 min bei 134°C autoklaviert.

Über die Röhren wurde jeweils ein Gummiring (Glockendichtung; Lux, Wermelskirchen) mit 32 mm Innendurchmesser geschoben, um an ihnen später die Glaskammern in die Blutgefäße hängen zu können (Abb. 6b).

Die Dichtigkeitsprüfung und der Bau der Deckel wurden entsprechend den Plexiglas-Kammern durchgeführt. Aufgrund der Ergebnisse von Fourie et al. (2013) wurden die Versuche ab Oktober 2013 mit einem veränderten Deckel durchgeführt: Der Rand der perforierten PE-Deckel wurde mit einer Schere abgeschnitten, sodass sich die Deckel tief in die Zeckenkammer drücken ließen. Sie wurden mit einem etwa 4 x 10 cm großen Stück Netz bis auf eine Höhe von 5–10 mm über der Membran geschoben (Abb. 7).

Sterile 50-ml-Bechergläser (SIMAX[®], Bohemia Cristal, Selb) wurden mit 5 ml Futterblut gefüllt, in das die Zeckenkammern mithilfe des Gummiringes so hineingehängt wurden, dass sich zwischen der Membran und dem Glasboden ein 1–2 mm breiter blutgefüllter Spalt befand. Auch nach einer Sedimentation der Erythrozyten tauchte die Membran somit in die Sedimentationsschicht.

Die Bechergläser wurden zur Erwärmung des Blutes in ein Schüttelwasserbad mit einer Temperatur von 38°C gestellt. Die Bluttemperatur lag im Bereich von 36,9–37,7°C und die Lufttemperatur in den Zeckenkammern bei durchschnittlich 38,1°C. Das Wasserbad war mit einem lichtdurchlässigen Deckel ausgestattet, und die Schüttelfrequenz betrug 50/min. Die relative Luftfeuchtigkeit in den Zeckenkammern betrug durchschnittlich 78 %.

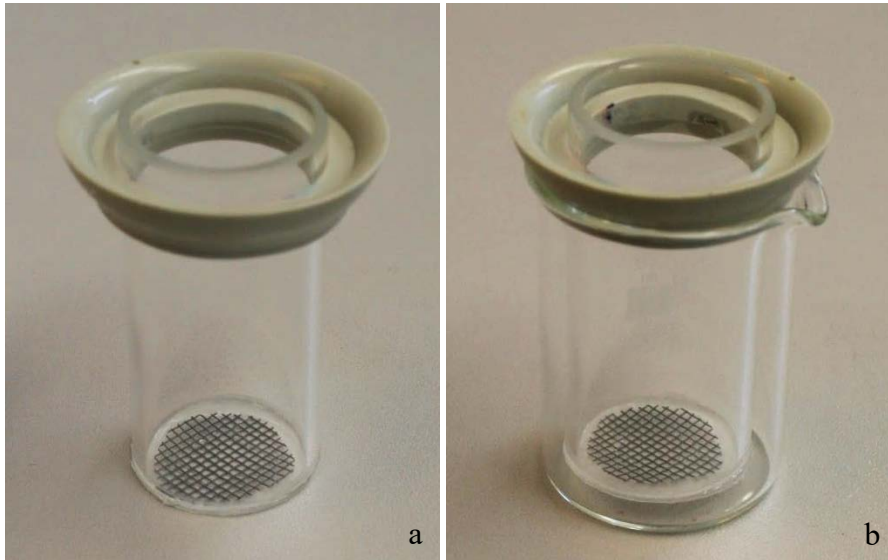


Abb. 6: **a:** Zeckenkammer aus Glas (ohne Deckel); **b:** Zeckenkammer mithilfe des Gummiringes eingehängt in ein 50-ml-Becherglas; zwischen Membran und Boden des Becherglases befindet sich ein Spalt von ca. 2 mm



Abb. 7 a und b: Deckel, der bis 5–10 mm über die Membran geschoben wird; verwendet ab Oktober 2013

3.3.4 Durchfluss-Fütterungssystem aus Polystyrol (DFS PS)

Als Zeckenkammern kamen hier ebenfalls die Glaskammern nach Kröber und Guerin (2007a) zum Einsatz. Die Durchflussskammern, die das Futterblut enthielten und in die die

Zeckenkammern gehängt wurden, wurden jeweils aus einer sterilen 75-cm²-Zellkulturflasche aus Polystyrol (Zellkulturflasche 75, TPP, Trasadingen, Schweiz) gebaut (Abb. 8). Mithilfe eines Lötkolbens wurden in die obere Fläche der Flasche zwei Kreise mit einem Durchmesser von 40 mm geschmolzen. In den Deckel und in die gegenüberliegende kurze Seitenfläche der Flasche, etwa 3 mm über dem Flaschenboden, wurde jeweils ein Loch von 5–7 mm Durchmesser geschmolzen. Von einer 200- μ l-Pipettenspitze wurde die Spitze mit einer Schere abgeschnitten und verworfen. Das übrig gebliebene Stück wurde mit der schmalen Seite in das Loch im Deckel der Zellkulturflasche gesteckt und dort mit Silikonkleber fixiert. Dies wurde später der Einlass für das Futterblut. In das andere Loch (den späteren Auslass für das Blut) wurde ein 3–5 cm langes Stück Silikonschlauch mit einem Außendurchmesser von 6 mm und einem Innendurchmesser von 4 mm gesteckt und ebenfalls mit Silikonkleber fixiert (Abb. 8).



Abb. 8: Durchflusskammer aus Polystyrol; **a:** Schrägaufsicht; **b:** Detailansicht des Deckels mit eingeklebtem breiteren Ende einer 200- μ l-Pipettenspitze; **c:** Durchflusskammer mit eingehängten Zeckenkammern aus Glas; zwischen den Silikonmembranen und dem Boden der Durchflusskammer befindet sich ein 1–2 mm breiter Spalt (hier ohne Futterblut)

Da das Innere der Kulturflaschen durch das Umbauen nicht mehr steril war und Polystyrol nicht zum Autoklavieren geeignet ist, wurden die Kammern vor jeder Verwendung mit

Wasser gewaschen, mit einem Zellstofftuch gründlich abgetrocknet und dann mit 70%igem Ethanol ausgespült. Anschließend kamen sie für mindestens 3 Stunden bei 80°C in den Trockenschrank.

Eine 1-l-Glasflasche (SCHOTT DURAN®, DURAN Group, Wertheim) diente als Vorratsbehältnis und wurde mit 600 ml Futterblut befüllt. Die Flasche wurde mit einem Deckel mit zwei Schraubverbindungskappen mit einem GL14-Gewinde und 2 PTFE-Einsätzen für Schläuche mit einem Außendurchmesser von 6 mm verschlossen. Ein Silikonschlauch war auf eine Länge von circa 29 cm geschnitten, reichte bis zum Boden der Flasche und diente der Belüftung. Der zweite Silikonschlauch wurde auf etwa 7 cm Länge geschnitten (Abb. 9b). Die Flasche wurde mit dem Deckel nach unten mit drei -20°C kalten Kühlakkus in eine gut isolierende Styroporbox gestellt, die so präpariert war, dass sich unter dem Flaschendeckel ein Durchlass für die Silikonschläuche befand (Abb. 9a). Nach dem Verschließen der Box wurde ein Infusionsbesteck (Soluflo®, Dispomed, Gelnhausen) in das kürzere Schlauchstück gesteckt und auf circa 60 cm Länge gekürzt, um das Totvolumen möglichst gering zu halten. Die Styroporbox mit dem Futterblut wurde erhöht auf einem Regal aufgestellt, um einen deutlichen Höhenunterschied zwischen dem Blutvorrat und der Durchflusskammer zu erzielen (Abb. 10a). Das gekürzte Ende des Infusionsschlauches wurde



Abb. 9: a: gekühlter Blutvorrat in der Flasche (hier ohne Blut); langer Schlauch zur Belüftung der Flasche; langer Schlauch zum Anschluss des Infusionsbesteckes; b: Detailaufnahme der Glasflasche mit 2 Oliven und Silikonschläuchen

in die konisch zulaufende abgeschnittene Pipettenspitze gesteckt, die als Einlass zur Durchflusskammer diente. Die Durchflusskammer wurde auf feinkörnigen Sand gestellt, der dünn auf einer Heizplatte (Präzitherm 28-1, Störk-Tronic, Stuttgart) ausgebreitet wurde (Abb. 10b). Wurde die Kammer direkt auf die Heizplatte gestellt, wurde das Futterblut nicht gleichmäßig und über einen längeren Zeitraum konstant erwärmt, da sich an der Unterseite der Durchflusskammer ein 1–2 mm hoher Rand befand, der zu einem Luftpolster zwischen Heizplatte und Durchflusskammer führte. Die Temperatur der Heizplatte wurde auf 40°C eingestellt, was eine Bluttemperatur von 37,1–37,3°C zur Folge hatte. Die Lufttemperatur in der Zeckenkammer lag im Mittel bei 36,4°C.

Der Blutfluss erfolgte passiv entlang der Schwerkraft durch den Infusionsschlauch und wurde mithilfe der Rollklemme reguliert. Bei wässrigen Lösungen entsprechen 20 Tropfen circa einem Milliliter Flüssigkeit. Angestrebt wurde ein Blutfluss von 300–350 ml pro Tag. Dementsprechend wurde eine Fließgeschwindigkeit von 4–5 Tropfen je Minute eingestellt.

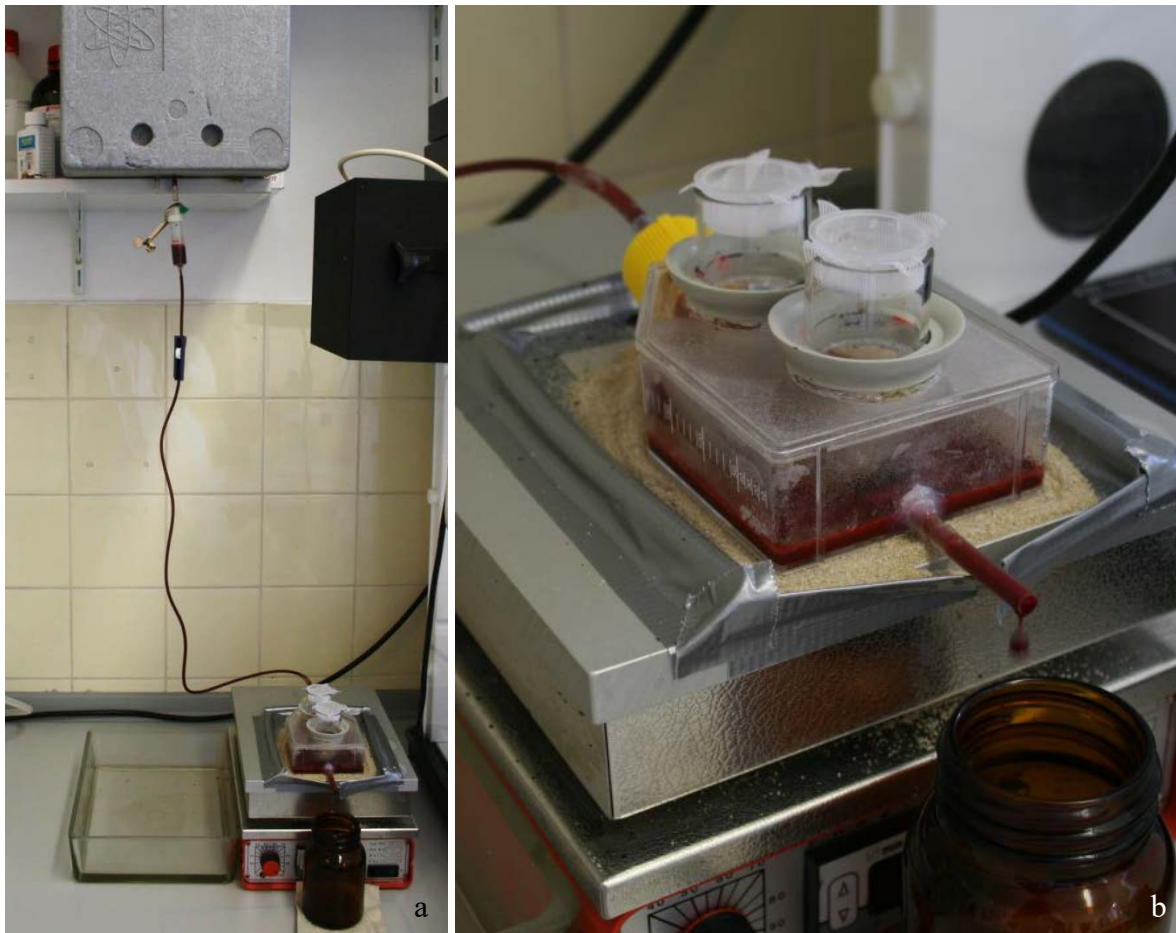


Abb. 10: a: Versuchsaufbau mit Durchflusskammer aus Polystyrol; b: Durchflusskammer aus Polystyrol auf Sand; Erwärmung durch Heizplatte; mit 2 eingehängten Zeckenkammern aus Glas

Der Abfluss des Blutes aus der Durchflusskammer erfolgte ebenfalls passiv. Aufgrund der Oberflächenspannung floss das Blut nicht kontinuierlich ab, sondern es kam zu einem Anstauen des Blutes in der Kammer und mehrmals täglich zu einem intervallartigen Ablauf in das Auffanggefäß.

Auf die Deckel der Zeckenkammern wurde jeweils ein Stück feuchter Zellstoff gelegt, um die Luftfeuchtigkeit in ihnen zu erhöhen. Bei den beiden oben genannten Systemen war das nicht nötig, da dort die Zeckenkammern im Wasserbad standen und ohnehin von einer sehr hohen Luftfeuchtigkeit umgeben waren. Der Zellstoff wurde täglich angefeuchtet. Die relative Luftfeuchtigkeit in den Zeckenkammern betrug so durchschnittlich 74 %.

3.3.5 Durchfluss-Fütterungssystem aus Glas (DFS Glas)

Auch bei diesem Fütterungssystem wurden die unter 3.3.3 beschriebenen Glaskammern als Zeckenkammern verwendet. Um eine bessere Hygiene zu gewährleisten und mehr Zecken gleichzeitig füttern zu können, wurden die Durchflusskammern nun jedoch aus autoklavierbarem Borosilikatglas und mit Platz zur gleichzeitigen Verwendung von 6 Zeckenkammern angefertigt. Die Herstellung der Kammern erfolgte durch eine Glasbläserei (Glastechnische Werkstatt, Institut für Chemie, Technische Universität Berlin).

Die Durchflusskammern (Abb. 11) bestanden aus einer Blutschale (circa 264 x 120 x 30 mm) aus Borosilikatglas mit zwei Glasoliven zum Anschluss von Schläuchen mit einem Innendurchmesser von 4–5 mm für den Blutein- und -auslass. Die Olive für den passiven Blutauslass befand sich 3 mm über dem Glasboden der Durchflusskammer, was später die Stauhöhe des Blutes in der Kammer regulierte. Wichtig war auch, dass der Boden der Kammer möglichst eben war, um eine gleichmäßige Erwärmung des Blutes durch die Heizplatte zu ermöglichen. Auf die Blutschale wurde ein passender Deckel aus Fensterglas (circa 264 x 120 mm) gelegt, in den 6 Löcher mit einem Durchmesser von 40 mm gebohrt waren. Diese Löcher dienten später zum Einhängen der Zeckenkammern.

Vor jeder Verwendung wurden die Blutschalen autoklaviert. Die Deckel der Durchflusskammern blieben unsteril, und es wurde beim Einhängen und Herausnehmen der Zeckenkammern stets darauf geachtet, dass sie nicht den Deckel berührten, um eine Kontamination zu vermeiden.

Analog zu dem Vorgehen bei den Durchflusskammern aus Polystyrol wurde eine 1-l-Glasflasche (SCHOTT DURAN[®], DURAN Group, Wertheim) mit 600 ml Futterblut befüllt. Sie wurde mit einem Deckel mit zwei Durchlässen für Schläuche mit einem Außendurchmesser von 6 mm und einem Innendurchmesser von 4 mm verschlossen (Abb. 9b). In den einen Durchlass wurde zur Belüftung ein kurzes Schlauchstück von 5 cm gesteckt, das mit einem Spritzenfilter mit 0,2 µm Porengröße (Rotilabo Spritzenfilter CA, Roth) verbunden war. Im zweiten Durchlass wurde ein Schlauch von 35–40 cm Länge fixiert, der bis auf den Boden der Flasche reichte und der Blutentnahme diente (Abb. 12 und 13). Die

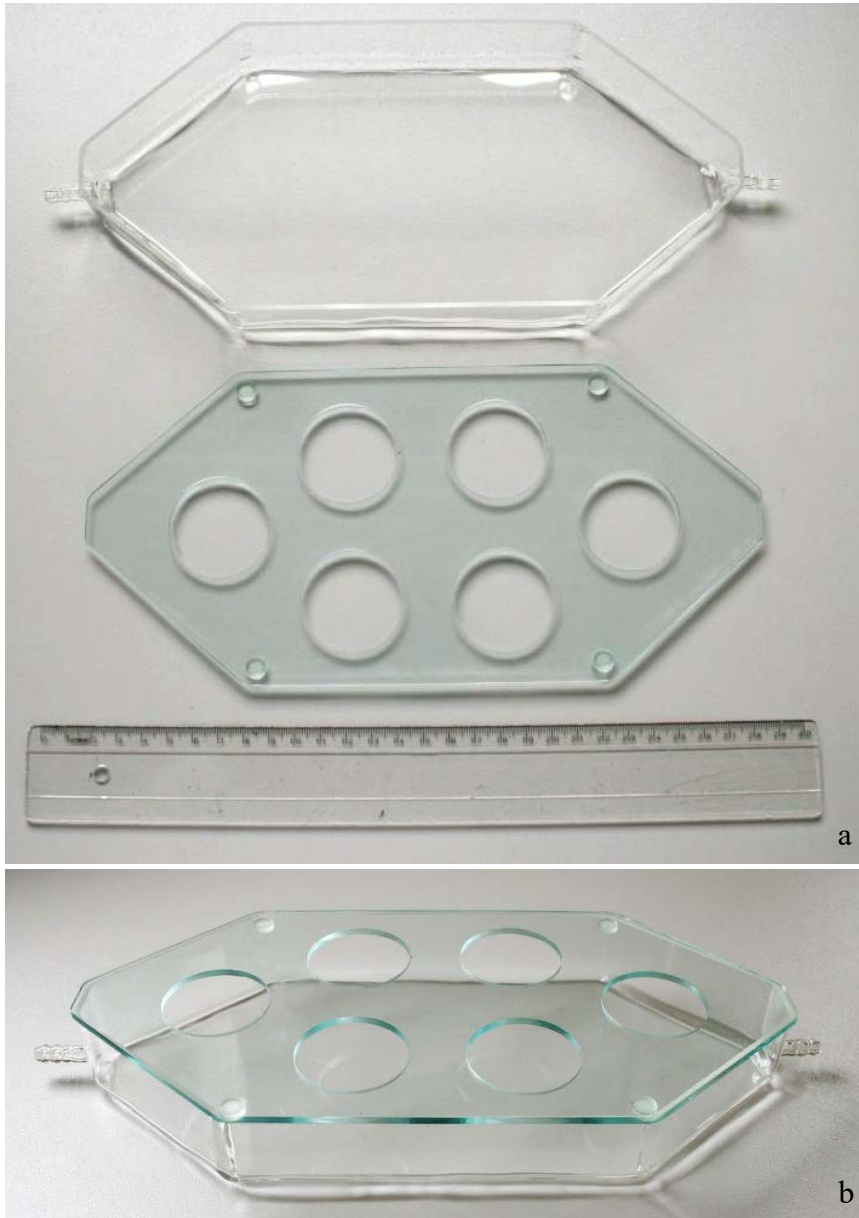


Abb. 11 a und b: Glasdurchflusskammer aus Borosilikatglas mit abnehmbarem Deckel aus Fensterglas; mit Löchern zum Einhängen von 6 Zeckenkammern

Flasche wurde zusammen mit drei -20°C kalten Kühlakkus aufrecht in eine fest verschlossene Styroporbox gestellt, die für den Durchlass der beiden Schläuche mit einem Loch versehen war. Der Schlauch für die Blutentnahme wurde mithilfe eines Schlauchverbinders (für Schlauch-ID von 3–5 mm, VWR, Darmstadt) mit einem anderen 40 cm langen Schlauch mit 2,79 mm Innendurchmesser und drei Stoppfern (IDEX, Wertheim) verbunden. Dieser Schlauch war in eine Peristaltikpumpe (Ismatec Reglo ICC, Modell ISM 4408, IDEX, Wertheim) eingespannt und wiederum über einen Schlauchverbinder mit einem kurzen Schlauchstück (ID 5 mm, AD 8 mm) verbunden, welches über jene Glasolive der Durchflusskammer geschoben war, die dem Bluteinlass diente (Abb. 12 und 13). Alle in diesem Versuchsaufbau verwendeten Schläuche bestanden aus Silikon.

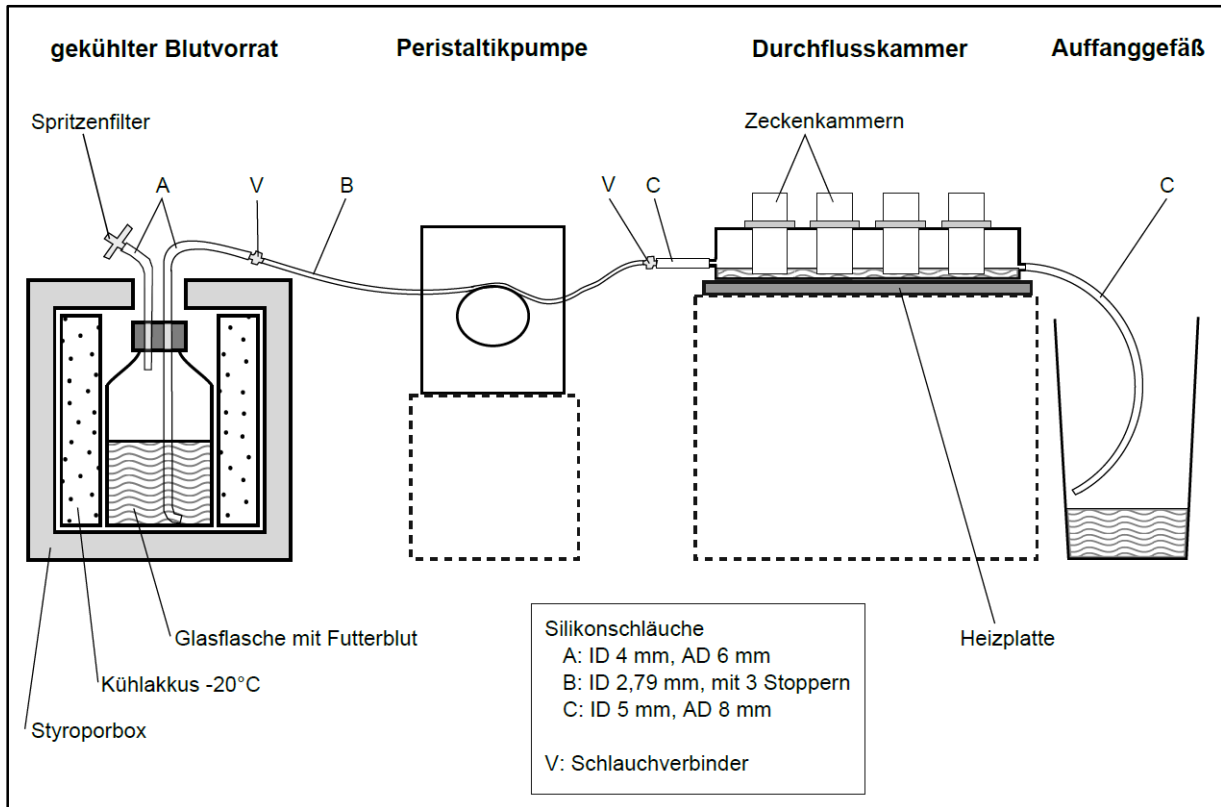


Abb. 12: Schematischer Versuchsaufbau des Durchfluss-Fütterungssystems aus Glas (DFS Glas)

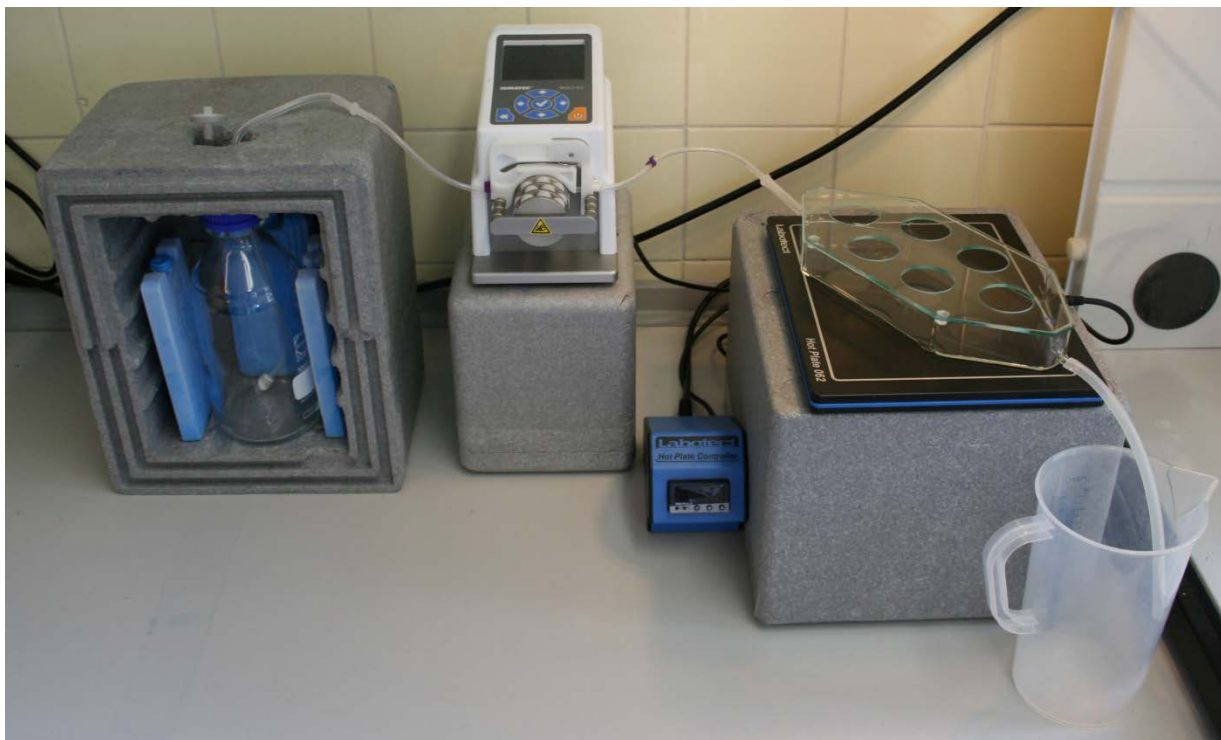


Abb. 13: Versuchsaufbau des Durchfluss-Fütterungssystems aus Glas (DFS Glas) (hier ohne Blut, Zeckenkammern und Abdeckung vor dem Blutvorrat)

Die Durchflusskammer mit dem Futterblut und den 6 eingehängten Zeckenkammern stand auf einer Heizplatte (Hot Plate 062, Labotect, Göttingen), deren Temperatur auf 38,0°C geregelt war. Dies hatte eine Bluttemperatur von 36,6–38,3°C zur Folge. Die Lufttemperatur in den Zeckenkammern lag durchschnittlich bei 36,4°C.

Der Blutfluss wurde über die Peristaltikpumpe reguliert. Es wurde eine Pumprate von 0,2 ml/min eingestellt (288 ml/d).

Der Abfluss des Blutes aus der Durchflusskammer erfolgte passiv durch einen Silikonschlauch (ID 5 mm, AD 8 mm), der an der zweiten Olive angeschlossen war. Ein Auffanggefäß diente zum Sammeln des verbrauchten Blutes. Der Abfluss erfolgte mehrmals täglich intervallartig, da die Oberflächenspannung des Blutes in der Kammer einen kontinuierlichen Abfluss verhinderte.

Auch hier wurde auf die Deckel der Zeckenkammern jeweils ein Stück feuchter Zellstoff gelegt, um die Luftfeuchtigkeit in den Zeckenkammern, die dem Raumklima entsprach, auf durchschnittlich 74 % rH zu erhöhen.

3.3.6 Fixierungsstimuli für Zeckenkammern mit Silikonmembranen

Zecken sind optimal an die Blutaufnahme am Wirtstier angepasst. Zahlreiche Reize und Faktoren beeinflussen die komplexe Abfolge von der Wirtssuche über die Suche einer geeigneten Stelle am Wirt und die Fixierung bis hin zur Blutaufnahme. Um das Vorhandensein eines geeigneten Wirtes vorzutäuschen, ist im artifiziellen Fütterungssystem daher der Einsatz verschiedener Fixierungsstimuli nötig.

Es wurde vermutet, dass von dem angebotenen erwärmten Futterblut bereits eine stimulierende Wirkung ausging. Daher wurde versucht, Blut von Tieren zu verwenden, die als Wirte in Betracht kamen (Rinder und Kaninchen). Auch die Bluttemperatur (siehe Beschreibung der einzelnen Fütterungssysteme) orientierte sich an der der möglichen Wirtstiere. Das Blut wurde zusätzlich mit ATP versetzt, das für Schildzecken und andere blutsaugende Arthropoden eine saugstimulierende Wirkung hat (Hosoi, 1958; 1959; Galun, 1967; Kemp, 1980; Sonenshine et al., 1986). Ebenfalls wirkt Glukose, die primär zur Erythrozyten-Stabilisierung zugesetzt wurde, als Phagostimulanz (Galun, 1978; Soares et al., 2013).

Neben der stimulierenden Wirkung des angebotenen Futterblutes kamen mechanische und olfaktorische Fixierungsstimuli zum Einsatz.

Als mechanischer Stimulus diente das Moskitonetz, das auf die Membran geklebt wurde. Das Fliesenkreuz und das Metallgitter aus Versuch Ir-1A (siehe 3.7.1, Tab. 4) sollten denselben Effekt haben.

Fein geschnittene helle Wirtstierhaare (Rind, Kaninchen oder Gerbil), die auf die Membran gestreut wurden, sollten sowohl mechanisch als auch olfaktorisch stimulierend wirken.

Der Wirtstiergeruch wurde zusätzlich durch das Aufbringen von 90 µl (in einigen Versuchen auch mehr) Tierhaarextrakt verstärkt.

Es wurde jeweils ein Extrakt von Rinder- und von Kaninchenhaar mit Dichlormethan (DCM) als Lösungsmittel nach einem Protokoll von Dr. T. Kröber und Dr. P. Guerin (Anleitung ICTTD-Workshop „In vitro feeding of ixodid ticks“, 05.–08.05.2008, Université de Neuchâtel) angefertigt. Dazu wurden von lebendigen Galloway-Rindern und von am Schlachthof getöteten Kaninchen jeweils circa 50 g Haare mit der Schere und einer Schermaschine abgeschnitten. Es wurde darauf geachtet, dass die Tiere in der Vergangenheit nicht mit Akariziden behandelt worden waren. Die Haare wurden auf eine Länge von 5–10 mm geschnitten und in einen 1-l-Erlenmeyerkolben (SCHOTT DURAN[®], DURAN Group, Wertheim) gegeben. Aufgrund der Toxizität von DCM und seiner Eigenschaft, Kunststoffe aufzulösen, wurden alle Arbeiten unter einer Abzugshaube und ausschließlich mit Glasmaterialien durchgeführt. 350 ml DCM wurden über die Haare gegossen. Nach 20 min Einwirkzeit und gelegentlichem Schwenken des Kolbens wurden 100 ml in eine Glasflasche abgegossen. Der Kolben mit den Haaren wurde mit frischen 100 ml DCM aufgefüllt und der gesamte Vorgang zweimal wiederholt. Beim letzten Abgießen wurde so viel von der Lösung wie möglich in die Glasflasche überführt. Eine 1-l-Saugflasche (SCHOTT DURAN[®], DURAN Group, Wertheim) wurde über eine konische Gummidichtung (DURAN Group, Wertheim) mit einem Büchnertrichter (SCHOTT DURAN[®], DURAN Group, Wertheim) verbunden, in den ein Glasfaserfilter GF6 (Whatman, Dassel) gelegt war. Das DCM mit den darin gelösten Geruchsstoffen wurde aus der Flasche in den Büchnertrichter überführt. An die Saugflasche wurde mithilfe einer Pumpe (Vacuubrand, Wertheim) ein Vakuum angelegt, sodass die Flüssigkeit durch den Glasfaserfilter in die Saugflasche filtriert wurde. In einem Rotationsverdampfer (Institut für Veterinär-Biochemie, FU Berlin) erfolgte anschließend bei 55°C die vollständige Verdampfung des Dichlormethans. Einige Tropfen öligere Flüssigkeit blieben im Rundkolben des Verdampfers zurück und wurden nun geruchlich beurteilt. War der gewünschte Tiergeruch wahrnehmbar, wurde das Extrakt weiterverarbeitet. Das Rinderextrakt wurde wieder in 100 ml DCM gelöst, das Kaninchenextrakt in 50 ml DCM, da sich hier aus der gleichen Menge Haare weniger geruchstragende Substanzen herauslösen ließen. Nun sollte festgestellt werden, wie viel Material mit geringer Flüchtigkeit, das heißt wie viel Extrakt, in einem Milliliter Lösung vorhanden war. Dazu wurde ein Objektträger mit einer Präzisionswaage gewogen und anschließend 1 ml Lösung aufgebracht, um das DCM unter der Abzugshaube abdampfen zu lassen. Nach erneutem Wiegen lieferte die Differenz die Masse der geruchstragenden Substanzen je ml. Angestrebt waren circa 10 mg/ml. Diese Konzentration wurde auch von Kuhnert et al. (1995) verwendet. War die Konzentration zu hoch oder zu niedrig, wurden die Messungen nach Verdünnung der Lösung mit DCM beziehungsweise nach Abdampfen von DCM unter der Abzugshaube wiederholt. Die resultierenden Lösungen wurden in 2-ml-Glasröhrchen mit Schraubkappe portioniert und bei -80°C gelagert.

Ein Versuch mit *D. reticulatus*-Larven (Dr-3L; siehe 3.8.3, Tab. 10) wurde mit Gerbilhaarextrakt durchgeführt. Dazu wurde das Protokoll der Extrakt-Herstellung für eine Durchführung mit einer sehr kleinen Menge an Haaren abgeändert. 1–2 g Haare wurden mit einer Schere von lebenden Gerbilen abgeschnitten und zusammen mit 5 ml DCM in ein 50-ml-Becherglas gegeben. Während der 40-minütigen Einwirkzeit wurde das Glas mehrmals geschwenkt und die Lösung anschließend über einen Glasfaserfilter GF 6 (Whatman, Dassel) in ein anderes 50-ml-Becherglas umgegossen. Die Haare wurden erneut mit 5 ml DCM bedeckt und der Vorgang wiederholt. Die filtrierte Lösung wurde nun für 20 min unter eine Abzugshaube gestellt, um das DCM abdampfen zu lassen, bis nur noch 1 ml Lösung übrig war. Für die geruchliche Beurteilung wurde ein Tropfen der Lösung auf einen Objektträger gegeben. Nach dem Verdampfen des DCM war Gerbilgeruch wahrnehmbar. Aufgrund der geringen Menge wurde hier vor der Verwendung der Lösung keine Messung der Extraktmenge durchgeführt.

Bei einem weiteren Versuch mit *D. reticulatus*-Larven (Dr-4L, siehe Tab. 10) wurde ein Extrakt verwendet, dessen Herstellung von dem oben genannten Protokoll abwich. Hergestellt wurde ein Kaninchenextrakt mit 70%igem Ethanol als Lösungsmittel (Tajeri et Razmi, 2011), um eine mögliche toxische Wirkung von DCM-Spuren auf die Zecken auszuschließen. Dazu wurden 20 g Haare mit einer Schere von getöteten Kaninchen am Schlachthof abgeschnitten und mit 300 ml vergälltem Ethanol 70 % in einen 1-l-Erlenmeyerkolben (SCHOTT DURAN®, DURAN Group, Wertheim) gegeben. Nach einer Stunde Einwirkzeit und gelegentlichem Schwenken wurde so viel von der Lösung wie möglich in einen anderen Kolben abgegossen. Mit frischen 100 ml Ethanol wurde der Vorgang wiederholt. Es folgte auch hier der Filtrierungsschritt durch den Glasfaserfilter. Die entstandene Lösung wurde für 9 Tage unter die Abzugshaube gestellt, um Ethanol verdampfen zu lassen. Das Ethanol schien eine geringere Lösungskraft als das DCM aufzuweisen – eine geringere Menge an Extrakt wurde gewonnen. Eine Vorratslösung von circa 3 mg/ml wurde schließlich in Falcon-Tubes (Sarstedt, Nürnberg) bei -20°C eingefroren; Kaninchengeruch war bei auf Objektträger getropften Extrakt-Proben nach Verdampfen des Ethanols wahrnehmbar.

Nicht nur vom Wirtstier, sondern auch von saugenden Artgenossen können für Zecken fixierungsstimulierende Reize ausgehen. Um die erfolgreiche Blutaufnahme von Artgenossen vorzutäuschen, wurden Faeces aus vorangegangenen Adulten-Versuchen zu feinem Staub gemörsert und auf die Membranen gestreut. Denn sowohl bei Argasiden (Otieno et al., 1985) als auch bei Ixodiden (Sonenshine, 1985; Grenacher et al., 2001; Sonenshine, 2004) wurden Stoffe in den Exkreten identifiziert, die als Attraktantien wirken, wie z. B. die Purine Guanin und Xanthin, und Ammoniak.

