Einschleppung von Krankheitserregern aus dem mediterranen Raum

innerhalb des Forschungsprogramms
Herausforderung Klimawandel Baden-Württemberg

Peter Kimmig [(1)], Ute Mackenstedt [(1)], Torsten Naucke [(1)], Rainer Oehme [(2)], Silvia Pluta (1)

[(1)] Institut für Zoologie, Fachrichtung Parasitologie
Universität Hohenheim

[(2)] Landesgesundheitsamt
Regierungspräsidium Stuttgart

2009

Inhaltsverzeichnis

Teilprojekt „Dermacentor-Zecken als Überträger von Q-Fieber (Coxiella burnetii) und Mittelmeerfleckfieber (Rickettsia conorii)“ 3

Teilprojekt „Sandmücken als Überträger von Leishmaniosen (Leishmania infantum) und Sandmückenfieber (Phleboviren)“.....17

Teilprojekt „Dermacentor-Zecken als Überträger von Q-Fieber (Coxiella burnetii) und Mittelmeerfleckfieber (Rickettsia conorii)“

innerhalb des Forschungsprogramms
Herausforderung Klimawandel Baden-Württemberg

Peter Kimmig [(1)], Ute Mackenstedt [(1)], Rainer Oehme [(2)], Silvia Pluta [(1)]

[(1)] Institut für Zoologie, Fachrichtung Parasitologie
Universität Hohenheim

[(2)] Landesgesundheitsamt
Regierungspräsidium Stuttgart

2009

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Zielsetzung 5
1.1 Vektor: *Dermacentor* spp. 5
1.2 *Coxiella burnettii* 5
1.3 *Rickettsia* spp. 6
1.4 Zielsetzung 6
2 Material und Methoden 7
2.1 Material 7
2.1.1 Zecken 7
2.1.2 Nager 7
2.2 Molekularbiologische Methoden 7
2.2.1 DNA-Extraktion 7
2.2.2 Nachweis von *Coxiella burnetti* mittels PCR 8
2.2.3 Nachweis von *Rickettsia* spp. 8
2.2.4 Sequenzierung 9
2.3 Serologische Methoden 9
2.3.1 Nachweis von Coxiella burnetii -Antikörpern mittels ELISA 9
3 Ergebnisse 10
3.1 Sammeln von Zecken und Nagern 10
3.2 Nachweis von *Coxiella burnetii* 11
3.3 Nachweis von *Rickettsia* spp 11
4. Diskussion 12
4.1 *Coxiella burnetii* 12
4.2 *Rickettsia* spp. 13
5. Ausblick 14
Literatur 14

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Vektor: *Dermacentor* spp.

In Deutschland sind zwei Vertreter der Gattung *Dermacentor* endemisch: die Schafzecke *Dermacentor marginatus* sowie die Auwaldzecke *Dermacentor reticulatus*. *D. marginatus* ist eine wärmeliebende Zecke, die für ihren Entwicklungszyklus warme und trockene Habitate benötigt. Ihr Vorkommen in Deutschland ist daher auf wenige Stellen beschränkt. Diese befinden sich vor allem im südlichen Rheintal von Lörrach in Baden-Württemberg bis nach Mainz in Rheinland-Pfalz, sowie im Maintal von Mainz ostwärts bis nach Bamberg in Bayern (Liebisch und Rahmann., 1976).

D. reticulatus ist dagegen an kühlere und feuchtere Bedingungen angepasst und zeigt daher eine weitere geografische Verbreitung. Populationen dieser Zeckenart wurden sowohl in Süddeutschland (z.B. in Freiburg und Karlsruhe) als auch im Osten Deutschlands in Sachsen und Berlin gefunden (Dautel et al., 2006). Sowohl *D. marginatus* als auch *D. reticulatus* dienen als Vektoren für verschiedene Pathogene, darunter *Coxiella burnetii* und *Rickettsia* spp. (Parola und Raoult., 2001).

1.2 *Coxiella burnettii*

Coxiella burnetii, der Erreger des Q-Fiebers, ist ein obligat intrazellulärer Vertreter der γ-Proteobakterien, Ordnung Legionellales. Coxiellen treten in zwei unterschiedlichen Stadien auf. Die so genannte large cell variant (LCV) ist intrazellulär und befällt vor allem Makrophagen. Ausgehend von dieser Form wird die sporenähnliche small cell variant (SCV) gebildet, die metabolisch inaktiv und sehr widerstandsfähig gegenüber Umwelteinflüssen wie UV-Strahlung und Austrocknung ist. Daher kann diese Form in der Umwelt über mehrere Wochen oder Monate infektiös bleiben (Maurin und Raoult, 1999).