3.3.7 Versuchsdurchführung und Blutwechsel

Zu Beginn eines Versuches wurden auf die Silikonmembranen der Zeckenkammern je 90 µl (teilweise auch mehr; siehe Versuchsübersichten in 3.7 und 3.8) Tierhaarextrakt aufgebracht.

Vor dem Einsetzen der Zecken wurde eine Einwirkzeit von mindestens 1,5 Stunden (maximal 4 Stunden) abgewartet, um das toxische DCM von der Membran verdampfen zu lassen. Je Kammer wurden in der Regel 7 ♀ und 5 ♂ eingesetzt (und bei *I. ricinus* z. T. eine abweichende Anzahl aufgrund der Verfügbarkeit von Zecken zum Versuchszeitpunkt; siehe 3.7.1, Tab. 4). Bei Versuchen mit Juvenilen wurden 12–17 Nymphen von *I. ricinus* bzw. 40–60 Nymphen von *D. reticulatus* oder circa 50 Larven von *I. ricinus* bzw. 250–500 Larven von *D. reticulatus* eingesetzt.

Frisches Futterblut wurde mit ATP und Gentamycin (siehe 3.5.3) versetzt und bei Fütterungssystemen nach Kröber und Guerin in gereinigte Wells bzw. gereinigte und autoklavierte 50-ml-Bechergläser pipettiert und im Wasserbad erwärmt. Bei den Durchflusssystemen wurden die Vorratsflasche, Schläuche und Durchflussskammer befüllt und das Blut in der Durchflussskammer über die Heizplatte erwärmt. Anschließend wurden die Zeckenkammern so in die Wells bzw. Bechergläser oder in die Durchflussskammer eingehängt, dass sich ein 1–2 mm breiter blutgefüllter Spalt zwischen Boden und Membran befand und dass die Zeckenkammern in die Sedimentationsschicht des Blutes eintauchten.

Ein künstlicher 15:9-Hell-Dunkel-Rhythmus wurde zusätzlich zum natürlichen Lichtzyklus installiert, wenn die natürliche Lichtdauer am Tag unter 15 Stunden lag.

Bei Fütterungssystemen nach Kröber und Guerin wurde über den gesamten Versuchszeitraum alle 12 (maximal 14) Stunden ein Blutwechsel durchgeführt. Dazu wurde Futterblut wiederum mit ATP und Gentamycin versehen, in frische Wells bzw. sterile Bechergläser gefüllt und angewärmt.

Bei den beiden Durchflusssystemen wurden alle 2 Tage die Blutvorratsflasche und die angeschlossenen Silikonschläuche bzw. das Infusionsbesteck ausgetauscht. 600 ml Futterblut wurden mit Gentamycin, und beim Glas-Durchflusssystem auch mit ATP, versetzt und in eine saubere, autoklavierte Glasflasche und neue oder autoklavierte Schläuche gegeben. Einmal täglich wurden die Kühlakkus und die Durchflussskammer gewechselt und das Blutauffanggefäß geleert. Das Futterblut wurde in die saubere (und beim Glassystem autoklavierte) neue Durchflussskammer gepumpt/laufen gelassen und über die Heizplatte erwärmt.

Die Zeckenkammern wurden alle 12 (maximal) 14 Stunden während des Blutwechsels aus ihren Blutgefäßen herausgenommen und die Membran und der untere Bereich der Kammer gründlich mit steriler physiologischer Kochsalzlösung abgespült. (Dies wurde auch bei den Durchflusssystemen gemacht, um eine Vergleichbarkeit mit den anderen Systemen zu gewährleisten.) Die Anzahl der fixierten und vollgesogenen Zecken wurde unter einer Stereolupe (Stemi DV4, Zeiss, Oberkochen) erfasst (bei Adulten wurde dazu der Deckel der Zeckenkammer entfernt; bei Juvenilen erfolgte eine Schätzung ohne Abnahme des Deckels). Wurden Verklebungen der Adulten mit Faeces festgestellt, wurde versucht, diese mithilfe einer Pinzette vorsichtig zu lösen. Waren die Zecken kurz vor dem Vollsaugen, fielen oft größere Mengen Faeces in der Kammer an, die bei den Blutwechseln regelmäßig entfernt wurden. Traten kleinere Perforationen der Membran auf, wurde das eingetretene Blut

vorsichtig mit Zellstoff aus der Kammer getupft, oder die Kammer und die Zecken wurden mit warmer physiologischer Kochsalzlösung abgespült und anschließend mit Zellstoff abgetrocknet. Größere Perforationen der Membran bzw. Rupturen führten meist zu einem Ausscheiden der Kammer aus dem Versuch. In diesem Fall konnten teilgesogene Zecken nach Reinigung und Abtrocknen teilweise zurück in eine andere Kammer der gleichen Versuchsgruppe gesetzt werden. Nach einer vorübergehenden Bewegungslosigkeit wurden sie meist wieder aktiv und konnten sich erneut fixieren.

Wurde ein Schimmelpilzbefall an der Membran oder der Kammer festgestellt, erfolgte eine 10-minütige Behandlung in angewärmter Nystatin-Lösung (10.000 I.E./ml in PBS, Sigma, Steinheim), die in ein Well bzw. Becherglas gegeben wurde.

Schließlich wurden die Zeckenkammern wieder in die frischen Wells, Bechergläser oder in die Durchflussskammer mit dem bereits erwärmten Futterblut gehängt.

3.4 *In-vitro*-Fütterungssystem mit Tierhäuten, nach Bonnet (FSB)

Neben den oben vorgestellten Fütterungssystemen sollte noch ein gänzlich anderes System zur Schildzeckenfütterung getestet werden. Dieses System wurde von Bonnet et al. (2007) zur Fütterung aller Stadien von *I. ricinus* eingesetzt und zeichnet sich vor allem dadurch aus, dass Tierhäute statt Silikonmembranen verwendet werden und sich das Futterblut über statt unter den Zecken befindet. Ursprünglich wurde dieses System zur Fütterung von *Anopheles gambiae* entwickelt (Bonnet et al., 2000).

3.4.1 Präparation der Tierhäute

Dieses Fütterungssystem wurde mit allen Stadien von *D. reticulatus* getestet. Als Membran kamen hier präparierte Tierhäute zum Einsatz. Für adulte Zecken wurden Kaninchenhäute verwendet, für juvenile Mäusehäute. Erstere stammten vom Kaninchenschlachthof (Kaninchenspezialitäten aus Beelitz Ulrich Schmidt oHG, Beelitz, Landkreis Potsdam-Mittelmark) und letztere wurden durch Enthäuten von euthanasierten Mäusen aus der Diagnostik des Institutes für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin, FU Berlin, gewonnen.

Die Mäusehäute wurden zu Kreisen mit 7 cm Durchmesser zugeschnitten, die Kaninchenhäute zu Kreisen mit 13 cm Durchmesser. Von allen Hautstücken wurden Bindegewebe, Hautmuskel, Fett und Subkutis sorgfältig abpräpariert. Anschließend wurden sie in Petrischalen einmal in 70%igem Ethanol, zweimal in destilliertem Wasser, zweimal in Dulbecco's PBS (ohne Ca und Mg, PAA, Pasching, Österreich) und einmal in einer Lösung

von 50 µg/ml Gentamycin (Roth, Karlsruhe), 0,25 µg/ml Amphotericin B (Sigma, Steinheim), 0,25 µg/ml Streptomycin und 0,25 I.E./ml Penicillin (Penicillin-Streptomycin, Sigma, Steinheim) in destilliertem Wasser gewaschen. Zwischen den Waschsritten wurde die Fellseite auf Zellstoff abgetupft.

Die Hautstücke wurden entweder in Probenbeuteln bei -20°C eingefroren oder frisch verwendet.

Im ersten Versuch mit diesem Fütterungssystem (siehe 3.8.1, Tab. 7, Dr-5A; 3.8.2, Tab. 9, Dr-2N) wurde auch die Verwendung von Silikonmembranen anstelle der Tierhäute getestet.

3.4.2 Aufbau des Fütterungssystems

Dieses Fütterungssystem bestand aus zwei Glaskomponenten (Ellipse Labo, La Chapelle La Reine, Frankreich) und wurde in zwei verschiedenen Größen (circa 10 cm und 7 cm Durchmesser) getestet. Das runde Unterteil der Glaskomponenten diente als Zeckenkammer und hatte einen Einlass, der mit einem Schraubverschluss mit einem Netz oder einem Glasfilter luftdurchlässig verschlossen werden konnte (Abb. 14 und 15). Er ermöglichte eine Belüftung der Zeckenkammer. Außerdem besaß die Zeckenkammer oben eine große runde Öffnung, in die das Oberteil passte. Dieses bestand aus einer Blutkammer (unten), die mit einer Tierhaut (bzw. einer Silikonmembran) verschlossen wurde, welche mit einem Gummi um die Kammer fixiert wurde. Mittig führte aus der Blutkammer ein Glasrohr nach oben, über welches die Kammer mit Blut befüllt, geleert und gereinigt werden konnte. Nach dem Befüllen der Kammer mit Blut wurde die Öffnung des Rohres mit Parafilm M (American National Can, Chicago, USA) verschlossen. Direkt oberhalb der Blutkammer schloss sich, abgetrennt durch eine Glaswand, eine Wasserkammer an. Sie war mit einem Ein- und einem Auslass versehen, die über Silikonschläuche (ID 6 mm, AD 10 mm) an ein Umwälzthermostat (Wasserbad Typ F10 und Regler Typ C, Julabo, Seelbach) angeschlossen waren (Abb. 14 und 15). Darüber wurde das Wasser auf 37°C erwärmt und durch die Wasserkammer gepumpt, wodurch eine gleichmäßige Erwärmung des Blutes in der Blutkammer gewährleistet war. Die Lufttemperatur in der Zeckenkammer (durchschnittlich 25,4°C) lag wenige Grad Celsius über der Raumtemperatur.

Nachdem die Zecken in die Zeckenkammer gesetzt worden waren, wurden Ober- und Unterteil mit Parafilm verbunden, um ein Entweichen der Zecken durch mögliche Ritzen zwischen den beiden Glasteilen zu verhindern.

In diesem Fütterungssystem wurden neben dem Tierfell keine weiteren mechanischen oder olfaktorischen Fixierungsstimuli eingesetzt.

Vor jeder Verwendung der Glaskammern wurden diese autoklaviert.

3.4.3 Versuchsdurchführung und Blutwechsel

Wurde ein Versuch begonnen, wurden zunächst die autoklavierten Blutkammern mit dem Tierfell bespannt, das von den durchgeführten Waschschrritten noch nass war. Es wurde für mehrere Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen oder mit einem lauwarm eingestellten Föhn getrocknet. Bei den Versuchen Dr-9A, Dr-3N und -4N und Dr-8L und -9L (siehe 3.8, Tab. 7, 9 und 10) wurden auf der Hälfte der Fellfläche nun die Haare mit einer Schere auf circa 1 mm Länge gekürzt, da vermutet wurde, dass die Zecken Bereiche mit sehr kurzem Haar bevorzugen könnten, wie es auch am Tier (Ohren, Lider) zu beobachten ist.

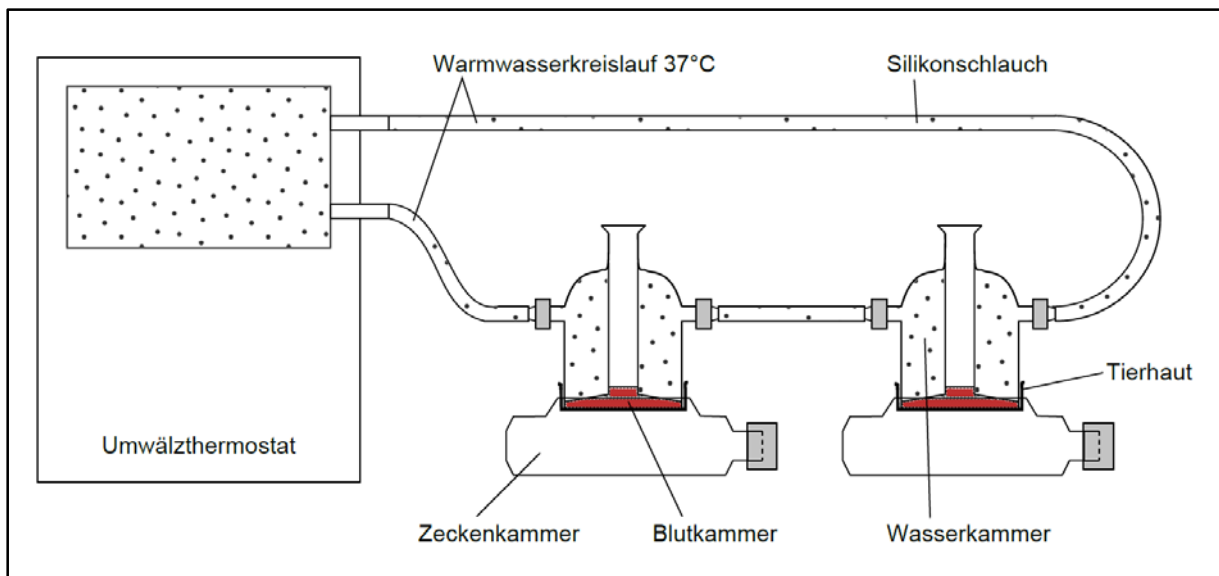


Abb. 14: Versuchsaufbau des *In-vitro*-Fütterungssystems mit Tierhäuten, nach Bonnet et al. (2007)

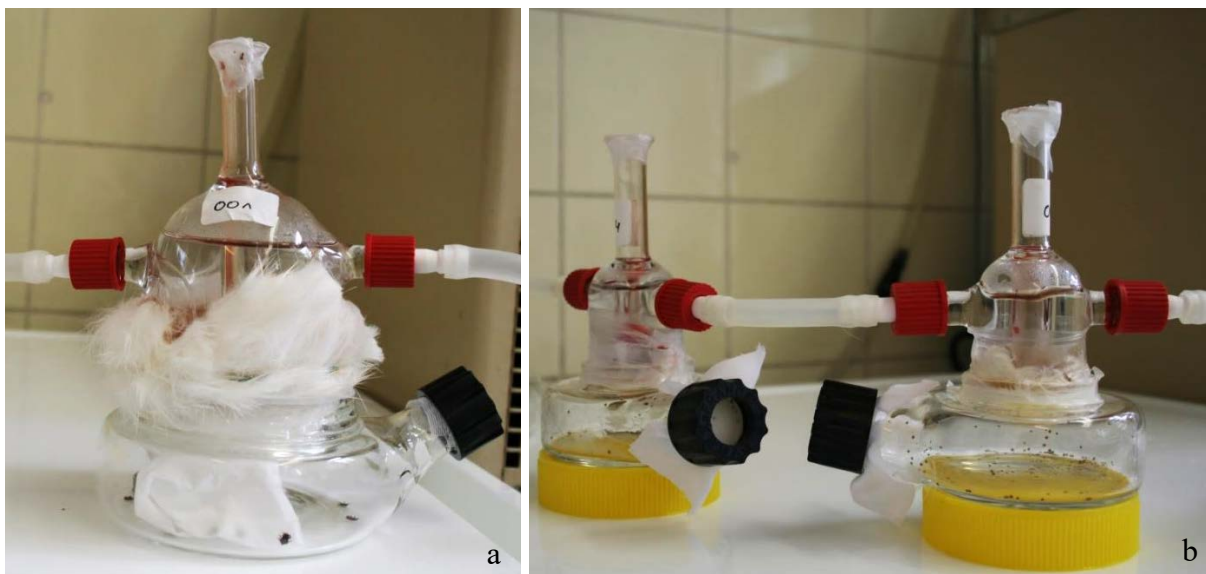


Abb. 15: Fütterungskammer nach Bonnet; **a:** große Kammer für adulte Zecken mit Kaninchenhaut; **b:** kleine Kammern für juvenile Zecken mit Mäusehaut

Anschließend wurden die Zecken in die Zeckenkammern gesetzt, wobei für Adulte ausschließlich die großen, für Juvenile die kleinen Kammern verwendet wurden. Es wurden jeweils 40 Adulte (20 ♀, 20 ♂), bzw. circa 200 Nymphen oder 1700–2000 Larven (in Versuch Dr-7L nur 120 Larven) in eine Kammer gesetzt. Aufgrund der Beobachtungen in den ersten Versuchen (Dr-5A und -2N), bei denen sehr viel Kondenswasser in den Zeckenkammern entstand, wurden in Versuch Dr-6A in eine Kammer Reiskörner und in die andere Kammer Windelstücke mit zu den Zecken gelegt (siehe 3.8.1, Tab. 7). Da die Reiskörner deutlich weniger Wasser aufnehmen konnten und Schimmelwachstum begünstigten, wurden in allen folgenden Versuchen Windelstücke mit in die Zeckenkammern gelegt. Die relative Luftfeuchtigkeit stieg während der Versuche dennoch stetig an – in den letzten Versuchstagen wurden Werte von beinahe 100 % erreicht.

Nach dem Einsetzen der Zecken wurden Unter- und Oberteil des Systems ineinandergesteckt und mit Parafilm M (American National Can, Chicago, USA) verbunden. Das Oberteil wurde an den Warmwasserkreislauf angeschlossen.

Bei Versuch Dr-7A (siehe Tab. 7) wurde die Zeckenkammer weggelassen und durch ein Netz ersetzt, das wie die Tierhaut mit einem Gummiring um die Blutkammer fixiert war. Das Oberteil des Fütterungssystems wurde über ein mit Wasser gefülltes Gefäß gehängt, um die Luftfeuchtigkeit in der Umgebung der Zecken zu erhöhen. So wurden die Bildung von Kondenswasser verhindert und die Zecken in unmittelbarer Nähe zum Tierfell gehalten.

Frisches Schlachthofblut wurde mit ATP und Gentamycin versetzt (siehe 3.5.3) und in das Rohr der Blutkammern pipettiert: 10 ml je großer und 4 ml je kleiner Kammer. Das Rohr wurde mit Parafilm luftdicht verschlossen.

Auch hier wurde ein künstlicher 15:9-Hell-Dunkel-Rhythmus installiert, wenn die natürliche Lichtdauer am Tag weniger als 15 Stunden betrug.

Ein Versuch mit Adulten dauerte durchschnittlich 14 Tage und mit Juvenilen 7 Tage. Während dieser Zeit wurden alle 12 (maximal 14) Stunden ein Blutwechsel und eine Reinigung der Blutkammern durchgeführt. Dazu wurde der Parafilm von der Blutröhre entfernt und das Blut ausgekippt. Mit einer 37°C warmen Spüllösung, bestehend aus RPMI 1640 (Sigma, Steinheim), versetzt mit 50 µg/ml Gentamycin (Roth, Karlsruhe) und 0,25 µg/ml Amphotericin B (Sigma, Steinheim), wurden die Blutkammern mehrmals ausgespült.

Während des Blutwechsels wurde stets die Anzahl der fixierten Zecken ermittelt (bei Juvenilen geschätzt) und dokumentiert.

Anschließend wurden die Blutkammern wieder mit Futterblut befüllt und mit Parafilm verschlossen.

3.5 Futterblut

3.5.1 Rinderblut

Für Versuche mit adulten Zecken und überwiegend auch für Versuche mit juvenilen Zecken wurde Rinderblut verwendet. Dieses wurde wöchentlich auf einem Schlachthof (Hakenberger Fleisch GmbH, Hakenberg, Landkreis Ostprignitz-Ruppin) während des Tötungsprozesses aufgefangen. Dazu wurden die Rinder durch das Schlachthofpersonal mit einem Bolzenschuss betäubt, am Hinterbein nach oben gezogen und in das Schlachtband gehängt, sodass der Kopf frei hing. Es erfolgte der Entbluteschnitt am Hals. Der erste Blutschwall wurde verworfen. Dann wurde das ausströmende Blut in sterilen 1-l-Glasflaschen (SCHOTT DURAN[®], DURAN Group, Wertheim) aufgefangen, ohne damit das Tier zu berühren. Die Innenwände der Flaschen waren, um eine Koagulation zu verhindern, vorher mit 0,8 ml Heparin-Natrium 250 000 (ratiopharm GmbH, Ulm) benetzt worden, sodass im Blut eine Endkonzentration von 20 I.E./ml Heparin erreicht wurde. Sofort nach dem Auffangen wurden die Flaschen verschlossen und sorgfältig geschwenkt, sodass eine gute Vermischung des Blutes mit dem Heparin sicher gestellt war und eine Bildung von Koagulationen verhindert wurde.

Abweichend davon wurde im ersten Versuch mit *I. ricinus*-Adulten und -Nymphen (siehe 3.7.1, Tab. 4, Ir-1A und 3.7.2, Tab. 5, Ir-1N) noch eine höhere Heparinkonzentration von 50 I.E./ml und im zweiten Versuch mit Adulten und Nymphen (siehe 3.7.1, Tab. 4, Ir-2A und 3.7.2, Tab. 5, Ir-2N) eine niedrigere Heparinkonzentrationen zwischen 2,5 und 10 I.E./ml verwendet, bevor die Konzentration aufgrund der eigenen Beobachtungen für alle folgenden Versuche mit *I. ricinus* und *D. reticulatus* auf 20 I.E./ml eingestellt wurde, die auch von Barré et al. (1998) empfohlen wird.

Des Weiteren wurde in einem Versuch (Ir-2A; siehe Tab. 4) getestet, durch Rühren manuell defibriertes statt heparinisiertes Blut zu verwenden. Dazu wurde das Blut auf dem Schlachthof in gleicher Weise, diesmal allerdings in einem sterilen 3-l-Becherglas (SCHOTT DURAN[®], DURAN Group, Wertheim), aufgefangen. Sofort nach dem Auffangen wurde das Blut kräftig mit einer sterilen Einmalpipette für mehrere Minuten gerührt, sodass sich Fibrinklumpen bildeten, die entfernt werden konnten. Anschließend wurde das Blut durch einen sterilen Büchnertrichter (SCHOTT DURAN[®], DURAN Group, Wertheim), durch den die restlichen kleineren Blutkoagel zurückgehalten wurden, in eine sterile 1-l-Glasflasche gegossen.

3.5.2 Kaninchenblut

In je einem Versuch mit *I. ricinus*-Larven (siehe 3.7.2, Tab. 5, Ir-1L) und mit *D. reticulatus*-Larven und -Nymphen (siehe 3.8.2, Tab. 9, Dr-1N und 3.8.3, Tab. 10, Dr-3L) wurde die Verwendung von heparinisiertem Kaninchenblut getestet. Dieses wurde auf einem

Kaninchenschlachthof (Kaninchenspezialitäten aus Beelitz Ulrich Schmidt oHG, Beelitz, Landkreis Potsdam-Mittelmark) in ähnlicher Weise wie das Rinderblut gesammelt. Die Betäubung der Tiere erfolgte mit elektrischem Strom über Elektroden am Kopf. Unmittelbar nach der Betäubung wurden die Kaninchen kopfüber an den Hinterläufen aufgehängt und sofort der Entbluteschnitt durchgeführt. In einem sterilen 500-ml-Becher (aus Polypropylen, mit Schraubverschluss; Sarstedt, Nürnberg) wurde das Blut mehrerer Kaninchen aufgefangen. Die Innenwände des Bechers waren vorher mit 0,4 ml Heparin-Natrium 250 000 (ratiopharm GmbH, Ulm) benetzt worden, sodass im Blut eine Endkonzentration von 20 I.E./ml Heparin erreicht wurde. Je Kaninchen konnten circa 50 ml Blut aufgefangen werden. Zum Füllen eines Bechers wurde das Blut von durchschnittlich 10 Kaninchen benötigt. Sofort nach dem Auffangen wurde der Becher verschlossen und sorgfältig geschwenkt, sodass eine gründliche Vermischung des Blutes mit dem Heparin sichergestellt war.

Für einen Versuch mit *D. reticulatus*-Larven (Dr-6L; siehe Tab. 10) kam manuell defibriniertes Kaninchenblut zum Einsatz. Dazu wurde das Blut in denselben Bechern aufgefangen, die jedoch nicht mit Heparin benetzt waren. Unmittelbar nach dem Auffangen wurde das Blut kräftig für mehrere Minuten mit einer sterilen Einmalpipette gerührt. Die dadurch entstandenen Fibrinklumpen wurden aus dem Blut herausgenommen und kleinere Koagel durch Abgießen durch einen sterilen Büchnertrichter in einen frischen Becher entfernt.

3.5.3 Transport, Lagerung, Blutzusätze und Bestrahlung

Da das Auffangen offen im Schlachtraum durchgeführt wurde und das Blut stets mit der Stichstelle und dem umgebenden Fell in Berührung kam, ist die Methode der Blutgewinnung als unsteril einzustufen.

Der Transport des Blutes zum Labor erfolgte in einer Kühlbox mit Kühllakkus und dauerte circa 1,5 Stunden. Während des Transportes fand bereits eine deutliche Abkühlung des anfangs noch körperwarmen Blutes statt.

Zur Stabilisierung der Erythrozyten wurde das Blut im Labor sofort mit 2 g/l Glucose-Monohydrat (Merck, Darmstadt) versetzt, welches mit sterilen Pipetten in das Blut eingerührt wurde.

Die Lagerung erfolgte bei +4°C und in der Regel für maximal 9 Tage. War es bei einzelnen Versuchen aus logistischen Gründen nötig, das Blut länger als 9 Tage zu verwenden, wird darauf in den Versuchsübersichten von *I. ricinus* und *D. reticulatus* (3.7 und 3.8) gesondert hingewiesen. Optische und olfaktorische Abweichungen wurden nach 9 Tagen Kühlung nicht beobachtet. In einzelnen Versuchen wurde darüber hinaus bei -20°C tiefgekühlt gelagertes Blut verwendet, das anschließend langsam bei +4°C aufgetaut wurde (Ir-3A, Dr-1A, -2A und -4A, Dr-5L; siehe Tab. 4, 6 und 10).

Unmittelbar vor der Verfütterung des Blutes wurden zwei weitere Blutzusätze zugefügt. ATP (CAS No. 56-65-5; Sigma, Steinheim) als Phagostimulanz wurde in Form einer frisch aufgetauten Lösung (10^{-1} mol/l in 0,9 %igem NaCl) in einer Konzentration von 10 µl/ml ins Blut gegeben, sodass eine Endkonzentration von 10^{-3} mol/l bzw. 10^{-6} mol/ml ATP im Futterblut erreicht wurde. Bei Versuchen mit dem DFS PS wurde auf die ATP-Zugabe verzichtet, während bei zwei Versuchen mit Larven eine höhere Konzentration verwendet wurde (Dr-5L und -6L; 3.8.3, Tab. 10). Gentamycin in einer Konzentration von 5 µg/ml (Cellopure[®], Roth, Karlsruhe) sollte das Keimwachstum in dem jeweils über etwa 12 Stunden körperwarm gehaltenen Futterblut reduzieren.

Da ein negativer Einfluss des Gentamycins im Futterblut auf die Endosymbionten der Zecken vermutet wurde, wurden im Fütterungssystem K+G Glas Versuche zum Verzicht auf Antibiotika-Zugabe zum Futterblut und zu deren Ersatz durch eine Gamma-Bestrahlung durchgeführt. Für die Bestrahlung am Helmholtz-Zentrum Berlin wurde das Futterblut in 50-ml-Falcon-Tubes (Sarstedt, Nümbrecht) gefüllt, zur Kühlung auf -20°C kalte Kühlakkus gestellt, in einem definierten Abstand kreisförmig um eine ^{60}Co -Quelle angeordnet und für 3,75 h mit 266 Gy/h bestrahlt. Nach der Hälfte der Zeit wurde jedes Falcon-Tube um 180° gedreht, um eine gleichmäßige Bestrahlung zu ermöglichen. Die Strahlendosis betrug insgesamt durchschnittlich 1 kGy. Bei dieser Versuchsreihe wurden das Versetzen des Futterblutes mit seinen Zusätzen und das Befüllen der frischen Blutkammern in einer Sterilbank durchgeführt.

3.6 Aufbewahrung der Zecken nach der Fütterung und Überwachung ihrer Weiterentwicklung

Vollgesaugte Zecken wurden einzeln in perforierten, mit feiner Gaze verschlossenen 2-ml-Eppendorfgefäßen (Sarstedt, Nümbrecht) im Exsikkator bei $20-22^{\circ}\text{C}$, 80–90 % relativer Luftfeuchtigkeit und einem 15:9-Hell-Dunkel-Zyklus aufbewahrt. Zecken, die sich im Laufe eines Versuches nicht vollgesaugt hatten, und männliche Zecken wurden verworfen und entsorgt. Die vollgesaugten Weibchen wurden dann etwa wöchentlich hinsichtlich Eiablage und anderen Auffälligkeiten, die Gelege hinsichtlich Larvenschlupf kontrolliert. Vor dem Larvenschlupf wurden die Gelege dabei von den Weibchen getrennt und gewogen. Die Juvenilen wurden etwa wöchentlich hinsichtlich ihrer Häutung kontrolliert.

3.7 Versuche zur *In-vitro*-Fütterung von *I. ricinus*

3.7.1 Versuche mit *I. ricinus*-Adulten

Nachdem bereits anderen Autoren (Kröber et Guerin, 2007a) die *In-vitro*-Fütterung von *I. ricinus* gelungen war, sollte der Aufbau und die Etablierung der künstlichen Schildzeckenfütterung am Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der FU Berlin mit dieser veterinärmedizinisch bedeutsamen und leicht verfügbaren Zeckenspezies begonnen werden. Zu Beginn der Versuche wurden verschiedene mechanische und olfaktorische Fixierungsstimuli, verschiedene Membrandicken und Verhältnisse an Männchen und Weibchen getestet (Tab. 4). Die Heparinmenge im Blut wurde nach den Beobachtungen, die im zweiten Versuch (Ir-2A) gemacht wurden, auf 20 I.E./ml eingestellt.

Ir-5A fand in einem größeren zeitlichen Abstand zu den anderen Versuchen und mit einem leicht veränderten Versuchsaufbau statt und diente der Realisierung eines Lebenszyklus von *I. ricinus in vitro*, da vorangegangene Nymphen, Larven und Adulte alle erfolgreich *in vitro* gefüttert worden waren. Die Fütterung erfolgte hier in einem Klimaschrank (ICH 256C; Memmert, Schwabach) mit einem CO₂-Gehalt von 5 %, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50–80 % und einer Temperatur von 20°C. Das Blut im Becherglas wurde auf einer Heizplatte (Hot Plate 062; Labotect, Göttingen) mit 42,2°C auf 36,5–37,9°C erwärmt.

Die Zecken wurden durchschnittlich 47 und maximal 270 Tage nach dem Fangen bzw. Häuten verwendet.

3.7.2 Versuche mit *I. ricinus*-Nymphen und -Larven

Juvenile *I. ricinus* wurden in den Fütterungssystemen nach Kröber und Guerin mit Zeckenkammern aus Plexiglas (K+G Plexi) und aus Glas (K+G Glas) im Schüttelwasserbad gefüttert. Einen Überblick über die Versuchsparameter gibt Tab. 5. Das Alter der Nymphen nach Fang bzw. Häutung war im Mittel 8 und maximal 25 Tage, das der Larven nach ihrem Schlupf durchschnittlich 190 und maximal 225 Tage.

Tab. 4: Versuche Nummer Ir-1A bis Ir-5A zur *In-vitro*-Fütterung von *I. ricinus*-Adulten mit Fütterungssystemen nach Kröber und Guerin aus Plexiglas (K+G Plexi) und aus Glas (K+G Glas); Blut: vom Rind, mit 2 mg/ml Glucose-Monohydrat, 10^{-6} mol/ml ATP und 5 µg/ml Gentamycin; Fixierungsstimulus bei allen Versuchen: Rinderhaare

Versuchs- Nummer	Fütterungs- system	Silikonmembran (µm)	Bluterwärmung	Schüttelfrequenz Wasserbad (/min)	Fixierungsstimuli				Deckelhöhe (mm)	Blut			N Fütterungs- kammern	Herkunft	Zecken	
					Rinderhaar- extrakt (µl)	Membran über Rind gerieben	Mechanischer Stimulus	Zeckenfaeces		Na-Heparin (I.E./ml)	Lagerungs- temperatur (°C)	Maximale Lage- rungsdauer (d)			Verhältnis ♀/♂ je Kammer	N Weibchen (N Zecken)
Ir-1A	K+G Plexi	70	S	35	100	+	N	n. d.	40,0	50	+4	10	1	W	6♀/5♂	6 (11)
	K+G Plexi	140	S	35	100	+	N	n. d.	40,0	50	+4	10	1	W	6♀/5♂	6 (11)
	K+G Plexi	70	S	35	100	+	G	n. d.	40,0	50	+4	10	1	W	6♀/5♂	6 (11)
	K+G Plexi	140	S	35	100	+	G	n. d.	40,0	50	+4	10	1	W	6♀/5♂	6 (11)
	K+G Plexi	70	S	35	100	+	F	n. d.	40,0	50	+4	10	1	W	6♀/5♂	6 (11)
	K+G Plexi	140	S	35	100	+	F	n. d.	40,0	50	+4	10	1	W	6♀/5♂	6 (11)
Ir-2A	K+G Plexi	100	S	50	90	n. d.	N	+	40,0	2,5–10	+4	9	4	W	7♀/5♂	28 (48)
	K+G Plexi	100	S	50	90	n. d.	N	+	40,0	0 ²	+4	9	4	W	7♀/5♂	28 (48)
Ir-3A	K+G Plexi	100	S	50	90	n. d.	N	+	40,0	20	+4	9	1	W	10♀/8♂	10 (18)
	K+G Plexi	100	S	50	90	n. d.	N	+	40,0	20	-20	9	1	W	10♀/8♂	10 (18)
Ir-4A	K+G Glas	100	S	50	90	n. d.	N	+	60,0	20	+4	15	2	L ³	4-5♀/5♂	9 (19)
Ir-5A	K+G Glas	100	H ¹	n. d.	90	n. d.	N	+	7,5	20	+4	9	1	L ⁴	6♀/3♂	6 (9)

¹ Versuchsdurchführung im Klimaschrank (rH 50–80%, CO₂ 5%, T_{Luft} 20°C, T_{Heizplatte} 42,2°C, T_{Blut} 36,5–37,0°C); ² Blut wurde manuell defibriniert; ³ gehäutet aus Ir-2N und -3N; ⁴ gehäutet aus Ir-4N, gehäutet aus Ir-1L, geschlüpft aus Ir-2A und -3A; F = Fliesenkreuz; G = Metallgitter; H = Heizplatte; L = *In-vitro* - Laborzucht; N = Moskitonetz; n. d. = nicht durchgeführt; S = Schüttelwasserbad; W = Wildfang

Tab. 5: Versuche zur *In-vitro*-Fütterung von *I. ricinus*-Nymphen und -Larven mit Fütterungssystemen nach Kröber und Guerin aus Plexiglas (K+G Plexi) und aus Glas (K+G Glas) im Schüttelwasserbad; Blut: mit 2 mg/ml Glucose-Monohydrat, 10^{-6} mol/ml ATP und 5 µg/ml Gentamycin

Zecken	Versuchs- Nummer	Fütterungs- system	Silikonmembran (µm)	Schüttelfrequenz Wasserbad (/min)	Fixierungsstimuli					Deckelhöhe (mm)	Blut			Zecken			
					Tierhaarextrakt Tierhaarextrakt (µl)	Moskitonetz	Tierhaare	Zeckenfaeces	Tierart		Na-Heparin (I.E./ml)	Maximale Lage- rungsdauer (d)	N Fütterungs- kammern	Herkunft	N Juvenile je Kammer	N Juvenile gesamt	
I. ricinus Nymphen	Ir-1N	K+G Plexi	70	35	R	100	+	R	n. d.	40,0	R	50	10	1	W	15	15
	Ir-2N	K+G Plexi	60	50	R	90	+	R	+	40,0	R	2,5–10	9	2	W	17	34
	Ir-3N	K+G Plexi	60	50	R	90	n. d.	R	+	40,0	R	20	9	2	W	12	24
	Ir-4N	K+G Glas	66	50	R	90	n. d.	R	+	7,5	R	20	13	1	L ²	17	17
I. ricinus Larven	Ir-1L	K+G Glas	50 ¹	50	K	90	n. d.	K	+	60,0	K	20	9	1	L ³	50	50

¹ Membran ohne Linsenpapier und mit doppelter Menge Silikonöl; ² gehäutet aus Ir-1L; ³ geschlüpft aus Ir-2A und -3A; K = Kaninchen; L = *In-vitro* - Laborzucht; n. d. = nicht durchgeführt; R = Rind; W = Wildfang

3.8 Versuche zur *In-vitro*-Fütterung von *D. reticulatus*

3.8.1 Versuche mit *D. reticulatus*-Adulten

Nach Vorversuchen mit *I. ricinus* sollte die *In-vitro*-Fütterung nun für die Zeckenspezies *D. reticulatus* adaptiert und optimiert werden. Mit dem Ziel, die *In-vitro*-Fütterung hinsichtlich Arbeitsaufwand und Zeckenzucht-Erfolg vergleichbar mit der Fütterung am Wirtstier zu gestalten, wurden systematisch verschiedene Parameter getestet. Dabei diente stets eine Kontrollgruppe mit Zecken vom selben Fangtag und mit der gleichen Fitness als Vergleich. Die Versuche wurden wiederholt. Bei Versuchen mit Zeckenkammern nach Kröber und Guerin wurden als Fixierungsstimuli stets ein Moskitonetz, 90 µl Rinderhaarextrakt, Rinderhaare und Zeckenfaeces mit in die Kammern gegeben. Spätestens 50 und im Mittel 16 Tage nach Fang bzw. Häutung wurden die Zecken verwendet.

Versuche zur Verfütterung von tiefkühlgelagertem Blut

Die Verwendung, Lagerung und Haltbarkeit von Blut war aus organisatorischer und finanzieller Sicht problematisch: Aufgrund der begrenzten Haltbarkeit mussten regelmäßig weite Wege zum Schlachthof zurückgelegt werden. Um das Problem zu umgehen, wurde eine Verfütterung von zuvor tiefgekühlt gelagertem Blut getestet. Dazu wurde gleichzeitig stets das Blut eines Rindes verwendet, von dem eine Hälfte bei -20°C eingefroren und bei +4°C langsam wieder aufgetaut und die andere Hälfte währenddessen (maximal 2 Tage) bei +4°C aufbewahrt wurde (Tab. 6).

Tab. 6: Versuche zur Verfütterung von tiefkühlgelagertem Blut in Fütterungssystemen nach Kröber und Guerin aus Plexiglas (K+G Plexi) und aus Glas (K+G Glas) im Schüttelwasserbad; mit Silikonmembranen (100 µm); Fixierungsstimuli: Moskitonetz, 90 µl Rinderhaarextrakt, Rinderhaare und Zeckenfaeces; Deckelhöhe 60 mm; Blut vom Rind, mit 20 I.E./ml Na-Heparin, 2 mg/ml Glucose-Monohydrat, 10⁻⁶ mol/ml ATP und 5 µg/ml Gentamycin; mit *D. reticulatus*-Adulten aus Wildfang; 7♀ und 5♂ je Kammer

Lagerungs- temperatur Blut	Versuchs- Nummer	Fütterungs- system	N Fütterungs- kammern	N Weibchen (N Zecken)
+4°C	Dr-1A	K+G Plexi	4	28 (48)
	Dr-2A	K+G Plexi	5	35 (60)
	Dr-2A	K+G Glas	2	14 (24)
	Dr-4A	K+G Glas	6	42 (72)
-20°C	Dr-1A	K+G Plexi	4	28 (48)
	Dr-2A	K+G Plexi	5	35 (60)
	Dr-2A	K+G Glas	2	14 (24)
	Dr-4A	K+G Glas	6	42 (72)

Versuche zum Vergleich verschiedener Fütterungssysteme

Neben dem Fütterungssystem nach Kröber und Guerin (K+G Glas, siehe 3.3.3) wurde für *D. reticulatus* auch jenes nach Bonnet (FSB, siehe 3.4) getestet, welches in seinem Aufbau stark von ersterem abwich und Tierhäute anstelle künstlicher Membranen verwendete. Bei beiden Systemen war jedoch ein zweimaliger Blutwechsel pro Tag nötig. Dies sollte in einem automatisierten System umgangen und auf maximal eine Wartung pro Tag reduziert werden.

Tab. 7: Versuche zum Vergleich verschiedener Fütterungssysteme: K+G Glas (Fütterungssystem nach Kröber und Guerin, aus Glas), DFS PS (Durchfluss-Fütterungssystem aus Polystyrol), DFS Glas (Durchfluss-Fütterungssystem aus Glas), FSB (Fütterungssystem nach Bonnet); mit *D. reticulatus*-Adulten aus Wildfang; Blut vom Rind, mit 20 I.E./ml Na-Heparin, 2 mg/ml Glucose-Monohydrat und 5 µg/ml Gentamycin

Fütterungssystem	Versuchsnummer	Membran	Fixierungsstimuli			Blut			Zecken	
			Rinderhaar-extrakt (µl)	Moskitonetz, Rinderhaare, Zeckenfaeces	Deckelhöhe (mm)	ATP (x 10 ⁻⁶ mol/ml)	Maximale Lagerungsdauer (d)	N Fütterungskammern	Verhältnis ♀/♂ je Kammer	N Weibchen (N Zecken)
K+G Glas	Dr-6A	S	90	+	60,0	1	9	5	7♀/5♂	35 (60)
	Dr-6A	S	90	+	7,5	1	9	5	7♀/5♂	35 (60)
	Dr-7A	S	90	+	7,5	1	9	7	7♀/5♂	49 (84)
	Dr-8A	S	90	+	7,5	1	9	7	7♀/5♂	49 (84)
	Dr-9A	S	90	+	7,5	1	9	7	7♀/5♂	49 (84)
	Dr-10A	S	90	+	7,5	1	9	6	7♀/5♂	42 (72)
	Dr-11A	S	90	+	7,5	1	9	6	7♀/5♂	42 (72)
DFS PS	Dr-6A	S	90	+	60,0	0	9	2	7♀/5♂	14 (24)
	Dr-7A	S	90	+	7,5	0	9	2	7♀/5♂	14 (24)
	Dr-8A	S	90	+	7,5	0	9	2	7♀/5♂	14 (24)
	Dr-9A	S	90	+	7,5	0	9	2	7♀/5♂	14 (24)
DFS Glas	Dr-10A	S	90	+	7,5	1	9	6	7♀/5♂	42 (72)
	Dr-11A	S	90	+	7,5	1	9	6	7♀/5♂	42 (72)
FSB	Dr-5A	H	n. d.	n. d.	n. d.	1	10	1	20♀/20♂	20 (40)
	Dr-5A	S	450	n. d.	n. d.	1	10	1	20♀/20♂	20 (40)
	Dr-6A	H ¹	n. d.	n. d.	n. d.	1	9	1	20♀/20♂	20 (40)
	Dr-6A	H ²	n. d.	n. d.	n. d.	1	9	1	20♀/20♂	20 (40)
	Dr-7A	H ³	n. d.	n. d.	n. d.	1	9	2	20♀/20♂	40 (80)
	Dr-9A	H ¹	n. d.	n. d.	n. d.	1	9	2	20♀/20♂	40 (80)

¹ Windelstück in Zeckenkammer; ² Reis in Zeckenkammer; ³ Zeckennetz (statt Zeckenkammer); H = Kaininchenhaut; n. d. = nicht durchgeführt; S = Silikonmembran (100 µm)

Für erste Versuche diente das Durchflusssystem aus Polystyrol (DFS PS, siehe 3.3.4), das später abgelöst wurde durch das Durchflusssystem aus Glas (DFS Glas, siehe 3.3.5). Beim DFS PS wurde aus finanziellen Gründen noch auf die Zugabe von ATP verzichtet. Hier sollte in erster Linie die Machbarkeit des prinzipiellen Aufbaus beurteilt werden. Das System K+G Glas diente bei der Testung der drei anderen Fütterungssysteme als Kontrollgruppe. (Tab. 7)

Versuche zur Verfütterung von Blut ohne Antibiotikazugabe und mit Gamma- Bestrahlung

Um einen möglichen negativen Einfluss des Gentamycins zu eliminieren, wurden Versuche zur Verfütterung von Blut ohne Antibiotikazugabe und von gammabestrahltem Blut durchgeführt (Tab. 8). Die Zecken der Kontrollgruppe erhielten wie üblich Futterblut mit 5 µg/ml Gentamycin, die Zecken der zweiten Gruppe erhielten Futterblut ohne Antibiotikum und die Zecken der dritten Gruppe Futterblut ohne Antibiotikum, das vor der Verfütterung mit Gamma-Strahlung mit einer Dosis von 1 kGy bestrahlt wurde (siehe 3.5.3).

Tab. 8: Versuche zur Verfütterung von Blut ohne Antibiotikazugabe und mit Gamma-
Bestrahlung im Glas-Fütterungssystem nach Kröber und Guerin (K+G Glas) im Schüttelwasserbad; mit Silikonmembranen (100 µm); Fixierungsstimuli: Moskitonetz, 90 µl Rinderhaarextrakt, Rinderhaare, Zeckenfaeces; Deckelhöhe 7,5 mm; Blut vom Rind, mit 20 I.E./ml Na-Heparin, 2 mg/ml Glucose-Monohydrat und 10⁻⁶ mol/ml ATP; mit *D. reticulatus*-Adulten aus Wildfang; 7♀ und 5♂ je Kammer

Versuchsgruppe	Versuchs- Nummer	Gentamycin (µg/ml)	Gamma- Bestrahlung (kGy)	Anzahl Kammern	N Weibchen (N Zecken)
Mit Antibiotikum	Dr-7A	5	n. d.	7	49 (84)
	Dr-8A	5	n. d.	7	49 (84)
	Dr-9A	5	n. d.	7	49 (84)
Ohne Antibiotikum	Dr-7A	0	n. d.	7	49 (84)
	Dr-8A	0	n. d.	7	49 (84)
	Dr-9A	0	n. d.	7	49 (84)
Ohne Antibiotikum und mit Gamma- Bestrahlung	Dr-7A	0	1	7	49 (84)
	Dr-8A	0	1	7	49 (84)
	Dr-9A	0	1	7	49 (84)

n. d. = nicht durchgeführt

Der Erfolg der Bestrahlung wurde hinsichtlich der Keimzahl überprüft, indem vor der Verfütterung drei 100-µl-Proben des unbestrahlten und bestrahlten Blutes auf jeweils einer Blutagarplatte ausgestrichen wurden. Analog dazu wurde die Entwicklung des Keimwachstums im verfütterten Blut in den drei Gruppen vergleichend überwacht. Dazu wurden einmal täglich nach dem Blutwechsel 20 µl Futterblut aus jedem Becherglas entnommen (7 Bechergläser je Gruppe), um damit jeweils eine Teilfläche der Blutagarplatten zu beimpfen (2 Agarplatten je Gruppe mit je 3 bzw. 4 Flächen in Tortenstückform). Die

Bebrütung der Blutagarplatten erfolgte aerob bei 37°C für 24 h. Anschließend wurden die Kolonien ausgezählt und auf keimbildende Einheiten je Milliliter Futterblut (CFU/ml) hochgerechnet. Von am häufigsten auftretenden Kolonietypen wurden Reinkulturen angelegt, die durch das Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, FU Berlin, diagnostiziert wurden.

3.8.2 Versuche mit *D. reticulatus*-Nymphen

Für die *In-vitro*-Fütterung von *D. reticulatus*-Nymphen wurden das Fütterungssystem nach Kröber und Guerin mit Zeckenkammern aus Glas (K+G Glas) im Schüttelwasserbad und das Fütterungssystem nach Bonnet (FSB) verwendet. Diverse Abwandlungen der Systeme, insbesondere die Membrandicke und -konsistenz betreffend, wurden getestet. Einen Überblick gibt Tab. 9. Das Alter der Nymphen zu Beginn der Versuche war maximal 30 und durchschnittlich 18 Tage.

3.8.3 Versuche mit *D. reticulatus*-Larven

Die Fütterungssysteme nach Kröber und Guerin mit Zeckenkammern aus Glas (K+G Glas) und nach Bonnet (FSB) wurden auch für Versuche zur *In-vitro*-Fütterung von *D. reticulatus*-Larven verwendet. Für das System K+G Glas wurden teilweise sehr dünne und weichere Silikonmembranen verwendet (siehe 3.3.1 Herstellung der Silikonmembranen). Die Verwendung von verschiedenen Tierhaarextrakten und verschiedenen Tierhaaren (oder das Weglassen von diesen) und die Verwendung von Kaninchenblut anstelle des Rinderblutes wurden getestet. Auch wurden eine Erhöhung der ATP-Menge, ein Weglassen von Gentamycin und der Ersatz der Heparin-Zugabe durch eine manuelle Defibrinierung versucht, um Larven zur Blutaufnahme anzuregen. Da eine toxische Wirkung auf die Larven durch das DCM im Tierhaarextrakt in Erwägung gezogen wurde, erfolgte außerdem ein Test von Tierhaarextrakt mit Ethanol als Lösungsmittel (siehe 3.3.6 Fixierungsstimuli). Das Alter der verwendeten Larven war durchschnittlich 31 und maximal 90 Tage. Einen Überblick über die durchgeführten Versuche gibt Tab. 10.

Tab. 9: Versuche zur *In-vitro*-Fütterung von *D. reticulatus*-Nymphen mit den Fütterungssystemen nach Kröber und Guerin aus Glas (K+G Glas) im Schüttelwasserbad und nach Bonnet (FSB); Blut: mit 20 I.E./ml Na-Heparin, 2 mg/ml Glucose-Monohydrat, 10^{-6} mol/ml ATP und 5 µg/ml Gentamycin; Nymphen aus *In-vivo*-Zucht an Mäusen

Fütterungs- system	Versuchs- Nummer	Membran			Fixierungsstimuli				Tierart Blut	N Fütterungs- kammern	N Nymphen je Kammer	N Nymphen gesamt
		Art	Dicke (µm)	Silikonöl-Menge (-fach)	Kaninchenhaar- extrakt (µl)	Moskitonetz	Kaninchenhaare, Zeckenfaeces	Deckelhöhe (mm)				
K+G	Dr-1N	S	53	2	90	+	+	60,0	K	1	60	60
Glas		S	53	2	90 ⁴	n. d.	+	60,0	K	1	60	60
		S ¹	65–84	1	90	+	+	60,0	K	2	60	120
		S ¹	65–93	1	90 ⁴	n. d.	+	60,0	K	4	60	240
		S	53	2	90	+	+	60,0	R	1	60	60
		S	53	2	90 ⁴	n. d.	+	60,0	R	1	60	60
		S	66	1	90	+	+	60,0	R	1	60	60
		Dr-3N	S ²	52–60	1	90	n. d.	+	7,5	R	4	40
	Dr-4N	S ¹	40–60	1	90	n. d.	+	7,5	R	2	50	100
FSB	Dr-2N	H	n. b.	1	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	R	1	200	200
		S	65	1	180	n. d.	n. d.	n. d.	R	1	200	200
	Dr-3N	H ³	n. b.	1	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	R	1	200	200
	Dr-4N	H ³	n. b.	1	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	R	1	200	200

¹ eine der Kammern mit Silikonmembran ohne Linsenpapier als Matrix; ² zwei der Kammern mit Silikonmembran ohne Linsenpapier als Matrix; ³ Windelstück in Zeckenkammer; ⁴ an Versuchstag 4 Neustart des Versuches mit je 400 µl Kaninchenhaarextrakt; H = Mäusehaut; K = Kaninchen; n. b. = nicht bestimmt; n. d. = nicht durchgeführt; R = Rind; S = Silikonmembran

Tab. 10: Versuche zur *In-vitro*-Fütterung von *D. reticulatus*-Larven mit den Fütterungssystemen nach Kröber und Guerin aus Glas (K+G Glas) im Schüttelwasserbad und nach Bonnet (FSB); Blut mit 2 mg/ml Glucose-Monohydrat

Fütterungs- system	Versuchs- Nummer	Art	Membran				Fixierungsstimuli				
			Dicke (µm)	Silikonmischung + 5 g Toluol	Silikonöl- Menge (-fach)	Linsenpapier als Matrix	Tierhaarextrakt	Tierhaarextrakt (µl)	Moskitonetz	Tierhaare	Zeckenfaeces
K+G Glas	Dr-1L	S	15–109	n. d.	1	n. d.	R	90	+	G	+
		S	43	n. d.	1	n. d.	R	90	n. d.	G	+
		S	51–95	+	1	+	R	90	n. d.	G	+
	Dr-2L	S	15–109	n. d.	1	n. d.	K	90	+	K	+
		S	43	n. d.	1	n. d.	K	90	n. d.	K	+
		S	51–95	+	1	+	K	90	n. d.	K	+
		S	51	+	1	+	K	100	n. d.	n. d.	+
		S	15–95	n. d.	1	n. d.	K	100	+	n. d.	+
	Dr-3L	S	4–35	n. d.	1	n. d.	K	90	n. d.	n. d.	+
		S	19–35	n. d.	1	n. d.	G	90	n. d.	n. d.	+
		S	4–35	n. d.	1	n. d.	K	90	n. d.	n. d.	+
		S	19	n. d.	1	n. d.	G	90	n. d.	n. d.	+
	Dr-4L	S	23–80	n. d.	1	n. d.	K	90	+	K	+
		S	31	n. d.	1	n. d.	K	90	n. d.	K	+
		S	53	n. d.	2	+	K	90	n. d.	K	+
		S	50	n. d.	2	n. d.	K	90	n. d.	K	+
		S ¹	66	n. d.	n. d.	+	K	90	n. d.	K	+
		S	23–80	n. d.	1	n. d.	K ³	90	+	K	+
		S	31	n. d.	1	n. d.	K ³	90	n. d.	K	+
		S	53	n. d.	2	+	K ³	90	n. d.	K	+
	Dr-5L	S	50	n. d.	2	n. d.	K	90	n. d.	K	+
		S	53	n. d.	2	+	K	90	n. d.	K	+
	Dr-6L	S	31–35	n. d.	1	n. d.	K	90	n. d.	K	+
		S	50	n. d.	2	n. d.	K	90	n. d.	K	+
	Dr-8L	S	60	n. d.	1	+	K	90	n. d.	K	+
		S	32–52	n. d.	1	n. d.	K	90	n. d.	K	+
	Dr-9L	S	58	n. d.	1	+	K	90	n. d.	K	+
		S	32–41	n. d.	1	n. d.	K	90	n. d.	K	+
FSB	Dr-7L	H ²	n. b.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	
	Dr-8L	H ²	n. b.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	
	Dr-9L	H ²	n. b.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	

¹ Silikonkleber auf Linsenpapier ausgestrichen; ² Windelstück in Zeckenkammer; ³ Tierhaarextrakt mit Ethanol 70 % (statt Dichlormethan) als Lösungsmittel; ⁴ Blut wurde manuell defi-

Fortsetzung Tab. 10

Deckelhöhe (mm)	Tierart	Blut					N Fütterungs- kammern	Herkunft	Larven	
		Na-Heparin (I.E./ml)	Lagerungstem- peratur (°C)	ATP (x 10 ⁻⁶ mol/ml)	Gentamycin (µg/ml)	N Larven je Kammer			N Larven gesamt	
60,0	R	20	+4	1	5	4	L	500	2000	
60,0	R	20	+4	1	5	1	L	500	500	
60,0	R	20	+4	1	5	3	L	500	1500	
60,0	R	20	+4	1	5	4	L	500	2000	
60,0	R	20	+4	1	5	1	L	500	500	
60,0	R	20	+4	1	5	3	L	500	1500	
60,0	R	20	+4	1	5	1	L	500	500	
60,0	R	20	+4	1	5	1	L	500	500	
60,0	R	20	+4	1	5	4	L	250	1000	
60,0	R	20	+4	1	5	2	L	250	500	
60,0	K	20	+4	1	5	4	L	250	1000	
60,0	K	20	+4	1	5	1	L	250	250	
60,0	R	20	+4	1	5	2	L	500	1000	
60,0	R	20	+4	1	5	1	L	500	500	
60,0	R	20	+4	1	5	1	L	500	500	
60,0	R	20	+4	1	5	1	L	500	500	
60,0	R	20	+4	1	5	1	L	500	500	
60,0	R	20	+4	1	5	2	L	500	1000	
60,0	R	20	+4	1	5	1	L	500	500	
60,0	R	20	+4	1	5	1	L	500	500	
60,0	R	20	+4	1	5	1	L	500	500	
60,0	R	20	+4	1	5	1	L	500	500	
60,0	R	20	-20	4	5	1	T	250	250	
60,0	R	20	-20	4	5	1	T	250	250	
60,0	K	0 ⁴	+4	2	0	2	L	500	1000	
60,0	K	0 ⁴	+4	2	0	2	L	500	1000	
7,5	R	20	+4	1	5	2	L	500	1000	
7,5	R	20	+4	1	5	4	L	500	2000	
7,5	R	20	+4	1	5	2	T	500	1000	
7,5	R	20	+4	1	5	4	T	500	2000	
n. d.	R	20	+4	1	5	1	T	120	120	
n. d.	R	20	+4	1	5	1	L	1700	1700	
n. d.	R	20	+4	1	5	1	T	2000	2000	

briniert; G = Gerbil; H = Mäusehaut; K = Kaninchen; L = *In-vitro* -Laborzucht;
n. b. = nicht bestimmt; n. d. = nicht durchgeführt; R = Rind; S = Silikonmembran;
T = *In-vivo* -Zucht am Tier

3.9 *In-vivo*-Versuche mit *D. reticulatus*

Die Ergebnisse der *In-vitro*-Fütterung von *D. reticulatus* wurden mit *In-vivo*-Daten verglichen, die im Rahmen der Zeckenzucht am Tier (Tierversuchsantrag Nummer H0078/10, Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin) am Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin, FU Berlin, gesammelt wurden.

Für die *In-vivo*-Fütterung wurden bei adulten Zecken jeweils 5–20 Weibchen und Männchen in einem Leinenbeutel um ein Kaninchen- oder Beagle-Ohr fixiert. Die Tiere befanden sich dabei in einem Stall bei natürlichem Tageslicht (die Versuche fanden Ende April, Ende Mai und Anfang Dezember statt) und einer durchschnittlichen Raumtemperatur von 20°C. *D. reticulatus*-Nymphen wurden in gleicher Weise, jedoch stets am Kaninchenohr, gefüttert. Bei Larven hingegen fand die Fütterung an weißen Mäusen statt. Diese wurden in circa 25 x 40 cm großen Einzelkäfigen (EBECO, Castrop-Rauxel) gehalten, die aus einer Kunststoffschale mit Gitterabdeckung bestanden. Die Käfige wurden in eine wassergefüllte Schale (Bürkle, Lörrach) gestellt, die ein Entweichen der Larven verhinderte und aus der schließlich die vollgesaugten und abgefallenen Larven gesammelt wurden. Die Mäuse wurden durch einen Halskragen aus Karton am Putzen der Ohren und Lider gehindert, wo sich ein Großteil der Larven fixierte.

Verglichen wurden die Adulten-Ergebnisse mit *In-vitro*-Fütterungsversuchen von *D. reticulatus*-Adulten aus Wildfang im Fütterungssystem K+G Glas: im Schüttelwasserbad, 7 ♀ und 5 ♂ je Kammer, Deckelhöhe 5–10 mm, Blut vom Rind, mit 20 I.E./ml Na-Heparin, 2 mg/ml Glucose-Monohydrat, 10⁻⁶ mol/ml ATP und 5 µg/ml Gentamycin, mit folgenden Fixierungsstimuli: Moskitonetz, 90 µl Rinderhaarextrakt, Rinderhaare und Zeckenfaeces.

3.10 Ermittlung des ungesogenen Gewichtes und des Critical Weight von *I. ricinus*- und *D. reticulatus*-Weibchen

Bei der Auswertung der *In-vitro*-Fütterungsversuche war es teilweise schwierig zu beurteilen, wie weit Weibchen vollgesogen waren und demzufolge ob sie in die Auswertung der Versuche mit eingehen sollten. Als Entscheidungskriterium wurde hierfür das Critical Weight (CW) (Lomas et Kaufman, 1999; Weiss et Kaufman, 2001; Kaufman, 2007) gewählt, welches für *Dermacentor andersoni* zwischen dem 10- und 13-Fachen des ungesogenen Gewichtes liegt (Ullah et Kaufman, 2014) und den Übergang von der Slow-Feeding- zur Rapid-Feeding-Phase markiert. Außerdem wird davon ausgegangen, dass bei Weibchen, die sich über das CW hinaus vollsaugen, eine Paarung stattgefunden hat und dass sie fähig sind, Eier abzulegen. Da für *I. ricinus* und *D. reticulatus* das CW bisher nicht ermittelt wurde, wurde

das ungesogene Gewicht hier mit 13 multipliziert, also die Obergrenze des bisher ermittelten Faktors gewählt.

Für die Ermittlung des ungesogenen Gewichtes wurden 60 *D. reticulatus*-Weibchen aus Wildfang (8–15 Tage nach dem Flaggen) und 46 *I. ricinus*-Weibchen aus *In-vivo*-Laborzucht mit einer Präzisionswaage (PCB 250-3, Kern, München, für *D. reticulatus*; und Discovery[®], Ohaus, Nänikon, Schweiz, für *I. ricinus*) gewogen.

Alle Weibchen, die manuell von der Membran abgelöst werden mussten und unter dem CW lagen, wurden als nicht vollgesaugt beurteilt.

3.11 Ermittlung von Eigewichten von *D. reticulatus*

Um von den Gelegegewichten auf die Eizahlen der Gelege schließen zu können, wurde das mittlere Eigewicht von *D. reticulatus* bestimmt. Dazu wurden Eipakete von 10–182 Eiern von verschiedenen Gelegen entnommen, unter einer Stereolupe ausgezählt und jeweils in ein Eppendorfgefäß überführt, das mit und ohne Eier auf einer Präzisionswaage (Discovery[®], Ohaus, Nänikon, Schweiz) gewogen wurde. Die Eier wurden gewogen, wenn der Larvenschlupf noch nicht begonnen hatte, aber bei den ersten Eiern der Fortschritt der Embryonierung bereits anhand weißer Punkte, die die Malpighischen Gefäße repräsentieren, sichtbar war. Zu diesem Zeitpunkt wurden auch stets die Gelege gewogen. Für die Messung wurden nur Eier verwendet, die unter der Stereolupe unversehrt aussahen und nicht eingetrocknet oder mit Schimmel befallen waren. Insgesamt wurden 1714 Eier gewogen.

3.12 Auswertung der Daten

Während der Versuche wurden folgende Daten erhoben: Fixierungsrate und Vollsaugrate, bezogen auf die Anzahl im Versuch eingesetzter Zecken, und Vollsauggewicht der Weibchen und Nymphen. Nach Abschluss eines Versuches wurden die vollgesogenen Weibchen oder Juvenilen weiter überwacht und einmal wöchentlich begutachtet. Dabei wurden Eiablage und Larvenschlupf oder bei Juvenilen der Häutungserfolg dokumentiert, was in folgenden Daten festgehalten wurde: Eiablagrate bezogen auf vollgesogene Weibchen, Gelegegewicht, Eikonversionsfaktor (EKF; Anteil der Körpermasse, der in Gelegemasse umgesetzt wurde, in Prozent), Anzahl der larvenproduzierenden Weibchen, Larvenschlupfrate je Gelege, Larvenmasse (Faktor aus Larvenschlupfrate und Gelegemasse), bzw. bei Juvenilen die Häutungsrate. Die Larvenschlupfrate je Gelege wurde dabei in 5er-Schritten (Larvenschlupf bei (fast) keinen, circa einem Viertel, der Hälfte, einem Dreiviertel oder (fast) allen Eiern)

geschätzt. Außerdem wurde die Dauer vom Vollsaugen bis zum Eiablage- und bis zum Larvenschlupfbeginn, bzw. bis zum Häutungsbeginn ermittelt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit den Programmen IBM SPSS Statistics 20, Microsoft Excel 14.0 und GraphPad Prism 5.03.

Um Häufigkeiten bei kategorialen Daten auf signifikante Unterschiede zu untersuchen, wurde der exakte Test nach Fisher verwendet. Bei den Ergebnissen der Larven von *D. reticulatus* wurde aufgrund der großen Zeckenzahlen ($N > 1000$) stattdessen der Chi-Quadrat-Test gewählt.

Die Auswahl der statistischen Tests bei metrischen Daten erfolgte anhand der Anzahl der zu vergleichenden Gruppen sowie des Vorhandenseins einer Normalverteilung und einer Varianzhomogenität. Der Shapiro-Wilk-Test, Histogramme und Q-Q-Plots wurden zur Beurteilung der Normalverteilung herangezogen. Abb. 16 zeigt das Vorgehen beim Auswählen der statistischen Tests für metrische Daten. Bei signifikanten Ergebnissen in der ANOVA wurde im Anschluss der Bonferroni-Test durchgeführt, um zu identifizieren zwischen welchen Gruppen signifikante Unterschiede vorlagen.

Bei den Tests wurde mit einem 95 %-Konfidenzintervall gearbeitet.

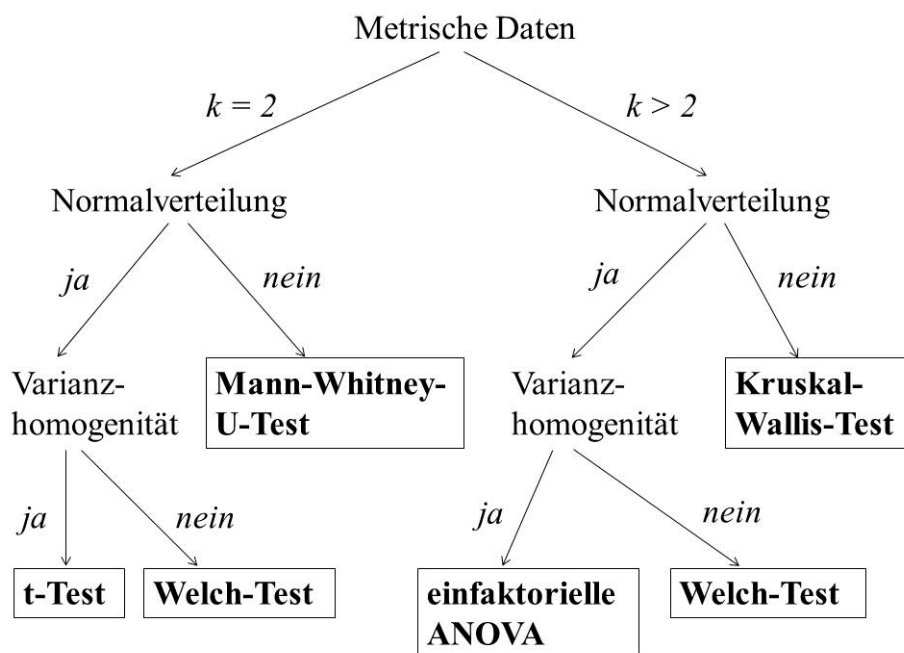


Abb. 16: Auswahl der statistischen Tests bei metrischen Daten; k: Anzahl der Gruppen

4. Ergebnisse

4.1 Mundwerkzeuglängen

Die Hypostomlängen aller Stadien von *D. reticulatus* und *I. ricinus* wurden ermittelt, um die Membrandicken in der *In-vitro*-Fütterung auf die Mundwerkzeuge der Zecken abstimmen zu können. Die Mittelwerte sind in Tab. 11 und Abb. 17 dargestellt.

Tab. 11: Mittlere Hypostomlängen von *D. reticulatus* und *I. ricinus*

		N	mittlere Hypostomlänge (µm)	Standardabweichung (µm)
<i>D. reticulatus</i>	♀	32	383,0	27,4
	♂	31	320,9	28,2
	Nymphen	37	125,2	7,4
	Larven	34	72,4	4,7
<i>I. ricinus</i>	♀	33	555,7	31,6
	♂	32	282,8	17,0
	Nymphen	32	213,3	16,4
	Larven	32	93,3	7,3

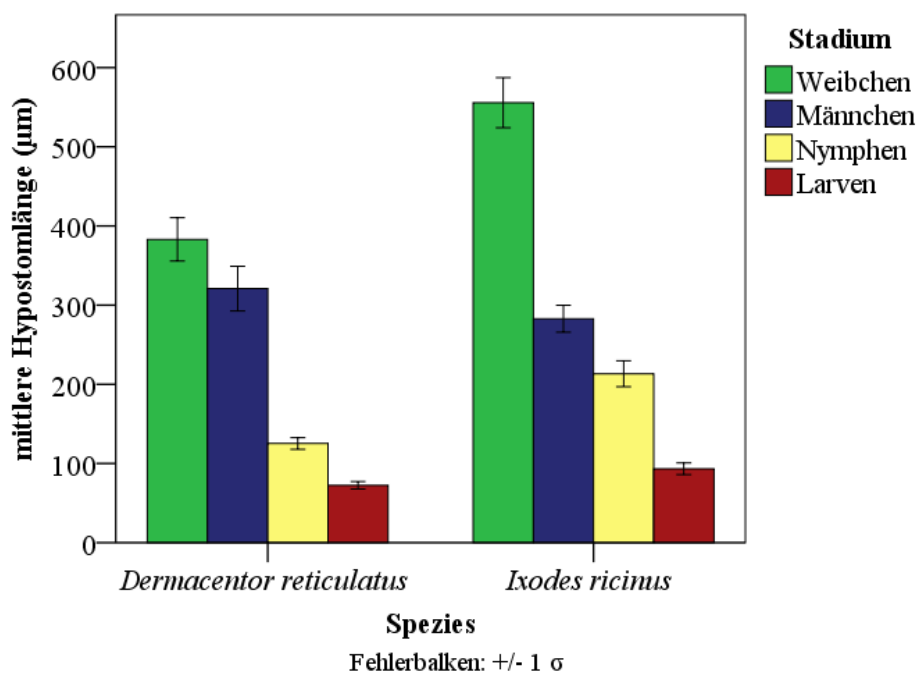


Abb. 17: Mittlere Hypostomlängen von *D. reticulatus* und *I. ricinus*

4.2 Ungesogenes Gewicht und Critical Weight von *I. ricinus*- und *D. reticulatus*-Weibchen

Das Gewicht von nüchternen Weibchen wurde benötigt, um ihr Critical Weight (CW) (siehe 3.10) zu berechnen. Dieses wurde als Entscheidungskriterium herangezogen, ob Weibchen als vollgesaugt beurteilt wurden oder nicht: Gesogene Weibchen, deren Gewicht unter dem CW lag und die manuell von der Membran abgelöst werden mussten, wurden als nicht vollgesaugt erachtet.

Ungesogene *I. ricinus*-Weibchen wogen im Durchschnitt 1,84 mg ($\sigma = 0,23$ mg). Das ergibt mit dem Faktor 13 (siehe 3.10) ein CW von 23,9 mg für *I. ricinus*.

Bei ungesogenen *D. reticulatus*-Weibchen wurde ein mittleres Gewicht von 4,28 mg ermittelt ($\sigma = 0,72$ mg), woraus ein CW von 55,6 mg resultiert.

4.3 Versuche zur *In-vitro*-Fütterung von *I. ricinus*

Alle Stadien von *I. ricinus* nahmen die Silikonmembranen an und ließen sich im künstlichen Fütterungssystem bis zur Repletion füttern. Mit der erfolgreichen Fütterung von Adulten (Ir-2A und -3A), den aus ihren Gelegen geschlüpften Larven (Ir-1L), den daraus gehäuteten Nymphen (Ir-4N) und Adulten (Ir-5A; siehe auch 3.7, Tab. 4 und 5) wurde ein Lebenszyklus vollständig per *In-vitro*-Fütterung realisiert. Die entstandenen Adulten legten wiederum Eier ab, aus denen Larven hervorgingen.

4.3.1 Versuche mit *I. ricinus*-Adulten

Die ersten Fütterungsversuche mit *I. ricinus*-Adulten dienten der Etablierung der Schildzecken-*In-vitro*-Fütterung nach der Methode von Kröber und Guerin (2007a) am Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der FU Berlin. Dabei wurden diverse Optimierungen des Fütterungssystems, insbesondere hinsichtlich Silikonmembranen, Fixierungsstimuli, Zecken, Fütterungskammern und Gerinnungshemmung des Blutes, getestet (siehe auch 3.7.1, Tab. 4).

In Versuch Ir-1A wurden zunächst verschiedene Fixierungsstimuli und Membrandicken getestet. Bei den mechanischen Fixierungsstimuli stellte sich das Moskitonetz im Vergleich zu Metallgitter und Fliesenkreuz als praktikabler heraus und führte auch zu etwas höheren Fixierungsraten, weshalb bei folgenden Versuchen stets das Moskitonetz verwendet wurde. Als olfaktorische Fixierungsstimuli erwiesen sich 100 μ l Rinderhaarextrakt für die Kammer-

Grundfläche als ausreichend, während sich die Methode des Reibens der Membran über ein Rind als schlecht standardisierbar und unhygienisch herausstellte, weshalb auf diese zusätzliche Maßnahme in den weiteren Versuchen verzichtet wurde. Für die folgenden Versuche wurden außerdem die Rinderhaarextrakt-Menge auf 90 µl reduziert, die Schüttelfrequenz auf 50/min erhöht und die Membrandicke, da im Versuch Ir-1A beide Dicken von 70 und 140 µm gut angenommen wurden, auf 100 µm (80–120 µm) eingestellt. Die Ergebnisse aus Versuch Ir-1A sind statistisch nicht abgesichert, da es sich um kleine Zeckenzahlen handelt, gaben aber eine erste Orientierung für die Festsetzung der Parameter im *In-vitro*-Fütterungssystem.

Bei der Optimierung der Gerinnungshemmung des Futterblutes in Versuch Ir-2A erwies sich der Zusatz von Heparin als hygienischer und praktikabler gegenüber der manuellen Defibrinierung am Schlachthof. 10 und auch 2,5 I.E./ml waren zunächst für die Gerinnungshemmung des Blutes ausreichend, doch bei der Verfütterung zeigten sich bei beiden Konzentrationen noch feinste Blutkoagel an den Kammerwänden und Membranen. Daher wurde die Konzentration für die folgenden Versuche auf 20 I.E./ml eingestellt, bei der dieses Problem nicht auftrat.

In den Versuchen mit Plexiglaskammern (Ir-1A bis -3A; siehe 3.7.1, Tab. 4) trat nach mehreren Versuchstagen oder am Ende eines Versuches stets bei einigen Kammern ein Schimmelbefall auf. Insgesamt waren 8 der 16 Zeckenkammern aus Plexiglas an der Membranunterseite mit Schimmel befallen. Mit Einführung der autoklavierbaren Glas-Fütterungskammern war ein wesentlich hygienischeres Arbeiten möglich und Schimmelwachstum trat nur noch selten auf.

Ein Besatz der Fütterungskammern mit 12 adulten Zecken mit einem Geschlechterverhältnis von 7 ♀ und 5 ♂ erschien optimal und wurde anschließend für die Fütterung von *D. reticulatus* übernommen. Für *I. ricinus*-Adulte wurde dennoch meist eine abweichende Zeckenanzahl gewählt, was allerdings ausschließlich durch die begrenzte Verfügbarkeit der Zecken aus der Laborzucht oder vom Flaggen bedingt war.