Liebisch beschrieb 1977 den komplexen Lebenszyklus von *C. burnetii* (Liebisch, 1977). Danach werden die Bakterien in einem basalen oder haploxenischen Zyklus von Zeckenlarven und -nymphen auf Nager und andere kleine Säugetiere übertragen. Diese Zirkulation wird auch als Naturherd bezeichnet. Adulte Zecken, die im Falle von *Dermacentor* spp. im Frühjahr und Herbst auftreten, infizieren größere Wild- und Haustiere, vor allem Rotwild, Ziegen und Schafe. Infizierte Tiere scheiden mit dem Kot (Zecken) bzw. mit Geburtsflüssigkeiten (Säugetiere) enorme Mengen der hochinfektiösen SCVs aus und kontaminieren auf diese Weise ihre Umgebung. Im zweiten oder hemixenischen Teil des Zyklus ist kein Vektor in die Übertragung der Bakterien eingeschaltet; in diesem Fall infizieren sich die Wirte durch Inhalation von erregerhaltigen Aerosolen. Heiße, trockene Wetterbedingungen sowie Wind erleichtern die Verbreitung der SCVs und erhöhen somit das Infektionsrisiko. Erkrankungen durch den Verzehr roher Milch (alimentäre Infektionen) sind ebenfalls möglich, kommen allerdings nur sehr selten vor (Liebisch, 1977).

Der Mensch infiziert sich hauptsächlich durch Inhalation infektiöser Aerosole, wobei Schafe die Hauptinfektionsquelle darstellen. Akute Infektionen bleiben in den meisten Fällen (bis zu 60 %) symptomlos, können sich aber auch als selbstlimitierende, grippeähnliche Erkrankung äußern (ca. 38 %), zu deren Hauptsymptomen Fieber, starke retroorbitale Kopfschmerzen, Schüttelfrost, Abgeschlagenheit, Muskel- und Gelenkschmerzen zählen. In etwa 2 % aller Fälle kommt es zu einer schweren akuten Infektion, die sich meist durch atypische Pneumonie oder Hepatitis äußert. Chronische Erkrankungen, die bei ungefähr 0,2 % der Patienten vorkommen, führen vor

allem zu Endokarditis, wobei Patienten mit vorangegangenen Erkrankungen der Herzklappen besonders häufig betroffen sind. Bei Schwangeren können akute Q-Fieber- Infektionen zu Fehl- oder Frühgeburten führen; zudem haben diese Patientinnen ein deutlich erhöhtes Risiko, an chronischem Q-Fieber zu erkranken (Maurin und Raoult, 1999).

In Deutschland treten zum einen vereinzelte Q-Fieber-Infektionen auf, die vor allem Schäfer, Tierärzte und andere Personen mit direktem Kontakt zu infizierten Tieren betreffen. Zum anderen kommt es immer wieder zu größeren Q-Fieber-Ausbrüchen, bei denen z.T. mehrere hundert Personen erkranken. Bei den meisten dieser Ausbrüche können Q-Fieber-infizierte Schafe als Infektionsquelle identifiziert werden. In Deutschland erkrankten in den Jahren 2001-2008 durchschnittlich 258 Personen pro Jahr an Q-Fieber; Baden-Württemberg ist mit 59 Erkrankungen jährlich am stärksten betroffen (Robert Koch-Institut: SurvStat, http://www3.rki.de/SurvStat).

1.3 *Rickettsia* spp.

Bakterien der Gattung *Rickettsia* gehören zu den α-Proteobakterien, Ordnung Rickettsiales. Sie sind weltweit mit einer sehr großen Artenzahl verbreitet; bisher wurden 14 Arten als humanpathogen identifiziert (Raoult und Roux, 1997). Rickettsien sind, genau wie *C. burnetii*, obligat intrazellulär, bilden jedoch keine sporenähnlichen Formen aus; sie werden daher ausschließlich von Vektoren übertragen.