Insgesamt wurden bei den *In-vitro*-Fütterungsversuchen mit *I. ricinus*-Adulten in Fütterungssystemen mit Silikonmembranen bei den Weibchen eine mittlere Fixierungsrate von 74,8 % und eine Vollsaugrate von 40,2 % erzielt; die Ergebnisse der einzelnen Versuche unterlagen dabei deutlichen Schwankungen, und Versuch Ir-5A, der als einziger im Klimaschrank unter kontrollierten Umgebungsbedingungen und einer erhöhten CO₂-Spannung stattfand, fiel durch 100,0 % Fixierungs- und Vollsaugrate auf (Abb. 18). Vor und auch während der Fütterungsversuche wurde Kopulationsverhalten beobachtet. Ein Versuch dauerte durchschnittlich 18 d. Von den vollgesaugten Weibchen zeigten 62,7 % Eiablage, und 23,5 % der vollgesaugten Weibchen produzierten Larven. Pro Gelege schlüpfen im Mittel aus 18,2 % der Eier Larven. Bei Versuch Ir-4A legte kein Weibchen Eier ab.

Das mittlere Vollsauggewicht und das Gelegegewicht beliefen sich auf 209,2 mg ($\sigma = 86,6$ mg) bzw. auf 34,6 mg ($\sigma = 22,0$ mg) (Abb. 19). Der Eikonversionsfaktor (EKF) betrug durchschnittlich 15,6 %.

Auffallend war, dass sich viele vollgesogene Weibchen nicht selbstständig von der Membran ablösten. Sie blieben über mehrere Stunden oder Tage ohne eine weitere wahrnehmbare Größenzunahme mit dem Hypostom in der Silikonmembran verankert. Von den insgesamt 51 vollgesogenen *I. ricinus*-Weibchen mussten daher jeweils am Versuchsende 29 manuell von der Membran abgelöst werden.

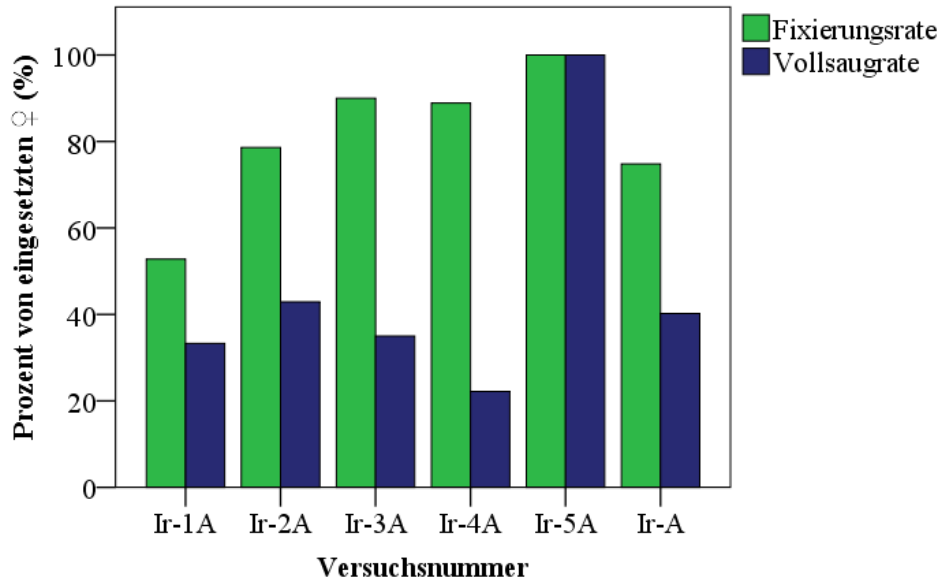


Abb. 18: Fixierungs- und Vollsaugraten von *I. ricinus*-Weibchen in *In-vitro*-Fütterungssystemen mit Silikonmembranen (K+G Plexi und K+G Glas) der Versuche Ir-1A bis Ir-5A und Ergebnis der Versuche im Durchschnitt (Ir-A); Anzahl der eingesetzten Weibchen: $N_{Ir-1A} = 36$; $N_{Ir-2A} = 56$; $N_{Ir-3A} = 20$; $N_{Ir-4A} = 9$; $N_{Ir-5A} = 6$; $N_{Ir-A} = 127$

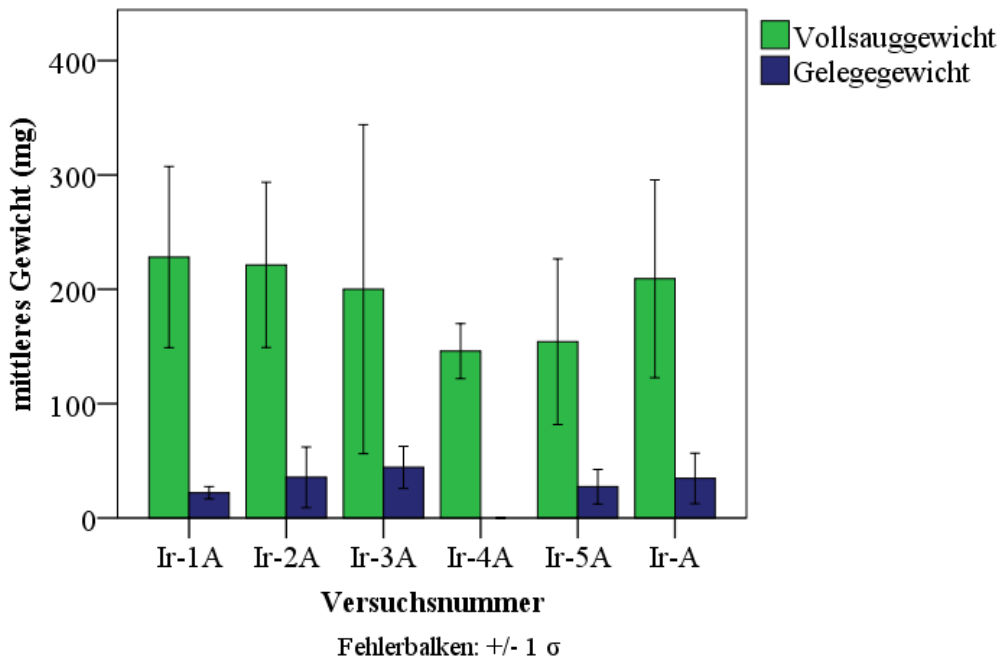


Abb. 19: Mittlere Vollsaug- und Gelegegewichte von *I. ricinus*-Weibchen in *In-vitro*-Fütterungssystemen mit Silikonmembranen (K+G Plexi und K+G Glas) der Versuche Ir-1A bis Ir-5A und Ergebnis der Versuche im Durchschnitt (Ir-A)

4.3.2 Versuche mit *I. ricinus*-Nymphen und -Larven

Bei den ersten *In-vitro*-Versuchen mit *I. ricinus*-Nymphen (Ir-1N und -2N; siehe 3.7.2, Tab. 5) wurde analog zu den Versuchen mit Adulten ein Stück Moskitonetz als mechanischer Fixierungsstimulus auf die Silikonmembran geklebt. Dieses Netz hinderte die Nymphen jedoch daran, an die Membran zu kommen, oder, wenn es ihnen gelang, sich zu fixieren, sich vollzusaugen, da sie dann zwischen Membran und Netz eingeklemmt wurden. Daher wurden mit dem Moskitonetz deutlich geringere Fixierungsraten (20,4 %) als ohne (73,2 %) erzielt (Abb. 20). Im Larvenversuch (Ir-1L; 3.7.2, Tab. 5) wurde das Netz von Anfang an weggelassen und eine Fixierungsrate von 56,0 % erreicht (Abb. 20). Von den fixierten Juvenilen saugten sich fast alle voll: 16,3 % und 73,2 % der Nymphen und 56,0 % der Larven (siehe Abb. 20). Die Versuche mit *I. ricinus*-Juvenilen dauerten im Durchschnitt 8 d.

Die Häutungsrate zum nächsten Stadium betrug bei Nymphen 78,9 % und bei Larven 67,9 % der vollgesogenen (bzw. 33,3 % und 38,0 % der eingesetzten) Juvenilen. Die Nymphenversuche fanden alle zwischen Mitte August und Anfang Oktober (in verschiedenen Jahren) statt, und die Dauer vom Vollsaugen bis zum Beginn der Häutung betrug durchschnittlich 197 d ($\sigma = 55$ d). Der Versuch mit den Larven wurde im Juli durchgeführt, und hier dauerte es bis zur Häutung lediglich 29 d ($\sigma = 6$ d).

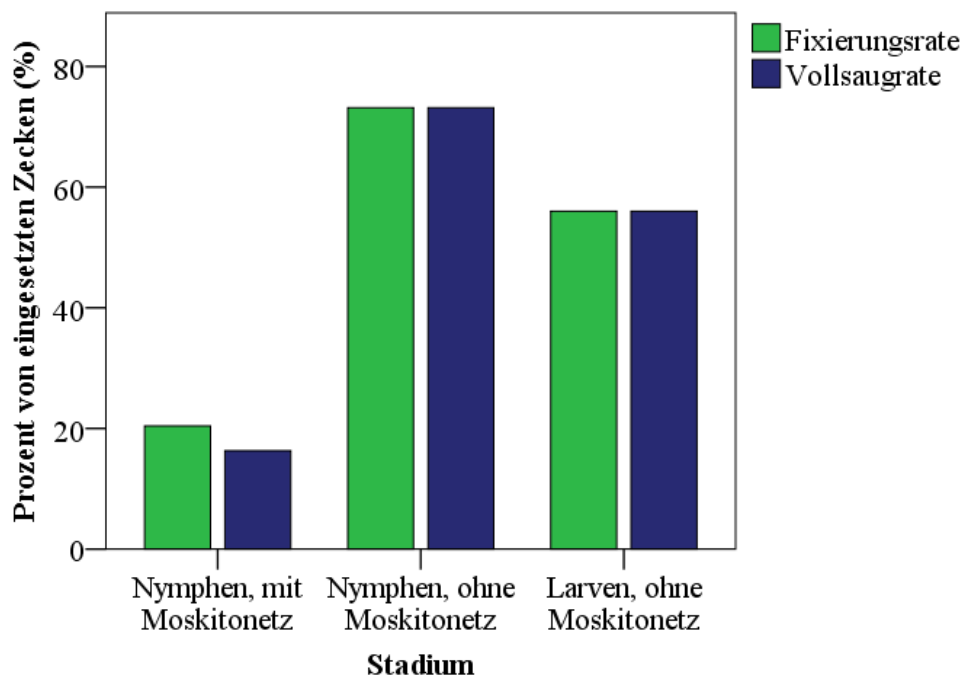


Abb. 20: Fixierungs- und Vollsaugraten von *I. ricinus*-Juvenilen in *In-vitro*-Fütterungssystemen mit Silikonmembranen (K+G Plexi und K+G Glas), mit und ohne Moskitonetz als Fixierungsstimulus; Anzahl der eingesetzten Juvenilen: $N_{Ny, m. Netz} = 49$; $N_{Ny, o. Netz} = 41$; $N_{Larven} = 50$

Darüber hinaus wurde das Vollsauggewicht der *I. ricinus*-Nymphen jeweils am Versuchsende ermittelt: es betrug im Mittel 3,3 mg. Bei getrennter Betrachtung der Vollsauggewichte von Nymphen, die sich später zu Männchen, und jenen, die sich später zu Weibchen häuteten, fiel allerdings ein deutlicher Unterschied auf. So erreichten Männchen (N = 13) als Nymphen ein mittleres Gewicht von 2,7 mg ($\sigma = 0,39$ mg) und Weibchen (N = 16) ein Gewicht von 4,1 mg ($\sigma = 0,72$ mg). Der Unterschied ist laut t-Test hoch signifikant ($p < 0,001$). Die Verteilung der Gewichte zeigt Abb. 21.

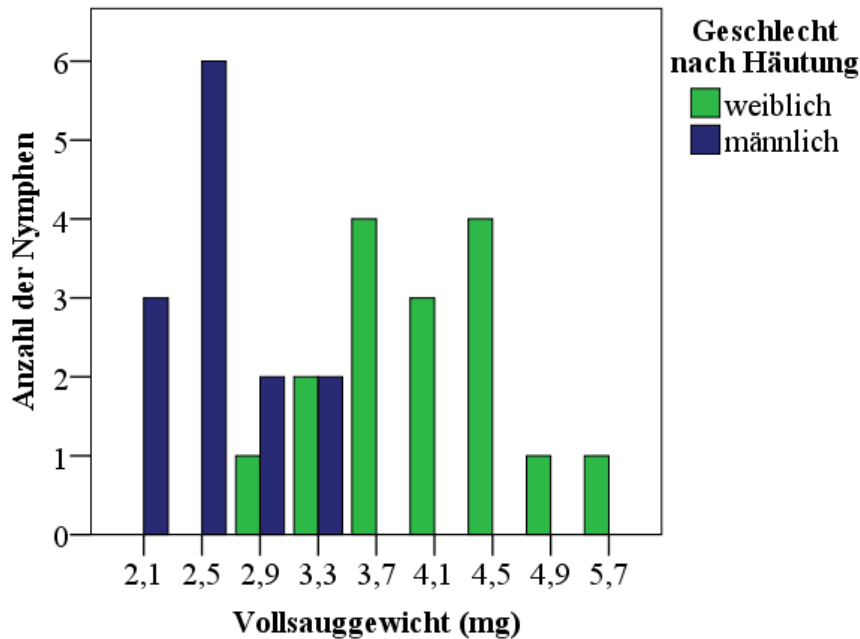


Abb. 21: Verteilung der Vollsauggewichte von *I. ricinus*-Nymphen unter Berücksichtigung des Geschlechtes nach der Häutung

4.4 Versuche zur *In-vitro*-Fütterung von *D. reticulatus*

4.4.1 Versuche mit *D. reticulatus*-Adulten

Nach erfolgreichen Fütterungsversuchen mit *I. ricinus* auf Silikonmembranen, wurde die *In-vitro*-Fütterung erstmals mit der Zeckenspezies *D. reticulatus* durchgeführt. Adulte *D. reticulatus* fixierten sich bereitwillig an den Silikonmembranen und nahmen Blut auf. Weibchen saugten sich voll und produzierten fertile Eier, aus denen Larven schlüpften. Die Ergebnisse aus der *In-vitro*-Fütterung wurden mit denen aus der Fütterung am Tier verglichen.

Mit dem Ziel, mit der *In-vitro*-Fütterung von Schildzecken bessere Ergebnisse zu erzielen sowie den Arbeitsaufwand zu reduzieren, wurden mit *D. reticulatus*-Adulten systematisch potenzielle Optimierungen getestet: Die Verfütterung von zuvor tiefgekühlt gelagertem Blut, ein Fütterungssystem mit Tierhäuten (FSB) und ein teilautomatisiertes System aus Polystyrol (DFS PS) sowie aus Glas (DFS Glas) und die Verfütterung von gammabestrahltm Blut und von Futterblut ohne Antibiotikazugabe wurden getestet.

Allgemeine Beobachtungen zu *In-vitro*-Versuchen mit *D. reticulatus*-Adulten auf Silikonmembranen

Beim Saugakt fiel auf, dass sich Adulte gerne unter dem Moskitonetz oder am Rand der Zeckenkammer fixierten. Im Gegensatz zu *I. ricinus* waren auch bei den Männchen Fixierung an der Membran und Blutaufnahme zu beobachten. Zum Ende eines Versuches sammelten sich außerdem stets große Mengen an Faeces in den Kammern an, die täglich entfernt werden mussten. Häufig hatten die Faeces eine klebrige Konsistenz und führten zu Verklebungen der Zecken, die teilweise während des Blutwechsels mit einer Pinzette vorsichtig gelöst werden konnten. Unter der Membran waren an den Stellen, an denen Zecken fixiert waren, deutliche Zement-Konuse sichtbar.

Vergleich der *In-vitro*- und *In-vivo*-Fütterung von *D. reticulatus*

Die Ergebnisse der *In-vitro*-Fütterung von *D. reticulatus*-Adulten im System K+G Glas wurden verglichen mit denen der *In-vivo*-Fütterung am Tier (Hund oder Kaninchen; siehe 3.9). Die Fütterung am Labortier kommt dem natürlichen Wirtssuch- und Blutaufnahmeverhalten von Zecken am nächsten. Dementsprechend wurden in den durchgeführten *In-vivo*-Versuchen bei allen gemessenen Daten im Durchschnitt höhere Werte als in den *In-vitro*-Fütterungsversuchen erzielt. Von den 357 Weibchen im *In-vitro*-System K+G Glas fixierten sich 50,1 %. Die Fixierungsrate bei der Fütterung der insgesamt 100 Weibchen am Tier wurde nicht ermittelt. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass sich die überwiegende Mehrheit der am Tier fixierten Weibchen auch vollsaugte. Die Vollsaugrate von eingesetzten Weibchen betrug *in vivo* 64,0 % und *in vitro* 29,7 %, was signifikant weniger war ($p < 0,0001$; exakter Test nach Fisher) (Abb. 22). Auch die Eiablagrate war mit 91,5 % niedriger als *in vivo* mit 100,0 % ($p < 0,05$; exakter Test nach Fisher), während sich die Raten an larvenproduzierenden Weibchen (88,9 % *in vivo* und 66,0 % *in vitro*) nicht signifikant unterschieden (Tab. 12). *In vivo* wurden außerdem ein signifikant höherer Eikonversionsfaktor (EKF) und eine höhere mittlere Larvenschlupfrate je Gelege beobachtet ($p < 0,001$; Mann-Whitney-Test).

Die mittleren Vollsaug- bzw. Gelegegewichte beliefen sich auf 266,3 mg ($\sigma = 71,4$ mg) *in vivo* und 219,9 mg ($\sigma = 78,9$ mg) *in vitro*, bzw. auf 123,9 mg ($\sigma = 54,3$ mg) und 96,3 mg ($\sigma = 42,9$ mg). Die mittlere Larvenmasse je Weibchen betrug *in vivo* 90,4 mg ($\sigma = 53,5$ mg) und *in vitro* 52,0 mg ($\sigma = 43,3$ mg) (Abb. 23).

Tab. 12: Ergebnisse der *In-vivo*- und *In-vitro*-Fütterungsversuche mit *D. reticulatus*-Adulten; die *In-vivo*-Fütterung erfolgte am Hund oder Kaninchen, die *In-vitro*-Fütterung auf Silikonmembranen; gleiche Buchstaben stehen für signifikante Unterschiede (bei a: $p < 0,0001$; bei b: $p < 0,05$; beides exakter Test nach Fisher; bei c und d: $p < 0,001$; beides Mann-Whitney-Test)

Versuchs- gruppe	Anzahl eingesetzter ♀	Fixierte ♀ (%)	Vollge- saugte ♀ (%)	♀ mit Eiablage (%) [^]	Larven- produzieren- de ♀ (%) [^]	EKF	Mittlere Larven- schlupfrate je Gelege
<i>in vivo</i>	100	n. b.	64 (64,0 %) ^a	64 (100,0 %) ^b	32* (88,9 %)	49,4 % ^c	84,8 % ^d
<i>in vitro</i>	357	179 (50,1 %)	106 (29,7 %) ^a	97 (91,5 %) ^b	70 (66,0 %)	42,0 % ^c	55,4 % ^d

* von 36 ♀ (da bei einem Versuch keine Ermittlung der larvenproduzierenden ♀)

[^] von vollgesaugten ♀

EKF - Eikonversionsfaktor

n. b. - nicht bestimmt

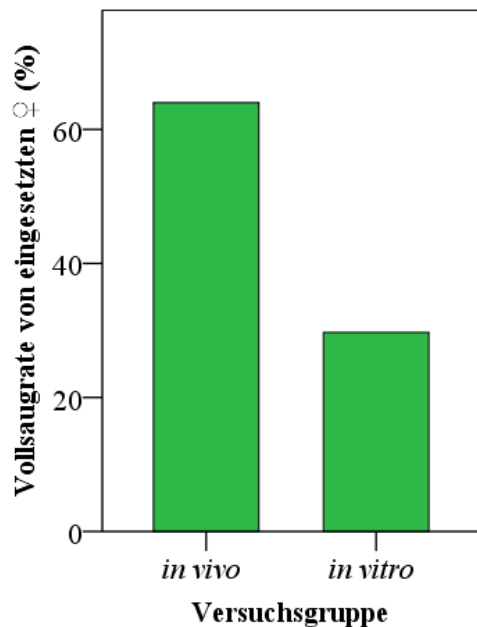


Abb. 22: Mittlere Vollsaugraten von *D. reticulatus*-Weibchen in der *In-vivo*- und *In-vitro*-Fütterung; der Unterschied ist signifikant ($p < 0,0001$; exakter Test nach Fisher)

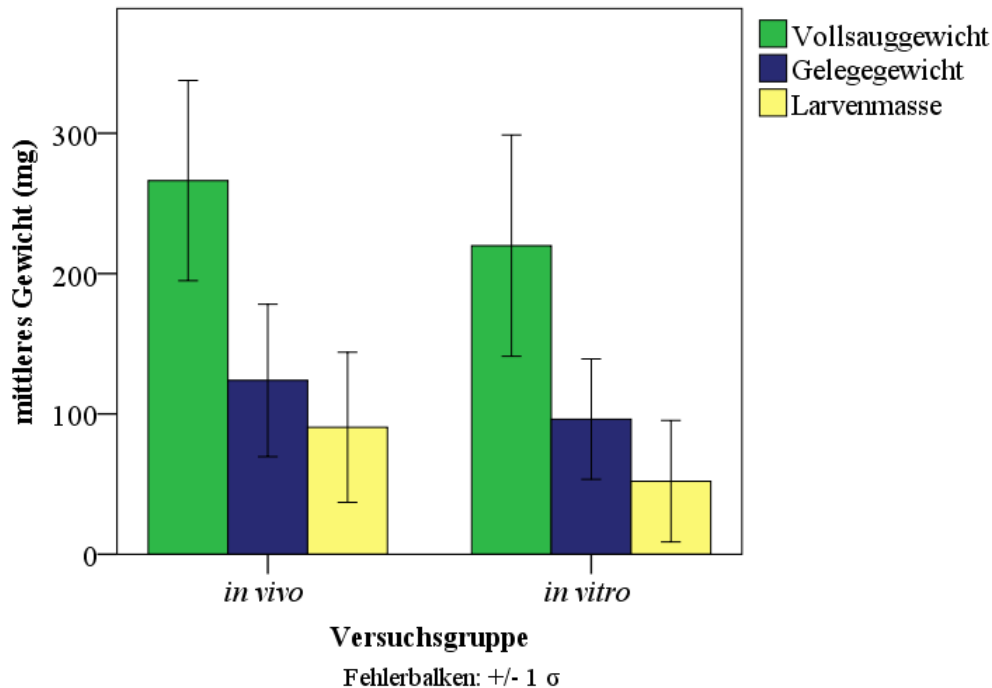


Abb. 23: Mittlere Vollsaug-, Gelege- und Larvengewichte von *D. reticulatus*-Adulten in der *In-vivo*- und *In-vitro*-Fütterung; die Unterschiede zwischen den Gewichten sind signifikant (Vollsauggewicht: $p < 0,001$; Gelegegewicht: $p < 0,01$; beides t-Test; Larvenmasse: $p < 0,01$; Mann-Whitney-Test)

Die durchschnittlichen Zeitspannen vom Vollsaugen bis zum Beginn der Eiablage und des Larvenschlupfes waren in der *In-vivo*-Fütterung mit 8 d ($\sigma = 8,0$ d) und 38 d ($\sigma = 12,8$ d) kürzer als in der *In-vitro*-Fütterung mit 27 d ($\sigma = 27,4$ d) und 59 d ($\sigma = 30,9$ d).

Auch die Versuchsdauer selbst war *in vivo* kürzer. Nach 10 Tagen waren die Weibchen in der Regel vollgesaugt, während Versuche *in vitro* durchschnittlich 15 Tage dauerten. *In vitro* fixierten sich nicht alle Weibchen gleich in den ersten Tagen, sondern begannen teilweise erst mit der Blutaufnahme, wenn sich andere Weibchen bereits vollgesaugt hatten.

Versuche zur Verfütterung von tiefkühlgelagertem Blut

Die Verfütterung von zuvor tiefgekühlt gelagertem Blut wurde getestet, um das Problem der notwendigen, jedoch häufigen und aufwendigen Beschaffung von Frischblut zu umgehen.

Bei der Verwendung von gefrorenem und folglich hämolysiertem Futterblut (siehe 3.8.1, Tab. 6, Versuche Dr-1A, -2A und -4A) zeigte sich, dass die Zecken auch dieses bereitwillig aufnahmen und sich vollsaugten. So wurden mit frischem und mit zuvor tiefkühlgelagertem Futterblut vergleichbare Ergebnisse erzielt (Tab. 13 und Abb. 24). Die größten Unterschiede waren in der Vollsaugrate und im Vollsauggewicht feststellbar – beides war in der Gruppe mit dem tiefkühlgelagerten Blut gegenüber der Gruppe mit dem frischen Blut verringert. Doch erwies sich keiner der Unterschiede als signifikant. Das mittlere Vollsauggewicht belief sich

auf 221,9 mg ($\sigma = 63,2$ mg) und 198,3 mg ($\sigma = 63,7$ mg), das mittlere Gelegegewicht auf 98,3 mg ($\sigma = 38,9$ mg) und 95,0 mg ($\sigma = 37,8$ mg) und die mittlere Larvenmasse auf 55,3 mg ($\sigma = 39,6$ mg) und 56,2 mg ($\sigma = 38,8$ mg) bei frischem und gefrorenem Blut (siehe Abb. 24).

Die mittlere Dauer vom Vollsaugen bis zum Beginn der Eiablage betrug mit frischem Blut 27 d ($\sigma = 23,7$ d) und mit gefrorenem Blut 19 d ($\sigma = 21,6$ d) und die Dauer vom Vollsaugen bis zum Beginn des Larvenschlupfes 61 d ($\sigma = 32,1$ d) und 59 d ($\sigma = 28,1$ d).

Tab. 13: Ergebnisse der *In-vitro*-Fütterung von *D. reticulatus*-Adulten unter Verwendung von frischem und zuvor tiefkühlgelagertem Futterblut; die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen sind nicht signifikant

Versuchsgruppe	Anzahl eingesetzter ♀	Fixierte ♀ (%)	Vollgesaugte ♀ (%)	♀ mit Eiablage (%)*	Larvenproduzierende ♀ (%)*	EKF	Mittlere Larvenschlupfrate je Gelege
Blut frisch	119	70 (58,8 %)	59 (49,6 %)	57 (96,6 %)	42 (71,2 %)	43,7 %	62,0 %
Blut gefroren	119	69 (58,0 %)	45 (37,8 %)	41 (91,1 %)	32 (71,1 %)	46,9 %	61,3 %

* von vollgesaugten ♀
EKF - Eikonversionsfaktor

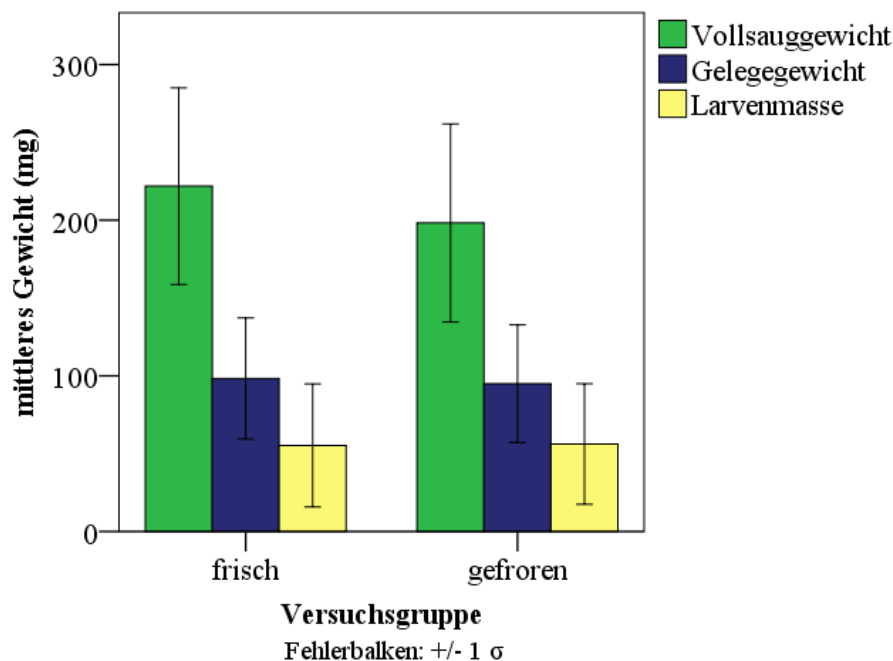


Abb. 24: Mittlere Vollsaug- und Gelege- und Larvengewichte unter Verwendung von frischem und zuvor tiefkühlgelagertem Futterblut in der *In-vitro*-Fütterung von *D. reticulatus*-Adulten

Ein deutlicher Unterschied war jedoch in der Häufigkeit des Schimmelbefalls an den Zeckenkammern und Membranunterseiten feststellbar. So waren die Kammern, bei denen die Fütterung mit tiefkühlgelagertem Blut erfolgte, mit 71 % wesentlich häufiger betroffen, im Vergleich zu 6 % bei frischem Blut; der Unterschied ist hoch signifikant ($p < 0,001$). Das Schimmelwachstum führte teilweise dazu, dass die Membranen perforierten und die entsprechenden Zeckenkammern aus dem Versuch genommen werden mussten oder dass sich die fixierten Weibchen nicht weiter vollsaugten.

In dieser Versuchsreihe wurden außerdem die anfänglich verwendeten Plexiglaskammern in 6-Well-Platten bald durch Glaskammern in Bechergläsern ersetzt. Mit dem zweiten System war ein wesentlich hygienischeres Arbeiten möglich, da alle Komponenten autoklaviert werden konnten. So wurde bei diesem System bei weniger Kammern und in der Regel erst später im Versuchsverlauf Schimmelwachstum beobachtet.

Versuche zum Vergleich verschiedener Fütterungssysteme

Die Verwendung eines Fütterungssystems mit Tierhäuten (FSB; Versuche Dr-5A, -6A, -7A und -9A), mit dem Bonnet et al. (2007) gute Ergebnisse bei der Fütterung von *I. ricinus* erzielt hatten, wurde als Alternative zu den Systemen mit Silikonmembranen untersucht. Um die zweimalige Wartung dieser Fütterungssysteme pro Tag zu verringern auf eine maximal tägliche Wartung, wurden zudem teilautomatisierte Systeme entwickelt: Für erste Versuche wurde eine Durchflusskammer aus Polystyrol für 2 Zeckenkammern (DFS PS; Versuche Dr-6A, -7A, -8A, -9A) entworfen. Diese wurde später ersetzt durch eine Durchflusskammer aus autoklavierbarem Glas für die gleichzeitige Verwendung von sechs Zeckenkammern (DFS Glas; Versuche Dr-10A, -11A).

Die vier verwendeten Fütterungssysteme (siehe auch 3.8.1, Tab. 7) wurden prinzipiell alle, jedoch unterschiedlich erfolgreich, durch die Zecken angenommen. Die Ergebnisse sind in Tab. 14, Abb. 25, 26 und 27 dargestellt. Während bei der Eiablagereate, der Rate an larvenproduzierenden Weibchen und dem Eikonversionsfaktor (EKF) keine wesentlichen Unterschiede beobachtet wurden, lieferten die Fixierungs- und Vollsaugrate, das Vollsaug-, Gelege- und Larvengewicht und die Larvenschlupfrate je Gelege signifikant verschiedene Ergebnisse. Die Fixierungsrate der Weibchen fiel beim Glas-Durchflusssystem (DFS Glas) mit 58,3 % am höchsten und beim Fütterungssystem mit Tierhäuten (FSB) mit 23,8 % am niedrigsten aus. Auch saugten sich im FSB signifikant weniger Weibchen voll (6,7 %) als in den anderen Fütterungssystemen (25,9–28,6 %) (Tab. 14, Abb. 25). Beim Vollsauggewicht wurden im DFS Glas und im FSB mit 269,6 mg ($\sigma = 105,1$ mg) und 291,1 mg ($\sigma = 102,1$ mg) die höchsten Werte erreicht, während die Ergebnisse im Fütterungssystem mit Kammern aus Glas (K+G Glas) und im Durchflusssystem aus Polystyrol (DFS PS) bei 211,8 mg ($\sigma = 81,8$ mg) und 218,9 mg ($\sigma = 100,3$ mg) lagen. Die mittleren Gelegegewichte beliefen sich für K+G Glas, DFS PS, DFS Glas und FSB auf 90,2 mg ($\sigma = 41,1$ mg), 96,9 mg ($\sigma = 46,8$ mg), 123,2 mg ($\sigma = 71,4$ mg) und 106,9 mg ($\sigma = 41,2$ mg) und die mittlere Larvenmasse auf 46,1 mg ($\sigma = 43,6$ mg), 71,9 mg ($\sigma = 38,4$ mg), 124,6 mg ($\sigma = 72,9$ mg) und 64,4 mg ($\sigma = 56,0$ mg) (Abb. 26). Alle Gewichte des DFS Glas waren signifikant höher als die des K+G

Glas (Vollsaug- und Gelegegewicht: $p < 0,05$ nach Bonferroni; Larvenmasse: $p < 0,001$ nach Kruskal-Wallis). Diese Tendenz zeichnete sich auch in der mittleren Larvenschlupfrate je Gelege ab: Die Werte des DFS Glas waren mit 92,5 % signifikant höher ($p < 0,001$; Kruskal-Wallis) als die des K+G Glas (50,0 %) (Abb. 27).

Vom Zeitpunkt des Vollsaugens bis zum Beginn der Eiablage dauerte es in den Systemen K+G Glas, DFS PS, DFS Glas und FSB 32 d ($\sigma = 28,4$ d), 34 d ($\sigma = 29,4$ d), 17 d ($\sigma = 31,7$ d) und 45 d ($\sigma = 28,0$ d) und vom Vollsaugen bis zum Beginn des Larvenschlupfes 69 d ($\sigma = 31,1$ d), 61 d ($\sigma = 26,8$ d), 29 d ($\sigma = 19,7$ d) und 77 d ($\sigma = 32,9$ d).