Auf Grund von serologischen und genotypischen Merkmalen sowie anhand des Übertragungswegs werden die Rickettsien in zwei Gruppen eingeteilt. Mitglieder der Fleckfieber-Gruppe werden von Läusen oder Flöhen übertragen, wohingegen Rickettsien der Zeckenstichfieber-Gruppe Zecken als Vektoren nutzen. Die Antigen-Merkmale innerhalb jeder Gruppe unterscheiden sich nur wenig, was eine serologische Unterscheidung der Rickettsien erschwert (Raoult und Roux, 1997).

Rickettsien befallen vor allem Endothelzellen kleiner Blutgefäße. Hier kommt es zu einer Vermehrung der Bakterien, was wiederum zu Vaskulitis und zu den typischen Symptomen einer Rickettsiose führt. Hierzu zählen vor allem Fieber, Kopfschmerzen und ein charakteristischer Hautausschlag. Die Symptomatik im Einzelnen sowie die Schwere der Erkrankung unterscheidet sich von Art zu Art. Rickettsiosen können mild und selbstlimiterend sein, sie können aber auch lebensbedrohlich oder tödlich verlaufen, wenn der Befall von inneren Organen wie Gehirn, Lunge oder Leber zu inneren Blutungen führt (Parola et al., 2005).

Bisher wurden in Deutschland in verschiedenen Zeckenarten nur apathogene Rickettsien-Arten bzw. Arten mit unbekannter Pathogenität gefunden, wie z.B. *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* (Hartelt et al., 2008) oder Rickettsia sp. RpA4 in *D. reticulatus* (Dautel et al., 2006).

1.4 Zielsetzung

Es wird allgemein angenommen, dass mit steigenden Durchschnittstemperaturen die Zahl und Verbreitung von Zecken, insbesondere von wärmeliebenden Arten wie *D. marginatus* und *D. reticulatus*, zunimmt, was gleichzeitig eine Ausbreitung zeckenübertragener Pathogene mit sich bringt (Grey et al., 2009).

Um die Gefährdung durch zeckenübertragene Infektionen in Zukunft abschätzen zu können, ist es von entscheidender Bedeutung, den „status quo“ zu kennen, d.h. die heutige Verbreitung von Pathogenen in Zecken zu erfassen.

In der vorliegenden Studie wurde daher mit molekularbiologischen und serologischen Methoden das Vorkommen von *Coxiella burnetii* und *Rickettsia* spp. In Süddeutschland in Zecken der Gattung *Dermacentor* sowie in Nagern untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zecken

Die für die Untersuchungen verwendeten adulten Zecken der Arten *D. marginatus* und *D. reticulatus* wurden im Rheintal im Landkreis Lörrach (Baden-Württemberg) sowie entlang des Mains im Stadtkreis Aschaffenburg (Bayern) mit Hilfe von Zeckenfahnen gesammelt. Die Sammelzeitpunkte lagen in der Hauptaktivitätszeit der *Dermacentor*-Zecken, d.h. jeweils im März und April 2006, 2007 und 2008. Beide Sammelgebiete sind als Endemiegebiete des Q-Fiebers bekannt. Die Zecken wurden einzeln in Schnappdeckel-Gefäße überführt und bis zur weiteren Untersuchung bei -70° C eingefroren.

2.1.2 Nager

Die untersuchten Nager stammten aus zwei Sammelgebieten in den Landkreisen Lörrach und Ortenau, die ebenfalls als Q-Fieber-Endemiegebiete gelten. Die Tiere wurden mit Hilfe von handelsüblichen Totschlagfallen an milden Tagen im September/Oktober 2006 und 2007 gefangen; die Fallen wurden möglichst gezielt auf Feldmaus-Wege gestellt, um den Fangerfolg zu erhöhen.

Bei der anschließenden Sektion im Institut für Parasitologie der Universität Hohenheim wurden von jedem Tier Proben von Leber, Lunge, Milz und Niere entnommen. Die Organproben wurden in Guanidinisothiocyanat-Puffer bei -70° C bis zur weiteren Bearbeitung eingefroren.

Um auch serologische Untersuchungen durchführen zu können, wurden von jedem Tier Brustraum-Exudate entnommen. Hierzu wurde der Brustraum mit 1ml PBS (pH 7,4) gespült und die Spülflüssigkeit in Schnappdeckelgefäßen bei -70° C eingefroren.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 DNA-Extraktion

Die Zecken wurden zunächst einzeln mit sterilen Kunststoff-Impfösen zerkleinert. Die DNA-Extraktion erfolgte mit Hilfe eines automatisierten Verfahrens mit dem Maxwell 16 (Promega) nach den Anweisungen des Herstellers. Dieses Aufreinigungsverfahren beruht auf der reversiblen Bindung der Nukleinsäuren an magnetische Silika-Partikel, die in mehreren Waschschritten von

Proteinen und anderen Verunreinigungen getrennt werden. Die Nukleinsäuren wurden mit 200 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert und bis zur weiteren Bearbeitung bei -70° C eingefroren.