Tab. 14: Ergebnisse der *In-vitro*-Fütterung von *D. reticulatus*-Adulten in vier verschiedenen Fütterungssystemen; innerhalb der Fixierungs- und Vollsaugrate (exakter Test nach Fisher) und der mittleren Larvenschlupfrate je Gelege (Kruskal-Wallis-Test) sind die Ergebnisse der vier Gruppen signifikant verschieden zueinander ($p < 0,001$); gleiche Buchstaben stehen für signifikante Unterschiede zwischen zwei Fütterungssystemen (bei b: $p < 0,05$; ansonsten $p < 0,001$)

Versuchs- gruppe	Anzahl einge- setzter ♀	Fixierte ♀ (%)	Vollge- saugte ♀ (%)	♀ mit Eiablage (%) ^o	Larven- produzieren- de ♀ (%) ^o	EKF	Mittlere Larven- schlupfrate je Gelege
K+G Glas	301	144 (47,8 %) ^a	78 (25,9 %) ^d	71 (91,0 %) ^o	51 (65,4 %) ^o	40,7 %	50,0 % ^g
DFS PS	56	22 (39,3 %) ^b	16 (28,6 %) ^e	14 (87,5 %) ^o	11 (68,8 %) ^o	40,8 %	68,2 %
DFS Glas	84	49 (58,3 %) ^{bc}	23 (27,4 %) ^f	21 (91,3 %) ^o	20 (87,0 %) ^o	42,7 %	92,5 % ^g
FSB	160	19* (23,8 %) ^{ac}	8 [^] (6,7 %) ^{def}	8 (100,0 %) ^o	8 (100,0 %) ^o	37,8 %	68,8 %

* von 80 ♀ (da bei 2 Versuchen keine Ermittlung der Fixierungsrate)

[^] von 120 ♀ (da 1 Versuch vorzeitig abgebrochen wurde)

^o von vollgesaugten ♀

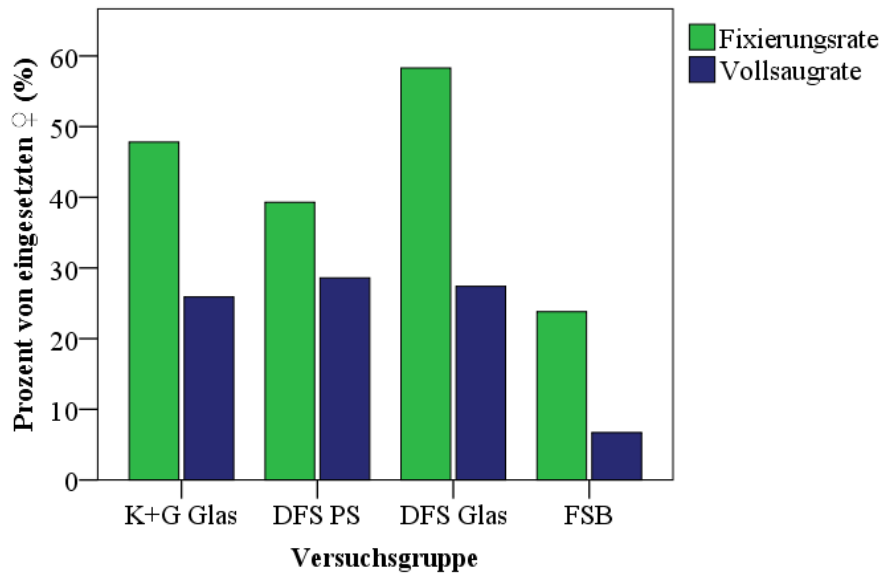
DFS Glas - Durchfluss-Fütterungssystem aus Glas, mit Silikonmembranen

DFS PS - Durchfluss-Fütterungssystem aus Polystyrol, mit Silikonmembranen

EKF - Eikonversionsfaktor

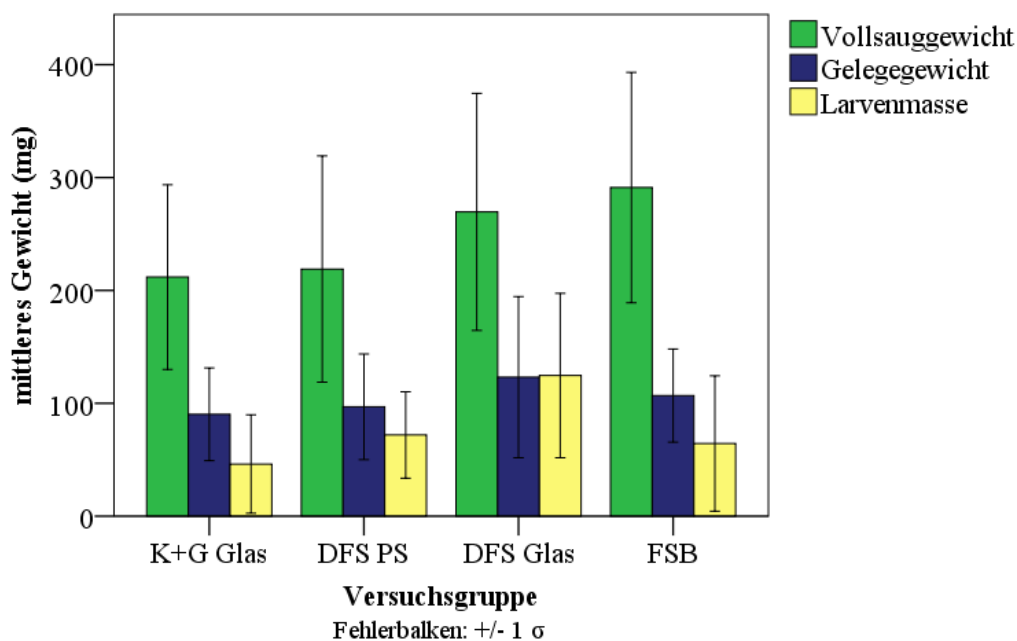
FSB - Fütterungssystem mit Tierhäuten

K+G Glas - Fütterungssystem aus Glas, mit Silikonmembranen



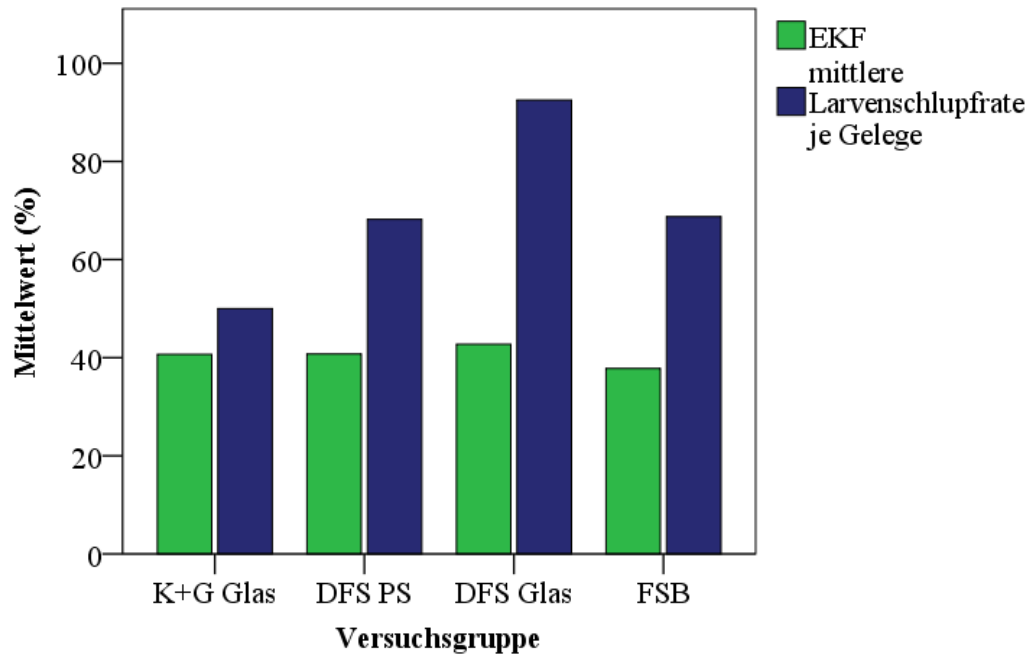
DFS Glas - Durchfluss-Fütterungssystem aus Glas, mit Silikonmembranen
 DFS PS - Durchfluss-Fütterungssystem aus Polystyrol, mit Silikonmembranen
 FSB - Fütterungssystem mit Tierhäuten
 K+G Glas - Fütterungssystem aus Glas, mit Silikonmembranen

Abb. 25: Fixierungs- und Vollsaugraten von *D. reticulatus*-Weibchen bei den vier getesteten *In-vitro*-Fütterungssystemen; zwischen den vier Gruppen gibt es signifikante Unterschiede ($p < 0,001$; exakter Test nach Fisher; siehe Tab. 14)



DFS Glas - Durchfluss-Fütterungssystem aus Glas, mit Silikonmembranen
 DFS PS - Durchfluss-Fütterungssystem aus Polystyrol, mit Silikonmembranen
 FSB - Fütterungssystem mit Tierhäuten
 K+G Glas - Fütterungssystem aus Glas, mit Silikonmembranen

Abb. 26: Mittlere Vollsaug-, Gelege- und Larvengewichte der vier *In-vitro*-Fütterungssysteme für *D. reticulatus*; die Unterschiede zwischen K+G Glas und DFS Glas sind jeweils signifikant (Vollsaug- und Gelegegewicht: $p < 0,05$ nach Bonferroni; Larvenmasse: $p < 0,001$ nach Kruskal-Wallis)



DFS Glas - Durchfluss-Fütterungssystem aus Glas, mit Silikonmembranen
 DFS PS - Durchfluss-Fütterungssystem aus Polystyrol, mit Silikonmembranen
 EKF - Eikonversionsfaktor
 FSB - Fütterungssystem mit Tierhäuten
 K+G Glas - Fütterungssystem aus Glas, mit Silikonmembranen

Abb. 27: Eikonversionsfaktor (EKF) und mittlere Larvenschlupfrate je Gelege der vier *In-vitro*-Fütterungssysteme für *D. reticulatus*; die Larvenschlupfraten von K+G Glas und DFS Glas sind signifikant verschieden ($p < 0,001$; Kruskal-Wallis-Test)

Während der Versuchsdurchführungen wurden bei den einzelnen Fütterungssystemen außerdem folgende Beobachtungen gemacht:

Beim DFS PS (siehe 3.3.4) wurde sehr schnell offensichtlich, dass aus hygienischen Gründen ein täglicher Austausch der Durchflusskammer nötig war. Wurde dieses Protokoll jedoch eingehalten, gab es keine nennenswerten Komplikationen mit bakteriellen Kontaminationen des Futterblutes; nach 24 Stunden war lediglich ein schmaler Biofilm im Inneren der Durchflusskammer auf Höhe des Blutspiegels sichtbar. Darüber hinaus zeigte sich, dass die Einstellung der Blutmenge über die Rollklemme am Infusionsschlauch nicht exakt möglich war. Das Blut floss daher teilweise langsamer oder schneller durch die Kammer als berechnet.

Das DFS Glas (siehe 3.3.5) erwies sich als hygienischer als das DFS PS, aber auch hier waren ein täglicher Wechsel der Durchflusskammer nötig und eine geringe Biofilmbildung auf Höhe des Blutspiegels vorhanden. Durch die Pumpe war in diesem System eine exakte und gleichmäßige Blutzufuhr gewährleistet. Der passive Abfluss erfolgte im DFS Glas wegen der größeren Fläche und somit größeren Oberflächenspannung jedoch seltener (häufig nur zweimal täglich) als im DFS PS.

Ebenso wie in den Systemen K+G Plexi und K+G Glas kam es in den beiden Durchflusssystemen zu einer Sedimentation der zellulären Blutbestandteile.

Beim FSB (siehe 3.4) fiel neben den sehr niedrigen Fixierungs- und Vollsaugraten eine starke Kondenswasserbildung in den Zeckenkammern auf, die dazu führte, dass die Zecken an den Glaswänden festklebten. Besonders in der zweiten Hälfte der Versuche mussten die Kammern mindestens alle 1–2 d ausgewischt werden. Bei der Mehrheit der Versuche wurden die Zeckenkammern daher anstelle des Glassiebes mit einem Netz luftdurchlässig verschlossen. Dies brachte allerdings nur eine leichte Besserung. Der Reis, der aufgrund des Kondenswassers in eine Zeckenkammer gestreut wurde, konnte schon nach wenigen Versuchstagen keine weitere Flüssigkeit aufnehmen und zeigte kurz darauf starkes Schimmelwachstum. Die Windelstücke, die dem gleichen Zweck dienen sollten, funktionierten wesentlich besser. Insbesondere zu Beginn eines Versuches konnte der Kondenswasserniederschlag deutlich reduziert werden, aber auch hier war jeweils nach einigen Tagen ein Auswechseln der Windelstücke nötig. Der Versuch mit Silikonmembranen anstelle der Kaninchenhaut war nicht erfolgreich. Nur selten hielten sich Zecken auf der Membran auf, und keine fixierte sich. Außerdem war die Kondenswasserbildung hier noch stärker. Im Versuch Dr-7A (siehe 3.8.1, Tab. 7) wurde die Zeckenkammer, um einen Niederschlag von Kondenswasser gänzlich zu verhindern, durch ein nahe am Kaninchenfell befestigtes Netz ersetzt. Hier konnte die Fixierung der Zecken während des Versuches nicht beurteilt werden, jedoch wurde am Versuchsende nur ein gesogenes Weibchen (93 mg) gefunden, weshalb dieser Versuchsaufbau für die folgenden Versuche verworfen wurde. An den Tierhäuten wurden trotz der vorangegangenen Waschschriffe nach einigen Tagen stets dunkle Verfärbungen wahrgenommen, zum Teil wurden diese durch einen strengen Geruch und in einem Fall auch durch eine Zersetzung des Gewebes begleitet. Zecken, die sich unter stark verfärbten Hautarealen fixiert hatten, zeigten häufig ein Sistieren der Blutaufnahme und saugten sich nicht voll.

Versuche zur Verfütterung von Blut ohne Antibiotikazugabe und mit Gamma- Bestrahlung

Es wurde die Verfütterung von Blut ohne Antibiotikazugabe und von Blut, das mit 1 kGy gammabestrahlt wurde, getestet, um einen potenziellen negativen Einfluss des Gentamycins im Futterblut auf die Zecken zu umgehen (siehe 3.8.1, Tab. 8; Versuche Dr-7A, -8A, -9A). Die Keimmenge im Futterblut wurde sowohl unmittelbar nach der Bestrahlung als auch nach der Verfütterung des Blutes mikrobiologisch überwacht.

Die mikrobiologische Überprüfung des Bestrahlungserfolges ergab, dass unbestrahltes Schlachthofblut der drei durchgeführten Versuche eine mittlere Keimzahl von 96,1 CFU/ml ($\sigma = 127,0$ CFU/ml) aufwies, während Schlachthofblut nach der Bestrahlung mit 1 kGy durchschnittlich nur 1,7 CFU/ml ($\sigma = 3,8$ CFU/ml) hatte.

Die Keimbelastung im verfütterten Blut stieg während des Versuches in jeder der drei Gruppen (Futterblut mit Antibiotikum, Futterblut ohne Antibiotikum, Futterblut ohne Antibiotikum mit Gamma-Bestrahlung) kontinuierlich an (Abb. 28). An Tag 7 bzw. 8 kam es noch einmal zu einem leichten Absinken der Keimzahl, da das kühl gelagerte Schlachthofblut nur für etwa eine Woche verwendet wurde und ab Tag 7 oder 8 frisches Blut eingesetzt

wurde. Auffällig ist, dass das Keimwachstum in der Gruppe mit dem bestrahlten Blut am stärksten war. Außerdem fiel auf, dass das Blut dieser Versuchsgruppe nach der Verfütterung sehr dunkel gefärbt war und streng roch. Die Gruppe ohne Antibiotikazugabe wies ein geringeres Keimwachstum auf; auch fanden Dunkelfärbung und Geruchsveränderung des Blutes später und in geringerem Umfang statt. Das geringste Keimwachstum trat in der Gruppe mit Antibiotikazugabe auf (Abb. 28).

Die im Futterblut am häufigsten beobachteten Keime waren Bakterien, die ubiquitär oder als Kommensalen auf der Haut von Menschen und Tieren vorkommen. Am häufigsten traten *Staphylococcus saprophyticus* und *Burkholderia sp.* auf, gefolgt von *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus xylosus* und *Stenotrophomonas maltophila*.

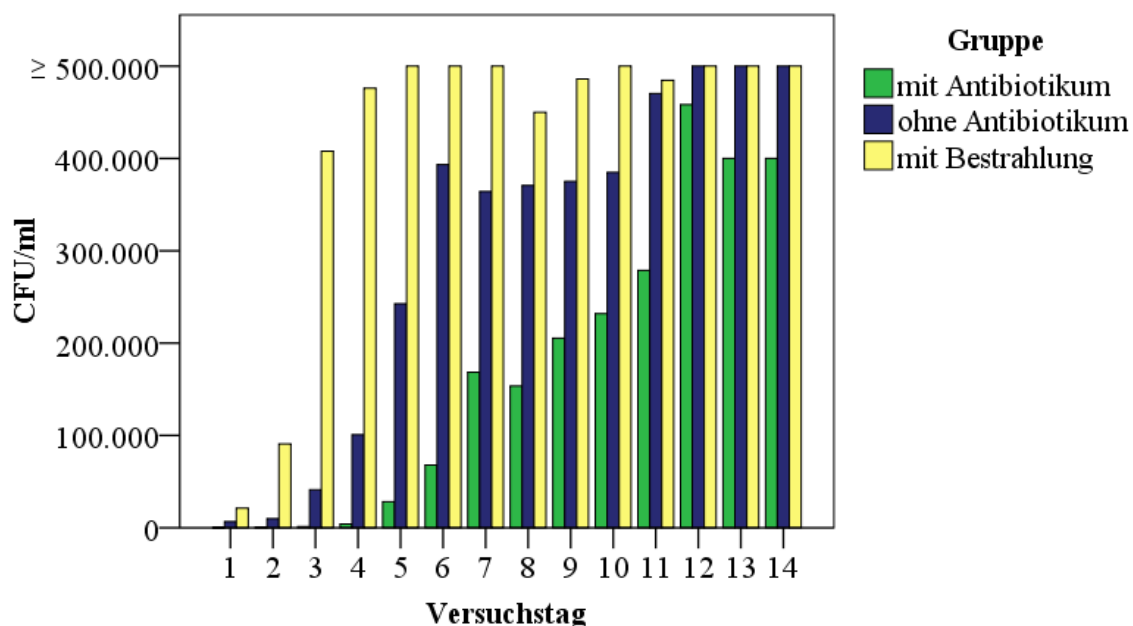


Abb. 28: Durchschnittliche Entwicklung der Keimzahl im verfütterten Blut während der drei Versuche in den drei Versuchsgruppen Futterblut mit Antibiotikum, Futterblut ohne Antibiotikum und Futterblut ohne Antibiotikum mit Gamma-Bestrahlung

Trotz der geruchlichen und optischen Veränderungen wurde das Blut in allen drei Gruppen durch die Zecken angenommen. Es waren auch keine nennenswerten Unterschiede in den Fixierungs- und Vollsaugraten feststellbar (Tab. 15). Allerdings legten in der Gruppe mit Antibiotika-Zugabe signifikant mehr Weibchen Eier ab (93,0 %) und produzierten Larven (79,1 %; siehe Tab. 15, Abb. 29). Auch der EKF war in dieser Gruppe signifikant höher als in den anderen beiden Gruppen und in der Gruppe ohne Antibiotika-Zugabe signifikant höher als in der Gruppe mit Bestrahlung (Tab. 15, Abb. 31).

In der Gruppe mit Antibiotikum, ohne Antibiotikum und mit Bestrahlung wurden Vollsauggewichte der Weibchen von 215,6 mg ($\sigma = 78,3$ mg), 222,9 mg ($\sigma = 78,1$ mg) und 188,1 mg ($\sigma = 60,0$ mg) und Gelegegewichte von 94,2 mg ($\sigma = 41,8$ mg), 74,4 mg ($\sigma =$

53,3 mg) und 40,5 mg ($\sigma = 29,3$ mg) erzielt. Die Larvenmassen betragen 55,7 mg ($\sigma = 45,1$ mg), 53,0 mg ($\sigma = 48,6$ mg) und 30,1 mg ($\sigma = 30,6$ mg). In der Gruppe mit der Gamma-Bestrahlung wurden also stets die niedrigsten Gewichte erzielt. Jedoch erwies sich nur das Gelegegewicht als signifikant verschieden ($p < 0,001$; Welch); es war in der Gruppe mit Gamma-Bestrahlung signifikant niedriger als in der Gruppe mit Antibiotikum ($p < 0,001$; Bonferroni) und ohne Antibiotikum ($p < 0,01$; Bonferroni) (Abb. 30).

Die durchschnittlichen Dauern vom Vollsaugen bis zum Eiablagebeginn und bis zum Larvenschlupfbeginn unterschieden sich mit 26 d ($\sigma = 25,1$ d), 30 d ($\sigma = 30,8$ d), 25 d ($\sigma = 23,5$ d) und 61 d ($\sigma = 25,7$ d), 54 d ($\sigma = 27,8$ d) und 53 d ($\sigma = 27,5$ d) für die Gruppen Futterblut mit Antibiotikum, ohne Antibiotikum und mit Bestrahlung nicht wesentlich voneinander.

Tab. 15: Ergebnisse der *In-vitro*-Fütterungsversuche mit *D. reticulatus*-Adulten zur Verfütterung von Blut ohne Antibiotikazugabe und mit Gamma-Bestrahlung; innerhalb der Eiablagerate und der Rate an larvenproduzierenden Weibchen (exakter Test nach Fisher) und des Eikonversionsfaktors (Welch-Test) sind die Ergebnisse der drei Gruppen signifikant verschieden zueinander ($p < 0,01$, $p < 0,05$ und $p < 0,001$); gleiche Buchstaben stehen für signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen (bei a, c, d, g: $p < 0,05$; bei b, e: $p < 0,01$; bei f: $p < 0,001$)

Versuchs- gruppe	Anzahl einge- setzter ♀	Fixierte ♀ (%)	Vollge- saugte ♀ (%)	♀ mit Eiablage (%)*	Larven- produzieren- de ♀ (%)*	EKF	Mittlere Larven- schlupfrate je Gelege
mit Anti- biotikum	147	72 (49,0 %)	43 (29,3 %)	40 (93,0 %) ^{ab}	34 (79,1 %) ^{cd}	42,2 % ^{ef}	58,8 %
ohne Anti- biotikum	147	77 (52,4 %)	47 (32,0 %)	35 (74,5 %) ^a	25 (53,2 %) ^c	30,4 % ^{eg}	60,0 %
mit Be- strahlung	147	75 (51,0 %)	50 (34,0 %)	32 (64,0 %) ^b	28 (56,0 %) ^d	21,6 % ^{fg}	61,6 %

* von vollgesaugten ♀
EKF - Eikonversionsfaktor

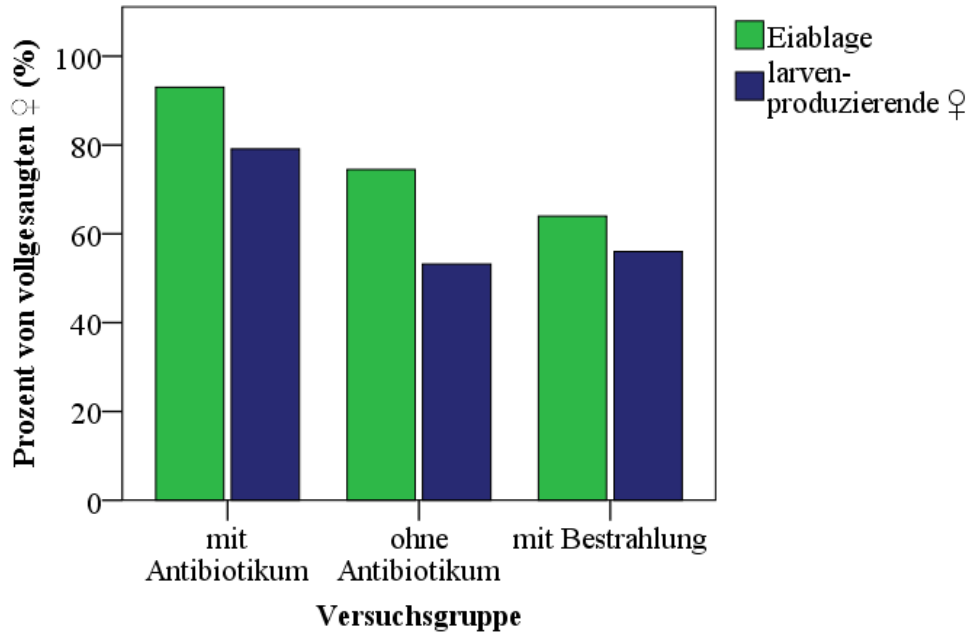


Abb. 29: Eiablage- und Rate an larvenproduzierenden Weibchen bei *In-vitro*-Fütterungsversuchen mit *D. reticulatus*-Adulten zur Verfütterung von Blut ohne Antibiotikazugabe und mit Gamma-Bestrahlung; die Gruppe mit Antibiotika-Zugabe hat signifikant höhere Raten (siehe auch Tab. 15)

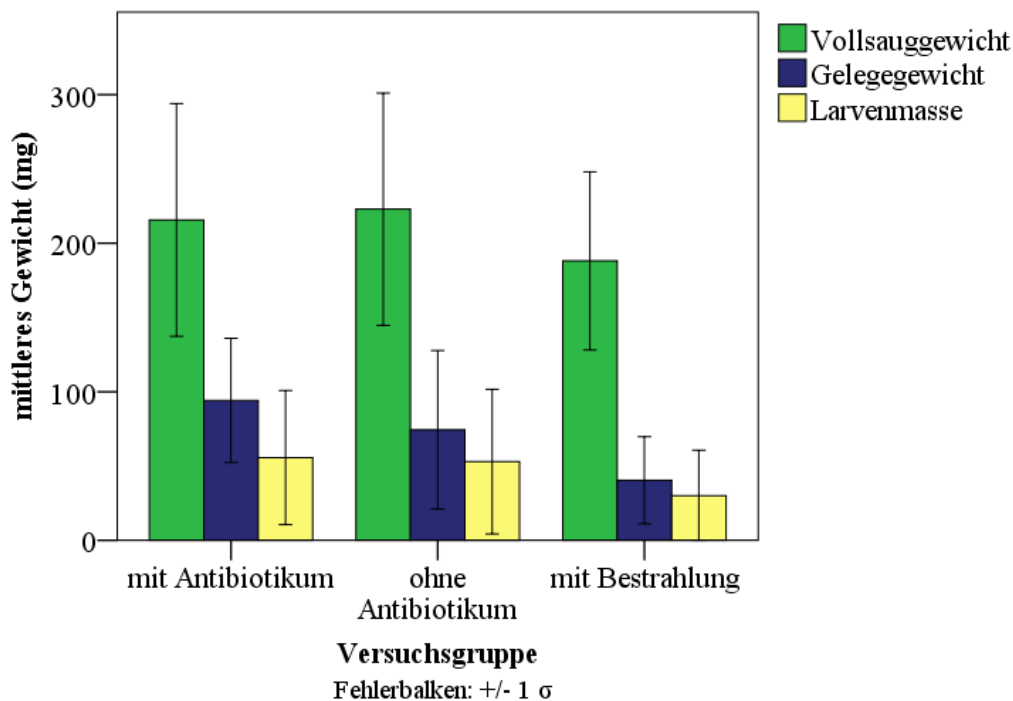


Abb. 30: Mittlere Vollsaug-, Gelege- und Larvengewichte der *In-vitro*-Fütterungsversuche mit *D. reticulatus*-Adulten zur Verfütterung von Blut ohne Antibiotikazugabe und mit Gamma-Bestrahlung; das Gelegegewicht der Gruppe mit Bestrahlung ist signifikant niedriger als in den beiden anderen Gruppen ($p < 0,001$ nach Welch)

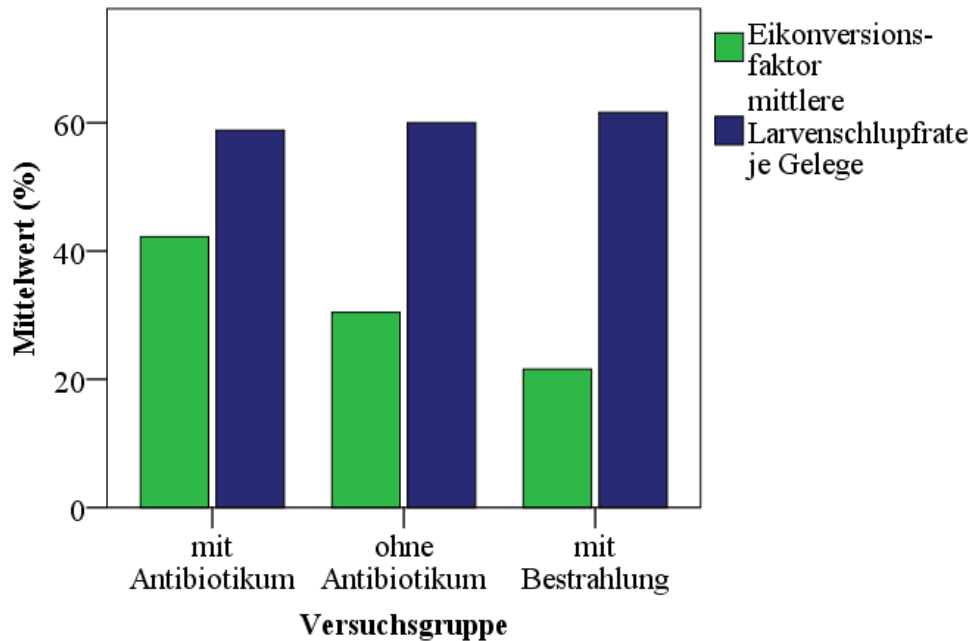


Abb. 31: Eikonversionsfaktor und mittlere Larvenschlupfrate je Gelege der *In-vitro*-Fütterungsversuche mit *D. reticulatus*-Adulten zur Verfütterung von Blut ohne Antibiotikazugabe und mit Gamma-Bestrahlung; die Unterschiede im EKF sind signifikant ($p < 0,001$; Welch-Test; siehe auch Tab. 15)

4.4.2 Versuche mit *D. reticulatus*-Nymphen

Die *In-vitro*-Fütterung von Nymphen von *D. reticulatus* (siehe 3.8.2, Tab. 9) stellte sich als schwieriger als die von *I. ricinus*-Nymphen heraus. Nur ein Bruchteil der Nymphen saugte sich voll und nur wenige fixierten sich überhaupt in beiden getesteten Systemen. Dabei wurden im System mit Tierhäuten (FSB; Versuche Dr-2N, -3N und -4N) signifikant höhere Raten erzielt (Tab. 16) als im Glassystem mit Silikonmembranen (K+G Glas; Versuche Dr-1N, -3N und -4N), obwohl diverse Modifikationen betreffend Membrandicke und -konsistenz und Deckelhöhe getestet wurden. Aus den insgesamt 1720 in den Versuchen eingesetzten Nymphen gingen lediglich 2 Adulte hervor.

Im FSB traten dieselben Probleme wie bei der Fütterung der Adulten auf. Auch hier kam es zu einem starken Niederschlag von Kondenswasser an den Glaswänden und zu optischen und geruchlichen Veränderungen an den Mäusehäuten. Der Versuch des Ersatzes der Haut durch eine Silikonmembran war auch bei den Nymphen nicht erfolgreich.

Bei Fütterungen am Kaninchen konnten keine Fixierungs- und Vollsaugraten ermittelt werden. Die Häutungsrate von vollgesaugten Nymphen betrug hier etwa 93 %. Eine *In-vivo*-Fütterung am Kaninchen dauerte im Durchschnitt 6,5 d und ein *In-vitro*-Versuch 7 d.

Tab. 16: Ergebnisse der *In-vitro*-Fütterung von *D. reticulatus*-Nymphen im Fütterungssystem mit Silikonmembranen (K+G Glas) und mit Tierhäuten (FSB); gleiche Buchstaben stehen für signifikante Unterschiede ($p < 0,0001$; exakter Test nach Fisher)

Fütterungs- system	Anzahl eingesetzter Nymphen	fixierte Nymphen	vollgesaugte Nymphen	Häutung zu Adulten	Häutungsrate von Vollgesaugten
K+G Glas	920	9 (0,98 %) ^a	0 (0,00 %) ^b	0 (0,00 %)	0,00 %
FSB	800	57 (7,13 %) ^a	15 (1,88 %) ^b	2 (0,25 %)	13,33 %

Im System K+G Glas fiel auf, dass stets schon nach 2–3 Versuchstagen ein Großteil der Nymphen tot war.

4.4.3 Versuche mit *D. reticulatus*-Larven

Die *In-vitro*-Fütterung von *D. reticulatus*-Larven ergab, trotz zahlreicher getesteter Modifikationen im Versuchsaufbau (siehe 3.8.3 und Tab. 10, Versuche Dr-1L bis -9L), ein ähnliches Bild wie bei den Nymphen. Auch hier wurden sehr niedrige Fixierungs-, Vollsaug- und Häutungsraten sowohl auf Silikonmembranen als auch auf Tierhäuten erzielt, wobei das System mit Tierhäuten (FSB) signifikant besser abschnitt ($p < 0,0001$; Chi-Quadrat-Test) (Tab. 17). Insgesamt häuteten sich 22 der 31320 eingesetzten Larven zu Nymphen. Dazu benötigten sie durchschnittlich 9 d ($\sigma = 6,6$ d); der Vollsaugzeitpunkt lag bei allen etwa Mitte Februar.

Tab. 17: Ergebnisse der *In-vitro*-Fütterung von *D. reticulatus*-Larven im Fütterungssystem mit Silikonmembranen (K+G Glas) und mit Tierhäuten (FSB); gleiche Buchstaben stehen für signifikante Unterschiede ($p < 0,0001$; Chi-Quadrat-Test)

Fütterungs- system	Anzahl eingesetzter Larven	fixierte Larven	vollgesaugte Larven	Häutung zu Nymphen	Häutungsrate von Vollgesaugten
K+G Glas	27500	59 (0,21 %) ^a	20 (0,07 %) ^b	5 (0,02 %) ^c	25,00 %
FSB	3820	165 (4,32 %) ^a	57 (1,49 %) ^b	17 (0,45 %) ^c	29,82 %

Auch bei den Larven starben viele im System K+G Glas bereits nach 1–3 Tagen. Außerdem hielt sich während der Versuche die Mehrheit der Larven am Deckel auf. In den Versuchen Dr-8L und -9L (siehe 3.8.3, Tab. 10) wurde der Deckel bis kurz oberhalb der Membran herunter geschoben, was dazu führte, dass die Larven sich zwangsläufig in Membrannähe

befanden. Aus diesen beiden Versuchen stammen ein Großteil der in Tab. 17 aufgeführten fixierten (23 von 59) und alle der vollgesogenen und gehäuteten Larven.

Im FSB traten wieder die bereits bei Adulten und Nymphen erläuterten Komplikationen auf.

Bei *In-vivo*-Versuchen an Mäusen wurde eine mittlere Häutungsrate von 90–95 % erzielt, und eine Fütterung dauerte durchschnittlich 4 d, während die *In-vitro*-Versuche im Durchschnitt über 6 d liefen.

4.5 Tageszeiten des Vollsaugens und Ablösens von *I. ricinus* und *D. reticulatus*

Im Zuge des Blutwechsels in den *In-vitro*-Systemen wurde zweimal täglich erfasst, wie viele Zecken sich vollgesaugt und selbstständig von der Membran abgelöst haben (siehe 3.3.7). Beim Blutwechsel morgens wurden also alle Zecken erfasst, die sich über Nacht, und abends alle Zecken, die sich während des Tages abgelöst hatten. Abb. 32 zeigt einen deutlichen Unterschied im Ablöseverhalten zwischen adulten *D. reticulatus* und adulten und juvenilen *I. ricinus* – erstere lösten sich bevorzugt nachts und letztere vor allem tagsüber ab. Die Ablösezeitpunkte von beiden untersuchten Stadien von *I. ricinus* sind hoch signifikant verschieden zu denen von *D. reticulatus* ($p < 0,0001$; exakter Test nach Fisher, zweiseitig).

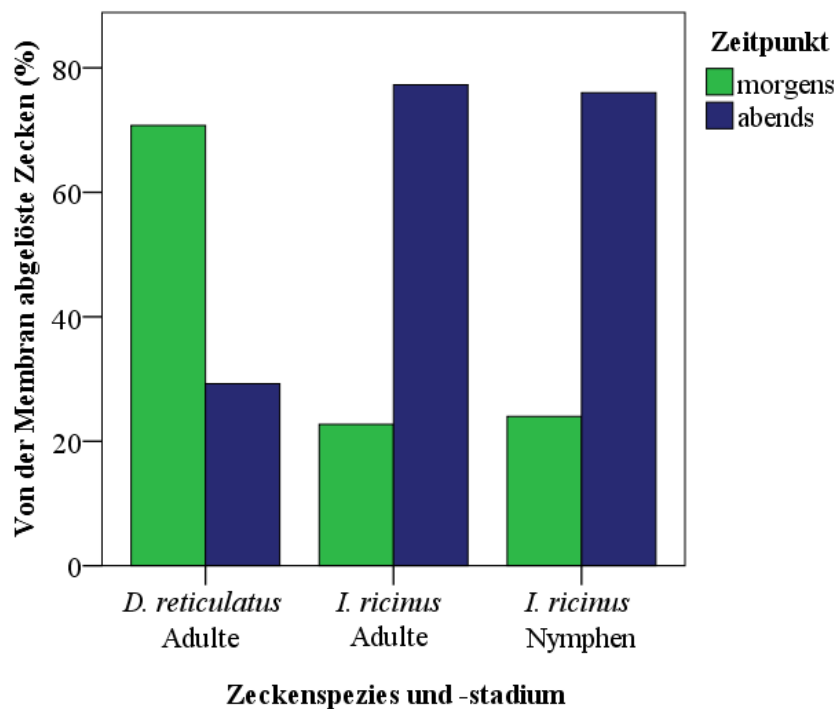


Abb. 32: Zeitpunkt des Ablösens vollgesaugter Zecken von der Silikonmembran in der *In-vitro*-Fütterung; $N_{D. reticulatus}$ Adulte = 294; $N_{I. ricinus}$ Adulte = 22; $N_{I. ricinus}$ Nymphen = 25

4.6 Zusammenhang von Vollsauggewicht und Gelegegewicht von *D. reticulatus* *in vivo* und *in vitro*

In der *In-vivo*-Fütterung von *D. reticulatus* wurde ein linearer Zusammenhang zwischen dem Repletionsgewicht der vollgesaugten Weibchen und dem Gelegegewicht mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,91$ ($p < 0,0001$) festgestellt (Abb. 33). Der Zusammenhang wurde auch in der *In-vitro*-Fütterung (System K+G Glas) von *D. reticulatus* bestätigt (Abb. 34; $R^2 = 0,65$; $p < 0,0001$).

D. reticulatus - *in vivo*

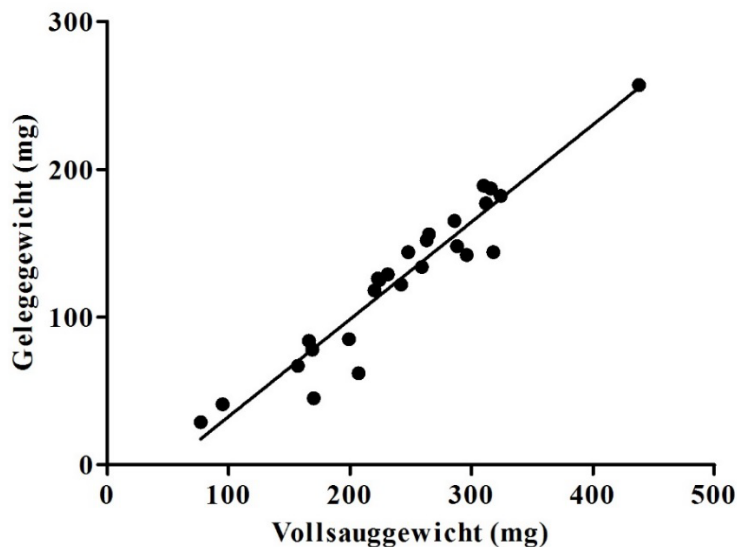


Abb. 33: Zusammenhang von Vollsauggewicht und Gelegegewicht in der *In-vivo*-Fütterung von *D. reticulatus*; $N = 26$; $R^2 = 0,91$; $p < 0,0001$

D. reticulatus - *in vitro*

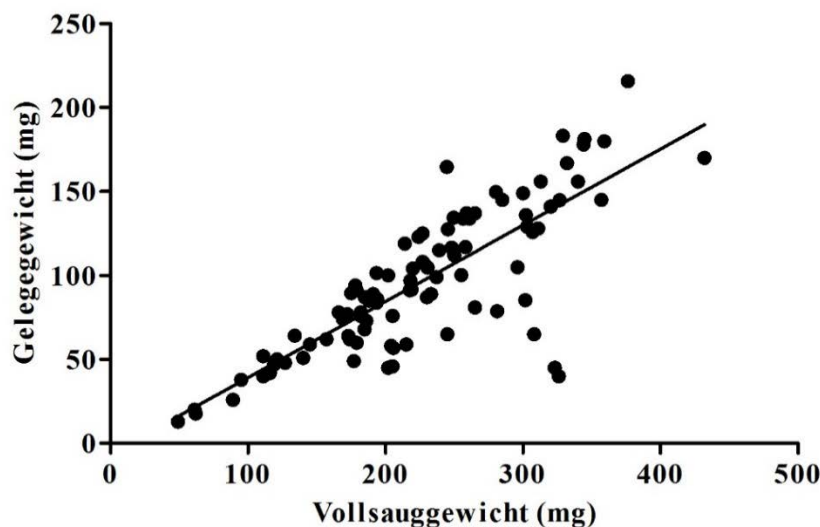


Abb. 34: Zusammenhang von Vollsauggewicht und Gelegegewicht in der *In-vitro*-Fütterung von *D. reticulatus* (K+G Glas); $N = 95$; $R^2 = 0,65$; $p < 0,0001$

4.7 Eigewichte von *D. reticulatus*

Um von den Gelegegewichten auf die Eizahlen der Gelege schließen zu können, wurde das durchschnittliche Eigewicht von *D. reticulatus* ermittelt. Das mittlere Gewicht eines Eies von *in vitro* gefütterten *D. reticulatus*-Weibchen betrug 45,3 µg.

5. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die *In-vitro*-Fütterung von *D. reticulatus* zu realisieren und zu optimieren. Dazu wurde als Ausgangspunkt eine erfolgreiche Fütterungsmethode für *I. ricinus* ausgewählt (Kröber et Guerin, 2007a) und zunächst für alle Stadien dieser Zeckenspezies in unserem Labor etabliert. Im Anschluss wurde die Fütterungstechnik auf *D. reticulatus*-Adulte angewandt, und es wurden Modifizierungen getestet, um bessere Fütterungsergebnisse zu erzielen und den Arbeitsaufwand zu reduzieren, was unerlässlich ist im Hinblick auf das Ziel, einen Großteil der Schildzecken-Fütterung am Versuchstier durch eine *In-vitro*-Fütterung zu ersetzen. Außerdem wurden Versuche durchgeführt, um die *In-vitro*-Fütterung so anzupassen, dass sie auch mit juvenilen *D. reticulatus* erfolgreich durchführbar ist.

5.1 Zecken

Da die adulten Zecken größtenteils aus der Vegetation geflaggt wurden, befanden sie sich alle auf Wirtssuche. Nach ihrer Lagerung wurden wiederum nur fitte und aktive Zecken für die Versuche verwendet. Das Ziel war es, möglichst viele Weibchen gleichzeitig zu füttern und dennoch nicht zu viele Zecken in einer Kammer zu haben, damit sie sich nicht beim Vollsaugen behindern konnten. Dementsprechend wurde in den Kammern nach Kröber und Guerin ein Verhältnis von 7 Weibchen zu 5 Männchen ausgewählt, auch angesichts der Tatsache, dass von der Fähigkeit zur mehrmaligen Kopulation der Männchen ausgegangen wird (Immler, 1973).

5.2 Silikonmembranen

Die Herstellung der Silikonmembranen in den gewünschten Dicken gelang mit etwas Übung ohne Schwierigkeiten; am Ende mussten nur noch wenige Membranen verworfen werden. Als alternative Herstellungsmethode wäre das Tauchen der Linsenpapiere in eine flüssigere Silikonmischung denkbar (Andrade et al., 2014), allerdings sind die so hergestellten Membranen mit durchschnittlich 195 µm für diverse Zeckenspezies und insbesondere für Juvenile zu dick. Es ist außerdem anzumerken, dass die Dickenmessung mittels Mikrometerschraube möglicherweise ungenaue Werte liefert, da kleine Falten, Bläschen oder

sonstige Unebenheiten in der Membran die Messwerte verzerren können und es ferner denkbar ist, dass die Membran beim Messen durch die Schraube komprimiert wird. Um dies zu umgehen, ließen sich kleine Membranproben als schmale Streifen aufrecht auf einen Objektträger legen und unter einem Mikroskop mit Messfunktion (z. B. Leica Application Suite) verschiedene Stellen ausmessen, um eine mittlere Dicke zu bestimmen.

5.3 Futterblut

Das heparinisierte Rinderblut, das in der Mehrheit der Versuche als Futterblut verwendet wurde, wurde sowohl von *I. ricinus* als auch von den *D. reticulatus*-Adulten gut angenommen. Bei dem hier eingehaltenen Blutwechsel-Intervall von 12 (maximal 14) Stunden blieb das Keimwachstum in einem tolerierbaren Bereich. Eine Verlängerung des Intervalls wurde nicht getestet, jedoch ist anzunehmen, dass bei einer längeren Warmhaltung des Blutes bei ca. 37°C ein verstärktes Keimwachstum auftreten würde.

Kuhnert (1995) fand den hier verwendeten bakteriziden Blutzusatz Gentamycin in einer Versuchsreihe zum Vergleich verschiedener Antibiotika in der *In-vitro*-Fütterung von Schildzecken anderen Antibiotika deutlich überlegen und empfiehlt die Konzentration von 5 µg/ml. Gegen Schimmelwachstum schlägt er vor, 100 I.E./ml Nystatin in das Futterblut zu geben. Da hier Schimmelbefall aber überwiegend nur bei der Verwendung der Zeckenkammern aus Plexiglas und bei der Verwendung von eingefrorenem Blut auftrat, wurde auf den Zusatz von Nystatin zum Blut verzichtet. Stattdessen wurden befallene Kammern beim Blutwechsel einzeln behandelt, indem sie für 10 Minuten in Nystatin-Lösung (10.000 I.E./ml in PBS) gestellt wurden.

Neben Glukose und ATP wäre reduziertes Glutathion als weiterer Blutzusatz mit phagostimulierender Wirkung denkbar (Galun et Kindler, 1965; Waladde et al., 1979; Kemp et al., 1982).

5.4 Fixierungsstimuli

Um Zecken im *In-vitro*-System mit künstlichen Membranen zu füttern und sie zum Fixieren und zur Blutaufnahme zu bewegen, sind Fixierungsstimuli nötig, die die von einem Wirtstier ausgehenden Stimuli nachahmen (Lees, 1948). In vorangegangenen künstlichen Fütterungen wurde beobachtet, dass sich die Zecken gerne in Ecken, wie den Kammerrändern, oder unter Tierhaaren oder leichten Gegenständen an der Membran fixieren (Kuhnert, 1995). Daher wurde als zusätzlicher mechanischer Stimulus ein Moskitonetz auf die Membran geklebt und

in einem Versuch außerdem ein Fliesenkreuz oder ein Metallgitter mit in die Kammer gegeben (Kröber et Guerin, 2007a).

Darüber hinaus wurden als olfaktorische Stimuli Wirtstierhaare, Tierhaarextrakt und konspezifische Zeckenfaeces in die Zeckenkammer gegeben. Diese Kombination aus Stimuli wurde bereits mehrmals erfolgreich in der *In-vitro*-Fütterung von Schildzecken verwendet (Waladde et al., 1991; Kuhnert, 1995; Kröber et Guerin, 2007a). Kuhnert (1995) und Waladde et al. (1991) berichten, dass sich die Zecken nur dann erfolgreich fixierten und vollsaugten, wenn Tierhaarextrakt anwesend war. Um dessen Wirkung zu verstärken, könnten verlängerte Einwirkzeiten des Lösungsmittels bei der Extrakt-Herstellung, z. B. über mehrere Tage, getestet (Mands et al., 2004) und höhere Konzentrationen an geruchstragenden Substanzen in den Kammern angewandt werden.

Lees (1948) stellte fest, dass Wirtstiergeruch ausschließlich dann attraktiv für *I. ricinus* war, wenn gleichzeitig ein thermischer Stimulus von 37°C vorhanden war. Auch bei anderen Schildzeckenspezies wurde die Wichtigkeit eines dem Wirtstier entsprechenden Temperaturreizes erkannt (Hindle et Merriman, 1912; Doube et Kemp, 1979; Kuhnert, 1995).

Kuhnert (1995) beobachtete außerdem einen positiven Effekt einer Schüttelung der Zeckenkammern auf das Vollsaugen von *A. hebraeum*-Adulten. Und mehrfach wurde von guten Fütterungsergebnissen unter einer Atmosphäre mit erhöhtem CO₂-Gehalt zwischen 3 und 10 % berichtet (Voigt et al., 1993; Habedank, 1995; Waladde et al., 1995).

5.5 Critical Weight

Für die Auswertung der Fütterungsversuche musste zunächst entschieden werden, welche gesogenen Weibchen mit eingehen und welche ausgeschlossen werden sollten. Denn ob ein Weibchen vollgesaugt war, war nicht immer eindeutig zu beurteilen, da sich teilweise einerseits sehr große, vollgesaugt erscheinende Weibchen nicht selbstständig von der Membran ablösen und sich andererseits gesogene Weibchen, die nicht vollgesaugt erschienen, selbstständig von der Membran ablösen und anschließend Eier ablegten. Graf (1978b) beobachtete Eiablage bei *I. ricinus* bereits ab einem Gewicht von 22,3 mg, Yao und Chen (1981) bei *Dermacentor silvarum* ab 15,3 mg und Darvishi et al. (2014) bei *Dermacentor marginatus* ab einem Gewicht von 21 mg und mit anschließendem Larvenschlupf ab 69 mg. Daher wurden sowohl Gewicht als auch manuelles Ablösen von der Membran als alleinige Kriterien als unzureichend erachtet und stattdessen das CW in Kombination mit dem nichtselbstständigen Ablösen als Entscheidungskriterium gewählt. Bisher wurde allerdings noch nicht abgeklärt, ob das CW bei *I. ricinus* anders zu bewerten ist, da bei dieser Spezies die Paarung auch schon vor der Blutaufnahme stattfinden kann.

Das ermittelte Gewicht ungesogener *I. ricinus*-Weibchen von durchschnittlich 1,84 mg ($\sigma = 0,23$ mg) deckt sich auch mit den Angaben von Bartosik und Buczek (2013), die ein Gewicht von 1,9 mg angeben.

5.6 Versuche zur *In-vitro*-Fütterung von *I. ricinus*

Mit *I. ricinus* gelang es, alle Stadien *in vitro* zu füttern. Mit der erfolgreichen Fütterung einer Generation an Adulten, der daraus resultierenden Larven, Nymphen und Adulten wurde ein Lebenszyklus vollständig per *In-vitro*-Fütterung über Silikonmembranen realisiert. Die entstandenen Adulten legten wiederum Eier ab, aus denen Larven schlüpften.

5.6.1 *I. ricinus*-Adulte

Die Fütterung von adulten *I. ricinus* im nach Kröber und Guerin (2007a) modifizierten System brachte gute Resultate: Die Silikonmembranen wurden bereitwillig durch die Weibchen angenommen und Fixierungs- und Vollsaugraten von durchschnittlich 74,8 % und 40,2 % erzielt. Kröber und Guerin (2007a; 2007b) berichten von mittleren Fixierungsraten von bis zu 85 % und Bonnet et al. (2007), bei der Fütterung über Gerbil- und Kaninchenhäute, von 90–100 % und von hohen Vollsaugraten von durchschnittlich 78 %. Das mittlere Repletionsgewicht der Weibchen liegt mit 209,2 mg ($\sigma = 86,6$ mg) hingegen deutlich höher als bei der *In-vitro*-Fütterung von Bonnet et al. (2007) bzw. Kröber und Guerin (2007a) mit 161 mg bzw. 160 mg. Im Vergleich dazu werden bei der Fütterung am Tier mittlere Vollsauggewichte von 115 mg (Bonnet et al., 2007) über 263 mg ($\sigma = 71$ mg) (Graf, 1978b) bis 275–355 mg (Bartosik et Buczek, 2012) angegeben, was darauf hindeutet, dass bei der Blutaufnahme am Tier günstigere Bedingungen für die Zecke vorliegen als im artifiziellen System. Die Beobachtung, dass sich 29 der insgesamt 51 vollgesaugten *I. ricinus*-Weibchen nicht selbstständig von der Membran ablösten, kann auf Kotverklebungen zurückzuführen sein.

Von den vollgesaugten Weibchen legten 62,7 % Eier ab – etwas weniger als bei Bonnet et al. (2007) mit 72 % und bei Kröber und Guerin (2007a) mit 75 %. Auch der Larvenschlupf ist mit 23,5 % geringer als bei Bonnet et al. (2007) mit 77 %. Das mittlere Gelegegewicht ist mit 34,6 mg verhältnismäßig gering. Nimmt man die Angaben für Eigewichte von *Ixodes loricatus*, nämlich 80 $\mu\text{g}/\text{Ei}$ (Labruna et al., 1997), ergeben sich im Mittel circa 433 Eier je Gelege von *I. ricinus*. Diese Eizahl je Gelege liegt an der Untergrenze der Angaben aus Fütterungen am Tier, die sich auf 500–3200 Eier belaufen (Nuttall, 1913; Metianu, 1951). Auffallend war auch, dass trotz der konstanten Luftfeuchtigkeit im Exsikkator immer wieder Teile von Gelegen vertrockneten oder verschimmelten.

In Versuch Ir-4A (3.7.1, Tab. 4) wurde Blut verwendet, das länger als üblich, nämlich bis zu 15 d, bei +4°C gelagert wurde. In diesem Versuch saugten sich weniger Weibchen voll, und die vollgesaugten Weibchen wurden schwarz und starben, ohne Eier abzulegen. Es ist anzunehmen, dass die Qualität des Blutes zum Ende des Versuches nicht mehr ausreichend war und dass in der Verfütterung ein stärkeres Keimwachstum auftrat, das die saugenden Weibchen schädigte.

Im Gegensatz dazu wurden in Versuch Ir-5A (Tab. 4) höhere Fixierungs- und Vollsaugraten erzielt als im Durchschnitt. Dieser Versuch fand als einziger im Klimaschrank unter kontrollierten Umgebungsbedingungen und mit einer erhöhten CO₂-Konzentration von 5 % und mit einem bis kurz oberhalb der Membran heruntergeschobenen Deckel statt. Die veränderten Bedingungen schienen sich günstig auf die Blutaufnahme auszuwirken, jedoch kann mit der geringen Zeckenzahl von 6 Weibchen keine statistisch gesicherte Aussage getroffen werden. Vollsaug- und Gelegegewicht waren im Vergleich zu den anderen Versuchen nicht erhöht, während Kuhnert (1995) bei der Fütterung von *A. hebraeum*-Nymphen im Inkubator statt im Wasserbad höhere Vollsauggewichte erzielte.

5.6.2 *I. ricinus*-Juvenile

Von den eingesetzten Larven und Nymphen fixierten sich in den Versuchen ohne eingeklebtes Moskitonetz 56,0 % und 73,2 %; von den fixierten saugten sich alle Juvenile voll. Bonnet et al. (2007) geben bei der Fütterung über Gerbil- und Kaninchenhäute Fixierungsraten von 90–100 % und Vollsaugraten von Larven und Nymphen von 75–86 % und 74–100 % an. Zwischen den Vollsauggewichten von Nymphen, die sich später zu Männchen (2,7 mg), und jenen, die sich später zu Weibchen (4,1 mg) häuteten, wurde ein hoch signifikanter Unterschied festgestellt. Zu entsprechenden Ergebnissen kamen auch Graf (1978a), Dusbábek et al. (1994) und Dusbábek (1996).

Die Larven, deren Fütterung im Juli stattfand, benötigten im Mittel 29 d bis zur Häutung zu Nymphen. Lamontellerie (1965) gibt dafür bei *In-vivo*-Fütterung einen Zeitraum von 41–47 d an, Metianu (1951) von 22–25 d. Bei den Nymphen, die zwischen Mitte August und Anfang Oktober gefüttert wurden, gab es eine deutlich größere Spannbreite innerhalb der Dauern bis zur Häutung zu Adulten; im Mittel benötigten sie 197 d ($\sigma = 55$ d). Die Ursache für die lange Dauer können der Zeitpunkt der Fütterung und der Einfluss der Jahreszeit sein, da *I. ricinus* in den Wintermonaten eine Diapause durchläuft (Hancock et al., 2011). Lamontellerie (1965) beobachtete Dauern von 34–40 d, wenn die Fütterung am Tier von März bis Juli, und von 221–256 d, wenn die Fütterung ab August stattfand. Die Häutung erfolgte dann erst im März bis Juli des Folgejahres. Bei Metianu (1951) häuteten sich die Nymphen nach 28–86 d bei Fütterung im Juni und Juli und erst nach 186–213 d bei Fütterung im November, nämlich im Mai und Juni des Folgejahres.

5.7 Versuche zur *In-vitro*-Fütterung von *D. reticulatus*

5.7.1 *D. reticulatus*-Adulte

Die *In-vitro*-Fütterung von *D. reticulatus*-Adulten war erfolgreich: Männchen und Weibchen fixierten sich an den Silikonmembranen und nahmen Blut auf, Weibchen saugten sich voll und legten Eier ab, aus denen Larven schlüpften.

Von einer zähen, klebrigen Kotkonsistenz der Zecken, die in *In-vitro*-Versuchen beobachtet wurde und die teilweise zum Verkleben der Zecken führte und diese in einigen Fällen am Vollsaugen oder Ablösen von der Membran hinderte, berichten auch andere Autoren, nämlich bei der *In-vitro*-Fütterung von *Dermacentor nuttalli* (Habedank, 1995) und *Hyalomma anatolicum anatolicum* und *Hyalomma dromedarii* (Tajeri et Razmi, 2011). Die Ursache dafür bleibt unklar; möglicherweise üben das Alter des Futterblutes oder dessen Zusätze einen Einfluss aus. Es ist ferner denkbar, dass das Problem in Fütterungssystemen, in denen das Blut über den Zecken angeboten wird, nicht auftritt, da in diesem Fall die Faeces durch die Schwerkraft vermutlich nicht mit dem Capitulum oder den Beinen in Kontakt kommen.

Vergleich der *In-vitro*- und *In-vivo*-Fütterung von *D. reticulatus*

Die *In-vitro*-Fütterungsversuche dauerten mit durchschnittlich 15 d deutlich länger als die *In-vivo*-Fütterungen mit 10 d, da sich bei den künstlichen Fütterungen Weibchen teilweise erst nach einigen Tagen an der Membran fixierten und mit der Blutaufnahme begannen. Auch Kemp et al. (1975) und Bonnet et al. (2007) berichten von längeren Versuchsdauern *in vitro*. Bei der Fütterung am Tier bei 20–28°C Umgebungstemperatur werden bei *D. reticulatus*-Weibchen unterschiedliche Saugdauern zwischen 7 und 15 Tagen angegeben: 9–15 d (Arthur, 1960), 7–14 d (Honzakova, 1971; Slovak et al., 2002), 7–11 d (Nosek, 1972), 7–15 d (Immler, 1973) oder 8–13 d (Simo et al., 2004).

Erwartungsgemäß wurden bei der Fütterung am Tier bessere Resultate erzielt als mit der *In-vitro*-Fütterung. Erstere entspricht stärker dem natürlichen Wirtssuch- und Saugverhalten der Schildzecken. Neben signifikant höheren Fixierungs- und Vollsaugraten (siehe 4.4.1) wurden auch höhere Vollsauggewichte von 266,3 mg erzielt. Andere Autoren berichten von *In-vivo*-Repletionsgewichten von 250–410 mg auf Schafen (Sieberz et Gothe, 2000), von durchschnittlich 396,9 mg ($\sigma = 76,1$ mg) auf Mäusen und circa 476 mg auf Kaninchen (Simo et al., 2004) und von 251–356 mg auf Kaninchen (Bartosik et Buczek, 2012). Im Vergleich dazu ergab die *In-vitro*-Fütterung auf Silikonmembranen mittlere Vollsauggewichte von 219,9 mg, was circa 83 % der Gewichte der *In-vivo*-Fütterung entspricht. In anderen *In-vitro*-Fütterungen lagen die Vollsauggewichte deutlich weiter auseinander: Bei *Rhipicephalus appendiculatus* wurden circa 65 % (Waladde et al., 1991), bei *Dermacentor nuttalli* 50 % (Habedank et al., 1994; Habedank, 1995) und bei *Amblyomma variegatum* und

Amblyomma hebraeum circa 38 % des *In-vivo*-Gewichtes erreicht (Voigt et al., 1993; Kuhnert, 1995).

Die Präovipositionszeit, also die Dauer vom Vollsaugen bis zum Beginn der Eiablage, war *in vivo* mit durchschnittlich 8 d kürzer als *in vitro* mit 27 d. Andere Autoren geben sehr verschiedene Präovipositionszeiten für die *In-vivo*-Fütterung von *D. reticulatus* von 9–10 d (Metianu, 1951), 3–4 d (Arthur, 1960), 1–50 d (Honzakova, 1971), 5–12 d (Nosek, 1972), durchschnittlich 22 d (Sieberz et Gothe, 2000), 3–113 d (Slovak et al., 2002) oder durchschnittlich 2,2 d (Buczek et al., 2014) bei 20–28°C und 90–100 % rH an. Bei einer Erhöhung der Umgebungstemperatur von 20°C auf 27°C, bei 100 % rH, wurde eine Verkürzung der Präovipositionszeit von 23,9 d auf 14,6 d beobachtet (Zahler, 1994; Zahler et Gothe, 1995b). Immler (1973) ermittelte Dauern von 8–13 d bei der Fütterung von Wildfangzecken im Frühling und 8–58 d im Herbst sowie von 28–126 d bei der Fütterung von Zecken aus Laborzucht. Und Dusbábek et al. (1979) ermittelte Präovipositionszeiten von 1–25 d in der Natur.

Die Dauern vom Beginn der Eiablage bis zum Beginn des Larvenschlupfes lagen mit durchschnittlich 30 d *in vivo* und 32 d *in vitro* nah beieinander. Im Vergleich dazu werden an anderer Stelle Ovipositionsdauern, bei 20–28°C und 90–100 % rH, von im Mittel 31,6 d (Sieberz et Gothe, 2000) und von 9–11 d (Metianu, 1951), 6–25 d (Arthur, 1960; Nosek, 1972) und 18–20 d (Immler, 1973) angegeben. Bei einer Erhöhung der Umgebungstemperatur von 20°C auf 27°C, verkürzte sich die Ovipositionszeit von 31,5 d auf 22,9 d (Zahler, 1994; Zahler et Gothe, 1995b). Die Dauern der Embryonalentwicklung werden mit 12–19 d (Arthur, 1960; Nosek, 1972), 17–27 d (Honzakova, 1971), 16–21 d (Metianu, 1951; Immler, 1973), 10–38 d (Slovak et al., 2002), durchschnittlich 12,2 d (Buczek et al., 2014) und in der Natur mit 47–80 d (Dusbábek et al., 1979) angegeben.

Die Gelegegewichte waren in der *In-vivo*-Fütterung mit 123,9 mg signifikant höher als in der *In-vitro*-Fütterung mit 96,3 mg, was circa 78 % des Gelegegewichtes der *In-vivo*-Fütterung entspricht. Habedank et al. (1994) erzielten bei der *In-vitro*-Fütterung von *D. nuttalli* nur 35,4 % des Gelegegewichtes der *In-vivo*-Fütterung. Und Buczek et al. (2014) geben bei der Fütterung von *D. reticulatus* an Kaninchen sogar mittlere Gelegegewichte von 221 mg ($\sigma = 44$ mg) an. Zieht man das ermittelte Eigewicht von *D. reticulatus* von 45,3 μ g heran, so ergeben sich mittlere Eizahlen je Gelege von 2735 *in vivo* und 2126 *in vitro*. Andere Autoren geben je nach Wirtstierspezies mittlere Eizahlen von 1500–3000 (Metianu, 1951), 3000–4500 (Arthur, 1960), 3000–6000 (Nosek, 1972), 2000–3000 Eier (Immler, 1973) bzw. im Mittel 3473 Eier nach der Fütterung auf Schafen (Sieberz et Gothe, 2000), 4182 und 5458 Eier nach der Fütterung auf Kaninchen und Mäusen (Simo et al., 2004) und 3966 Eier nach der Fütterung auf Kaninchen (Buczek et al., 2014) an.

Per *In-vivo*-Fütterung wurde außerdem ein signifikant höherer Eikonversionsfaktor von 49,4 %, im Vergleich zu 42,0 % in der *In-vitro*-Fütterung, erzielt. Auch andere Autoren berichten von einem reduzierten EKF in der *In-vitro*-Fütterung im Vergleich zu *In-vivo*-Ergebnissen (Waladde et al., 1991; Habedank, 1995; Kuhnert et al., 1998). Buczek et al. (2014) erhielten einen EKF von 53 % bei der Fütterung von *D. reticulatus* am Kaninchen

sowie eine Eiablagerrate von 100 %. Diese wurde auch bei eigenen *In-vivo*-Fütterungen erzielt; die Eiablagerrate *in vitro* lag mit 91,5 % signifikant niedriger.

Der Anteil an larvenproduzierenden Weibchen von vollgesaugten Weibchen unterschied sich mit 88,9 % *in vivo* nicht signifikant von den niedrigeren 66,0 % *in vitro*, während die mittlere *In-vivo*-Larvenschlupfrate je Gelege mit 84,8 % signifikant über der *In-vitro*-Larvenschlupfrate von 55,4 % lag. Andere Autoren beobachteten *In-vivo*-Larvenschlupfraten von *D. reticulatus* von über 94 % (Immler, 1973; Zahler et Gothe, 1995a), Buczek et al. (2014) berichten sogar von Larvenschlupf in 100 % der Gelege und in 98,2 % der Eier. Habedank et al. (1994) erzielten bei der *In-vitro*-Fütterung von *D. nuttalli* eine Larvenschlupfrate von 46 %, im Vergleich zu 72 % bei der Fütterung am Kaninchen. Als mögliche Ursachen für die reduzierte Fruchtbarkeit *in vitro* wurden Nährmedium und Wasserbalance der Zecken diskutiert (Habedank, 1995): Sowohl schädigende Substanzen, wie Antibiotika oder toxische Abbauprodukte des warmen Futterblutes, als auch fehlende Nährstoffe und eine unzureichend hohe Luftfeuchtigkeit können nachteilige Auswirkungen auf die Fitness der Zecken haben.

Habedank et al. (1994) errechneten eine Effizienz ihrer *In-vitro*-Fütterung von *D. nuttalli* von 22 % im Vergleich zur *In-vivo*-Fütterung am Kaninchen.

Versuche zur Verfütterung von tiefkühlgelagertem Blut

Bei der Verfütterung von zuvor tiefkühlgelagertem und infolgedessen hämolysiertem Blut wurden verringerte Vollsaug- und Eiablagerraten und Vollsauggewichte erzielt. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Entsprechende Beobachtungen machten auch andere Autoren bei der *In-vitro*-Fütterung mit gefrierengelagertem Futterblut: Die Vollsaugraten und -gewichte von *A. variegatum*-Nymphen (Barré et al., 1998) und die Vollsauggewichte von *A. hebraeum*-Nymphen (Kuhnert, 1995) waren gegenüber frischem Blut verringert. Bei der *In-vitro*-Fütterung von *D. nuttalli*-Adulten wurden hingegen bei frischem und gefrorenem Blut vergleichbare Resultate erzielt (Habedank et al., 1994; Habedank, 1995).

Auffällig in der Gruppe mit dem tiefkühlgelagerten Futterblut war darüber hinaus der signifikant häufigere Schimmelbefall an den Kammern und Membranen. Dieser ist möglicherweise auf die Hämolyse zurückzuführen und wurde auch von Kuhnert (1995) beobachtet.

Insgesamt wird die *In-vitro*-Fütterung von Schildzecken mit gefrierengelagertem Blut als nicht optimal, aber machbar eingeschätzt. Denkbar wäre ferner, die Verfütterung von gefriergetrocknetem Blut zu testen, die beispielsweise bereits in der Fütterung von Tsetsefliegen erfolgreich Anwendung fand (Wetzel, 1980), oder das Futterblut mit Antimykotika zu versetzen (Kuhnert et al., 1995).

Versuche zum Vergleich verschiedener Fütterungssysteme

Bei der Verwendung der nach Kröber und Guerin modifizierten Fütterungssysteme wurden zwar sowohl für *I. ricinus* als auch für *D. reticulatus*-Adulte zufriedenstellende Ergebnisse erzielt. Jedoch macht der erhebliche Arbeits- und Zeitaufwand des manuellen Blutaustausches (Habedank, 1995) dieses *In-vitro*-Fütterungssystem unpraktikabel für die routinemäßige Zeckenzucht im Labor. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit Versuche zur Teilautomatisierung der Zeckenfütterung durchgeführt.

Erste Versuche erfolgten mit dem **Durchflusssystem aus Polystyrol**, das mit einem passiven Blutzuffluss funktionierte und nicht autoklaviert werden konnte. Trotz fehlender ATP-Zugabe zum Futterblut und schwankender Blutflussraten – bedingt durch eine unexakte Zuflussregulierung über die Rollklemme und einen unregelmäßigen passiven Blutabfluss – wurden mit diesem System gute Fütterungsergebnisse erzielt. Bei einem täglichen Wechsel der Durchflussskammer und dem üblichen Gentamycin-Zusatz von 5 µg/ml zum Futterblut hielt sich das Keimwachstum in Grenzen. Starke Kontaminationsprobleme wie in zuvor beschriebenen Durchflusssystemen (Kuhnert, 1995; Kuhnert et al., 1998) traten nicht auf. Eine höhere Blutflussrate als die hier eingestellten 300–350 ml pro Tag könnte die Keimmenge in der Blutkammer zudem reduzieren und würde die Zecken mit frischerem Blut versorgen. Allerdings wäre dann der Blutverbrauch für die *In-vitro*-Fütterung sehr hoch (Kuhnert, 1995).

Nach der erfolgreichen Testung des DFS PS wurde ein **Durchflusssystem aus Glas** aufgebaut, das autoklavierbar war, Platz für mehr Fütterungskammern bot und einen über eine Peristaltikpumpe kontrollierten Blutzuffluss aufwies. Mit diesem System wurden sehr gute Ergebnisse erzielt. Im Vergleich zu den anderen drei Fütterungssystemen wurden hier die höchste Fixierungsrate und Larvenschlupfrate je Gelege von 58,3 % und 92,5 % sowie das höchste Gelegegewicht und die größte Larvenmasse von 123,2 mg und 124,6 mg erzielt. Darüber hinaus war das Vollsauggewicht mit durchschnittlich 269,6 mg sehr hoch, und alle Gewichte des DFS Glas waren signifikant höher als die des K+G Glas. Mit dem DFS aus Glas war ein hygienischeres Arbeiten als mit dem aus Polystyrol möglich, dennoch musste die Durchflussskammer täglich gewechselt werden. Kondenswasser von der unsterilen Abdeckplatte der Kammer tropfte zurück in das Futterblut und war eine mögliche Kontaminationsquelle. Der passive Abfluss des Blutes erfolgte aufgrund der größeren Fläche der Kammer nur etwa zweimal täglich und damit seltener als beim DFS PS. Um das verbrauchte Blut häufiger oder kontinuierlich abfließen zu lassen, könnte man den Abflussschlauch ebenfalls an die Peristaltikpumpe anschließen.

Das ***In-vitro*-Fütterungssystem mit Tierhäuten** nach Bonnet (**FSB**) erzielte die niedrigsten Fixierungs- und Vollsaugraten von 23,8 % und 6,7 %. Allerdings waren die Vollsauggewichte mit 291,1 mg in diesem System am höchsten, und es legten von den wenigen vollgesaugten Weibchen, im Gegensatz zu den anderen Fütterungssystemen, alle Eier ab, aus denen Larven schlüpften.

Die Problematik der starken Kondenswasserbildung führte dazu, dass die Zecken an den Glaswänden der Zeckenkammer festklebten und damit am Fixieren an der Membran

gehindert wurden. Das Einlegen von Windelstücken sowie deren mehrmaliger Austausch und das wiederholte Auswischen der Zeckenkammern bedeuteten einen zusätzlichen Arbeitsaufwand und brachten nur vorübergehend eine Besserung. Die Tierhäute verdarben trotz antibiotischer Waschschriffe nach mehreren Versuchstagen und wiesen dunkle Verfärbungen und geruchliche Abweichungen auf. Zecken, die sich an verfärbten Stellen fixiert hatten, konnten sich meist nicht vollsaugen oder starben. Versuche, in denen die Tierhäute durch Silikonmembranen ersetzt wurden, verliefen erfolglos.

Insgesamt war das DFS Glas am vielversprechendsten: Es lieferte die besten Fütterungsergebnisse bei gleichzeitig reduziertem Arbeitsaufwand. Weitere Versuche mit diesem System sollten durchgeführt werden. Denkbar wären unter anderem der Test des Systems mit kontrolliertem Blutabfluss, mit einem seltenerem Wechsel der Durchflussskammern – z. B. durch erhöhte Antibiotika- oder durch Antimykotika-Zugaben – oder unter kontrollierten Umgebungsbedingungen im Klimaschrank.

Versuche zur Verfütterung von Blut ohne Antibiotikazugabe und mit Gamma- Bestrahlung

Möglicherweise haben Antibiotika-Zusätze in der Zeckenfütterung auch nachteilige Effekte. So wird beispielsweise von einer schädigenden Wirkung von Gentamycin im Futterblut auf die Darmflora von Schildzecken ausgegangen (Narasimhan et al., 2014). Außerdem werden diverse Mikroorganismen-Spezies, die in Ixodiden vorkommen und deren Rolle großteils noch unklar ist, als Endosymbionten diskutiert: Adlerozysten – hefeähnliche Organismen – wurden im Genitalsystem (Feldman-Muhsam, 1970), Rickettsiales unter anderem im Genitalsystem und in den Malpighischen Gefäßen (Mudrow, 1932; Sasser et al., 2006) und Coxiellen in verschiedenen Organen (Noda et al., 1997; Lalar et al., 2014) nachgewiesen. Antibiotika könnten Symbionten abtöten und somit die Zecken schädigen (Kemp et al., 1975; Kuhnert, 1995; Ninio et al., 2015). Aus diesem Grund wurden Versuche durchgeführt, die zum Ziel hatten, auf die Antibiotikazugabe zum Futterblut zu verzichten. Neben dem bloßen Weglassen des Gentamycins wurde, analog zu Versuchen mit Tsetsefliegen (Bauer et al., 1980; Hamann et Iwanek, 1981), eine Gamma-Bestrahlung des Blutes durchgeführt. Darüber hinaus wäre ein Nachweis der Änderungen des Zecken-Mikrobioms mittels PCR (polymerase chain reaction) oder RLB (reverse line blot hybridisation) denkbar.

Die Bestrahlung des Futterblutes war durchaus erfolgreich: Die ursprüngliche Keimbelastung des unsteril gewonnenen Blutes wurde von 96 auf unter 2 CFU/ml reduziert. Im Laufe der Verfütterung des Blutes nahm die Keimmenge jedoch in allen drei Gruppen zu. Zwar wurden die Zecken- und die Blutkammern vor ihrer Verwendung autoklaviert und der Blutwechsel unter einer Sterilbank durchgeführt. Trotzdem war ein steriles Arbeiten nicht möglich, da zum Beurteilen der Zecken der Deckel von jeder Zeckenkammer abgenommen werden musste. Dabei konnten einzelne Tierhaare auf die Außenseite der Zeckenkammer gelangen und diese und das Blut kontaminieren. Ein Verzicht auf die Tierhaare als Fixierungsstimulus würde wahrscheinlich ein hygienischeres Arbeiten erlauben; entsprechende Versuche wurden nicht durchgeführt. Wider Erwarten fand das Keimwachstum in der Gruppe mit dem

gammabestrahlten Blut am stärksten und am raschesten statt; es färbte sich bereits nach wenigen Versuchstagen innerhalb der 12 Stunden bis zum Blutaustausch stets dunkel und entwickelte einen strengen Verderbnisgeruch. Es ist bekannt, dass Bestrahlung Zellmembranen schädigen und im Blut somit zu Hämolyse führen kann (Myers et Bide, 1966; Kollmann et al., 1969; Hammad, 2008). Außerdem wird angenommen, dass Zellen, die eine Bestrahlung überlebt haben, danach empfindlicher gegen Umwelteinflüsse wie Temperatur – z. B. Erwärmung – oder pH-Wert sind (Myers et Bide, 1966; Hammad, 2008). Möglicherweise begünstigte die Hämolyse, analog zu den Beobachtungen bei der Verwendung von gefrorenem Blut, ein stärkeres Keimwachstum.

In der Gruppe ohne Antibiotikazugabe und ohne Bestrahlung war das Keimwachstum geringer und erfolgte später; in der Gruppe mit Antibiotikazugabe trat erwartungsgemäß das geringste Keimwachstum auf.

Dennoch saugten sich in allen Gruppen Weibchen mit vergleichbaren Fixierungs- und Vollsaugraten voll. Das höchste mittlere Vollsauggewicht wurde in der Gruppe ohne Antibiotikazugabe erzielt; der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Die Fruchtbarkeit, gekennzeichnet durch Eiablage und Larvenschlupf, war in der Gruppe mit Antibiotikazugabe am besten; einzig die Larvenschlupfrate je Gelege war in allen drei Gruppen ähnlich.

Es wird also deutlich, dass die Bestrahlung des Blutes nicht die erhofften Vorteile brachte und daher nicht nur aufgrund des finanziellen und organisatorischen Aufwandes für die *In-vitro*-Fütterung von Schildzecken zu verwerfen ist.