Für die molekularbiologische Untersuchung der Nager wurden Organpools hergestellt. Hierzu wurden von Leber, Lunge, Milz und Niere jeweils Stücke von 5 x 5 mm Größe präpariert, zusammengeführt und mit einem sterilen Pistill homogenisiert. Die DNA-Extraktion erfolgte analog zu den Zeckenproben mit Hilfe des Maxwell 16.

2.2.2 Nachweis von *Coxiella burnetti* mittels PCR

Für den Nachweis von *Coxiella burnetii* in Zecken und Nager-Organen wurde eine nested PCR nach Fenollar et al. (2004) verwendet, deren Primer an das Transposase-Gen der Insertionssequenz IS111 binden. Das Amplifikationsprodukt der ersten PCR hat eine Länge von 485bp, das der nested PCR ist 260bp lang. Die Reaktionsansätze und Temperaturprofile wurden modifiziert. Der 50µl-Ansatz der ersten PCR enthielt 10mM Tris-HCl (pH 8,3), 50mM KCl, 2,5mM MgCl2, 40,2mM Tris-HCl (pH 9), jeweils 200µM Nukleotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), jeweils 0,5µM der Primer IS111F1 und IS111R1, 1,5U Taq-Polymerase (Applied Biosystems) und 5µl aufgereinigte DNA als Template. Für die nested PCR wurden 1,5µl des Amplifikationsprodukts aus der ersten PCR in einen 50µl-Ansatz derselben Zusammensetzung überführt, der jeweils 0,5µM der nested-Primer IS111F2 und IS111R2 enthielt. Die erste PCR wurde auf einem Thermoblock-Cycler (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) mit folgendem Temperaturprofil durchgeführt: Eingangsdenaturierung bei 95°C für 3 min, gefolgt von 40 Zyklen Denaturierung (95° C, 30s), Amplifikation (52° C, 30 Sekunden) und Elongation (72° C, 60 Sekunden)sowie einer zusätzlichen Elongationsphase bei 72° C für 4 Minuten. Für die nested PCR wurde die Zyklenzahl auf 30 reduziert und die Elongationsphase auf 30 Sekunden verkürzt.

Die Amplifikationsprodukte der nested PCR wurden mittels Agarose- Gelelektrophorese nachgewiesen. Hierzu wurde ein 1,5 %iges Agarose-Gel hergestellt, dem 10µl 0,1 %iges Ethidiumbromid zugegeben wurde; die Elektrophorese lief bei 70V in einer Elektrophoresekammer ab. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer UV-Kammer.

2.2.3 Nachweis von *Rickettsia* spp.

Zum Nachweis von *Rickettsia* spp. in Zecken und Nager-Organproben wurden zwei PCR-Systeme mit unterschiedlichen Zielsequenzen verwendet. Beide PCR-Systeme waren spezifisch für Rickettsien der Zeckenstichfieber-Gruppe.

gltA-PCR

Die zunächst durchgeführte TaqMan real-time PCR auf dem LightCycler (Roche) nach Wölfel et al. (2008) hat als Zielsequenz ein 70bp großes Fragment des Citratsynthase-Gens *gltA*. Die Primer- und Sonden-Sequenzen wurden von Wölfel et al. übernommen, Reaktionsansätze und Temperaturprofil wurden modifiziert. Der 20 µl-Reaktionsansatz enthielt jeweils 0,5 µM der Primer PanRick 2for und PanRick2 rev, 0,2 µM der TaqMan-Sonde PanRick3 taq, 1,6 mM MgCl2 und 2 µl LC DANN Mastermix (LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes Kit, Roche). Die PCR wurde auf einem Roche LightCycler 1.5 mit folgendem Temperaturprofil durchgeführt: Eingangsdenaturierung bei 94° C für 1 m in, gefolgt von 50 Zyklen Denaturierung

(94° C, 4 s) und Amplifikation (55° C, 45s). Die Fluoreszenz wurde am Ende jeder Amplifikationsphase im F1/F2-Kanal gemessen.