5.7.2 *D. reticulatus*-Juvenile

Versuche mit *D. reticulatus*-Nymphen

Die *In-vitro*-Fütterung von Nymphen stellte sich als schwierig heraus: Von den insgesamt 1720 in den Versuchen eingesetzten Nymphen fixierten sich nur sehr wenige überhaupt an den Silikonmembranen oder Tierhäuten. Insgesamt saugten sich 15 Nymphen voll; alle im System FSB.

Die beobachteten Saugdauern von bis zu 7 d reihen sich in die Angaben anderer Autoren ein: 3–10 d (Metianu, 1951), 6–10 d (Arthur, 1960), 5–8 d (Honzakova, 1971), 3–4 d (Nosek, 1972), 4–7 d (Immler, 1973) oder 5–12 d (Slovak et al., 2002).

Von den 15 vollgesaugten Nymphen im FSB häuteten sich lediglich 2 (13,3 %) zu Adulten. Die Häutungsrate der *In-vivo*-Fütterung lag mit circa 93 % erheblich höher und ist vergleichbar mit der von Immler (1973) beobachteten Häutungsrate von 97,9 %.

Versuche mit *D. reticulatus*-Larven

Die *In-vitro*-Fütterung der Larven war ebenfalls wenig erfolgreich. Von den insgesamt etwa 31320 eingesetzten Larven saugten sich lediglich 77 voll. Zwar wurden wiederholt teilgesogene fixierte oder frei umherlaufende Larven in beiden Fütterungssystemen beobachtet, doch beendeten viele von ihnen nicht die Blutaufnahme. Wiederholtes Ablösen und Wiederfixieren von *R. microplus*-Larven zu Beginn der Blutaufnahme auf einem Wirtstier beobachtete auch Roberts (1971). Doch es stellt sich die Frage, warum sich die Larven in der *In-vitro*-Fütterung nicht erneut fixierten, um sich vollzusaugen. Möglicherweise waren die getesteten Fixierungs- und Saugstimuli unpassend oder nicht wirkungsvoll genug: Tierhaare und Tierhaarextrakte wurden von verschiedenen Spezies – Rind, Kaninchen und Gerbil – und Tierhaarextrakte mit den Lösungsmitteln Dichlormethan und Ethanol gewonnen und getestet. ATP als Saugstimulus wurde in erhöhten Konzentrationen ins Futterblut gegeben, und die Verfütterung von Blut sowohl von Rindern als auch von Kaninchen wurde versucht sowie die Verfütterung von hämolysiertem Blut. Da sich fixierte Larven wieder ablösten, wurde außerdem eine saughemmende Wirkung des Futterblutes in Erwägung gezogen, und in einem Versuch wurden Blutzusätze, nämlich Gentamycin und Heparin, weggelassen. Auch die Membranen wurden modifiziert, um die Larven zur Blutaufnahme zu bewegen: Dünnere und weichere Silikonmembranen – mit Toluol oder einer erhöhten Silikonölmenge und mit oder ohne Linsenpapier als Matrix – wurden verwendet. Im System K+G Glas fiel auf, dass sich zunächst ein Großteil der Larven am Deckel aufhielt statt in Membrannähe. Dies änderte sich, als der Deckel in zwei Versuchen bis kurz oberhalb der Membran geschoben wurde. Aus diesen Versuchen stammen alle vollgesogenen Larven im K+G Glas. Das System FSB mit Tierhäuten führte zu signifikant höheren Fixierungs- und Vollsaugraten von 4,3 % und 1,5 %, im Vergleich zu 0,2 % und 0,1 % im K+G Glas, obwohl Probleme wie Fäulnis der Häute und starker Kondenswasserniederschlag in der Zeckenkammer auftraten. Schlechtere Fütterungsergebnisse bei der Verwendung von gefrorenen Häuten, wie sie von Doube und Kemp (1979) beobachtet wurden, wurden hier nicht erzielt.

Im K+G Glas war außerdem auffällig, dass zahlreiche Larven, obgleich sie zunächst sehr agil waren und in der Kammer umherliefen, innerhalb der ersten Versuchstage starben. Eine mögliche Ursache kann eine unzureichend hohe relative Luftfeuchtigkeit in der warmen Zeckenkammer gewesen sein; diese betrug durchschnittlich 78 %. Entsprechende Beobachtungen wurden auch mit *R. microplus*-Larven in *In-vitro*-Fütterungen gemacht (Doube et Kemp, 1979). Von diesen wird auch berichtet, dass sie auf dem Wirt innerhalb von 24 h sterben, wenn sie an der Blutaufnahme gehindert werden und dass niedrige Luftfeuchtigkeiten und hohe Temperaturen das Sterben der Larven zusätzlich beschleunigen (Roberts, 1971).

Zum Vollsaugen benötigten die Larven *in vivo* bis zu 4 d und *in vitro* bis zu 6 d, was sich mit den von anderen Autoren beobachteten Saugdauern von *D. reticulatus*-Larven am Tier deckt, die 3–6 d angeben (Nosek, 1972; Immler, 1973; Zahler et Gothe, 1995a; Slovak et al., 2002). Bis zur Häutung zu Nymphen vergingen weitere 9 d ($\sigma = 6,6$ d). Bei der Fütterung am Tier und der anschließenden Lagerung bei 20–28°C und 90–100 % rH wurden ähnliche

Zeitspannen vom Vollsaugen bis zur Häutung angegeben: 9–20 d (Metianu, 1951), mindestens 5–7 d (Arthur, 1960), 7–8 d (Honzakova, 1971), 7–21 d (Nosek, 1972), 9–12 d (Immler, 1973) und 5–29 d (Slovak et al., 2002); und 10–23 d in der Natur (Dusbábek et al., 1979). Von den 20 vollgesaugten Larven im K+G Glas häuteten sich 5 (25,0 %), und von den 57 im FSB häuteten sich 17 (29,8 %) zu Nymphen; die beiden Häutungsraten sind nicht signifikant verschieden. Erheblich höher lagen hingegen die Häutungsrate bei der Fütterung am Tier mit 90–95 % sowie die von Immler (1973) beobachtete Rate von 98,6 %.

5.8 Tageszeiten des Vollsaugens und Ablösens von *I. ricinus* und *D. reticulatus*

Laut Balashov (1972) fallen wegelagernde Schildzecken bevorzugt dann vom Wirt ab, wenn dieser aktiv ist, sodass die Wahrscheinlichkeit hoch ist, dass sie in einem Habitat landen, das für ihre Weiterentwicklung günstig ist. Adulte *D. reticulatus* und adulte und nymphale *I. ricinus* haben jedoch Wirtstierpräferenzen, die sich stark überlappen. Es lässt sich demnach nicht anhand der Wirtstieraktivität erklären, warum sich erstere vor allem nachts und letztere bevorzugt tagsüber von der Membran ablösen. Die Beobachtungen lassen eher eine wirtstierunabhängige, möglicherweise zirkadiane Rhythmik vermuten.

5.9 Zusammenhang von Vollsauggewicht und Gelegegewicht von *D. reticulatus* *in vivo* und *in vitro*

Es wurde ein linearer Zusammenhang zwischen dem Repletionsgewicht der vollgesaugten *D. reticulatus*-Weibchen und ihrem Gelegegewicht, sowohl bei *In-vivo*- als auch bei *In-vitro*-Fütterung, festgestellt. Auch Sieberz und Gothe (2000) beobachteten, dass die Anzahl der Eier je Gelege proportional zum Vollsauggewicht von *D. reticulatus* ist, und ebenfalls wurde bei anderen Schildzeckenspezies diese lineare Beziehung beschrieben (Honzakova et al., 1975; Habedank, 1995).

5.10 Eigewichte von *D. reticulatus*

Das mittlere Eigewicht von *D. reticulatus* aus *In-vitro*-Fütterung liegt mit 45,3 µg unter den Eigewichten anderer Dermacentor-Spezies in *In-vivo*-Fütterung: 48,1 µg bei *D. marginatus* (Darvishi et al., 2014), 84,2 µg bei *D. nuttalli* (Habedank, 1995) und 55,0 µg bei *D. nitens* (Labruna et al., 1997) und unter dem für *D. reticulatus* errechneten Eigewicht von 55,7 µg aus den Angaben von Buczek et al. (2014). Habedank (1995) erzielte bei der *In-vitro*-Fütterung von *D. nuttalli* ein geringeres mittleres Eigewicht von 68,3–84,7 µg. Ein Vergleich mit Eigewichten von *D. reticulatus* nach Fütterung am Tier steht noch aus. Außerdem ist es sinnvoll, größere Eipakete auszuzählen und zu wiegen und Gelege von unterschiedlichen Zeckenchargen und Jahreszeiten einzubeziehen, um einen aussagekräftigen Wert für das mittlere Eigewicht von *D. reticulatus* zu gewinnen.

5.11 Schlussfolgerung

Zunächst wurde die *In-vitro*-Fütterung mit Silikonmembranen für *I. ricinus* nach der Methode von Kröber und Guerin (2007a) optimiert. Silikonmembranen, Fixierungsstimuli, Gerinnungshemmung des Futterblutes und Zeckenkammern wurden angepasst, sodass es gelang, alle drei Entwicklungsstadien von *I. ricinus* über einen vollständigen Lebenszyklus *in vitro* zu füttern. Insbesondere waren die Verwendung von dünneren Silikonmembranen ohne aufgeklebtes Moskitonetz für Larven und Nymphen und der Ersatz der Plexiglaskammern durch autoklavierbare Glaskammern von Vorteil. 40,2 % der Weibchen, 73,2 % der Nymphen und 56,0 % der Larven saugten sich voll. Unklar ist, ob sich Fitness, Fütterungserfolg oder Reproduktionsleistung der Zecken über einen längeren Zeitraum der *In-vitro*-Zucht verringern oder ob sie gar ansteigen, da auf diese Weise Individuen selektiert werden, die an die *In-vitro*-Fütterung angepasst sind. Entsprechende weiterführende Fütterungsversuche stehen aus. Ein Versuch mit *I. ricinus*-Adulten im Klimaschrank mit 5 % CO₂ in der Umgebungsluft lieferte zudem vielversprechende Ergebnisse; weitere Versuche sind notwendig, um einen möglichen positiven Einfluss der kontrollierten Umgebungsbedingungen zu bestätigen.

Die Versuche mit *I. ricinus* dienten schließlich als Grundlage für die Festsetzung von Parametern in der *In-vitro*-Fütterung von *D. reticulatus*: 7 ♀ und 5 ♂ aus Wildfang wurden je Zeckenkammer im Fütterungssystem aus Glas eingesetzt, Silikonmembranen von circa 100 µm Dicke wurden verwendet und Blut vom Rind, versetzt mit 20 I.E./ml Na-Heparin, 2 mg/ml Glucose-Monohydrat, 10⁻⁶ mol/ml ATP und 5 µg/ml Gentamycin, wurde im Schüttelwasserbad auf circa 37,5°C erwärmt; als Fixierungsstimuli wurden ein Moskitonetz, 90 µl Rinderhaarextrakt, Rinderhaare und Zeckenfaeces auf die Membran aufgebracht. Später wurde außerdem der Deckel der Zeckenkammern bis 5–10 mm oberhalb der Membran herunter geschoben, um die Zecken in Membrannähe zu halten. So saugten sich 29,7 % der

Weibchen voll und legten erfolgreich Gelege ab, aus denen vitale Larven schlüpften. Jedoch war die Durchführung der *In-vitro*-Fütterung relativ arbeitsintensiv und lieferte nur etwa halb so viele vollgesaugte Weibchen wie bei der Fütterung am Tier. Daher wurden mit adulten *D. reticulatus* im Anschluss systematisch potenzielle Optimierungen der *In-vitro*-Fütterung getestet, mit dem Ziel, diese effizienter und weniger arbeitsintensiv zu gestalten: die Verfütterung von gefrorenem und von gammabestrahlttem Blut, sowie die Verfütterung von Blut ohne Antibiotikazugabe und die Verwendung alternativer Fütterungssysteme, einschließlich neu entwickelter teilautomatisierter Fütterungssysteme, wurden untersucht.

Bei der Verfütterung von tiefgekühlt gelagertem Blut wurde ein gehäufter Schimmelbefall an den Kammern und Membranen festgestellt, lieferte ansonsten aber vergleichbare Fütterungsergebnisse gegenüber gekühlt gelagertem Futterblut. Versuche mit einem Zusatz von Antimykotika zum Futterblut oder mit gefriergetrocknetem Blut könnten gleichzeitig das Problem des Schimmelwachstums eliminieren und die Notwendigkeit der aufwendigen Beschaffung von Frischblut umgehen. Wurde gammabestrahlttes Blut ohne Antibiotikazugabe verwendet, trat ein sehr starkes Keimwachstum während der Verfütterung auf, das zwar die Weibchen nicht am Vollsaugen hinderte, sich aber negativ auf deren Reproduktion auswirkte. Die Bestrahlung von Futterblut in der *In-vitro*-Fütterung von Ixodiden wird somit nicht als potenzielle Alternative zur Antibiotikazugabe eingeschätzt. Die Reproduktion war auch dann verringert, wenn unbestrahltes Blut ohne Antibiotikazugabe verfüttert wurde, jedoch wurden in diesem Fall erhöhte Vollsauggewichte bei den Weibchen erzielt.

Von den getesteten alternativen Fütterungssystemen fiel das System mit Tierhäuten (Bonnet et al., 2007) mit sehr niedrigen Fixierungs- und Vollsaugraten und hohen Vollsauggewichten auf. Ein starker Kondenswasserniederschlag in den Zeckenkammern und das Verderben der Häute erschwerte die *In-vitro*-Fütterung mit diesem System. Die neu entwickelten teilautomatisierten Systeme – aus Polystyrol bzw. Glas – mit kontinuierlichem Blutfluss lieferten hingegen gute Ergebnisse. Vor allem das Durchflusssystem aus Glas zeichnete sich durch hohe Fixierungsraten, Vollsauggewichte und Larvenschlupfraten bei gleichzeitig reduziertem Arbeitsaufwand aus. Dieses System könnte der Reduzierung der Zeckenfütterungen am Tier und deren Ersatz durch *In-vitro*-Fütterungen den Weg ebnen, insbesondere wenn es weiter optimiert und mit anderen Zeckenspezies getestet wird. Die Erprobung einer selteneren Wartung der Durchflusskammer durch höhere Antibiotika- oder Antimykotikazugaben zum Futterblut, die Installation eines kontrollierten Blutabflusses oder die Verwendung des Systems unter definierten Umgebungsbedingungen und erhöhter CO₂-Spannung im Klimaschrank wären denkbar.

Im Gegensatz zu den Adulten stellte sich die *In-vitro*-Fütterung von juvenilen *D. reticulatus* als schwieriger heraus: auf Silikonmembranen saugte sich keine Nymphe voll und lediglich 0,07 % der Larven, und nur dann, wenn der Deckel der Zeckenkammer bis kurz oberhalb der Membran geschoben war. Auch die Modifizierung zahlreicher entscheidender Parameter im System, wie Zusammensetzung und Dicke der Silikonmembranen, olfaktorische und mechanische Fixierungsstimuli und Futterblut-Spezies und -Zusätze, führte nicht zum Erfolg. Im Fütterungssystem mit Tierhäuten wurden mit 1,88 % vollgesaugten Nymphen und 1,49 %

vollgesaugten Larven geringfügig bessere Ergebnisse erzielt. Für die *In-vitro*-Fütterung von *D. reticulatus*-Larven und -Nymphen sind unbedingt weitere Versuche und Optimierungen nötig; ein bis dicht über die Membran geschobener Kammerdeckel und Tierhäute als Membranen dienen als erster Ansatz für weitere Untersuchungen.

6. Zusammenfassung

Schildzecken stellen als obligat hämatophage Parasiten weltweit eine Gefahr für die Gesundheit von Mensch und Tier dar. Neben ihrem enormen Vektorpotenzial für eine Vielzahl an bakteriellen, viralen, protozoalen und anderen Pathogenen können sie ihrem Wirt durch den Saugakt auch direkte Schäden zufügen (Uilenberg, 1992). Für Untersuchungen der Biologie von Zecken, einschließlich ihrer Rolle als Vektoren für Pathogene, und das Entwickeln und Testen von Akariziden oder anderen Bekämpfungsmethoden, ist eine erhebliche Anzahl an Labortieren erforderlich, die als Wirte für die Zecken benötigt werden (Kröber et Guerin, 2007a). Mithilfe einer erfolgreichen *In-vitro*-Fütterung von Schildzecken ließe sich die Verwendung von Labortieren deutlich reduzieren. Zahlreiche Versuche zur *In-vitro*-Fütterung von diversen Ixodidenspezies wurden in den vergangenen hundert Jahren bereits durchgeführt, dennoch konnte sich aufgrund der reduzierten Zeckenfruchtbarkeit, des Arbeitsaufwandes und der langen Saugdauer der Zecken bisher keine Methode für den standardmäßigen Einsatz in der Laborzucht durchsetzen.

Im Hinblick auf die Tatsache, dass *Ixodes ricinus* und *Dermacentor reticulatus* die bedeutendsten Schildzecken in Mitteleuropa darstellen (Karbowski, 2014), sollte für die vorliegende Arbeit mit diesen beiden Spezies die *In-vitro*-Fütterung durchgeführt werden. Ein gut funktionierendes Fütterungssystem mit Silikonmembranen (Kröber et Guerin, 2007a) wurde dazu als Ausgangspunkt ausgewählt und für alle drei Entwicklungsstadien von *I. ricinus* optimiert. Insbesondere wurden die ursprünglich verwendeten Plexiglasskammern durch autoklavierbare Glaskammern ersetzt, verschiedene Fixierungsstimuli verwendet und dünnere Silikonmembranen für juvenile Zecken entwickelt. Bei den Weibchen wurden eine mittlere Fixierungsrate von 74,8 % (95/127) und eine Vollsaugrate von 40,2 % (51/127) mit einem mittleren Vollsauggewicht von 209,2 mg erzielt. Von den vollgesaugten Weibchen legten 62,7 % (32/51) Eier ab mit einem mittleren Gelegegewicht von 34,6 mg, und 23,5 % (12/51) produzierten Larven. Die Nymphen fixierten sich nach Optimierung des Systems zu 73,2 % (30/41), die Larven zu 56,0 % (28/50) an der Membran, von denen sich alle vollsaugten. Das mittlere Vollsauggewicht der Nymphen, die sich später zu Männchen, und derjenigen Nymphen, die sich später zu Weibchen häuteten, war mit 2,7 mg und 4,1 mg signifikant verschieden. Mit *I. ricinus* gelang es, einen Lebenszyklus vollständig per *In-vitro*-Fütterung über Silikonmembranen zu realisieren. Der nächste Schritt wäre die Beobachtung des Fütterungserfolges über mehrere Generationen von *I. ricinus* in der *In-vitro*-Fütterung.

Anschließend wurde die Fütterungstechnik auf *D. reticulatus* angewandt und modifiziert, mit dem Ziel, erstmals alle Stadien dieser Spezies *in vitro* zu füttern. Dabei wurden mit *D. reticulatus*-Adulten gute Ergebnisse erzielt. Von den 357 eingesetzten Weibchen im Fütterungssystem mit Zeckenkammern aus Glas (K+G Glas) fixierten sich 179 (50,1 %), und 106 (29,7 %) saugten sich voll. Von den vollgesaugten Weibchen legten 91,5 % (97/106) Eier ab, und 66,0 % (70/106) produzierten Larven. Die mittleren Vollsaug- und Gelegegewichte beliefen sich auf 219,9 mg und 96,3 mg. Die *In-vitro*-Fütterung von juvenilen *D. reticulatus*

stellte sich als schwieriger heraus. Im System K+G Glas saugten sich nur 0,07 % (20/27500) der Larven und keine Nymphe (0/920) voll, obgleich zahlreiche entscheidende Parameter, wie Zusammensetzung und Dicke der Silikonmembranen, olfaktorische und mechanische Fixierungsstimuli, Futterblut-Spezies und -Zusätze, getestet wurden. In einem anderen Fütterungssystem (FSB) (Bonnet et al., 2007), in dem Tierhäute als Membranen verwendet wurden, wurden geringfügig bessere Ergebnisse erzielt: Hier saugten sich 1,88 % (15/800) der Nymphen und 1,49 % (57/3820) der Larven voll. Eine weitere Optimierung der *In-vitro*-Fütterung von juvenilen *D. reticulatus* ist unbedingt notwendig.

Nachdem die *In-vitro*-Fütterung für adulte *D. reticulatus* etabliert war, wurden mit ihnen systematisch weitere Modifizierungen im Fütterungssystem getestet, um die *In-vitro*-Fütterung von Ixodiden zu optimieren und die Fütterung effizienter und weniger arbeitsintensiv zu gestalten. Dies wurde als essenzielle Voraussetzung für den routinemäßigen Einsatz der *In-vitro*-Fütterung von Schildzecken in anderen Laboren angesehen. Es wurden die Verfütterung von gefrorenem und gammabestrahltm Blut sowie die Verfütterung von Blut ohne Antibiotikazugabe und die Verwendung verschiedener Fütterungssysteme, einschließlich wartungsärmerer Durchflusssysteme, einschließlich wartungsärmerer Durchflusssysteme, getestet. Die Verfütterung von Blut, das bei -20°C, und Blut, das bei +4°C gelagert wurde, lieferte vergleichbare Fütterungsergebnisse, aber führte beim tiefkühlgelagerten Blut zu einem gehäuften Auftreten von Schimmelbefall an den Kammern und Membranen. Der Zusatz von Antimykotika oder die Verfütterung von gefriergetrocknetem Blut wären potenzielle Alternativen, um dieses Problem zu umgehen. Bei der Verwendung von bestrahltem Blut fiel ein starkes Keimwachstum während der Verfütterung auf, das zwar die Weibchen nicht am Vollsaugen hinderte, sich jedoch negativ auf die Reproduktion, insbesondere die Eiablage, auswirkte. Die Bestrahlung von Blut in der *In-vitro*-Fütterung von Ixodiden wird daher als unpraktikabel eingestuft. Wurde auf die Antibiotikazugabe zum Futterblut verzichtet, wurde ebenfalls die Reproduktion – wenn auch schwächer – gehemmt, während die Vollsauggewichte etwas höher ausfielen. Beim Vergleich verschiedener Fütterungssysteme fiel das System FSB mit den mit Abstand niedrigsten Fixierungs- und Vollsaugraten und dem höchsten Vollsauggewicht von 291,1 mg auf. Die beiden neu entworfenen Durchflusssysteme aus Polystyrol und aus Glas (DFS PS und DFS Glas) lieferten gute Ergebnisse. Vor allem das DFS Glas zeichnete sich durch eine hohe Fixierungsrate, ein großes mittleres Vollsauggewicht und einen verstärkten Larvenschlupf aus. Insgesamt war dieses System in Hinblick auf den Fütterungserfolg und den reduzierten Arbeitsaufwand am vielversprechendsten, und könnte Zeckenfütterungen am Tier partiell ersetzen. Weitere Optimierungen und die Fütterung von anderen Zeckenspezies in diesem System sollten getestet werden.

Ferner wurden die Hypostomlängen aller Stadien von *I. ricinus* und *D. reticulatus* ermittelt und ein linearer Zusammenhang zwischen Vollsaug- und Gelegegewicht von *D. reticulatus* für *In-vivo*- und *In-vitro*-Fütterung nachgewiesen. Die bevorzugten Zeitpunkte des Vollsaugens und Ablösens von der Membran waren für adulte *D. reticulatus* nachts und für nymphale und adulte *I. ricinus* tagsüber.

7. Summary

„*In vitro* feeding of *Dermacentor reticulatus* and *Ixodes ricinus* and development of a partially automated feeding system for ixodid ticks“

Hard ticks are obligate hematophagous arthropods that occur throughout the world and parasitize humans and animals. They rank among the most important vectors due to their ability to transmit bacterial, as well as viral, protozoan and other pathogens. The blood meal provokes direct damage to the host (Uilenberg, 1992). For studies on ticks, including their biology, the pathogens they transmit or the development of acaricides and other control measures, a considerable number of laboratory animals are required to act as hosts (Kröber et Guerin, 2007a). A successful *in vitro* feeding system for hard ticks has the potential to reduce the number of required laboratory animals. Researchers have been trying to develop artificial feeding systems for different tick species for over 100 years. Despite the progress made, *in vitro* feeding is currently not routinely used in the laboratory rearing of ticks, as it has not been adapted to feed all life stages from important tick species and is associated with a reduced fecundity in adult ticks. All developed methods are also complex and labour intensive due to the long duration of the tick's blood meal.

In Central Europe *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* represent the most important hard tick species (Karbowiak, 2014). Hence the aim of this study was to realize the *in vitro* feeding of these two species by improving an existing artificial feeding system using silicone membranes (Kröber et Guerin, 2007a). The feeding system was optimized for the feeding of all three developmental stages of *I. ricinus* by replacing the tick chambers made of acrylic glass by autoclavable glass chambers, using different attachment stimuli and reducing the membrane thickness for the feeding of juvenile stages. An average attachment rate of 74.8 % (95/127) and an engorgement rate of 40.2 % (51/127) with an average weight of 209.2 mg was obtained in the females. Of the replete females, 62.7 % (32/51) deposited egg batches with an average weight of 34.6 mg and 23.5 % (12/51) produced larvae. After optimization of the feeding system, 73.2 % (30/41) of the nymphs and 56.0 % (28/50) of the larvae fed to repletion on the membrane. There was a significant difference between the engorgement weights of nymphs that molted to males (2.7 mg) and those that molted to females (4.1 mg). The life cycle of *I. ricinus* was successfully completed *in vitro* by feeding on bovine blood through silicone membranes. The next step should be the observation of the development of the *in vitro* feeding success over several generations of *I. ricinus*.

The feeding technique was subsequently adapted for *D. reticulatus* and modified with the objective of feeding all life stages *in vitro*. Promising results were achieved with adult *D. reticulatus*: 179 (50.1 %) of the 357 females attached in the feeding system with glass tick chambers (K+G Glas) and 106 (29.7 %) engorged fully. Oviposition was observed in 91.5 % (97/106) of the engorged females and larvae hatched from 66.0 % (70/106) of the egg

batches. The average weights of the engorged females and the egg batches were 219.9 mg and 96.3 mg respectively. The *in vitro* feeding of *D. reticulatus* juveniles proved to be challenging. Only 0.07 % (20/27500) of the larvae and none of the nymphs (0/920) fed to repletion on silicone membranes. Efforts to optimize the composition and thickness of the membrane and to use different olfactory and mechanical attachment stimuli, blood from different animals and blood supplements were not successful. In another artificial feeding system which employed animal skins as membranes (FSB) (Bonnet et al., 2007) a slightly higher proportion of juveniles engorged: 1.49 % of larvae (57/3820) and 1.88 % of nymphs (15/800). A further optimization of the *in vitro* feeding of juvenile *D. reticulatus* is necessary.

Once the *in vitro* feeding of adult *D. reticulatus* had been established, further modifications were tested systematically in order to make the *in vitro* feeding more efficient and less laborious. This is a prerequisite for the adaptation of any *in vitro* feeding system for hard ticks by other laboratories. The use of previously frozen and of gamma-irradiated blood as well as of blood without the supplement of antibiotics for the tick feeding was investigated. In addition, different feeding systems including partially automated systems were tested. Although tick feeding and reproduction parameters did not differ significantly between ticks fed with blood stored at 4°C and blood stored at -20°C, a remarkably increased incidence of fungal growth was observed on tick chambers and membranes when previously frozen blood was used. The feeding of blood supplemented with fungicides or of freeze-dried blood could be possible alternatives. The utilization of gamma-irradiated blood for the *in vitro* feeding proved to be inappropriate since it resulted in an extensive microbial growth during the experiments. Although this did not prevent females from engorging, it resulted in a decreased fecundity. The use of blood without antibiotics also decreased the fecundity of the females, but to a lesser extent, while it increased the average engorgement weight. In a direct comparison between different feeding systems, females fed using the FSB noticeably showed lower attachment and engorgement rates, but also the highest mean engorgement weight of 291.1 mg. The *in vitro* tick feeding could be partially automated with two newly designed flow-through chambers made of polystyrene and glass (DFS PS and DFS Glas). Feeding of *D. reticulatus* adults using the DFS Glas system showed promising results, as it resulted in increased attachment, engorgement weights and egg hatch rates while the maintenance of the system was less laborious. After further optimizations and the feeding of other ixodid species, this partially automated feeding system could help replacing tick feedings on animal hosts by *in vitro* feeding.

The lengths of the hypostomes of all stages of *I. ricinus* and *D. reticulatus* were measured and a linear correlation between engorgement- and egg batch weight was demonstrated for *D. reticulatus* in both *in vivo* and *in vitro* feeding. It was furthermore observed that adult *D. reticulatus* mainly detached from the membrane during nighttime, in contrast to nymphal and adult *I. ricinus* which mainly detached during the day.

8. Literaturverzeichnis

- Andrade, J. J., Xu, G., Rich, S. M. (2014). A silicone membrane for *in vitro* feeding of *Ixodes scapularis* (Ixodida: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* 51(4): 878-879.
- Antunes, S., Merino, O., Mosqueda, J., Moreno-Cid, J. A., Bell-Sakyi, L., Fragkoudis, R., Weisheit, S., Perez de la Lastra, J. M., Alberdi, P., Domingos, A., Fuente, J. d. I. (2014). Tick capillary feeding for the study of proteins involved in tick-pathogen interactions as potential antigens for the control of tick infestation and pathogen infection. *Parasites and Vectors* 7(42).
- Arthur, D. R. (1960). *Ticks. A Monograph Of The Ixodoidea, Part V*, Cambridge University Press.
- Arthur, D. R. (1963). *British ticks*. London, Butterworths.
- Balashov, Y. S. (1972). Bloodsucking ticks (Ixodoidea) - vectors of diseases of man and animals (Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America, Issue 8), Entomological Society of America.
- Barré, N., Aprelon, R., Eugene, M. (1998). Attempts to feed *Amblyomma variegatum* ticks on artificial membranes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Jongejan, F., Goff, W., Camus, E. 849: 384-390.
- Bartosik, K., Buczek, A. (2012). The impact of intensity of invasion of *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* on the course of the parasitic phase. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 19(4): 651-655.
- Bartosik, K., Buczek, A. (2013). Determination of the parameters of the parasitic stage in *Ixodes ricinus* females. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 20(3): 441-446.
- Bartosik, K., Wisniowski, L., Buczek, A. (2011). Abundance and seasonal activity of adult *Dermacentor reticulatus* (Acari: Amblyommidae) in eastern Poland in relation to meteorological conditions and the photoperiod. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 18(2): 340-344.
- Bauch, R. (1990). *Ixodes ricinus*, *Haemaphysalis concinna* and *Dermacentor reticulatus* (Ixodida, Ixodidae) in the district of Leipzig (GDR). *Angewandte Parasitologie* 31(2): 57-64.

- Bauch, R. J., Danner, G. (1988). Funde von *Dermacentor reticulatus* (Ixodida, Ixodidae) in den DDR-Bezirken Leipzig und Halle. *Angewandte Parasitologie* 29(4): 250-254.
- Bauer, B., Iwanek, K. H., Hamann, H. J., Adamsky, G. (1980). Use of gamma-irradiated blood for feeding tsetse flies. Vienna, International Atomic Energy Agency.
- Bauer, B., Wetzel, H. (1976). A new membrane for feeding *Glossina morsitans* Westw. (Diptera, Glossinidae). *Bulletin of Entomological Research* 65(4): 563-565.
- Beelitz, P., Schumacher, S., Marholdt, F., Pfister, K., Silaghi, C. (2012). Untersuchungen zur Prävalenz von *Babesia canis canis* in Auwaldzecken (*Dermacentor reticulatus*) im Saarland. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 125(3/4): 168-171.
- Bishop, A., Gilchrist, B. M. (1946). Experiments upon the feeding of *Aedes aegypti* through animal membranes with a view to applying this method to the chemotherapy of malaria. *Parasitology* 37: 85-100.
- Bonnet, S., Gouagna, C., Safeukui, I., Meunier, J. Y., Boudin, C. (2000). Comparison of artificial membrane feeding with direct skin feeding to estimate infectiousness of *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers to mosquitoes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 94(1): 103-106.
- Bonnet, S., Jouglin, M., Malandrin, L., Becker, C., Agoulon, A., L'Hostis, M., Chauvin, A. (2007). Transstadial and transovarial persistence of *Babesia divergens* DNA in *Ixodes ricinus* ticks fed on infected blood in a new skin-feeding technique. *Parasitology* 134(2): 197-207.
- Bouwknegt, C., Rijn, P. A. v., Schipper, J. J. M., Holzel, D., Boonstra, J., Nijhof, A. M., Rooij, E. M. A. v., Jongejan, F. (2010). Potential role of ticks as vectors of bluetongue virus. *Experimental and Applied Acarology* 52(2): 183-192.
- Broadwater, A. H., Sonenshine, D. E., Hynes, W. L., Ceraul, S., Silva, A. M. d. (2002). Glass capillary tube feeding: a method for infecting nymphal *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) with the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Medical Entomology* 39(2): 285-292.
- Buczek, A., Bartosik, K., Kuczynski, P. (2014). Sensitivity to permethrin in a *Dermacentor reticulatus* population from eastern Poland in laboratory study. *Parasites and Vectors* 7(18).
- Burgdorfer, W. (1957). Artificial feeding of ixodid ticks for studies on the transmission of disease agents. *Journal of Infectious Diseases* 100: 212-214.

- Burkot, T. R., Happ, C. M., Dolan, M. C., Maupin, G. O. (2001). Infection of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) with *Borrelia burgdorferi* using a new artificial feeding technique. *Journal of Medical Entomology* 38(2): 167-171.
- Campbell, E. M., Burdin, M., Hoppler, S., Bowman, A. S. (2010). Role of an aquaporin in the sheep tick *Ixodes ricinus*: assessment as a potential control target. *International Journal for Parasitology* 40(1): 15-23.
- Cerny, V., Szymanski, S., Dusbabek, F., Daniel, M., Honzakova, E. (1982). Survival of unfed *Dermacentor reticulatus* (Fabr.) adults under natural conditions. *Wiadomosci Parazytologiczne* 28(1/2): 27-31.
- Chabaud, A.-G. (1950). Sur la Nutrition artificielle des tiques. *Annales de parasitologie humaine et comparée* 25: 42-47.
- Chmela, J. (1969). On the developmental cycle of the common tick (*Ixodes ricinus* L.) in the north-Moravian natural focus of tick-borne encephalitis. *Folia Parasitologica* 16(4): 313-319.
- Cornely, M., Schultz, U. (1992). Zur Zeckenfauna Ostdeutschlands. *Angewandte Parasitologie* 33(3): 173-183.
- Cotte, V., Bonnet, S., Rhun, D. I., Naour, E. I., Chauvin, A., Boulouis, H. J., Lecuelle, B., Lilin, T., Vayssier-Taussat, M. (2008). Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*. *Emerging Infectious Diseases* 14(7): 1074-1080.
- Darvishi, M. M., Youssefi, M. R., Changizi, E., Shayan, P., Lima, R. R., Rahimi, M. T. (2014). Biology of *Dermacentor marginatus* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 4(Suppl. 1): 284-289.
- Dautel, H., Dippel, C., Oehme, R., Hartelt, K., Schettler, E. (2006). Evidence for an increased geographical distribution of *Dermacentor reticulatus* in Germany and detection of *Rickettsia sp.* RpA4. *International Journal of Medical Microbiology* 40: 149-156.
- Dennig, H. K., Centurier, C., Gobel, E., Weiland, G. (1980). A contribution to canine babesiosis and its importance in the Federal Republic of Germany and Berlin-West. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*; 1980, recd 93(19).
- Deplazes, P., Eckert, J., Samson-Himmelstjerna, G. (2013). *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin*. Stuttgart, Enke.

- Dongus, H. (1994). *Hyalomma truncatum* und *Dermacentor reticulatus* (Parasitiformes: Ixodida: Ixodidae): Pheromone männlicher Adultzecken in der präparasitischen und wirtsgebundenen Phase. Dissertation, LMU München.
- Doube, B. M., Kemp, D. H. (1979). The influence of temperature, relative humidity and host factors on the attachment and survival of *Boophilus microplus* (Canestrini) larvae to skin slices. *International Journal for Parasitology* 9(5): 449-454.
- Dusbábek, F. (1996). Nymphal sexual dimorphism in the sheep tick *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae). *Folia Parasitologica* 43(1): 75-79.
- Dusbábek, F., Cerny, V., Honzakova, E., Daniel, M., Olejnicek, J. (1979). Differences in the developmental cycle of *Dermacentor reticulatus* in two closely situated biotopes. *Recent Advances in Acarology. Volume II.*; 1979: 155-157. 2 ref. New York, Academic Press.
- Dusbábek, F., Kopecky, J., Uhler, J. (1994). Effect of repeated infestations of BALB/c mice with *Ixodes ricinus* nymphs on tick-borne encephalitis virus infection. *Folia Parasitologica* 41(4): 312-316.
- Eichler, W. D. (1959). Die Zeckengattungen *Dermacentor* und *Hyalomma* auf dem Gebiete der Deutschen Demokratischen Republik. *Das deutsche Gesundheitswesen* 14: 1172.
- Elkins, D. B., Lane, R. P. (1988). An improved membrane feeder for haematophagous arthropods. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 82(2): 217-219.
- Enigk, K. (1958). Zum Vorkommen der Zecke *Dermacentor pictus* (Herm. 1804) in Deutschland. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 18(5): 419-422.
- Enigk, K., Grittner, I. (1953). Zur Zucht und Biologie der Zecken. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 16: 56-83.
- Estrada-Pena, A., Jongejan, F. (1999). Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. *Experimental & Applied Acarology* 23(9): 685-715.
- Fahrner, J., Barthelmess, C. (1988). Rearing of *Culicoides nubeculosus* (Diptera: Ceratopogonidae) by natural or artificial feeding in the laboratory. *Veterinary Parasitology* 28(4): 307-313.
- Feldman-Muhsam, B. (1970). Yeast-like symbionts of the genital system of ticks. *Journal of Parasitology Supplement* 56: 421.

- Fourie, J. J., Stanneck, D., Luus, H. G., Beugnet, F., Wijnveld, M., Jongejan, F. (2013). Transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* ticks feeding on dogs and on artificial membranes. *Veterinary parasitology* 197(3/4): 595-603.
- Galun, R. (1967). Feeding stimuli and artificial feeding. *Bull World Health Organ* 36(4): 590-593.
- Galun, R. (1978). Regulation of feeding in the tick *Ornithodoros tholozani*. Tick-borne diseases and their vectors. Edinburgh, Centre for Tropical Veterinary Medicine, University of Edinburgh: 64-67.
- Galun, R., Kindler, S. H. (1965). Glutathione as an inducer of feeding in ticks. *American Association for the Advancement of Science* 147: 166-167.
- GBIF. (2015). Global Biodiversity Information Facility. <http://www.gbif.org/>. Retrieved 01.10.2015.
- Gilot, B., Marjolet, M. (1982). Contribution to the study of human parasitism by ticks (Ixodidae and Argasidae), particularly in south-eastern France. *Medecine et Maladies Infectieuses* 12(6): 340-351.
- Gonsioroski, A. V., Bezerra, I. A., Utiumi, K. U., Driemeier, D., Farias, S. E., da Silva Vaz, I., Masuda, A. (2012). Anti-tick monoclonal antibody applied by artificial capillary feeding in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* females. *Experimental Parasitology* 130(4): 359-363.
- Gothe, R. (1999). *Zeckentoxikosen*. München, Hieronymus.
- Gothe, R., Schmid, I. (1995). Epidemiological case analysis of dogs with *Babesia* infection in Germany. *Kleintierpraxis* 40(3): 169-179.
- Gothe, R., Wegerdt, S. (1991). Die Babesiosen des Hundes in Deutschland: epidemiologische Fallanalysen. *Tierärztliche Praxis* 19(2): 170-173.
- Gothe, R., Wegerdt, S., Walden, R., Walden, A. (1989). Epidemiology of *Babesia canis* and *Babesia gibsoni* infections in dogs in Germany. *Kleintierpraxis* 34(7): 309-320.
- Graf, J. F. (1974). Ecologie et ethologie d'*Ixodes ricinus* L. en Suisse (Ixodoidea: Ixodidae). Troisieme note: copulation, nutrition et ponte. *Acarologia* 16(4).

- Graf, J. F. (1978a). Copulation, nutrition and oviposition in *Ixodes ricinus* L. (Ixodoidea: Ixodidae) - 1st part. Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft 51(1): 89-97.
- Graf, J. F. (1978b). Copulation, nutrition and oviposition in *Ixodes ricinus* L. (Ixodoidea: Ixodidae) - 3rd part. Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft 51(4): 343-360.
- Gray, J. S. (1987). Mating and behavioural diapause in *Ixodes ricinus* L. Experimental & Applied Acarology 3(1): 61-71.
- Gray, J. S. (1991). The development and seasonal activity of the tick *Ixodes ricinus*: a vector of Lyme borreliosis. Review of Medical and Veterinary Entomology 79(6): 323-333.
- Gray, J. S., Dautel, H., Estrada-Pena, A., Kahl, O., Lindgren, E. (2009). Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases(62): Article-ID: 593232.
- Gregson, J. D. (1942). Notes on the Laboratory Rearing of some Canadian Ticks (Acarina). Proceedings of the Entomological Society of British Columbia 39: 32-35.
- Gregson, J. D. (1962). Observations on the feeding of *Dermacentor andersoni* Stiles on perfused preparations. Verhandlungen 11. internationaler Kongress für Entomologie 2: 463-466.
- Gregson, J. D. (1967). Observations on the movement of fluids in the vicinity of the mouthparts of naturally feeding *Dermacentor andersoni* Stiles. Parasitology 57(pt. 1): 1-8.
- Gregson, J. D. (1973). Tick paralysis. An appraisal of natural and experimental data. Monograph, Canada Department of Agriculture; 1973. (9): 109 pp. 7 pp. ref.
- Grenacher, S., Krober, T., Guerin, P. M., Vlimant, M. (2001). Behavioural and chemoreceptor cell responses of the tick, *Ixodes ricinus*, to its own faeces and faecal constituents. Experimental and Applied Acarology 25(8): 641-660.
- Habedank, B. (1995). Untersuchungen zur Haltung und Fütterung von *Dermacentor nuttalli* Olenov, 1928 unter Laborbedingungen; ein Beitrag zur *In-vitro*-Fütterung ixodider Zecken über künstliche Membranen. Dissertation, HU Berlin.

- Habedank, B., Hiepe, T. (1993). *In vitro* feeding of ticks, *Dermacentor nuttalli*, Olenev 1928 (Acari Ixodidae) on a silicon membrane. *Dermatologische Monatsschrift* 179(9): 292-295.
- Habedank, B., Hiepe, T., Montag, C. (1994). Untersuchungen zur *In-vitro*-Fütterung von Zecken – Argasidae und Ixodidae. *Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie* 16: 107-114.
- Haddon jr, W. (1956). The Maintenance of the Human Body Louse *Pediculus humanus corporis* through complete Cycles of Growth by serial Feeding through artificial Membranes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 5(2): 326-330.
- Häfner, P., Ludwig, H. W. (1969). A method for membrane-feeding of the hog louse *Haematopinus suis*. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 33(2): 177-182.
- Haller, G. (1882). Beitrag zur Kenntnis der Milbenfauna Württembergs. Verein für vaterländische Naturkunde in Württemberg, Stuttgart.
- Hamann, H. J., Iwannek, K. H. (1981). The inactivation of bacteria potentially present in the diet of *in-vitro* fed tsetse flies. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene* 136(3): 228-231.
- Hammad, A. A. (2008). Microbiological aspects of radiation sterilization. *Trends in radiation sterilization of health care products*, IAEA (International Atomic Energy Agency): 119-128.
- Hancock, P. A., Brackley, R., Palmer, S. C. F. (2011). Modelling the effect of temperature variation on the seasonal dynamics of *Ixodes ricinus* tick populations. *International Journal for Parasitology* 41(5): 513-522.
- Hindle, E., Merriman, G. (1912). The sensory perceptions of *Argas persicus* (Oken). *Parasitology* 5: 203-216.
- Honzakova, E. (1971). Development of some tick species under standard laboratory conditions. *Folia Parasitologica* 18(4): 357-363.
- Honzakova, E., Olejnicek, J., Cerny, V., Daniel, M., Dusbabek, F. (1975). Relationship between number of eggs deposited and body weight of engorged *Ixodes ricinus* female. *Folia Parasitologica* 22(1): 37-43.
- Hornok, S., Farkas, R. (2009). Influence of biotope on the distribution and peak activity of questing ixodid ticks in Hungary. *Medical and Veterinary Entomology* 23(1): 41-46.

- Hosoi, T. (1958). Adenosine-5'-phosphates as the stimulating agent in blood for inducing gorging of the mosquito. *Nature* 181(4624): 1664-1665.
- Hosoi, T. (1959). Identification of blood components which induce gorging on the mosquito. *Journal of Insect Physiology* 3: 191-218.
- Howarth, J. A., Hokama, Y. (1978). Studies with *Ornithodoros coriaceus* Koch (Acarina: Argasidae), the suspected vector of epizootic bovine abortion. Tick-borne diseases and their vectors. Edinburgh, Centre for Tropical Veterinary Medicine, University of Edinburgh: 168-176.
- Howarth, J. A., Hokama, Y. (1983). Artificial feeding of adult and nymphal *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) during studies on bovine anaplasmosis. *Journal of Medical Entomology* 20(3): 248-256.
- Hubalek, Z., Halouzka, J., Juricova, Z. (2003). Host-seeking activity of ixodid ticks in relation to weather variables. *Journal of Vector Ecology* 28(2): 159-165.
- Hunt, G. J., McKinnon, C. N. (1990). Evaluation of membranes for feeding *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae) with an improved artificial blood-feeding apparatus. *Journal of Medical Entomology* 27(5): 934-937.
- Immler, R., Aeschlimann, A., Buttiker, W., Diehl, P. A., Eichen-Berger, G., Weiss, N. (1970). On the occurrence of Dermacentorticks (Ixodoidca) in Switzerland. *Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft* 43(2): 99-110.
- Immler, R. M. (1973). Untersuchungen zur Biologie und Ökologie der Zecke *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794) (Ixodidae) in einem endemischen Vorkommensgebiet. Dissertation, Universität Basel.
- Jongejan, F., Uilenberg, G. (2004). The global importance of ticks. (Special issue: Ticks: biology, disease and control). *Parasitology* 129(Supplement): S3-S14.
- Jöns, O. (2001). Klinische Wirksamkeit und Wirkmodus von Flumethrin Spray gegen Zecken am Hund. Dissertation, FU Berlin.
- Kahl, O. (1982). Untersuchung zur saisonalen und diurnalen Aktivität von *Ixodes ricinus* L. (Ixodidea, Ixodidae) in West-Berlin unter dem besonderen Aspekt ihrer Beeinflussung durch mikro- und makroklimatische Faktoren. Diplomarbeit, FU Berlin.

- Karbowiak, G. (2014). The occurrence of the *Dermacentor reticulatus* tick - its expansion to new areas and possible causes. *Annals of Parasitology* 60(1): 37-47.
- Kaufman, W. R. (2007). Gluttony and sex in female ixodid ticks: how do they compare to other blood-sucking arthropods? (Special issue: Physiology of vector arthropods). *Journal of Insect Physiology* 53(3): 264-273.
- Keirans, J. E. (2009). Order Ixodida. A manual of Acarology, 3rd ed. Krantz, G. W., Walter, D. E. Lubbock, Texas Tech University Press: 111-123.
- Kemp, D. H. (1980). The effect of host resistance on survival and feeding of the cattle tick *Boophilus microplus*. Ticks and tick-borne diseases. Proceedings of a symposium held at the 56th annual conference of the Australian Veterinary Association, Townsville, 14-18 May 1979. Artarmon, Australian Veterinary Association.
- Kemp, D. H., Agbede, R. I. S., Johnston, L. A. Y., Gough, J. M. (1986). Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: feeding and survival of the parasite on vaccinated cattle. *International Journal of Parasitology* 16(2): 115-120.
- Kemp, D. H., Bourne, A. (1980). *Boophilus microplus*: the effect of histamine on the attachment of cattle-tick larvae - studies *in vivo* and *in vitro*. *Parasitology* 80(3): 487-496.
- Kemp, D. H., Koudstaal, D., Roberts, J. A., Kerr, J. D. (1975). Feeding of *Boophilus microplus* larvae on a partially defined medium through thin slices of cattle skin. *Parasitology* 70(2): 243-254.
- Kemp, D. H., Stone, B. F., Binnington, K. C. (1982). Tick attachment and feeding: Role of the mouthparts, feeding apparatus, salivary gland secretions and the host response. *Physiology of ticks*. Obenchain, F. D., Galun, R. Oxford: 119-163.
- Kloft, W., Schlagbauer, A. (1965). Apparatur zur Massenfütterung blutsaugender Insekten durch künstliche Membranen. *Biologisches Zentralblatt* 84: 181-184.
- Klunker, R. (1979). Überblick über die *In-vitro*-Fütterung blutsaugender Arthropoden. *Angewandte Parasitologie* 20(2): 88-108.
- Kocan, K. M., Yoshioka, J., Sonenshine, D. E., Fuente, J. d. l., Ceraul, S. M., Blouin, E. F., Almazan, C. (2005). Capillary tube feeding system for studying tick-pathogen interactions of *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) and *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae). *Journal of Medical Entomology* 42(5): 864-874.

- Kollmann, G., Shapiro, B., Martin, D. (1969). The Mechanism of Radiation Hemolysis in Human Erythrocytes. *Radiation Research* 37(3): 551-566.
- Kröber, T., Guerin, P. (2007). The tick blood meal: from a living animal or from a silicone membrane? *Altex* 24 Spec No: 39-41.
- Kröber, T., Guerin, P. M. (2007a). An *in vitro* feeding assay to test acaricides for control of hard ticks. *Pest Management Science* 63(1): 17-22.
- Kröber, T., Guerin, P. M. (2007b). *In vitro* feeding assays for hard ticks. *Trends in Parasitology* 23(9): 445-449.
- Kuhnert, F. (1995). Untersuchungen zur *in vitro* Zucht von Schildzecken (Acari: Ixodidae). Dissertation, Université de Neuchâtel.
- Kuhnert, F., Diehl, P. A., Guerin, P. M. (1995). The life-cycle of the bont tick *Amblyomma hebraeum* *in vitro*. *International Journal for Parasitology* 25(8): 887-896.
- Kuhnert, F., Issmer, A. E., Grunewald, J. (1998). Teilautomatisierte *in vitro* Fütterung adulter Schildzecken (*Amblyomma hebraeum*). *ALTEX* 15(2): 67-72.
- Labruna, M. B., Leite, R. C., Oliveira, P. R. d. (1997). Study of the weight of eggs from six ixodid species from Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 92(2): 205-207.
- Lalzar, I., Friedmann, Y., Gottlieb, Y. (2014). Tissue tropism and vertical transmission of *Coxiella* in *Rhipicephalus sanguineus* and *Rhipicephalus turanicus* ticks. (Special Issue: Symbionts.). *Environmental Microbiology* 16(12): 3657-3668.
- Lamontellerie, M. (1965). Les tiques (Acarina, Ixodoidea) du sud-ouest de la France. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 40(1): 87-100.
- Lees, A. D. (1948). The sensory Physiology of the Sheep Tick, *Ixodes ricinus* L. *Journal of Experimental Biology* 25(2): 145-207.
- Lemos, G. S. D., Márquez-Bernardes, L. F., Arvelos, L. R., Paraíso, L. F., Penha-Silva, N. (2011). Influence of Glucose Concentration on the Membrane Stability of Human Erythrocytes. *Cell Biochemistry and Biophysics* 61(3): 531-537.
- Liebisch, A., Brandes, R., Hoppenstedt, K. (1985). Tick and flea infections of dogs and cats in the German Federal Republic. *Der Praktische Tierarzt* 66(10): 817-824.

- Liebisch, A., Rahman, M. S. (1976). Prevalence of the ticks *Dermacentor marginatus* (Sulzer, 1776) and *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794) and their importance as vectors of diseases in Germany. *Tropenmedizin und Parasitologie* 27(4): 393-404.
- Lindgren, E., Talleklint, L., Polfeldt, T. (2000). Impact of climatic change on the northern latitude limit and population density of the disease-transmitting European tick *Ixodes ricinus*. *Environmental Health Perspectives* 108(2): 119-123.
- Lomas, L., Kaufman, W. R. (1999). What is the meaning of 'critical weight' to female ixodid ticks?: A 'grand unification theory!'. International Congress of Acarology IX, Columbus, Ohio, Ohio Biological Survey.
- Loomis, E. C. (1961). Life histories of ticks under laboratory conditions (Acarina: Ixodidae and Argasidae). *Journal of Parasitology* 47: 91-99.
- Mands, V., Kline, D. L., Blackwell, A. (2004). Culicoides midge trap enhancement with animal odour baits in Scotland. *Medical and Veterinary Entomology* 18(4): 336-342.
- Mango, C. K. A., Galun, R. (1977). *Ornithodoros moubata*: breeding *in vitro*. *Experimental Parasitology* 42(2): 282-288.
- Maroli, M. (1985). The artificial feeding of laboratory reared palearctic sandflies (Diptera: Psychodidae) for studies on the transmission of disease agents. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 60(5): 631-634.
- Martinod, S., Gilot, B. (1991). Epidemiology of canine babesiosis in relation to the activity of *Dermacentor reticulatus* in southern Jura (France). *Experimental & Applied Acarology* 11(2,3): 215-222.
- Materna, J., Daniel, M., Metelka, L., Hrcarik, J. (2008). The vertical distribution, density and the development of the tick *Ixodes ricinus* in mountain areas influenced by climate changes (The Krkonose Mts., Czech Republic). *International Journal of Medical Microbiology* 44: 25-37.
- McCosker, P. J. (1979). Global aspects of the management and control of ticks of veterinary importance. *Recent Advances in Acarology. Volume II*; 1979: 45-53. 15 ref. New York, Academic Press.
- Menn, B. (2006). Untersuchungen zur Verbreitung und Ökologie von *Dermacentor spec.* (Ixodidae, Acari) in Deutschland. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

- Metianu, T. (1951). Contribution a l'étude des ixodidés de Roumanie. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 26: 446-463.
- Mews, A. R., Baumgartner, H., Luger, D., Offori, E. D. (1976). Colonisation of *Glossina morsitans morsitans* Westw. (Diptera, Glossinidae) in the laboratory using *in vitro* feeding techniques. *Bulletin of Entomological Research* 65(4): 631-642.
- Meyer-König, A. (1999). Zur Wasserbalancierung nüchterner Adultzecken von *Dermacentor marginatus* und *Dermacentor reticulatus* (Ixodida, Ixodidae). Dissertation, LMU München.
- Milne, A. (1944). The Ecology of the Sheep Tick, *Ixodes ricinus* L. Distribution of the Tick in Relation to Geology, Soil and Vegetation in northern England. *Parasitology* 35(4): 186-196.
- Milne, A. (1945). The Ecology of the Sheep Tick, *Ixodes ricinus* L. The seasonal Activity in Britain with particular Reference to northern England. *Parasitology* 36(3-4): 142-152.
- Milne, A. (1949). The Ecology of the Sheep Tick, *Ixodes ricinus* L. Host Relation-ships of the Tick. Part 2. Observations on Hill and Moorland Grazings in northern England. *Parasitology* 39(3-4): 173-197.
- Milne, A. (1950). The Ecology of the Sheep Tick, *Ixodes ricinus* L. Spatial Distribution. *Parasitology* 40(1-2): 35-45.
- Mokry, J. E. (1976). A simplified membrane technique for feeding blackflies (Diptera: Simuliidae) on blood in the laboratory. *Bulletin of the World Health Organization* 53(1): 127-129.
- 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(4): 675-679.
- Moura, S. T. d., Fonseca, A. H. d., Fernandes, C. G. N., Butler, J. F. (1997). Artificial feeding of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) through silicone membrane. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 92(4): 545-548.
- Mudrow, E. (1932). Über die intrazellulären Symbionten der Zecken. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 5(1): 138-183.

- Musyoki, J. M., Osir, E. O., Kiara, H. K., Kokwaro, E. D. (2004). Comparative studies on the infectivity of *Theileria parva* in ticks fed *in vitro* and those fed on cattle. *Experimental and Applied Acarology* 32(1/2): 51-67.
- Myers, D. K., Bide, R. W. (1966). Biochemical Effects of X-Irradiation on Erythrocytes. *Radiation Research* 27(2): 250-263.
- Narasimhan, S., Rajeevan, N., Liu, L., Zhao, Y. O., Heisig, J., Pan, J. Y., Eppler-Epstein, R., DePonte, K., Fish, D., Fikrig, E. (2014). Gut microbiota of the tick vector *Ixodes scapularis* modulate colonization of the Lyme disease spirochete. *Cell Host & Microbe* 15(1): 58-71.
- Negrobov, V. P., Borodin, V. S. (1964). Einige seltene Zeckenfunde im mittleren Teil der DDR. *Angewandte Parasitologie* 5(Pt. 2): 107-111.
- Nicolle, P. (1941). An apparatus for the artificial feeding of reduvid bugs. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 34: 179-185.
- Ninio, C., Plantard, O., Serra, V., Pollera, C., Ferrari, N., Cafiso, A., Sasser, D., Bazzocchi, C. (2015). Antibiotic treatment of the hard tick *Ixodes ricinus*: influence on *Mitochondria* load following blood meal. *Ticks and Tick borne Diseases* 6(5): 653-657.
- Noda, H., Munderloh, U. G., Kurtti, T. J. (1997). Endosymbionts of ticks and their relationship to *Wolbachia* spp. and tick-borne pathogens of humans and animals. *Applied and Environmental Microbiology* 63(10): 3926-3932.
- Nosek, J. (1972). The ecology and public health importance of *Dermacentor marginatus* and *D. reticulatus* ticks in central Europe. *Folia Parasitologica* 19(1): 93-102.
- Nosek, J. (1979). Overwintering cycles in *Dermacentor* ticks. *Angewandte Parasitologie* 20(1): 34-37.
- Nuttall, G. H. F. (1913). Observations on the Biology of Ixodidae, Pt. I. *Parasitology* 6(1): 68-118.
- Osborne, R. W., Mellor, P. S. (1985). Use of a silicone membrane feeding technique in the laboratory maintenance of a colony of *Ornithodoros moubata*. *Tropical Animal Health and Production* 17(1): 31-38.

- Otieno, D. A., Hassanali, A., Obenchain, F. D., Sternberg, A., Galun, R. (1985). Identification of guanine as an assembly pheromone of ticks. *Insect Science and its Application* 6(6): 667-670.
- Paine, S. H., Kemp, D. H., Allen, J. R. (1983). *In vitro* feeding of *Dermacentor andersoni* (Stiles): effects of histamine and other mediators. *Parasitology* 86 (Pt. 3): 419-428.
- Perret, J. L., Guerin, P. M., Diehl, P. A., Vlimant, M., Gern, L. (2003). Darkness induces mobility, and saturation deficit limits questing duration, in the tick *Ixodes ricinus*. *Journal of Experimental Biology* 206(11): 1809-1815.
- Petney, T. N., Pfaffle, M. P., Skuballa, J. D. (2012). An annotated checklist of the ticks (Acari: Ixodida) of Germany. *Systematic and Applied Acarology* 17(2): 115-170.
- Pierce, A. E., Pierce, M. H. (1956). A Note on the Cultivation of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Ixodidae: Acarina) on the embryonated Hen Egg. *Australian Veterinary Journal* 32(6): 144-146.
- Porretta, D., Mastrantonio, V., Amendolia, S., Gaiarsa, S., Epis, S., Genchi, C., Bandi, C., Otranto, D., Urbanelli, S. (2013). Effects of global changes on the climatic niche of the tick *Ixodes ricinus* inferred by species distribution modelling. *Parasites and Vectors* 6(271).
- Purnell, R. E., Joyner, L. P. (1967). Artificial feeding technique for *Rhipicephalus appendiculatus* and the transmission of *Theileria parva* from the salivary secretion. *Nature* 216(5114): 484-485.
- Rechav, Y., Zyzak, M., Fielden, L. J., Childs, J. E. (1999). Comparison of methods for introducing and producing artificial infection of ixodid ticks (Acari: Ixodidae) with *Ehrlichia chaffeensis*. *Journal of Medical Entomology* 36(4): 414-419.
- Roberts, J. A. (1971). Behavior of Larvae of the Cattle Tick, *Boophilus microplus* (Canestrini), on Cattle of Differing Degrees of Resistance. *The Journal of Parasitology* 57(3): 651-656.
- Rubel, F., Brugger, K., Monazahian, M., Habedank, B., Dautel, H., Leverenz, S., Kahl, O. (2014). The first German map of georeferenced ixodid tick locations. *Parasites and Vectors* 7(477).
- Rutledge, L. C., Ward, R. A., Gould, D. J. (1964). Studies on the feeding response of mosquitoes to nutritive solutions in a new membrane feeder. *Mosquito News* 24(4): 407-419.

- Sassera, D., Beninati, T., Bandi, C., Bouman, E. A., Sacchi, L., Fabbi, M., Lo, N. (2006). '*Candidatus Midichloria mitochondrii*', an endosymbiont of the tick *Ixodes ricinus* with a unique intramitochondrial lifestyle. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56(Pt. 11): 2535-2540.
- Schulz, M., Mahling, M., Pfister, K. (2014). Abundance and seasonal activity of questing *Ixodes ricinus* ticks in their natural habitats in southern Germany in 2011. *Journal of Vector Ecology* 39(1): 56-65.
- Schulze, P. (1925). Endemisches Vorkommen einer Mediterranen Zecke (*Dermacentor reticulatus* F.) in Deutschland. *Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere* 3(5): 704-705.
- Schulze, P. (1933). Die Arten der Zeckengattung *Dermacentor* s. 1. aus Europa, Asien und Neu-Guinea. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 6(3): 416-431.
- Sieberz, J., Gothe, R. (2000). Modus operandi of oviposition in *Dermacentor reticulatus* (Acari: Ixodidae). *Experimental & Applied Acarology* 24(1): 63-76.
- Simo, L., Kocakova, P., Slavikova, M., Kubes, M., Hajnicka, V., Vancova, I., Slovak, M. (2004). *Dermacentor reticulatus* (Acari, Ixodidae) female feeding in laboratory. *Biologia* 59(5): 655-660.
- Slovak, M., Labuda, M., Marley, S. E. (2002). Mass laboratory rearing of *Dermacentor reticulatus* ticks (Acarina, Ixodidae). *Biologia* 57(2): 261-266.
- Soares, S. F., Louly, C. C. B., Marion-Poll, F., Ribeiro, M. F. B., Borges, L. M. F. (2013). Study on cheliceral sensilla of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) involved in taste perception of phagostimulants. *Acta Tropica* 126(1): 75-83.
- Sonenshine, D. E. (1985). Pheromones and other semiochemicals of the Acari. *Annual Review of Entomology* 30: 1-28.
- Sonenshine, D. E. (2004). Pheromones and other semiochemicals of ticks and their use in tick control. (Special issue: Ticks: biology, disease and control). *Parasitology* 129(Supplement): 405-425.
- Sonenshine, D. E. (2014). *Biology of ticks, Vol. I*. New York (u.a.), Oxford Univ. Press.

- Sonenshine, D. E., Silverstein, R. M., Rechav, Y. (1982). Tick Pheromone Mechanisms. Physiology of Ticks. Obenchain, F. D., Galun, R. Oxford: 439-468.
- Sonenshine, D. E., Taylor, D., Carson, K. A. (1986). Chemically mediated behavior in Acari: adaptations for finding hosts and mates. Journal of Chemical Ecology 12(5): 1091-1108.
- Stender-Seidel, S., Böckeler, W. (1989). Reactions of tick *Ixodes ricinus* intestines after capillary-feeding with and without *Borrelia burgdorferi* (Spirochaetaceae). Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft 82: 292.
- Stone, B. F., Commins, M. A., Kemp, D. H. (1983). Artificial feeding of the Australian paralysis tick, *Ixodes holocyclus* and collection of paralyzing toxin. International Journal for Parasitology 13(5): 447-454.
- Szymanski, S. (1986). Distribution of the tick *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794) (Ixodidae) in Poland. Acta Parasitologica Polonica 31(16): 143-154.
- Tajeri, S., Razmi, G. R. (2011). *Hyalomma anatolicum anatolicum* and *Hyalomma dromedarii* (Acari: Ixodidae) imbibe bovine blood *in vitro* by utilizing an artificial feeding system. Veterinary Parasitology 180(3/4): 332-335.
- 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(6): 795-799.
- Tarshis, I. B. (1958). A preliminary Study on Feeding *Ornithodoros savignyi* (Audouin) on human Blood through Animal-derived Membranes (Acarina: Argasidae). Annals of the Entomological Society of America 51(3): 294-299.
- Totze, R. (1933). Beiträge zur Sinnesphysiologie der Zecken. Zeitschrift für Vergleichende Physiologie 19(1): 110-161.
- Tovornik, D., Soos, E. (1976). On the colour of the unfed female of *Ixodes gibbosus* Nuttall, 1916 found in the TBE focus on the island of Brac. Rad Jugoslavenska Akademija Znanostii Umjetnosti 372: 115-116.
- Uilenberg, G. (1992). Veterinary significance of ticks and tick-borne diseases. Tick vector biology: medical and veterinary aspects. Berlin, Springer-Verlag: 23-33.

- Ullah, S. A. K. M., Kaufman, W. R. (2014). Salivary gland degeneration and ovary development in the Rocky Mountain wood tick, *Dermacentor andersoni* stiles (Acari: Ixodidae). II. Determination of the 'critical weight'. Ticks and Tick borne Diseases 5(5): 516-522.
- Vega, R. d. l., Camejo, A., Fonseca, A. H. (2004). An automatic system to feed ticks through membranes. Revista de Salud Animal 26(3): 202-205.
- Vega, R. d. l., Diaz, G., Finlay, L. (2000). Artificial feeding in *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae) through micropipettes. Annals of the New York Academy of Sciences 916: 315-319.
- Vogel, R. (1924). *Dermacentor reticulatus* F. in Württemberg. Zentralbl Bakteriol I Abt Orig 93: 380.
- Voigt, W. P., Young, A. S., Mwaura, S. N., Nyaga, S. G., Njihia, G. M., Mwakima, F. N., Morzaria, S. P. (1993). *In vitro* feeding of instars of the ixodid tick *Amblyomma variegatum* on skin membranes and its application to the transmission of *Theileria mutans* and *Cowdria ruminantium*. Parasitology 107(3): 257-263.
- Wade, S. E., Georgi, J. R. (1988). Survival and reproduction of artificially fed cat fleas, *Ctenocephalides felis* Bouche (Siphonaptera: Pulicidae). Journal of Medical Entomology 25(3): 186-190.
- Waladde, S. M., Kemp, D. H., Rice, M. J. (1979). Feeding electrograms and fluid uptake measurements of cattle tick *Boophilus microplus* attached to artificial membranes. International Journal for Parasitology 9(2): 89-95.
- Waladde, S. M., Ochieng, S. A., Gichuhi, P. M. (1991). Artificial-membrane feeding of the ixodid tick, *Rhipicephalus appendiculatus*, to repletion. Experimental & Applied Acarology 11(4): 297-306.
- Waladde, S. M., Rice, M. J. (1982). The Sensory Basis of Tick Feeding Behaviour. Physiology of Ticks. Obenchain, F. D., Galun, R. Oxford: 71-118.
- Waladde, S. M., Young, A. S., Mwaura, S. N., Njihia, G. N., Mwakima, F. N. (1995). Optimization of the *in vitro* feeding of *Rhipicephalus appendiculatus* nymphae for the transmission of *Theileria parva*. Parasitology 111(4): 463-468.
- Waladde, S. M., Young, A. S., Ochieng, S. A., Mwaura, S. N., Mwakima, F. N. (1993). Transmission of *Theileria parva* to cattle by *Rhipicephalus appendiculatus* adults fed

- as nymphae *in vitro* on infected blood through an artificial membrane. *Parasitology* 107(3): 249-256.
- Walter, G., Kock, D., Liebisch, A. (1986). Contribution to the tick fauna of the German Federal Republic (Arachnida: Acarina: Ixodidae). *Senckenbergiana Biologica* 67(1-3): 199-206.
- Weis, L. M. (2014). *Dermacentor reticulatus* und *Babesia canis*: eine Feldstudie zum Vorkommen in Bayern mit anschließender digitaler Geländeanalyse. Dissertation, LMU München.
- Weiss, B. L., Kaufman, W. R. (2001). The relationship between 'critical weight' and 20-hydroxyecdysone in the female ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. *Journal of Insect Physiology* 47(11): 1261-1267.
- Wetzel, H. (1979). Artificial membrane for *in vitro* feeding of piercing-sucking arthropods. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 25(1): 117-119.
- Wetzel, H. (1980). The use of freeze-dried blood in the membrane feeding of tsetse flies (*Glossina p. palpalis*, Diptera: Glossinidae). *Tropenmedizin und Parasitologie* 31(3): 259-274.
- Willadsen, P., Kemp, D. H., McKenna, R. V. (1984). Bloodmeal ingestion and utilization as a component of host specificity in the tick, *Boophilus microplus*. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 70(3): 415-420.
- Winston, P. H., Bates, D. H. (1960). Saturated solutions for control of humidity in biological research. *Ecology* 41: 232-237.
- Yao, W. P., Chen, K. T. (1981). Relation between post-meal body weight and egg production in *Dermacentor silvarum* Olenov. *Acta Entomologica Sinica* 24(4): 403-406.
- Yoeli, M. (1938). Note on the experimental Infection of *Anopheles elutus* with *Plasmodium falciparum* by feeding through a prepared animal Membrane. *Rivista di Malariologia* 17(1): 62-66.
- Zahler, M. (1994). Zur Ökologie von *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794) (Parasitiformes: Ixodida: Ixodidae). Dissertation, LMU München.
- Zahler, M., Gothe, R. (1995a). Effect of temperature and humidity on egg hatch, moulting and longevity of larvae and nymphs of *Dermacentor reticulatus* (Ixodidae). *Applied Parasitology* 36(1): 53-65.

- Zahler, M., Gothe, R. (1995b). Effect of temperature and humidity on longevity of unfed adults and on oviposition of engorged females of *Dermacentor reticulatus* (Ixodidae). *Applied Parasitology* 36(3): 200-211.
- Zahler, M., Gothe, R. (1997a). Evidence for the reproductive isolation of *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* (Acari: Ixodidae) ticks based on cross-breeding, morphology and molecular studies. *Experimental & Applied Acarology* 21(10/11): 685-696.
- Zahler, M., Gothe, R. (1997b). Risk of new endemic foci of *Babesia canis* transmitted by *Dermacentor reticulatus* in Germany. An epidemiological study. *Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere/Heimtiere* 25(6): 666-670.
- Zahler, M., Loster, F., Merkle, C., Rinder, H., Gothe, R. (2000a). Risk of infection for dogs in Regensburg - a new endemic focus of *Babesia canis* and *Dermacentor reticulatus* in Germany. *Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere* 28(6): 395-398.
- Zahler, M., Steffen, T., Lutz, S., Hahnel, W. C., Rinder, H., Gothe, R. (2000b). *Babesia canis* and *Dermacentor reticulatus* in Munich: a new endemic focus in Germany. *Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere* 28(2): 116-120.

Publikationen

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits veröffentlicht:

Böhme, B., Bauer, B., Clausen, P.-H., Nijhof, A. M. (2013). *In-Vitro*-Fütterung der Auwaldzecke *Dermacentor reticulatus*. Aktuelle Erkenntnisse aus der Veterinärparasitologie – Tagung der DVG-Fachgruppe Parasitologie und Parasitäre Krankheiten, 8.–10.07.2013, Gießen, DVG

Böhme, B., Krull, C., Clausen, P.-H., Nijhof, A. M. (2014). OAKS: optimization and automation of artificial tick feeding. Joint 8th International Ticks and Tick-borne Pathogens (TTP-8) and 12th Biennial Society for Tropical Veterinary Medicine (STVM) Conference, 24.–29.08.2014, Cape Town

Böhme, B., Bauer, B., Clausen, P.-H., Nijhof, A. M. (2014). *In-vitro*-feeding of *Dermacentor reticulatus*. Workshop on Ticks and Tick-borne Diseases, 30.09.–02.10.2014, Berlin, Umweltbundesamt/Friedrich-Löffler-Institut

Nijhof, A. M., Böhme, B., Krull, C. (2015). Artificial feeding and infection of ticks. Workshop on Ticks and Tick-transmitted Diseases, 26.–27.03.2015, Český Krumlov

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Peter-Henning Clausen für das Ermöglichen der Durchführung des Projektes am Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der FU Berlin, für seine jederzeit freundliche Betreuung sowie die Korrektur der Dissertation.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Dr. Ard Nijhof für die Überlassung des interessanten Themas, seine stete fachliche Anleitung und Hilfsbereitschaft, seine Unterstützung bei den zeitaufwändigen Zeckenfütterungen und die Korrektur der Dissertation.

Für seine wertvollen Ratschläge und Anregungen in der Versuchsplanung möchte ich außerdem Herrn Dr. Burkhard Bauer danken.

Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung danke ich für die finanzielle Unterstützung bei der Beschaffung von Materialien (Förderkennzeichen: 031A228; Optimierung und Automatisierung der künstlichen Schildzeckenfütterung).

Für ihre stetige, zuverlässige und unkomplizierte Hilfe bei der Blutgewinnung bedanke ich mich ganz herzlich bei den Mitarbeitern der Schlachthöfe Hakenberger Fleisch GmbH und Kaninchenspezialitäten aus Beelitz Ulrich Schmidt oHG, sowie bei Herrn Holder aus dem Institut für Veterinär-Biochemie der FU Berlin für seine freundliche Hilfe bei der Rotationsverdampfung und beim Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der FU Berlin für die Erregerdifferenzierung im Futterblut. Den Mitarbeitern der Glasbläserei (Institut für Chemie, TU Berlin) danke ich für ihre exzellente, professionelle und schnelle Realisierung der Glas-Durchfluskkammern – besser hätten die Kammern nicht werden können!

Und für die Beratung in Sachen Statistik möchte ich mich bei Frau Pflieger und Herrn Deutsch von der fu:stat bedanken.

Ein großer Dank geht außerdem an die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Institutes für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der FU Berlin für die angenehme Zusammenarbeit und die Hilfe bei der praktischen Arbeit im Labor oder beim Zeckenfang, und besonders an Frau Hoffmann-Köhler für ihre Hilfe bei der *In-vivo*-Zeckenzucht.

Einen wichtigen Anteil am Entstehen dieser Arbeit haben meine wunderbaren Mitdotorandinnen und -dotoranden und Postdocs. Ihr habt meine Doktorarbeit durch euren Humor und Zusammenhalt, unsere gemeinsamen Mensagänge und Aktivitäten zu einer schönen und unvergesslichen Zeit gemacht.

Mein größter Dank gilt meinen Freunden, meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, sowie meinem Freund Sebastian. Ich danke euch von ganzem Herzen für euer unermüdliches Verständnis und eure liebevolle und bedingungslose Unterstützung.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 15.06.2016

Bettina Böhme