rOmpA-PCR

Alle Proben, die in der *gltA*-PCR positiv waren, wurden zusätzlich mit einer PCR auf dem Thermoblock-Cycler (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) getestet. Die von Regnery et al. (1991) übernommenen Primer amplifizieren ein 532bp großes Fragment des *rOmpA*-Gens, eines Rickettsien-Oberflächenproteins. Reaktionsansätze und Temperaturprofil wurden nach eigenen Versuchen optimiert. Der 50µl-Reaktionsansatz enthielt 10mM Tris-HCl (pH 8,3), 50mM KCl, 2,5mM MgCl2, 40,2mM Tris-HCl (pH 9), jeweils 200µl Nukleotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), jeweils 0,5µM der Primer Rr190.70p und Rr190.602n, 1,5U Taq Polymerase (Applied Biosystems) und 5µl aufgereinigte Template-DNA. Um die Zahl unspezifischer Amplifikationsprodukte zu verringern, wurden die PCR-Ansätze auf Eis pipettiert. Folgendes Temperaturprofil wurde für die PCR verwendet: Eingangsdenaturierung bei 95°C für 3min, gefolgt vo n 35 Zyklen Denaturierung (95°C, 20s), Amplifikation (60°C, 30s) und Elongati on (72°C, 1min) sowie einer zusätzlichen Elongationsphase bei 72°C für 5min. Di e Detektion der Amplifikationsprodukte erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese, wie unter 5.2.2.1 beschrieben. Die Amplifikationsprodukte dieser PCR wurden bis zur folgenden Sequenzierung bei -70°C aufbewahrt.

2.2.4 Sequenzierung

Da die hier verwendeten PCR-Systeme nur spezifisch für die Gattung *Rickettsia* waren, wurden zur Artdifferenzierung alle positiven Proben sequenziert. Hierzu wurden die Amplifikationsprodukte aus der *rOmpA*-PCR mit Hilfe des QiaQuick PCR purification Kit (Qiagen) entsprechend den Anweisungen des Herstellers aufgereinigt. Die Sequenzierreaktion erfolgte nach der Methode von Sanger, bei der fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide, sogenannte Abbruchbasen, verwendet werden (BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems). Die Auftrennung der DNA-Fragmente mit Hilfe der Kapillar-Gelelektrophorese sowie die Verarbeitung der Sequenzdaten erfolgte mit dem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Die erhaltenen DNA-Sequenzen wurden untereinander und mit Sequenzen der Genbank mit Hilfe des BLAST-Algorithmus verglichen (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

2.3 Serologische Methoden

2.3.1 Nachweis von Coxiella burnetii -Antikörpern mittels ELISA

Zum serologischen Nachweis von Phase2-IgG-Antikörpern gegen *C. burnetii* in den Exsudaten der Nager wurden zwei ELISA-Testkits kombiniert. Die mit *C. burnetii*- Phase 2-Antigen beschichteten ELISA-Teststreifen stammten aus dem *Coxiella burnetii*-Phase 2-IgG Test Kit (Virion/Serion), während sämtliche Reagenzien einem Kit entnommen wurden, das ein all species-Konjugat enthält (Immunozym IgG FSME all species, Progen). Die Kombination von verschiedenen Test-Kits war nötig, da keine Kits zum Nachweis von *C. burnetii*-Antikörpern mit Nager- oder all species-Konjugat erhältlich sind. Die Testdurchführung wurde gegenüber den Vorgaben der Hersteller leicht modifiziert.

Die Proben wurden im Verhältnis 1:100 in Verdünnungspuffer verdünnt. Jeweils 100µl Probenverdünnung wurden in die Vertiefungen der Teststreifen gegeben und bei Raumtemperatur für 60min inkubiert. Nach einem Waschschritt mit Waschpuffer wurden jeweils 200µl des Protein G peroxidase-gekoppelten all species-Konjugats zugegeben und für weitere 60min bei Raumtemperatur inkubiert, gefolgt von einem weiteren Waschschritt. Die Substratreaktion wurde mit 200µl TMB (Tetramethylbenzidin)-Substrat bei Raumtemperatur für 30min im Dunklen durchgeführt. Zum Stoppen der Reaktion wurden 50µl 0,5M Schwefelsäure in die Vertiefungen gegeben. Die Extinktionsraten wurden bei 450nm in einem ELISA reader gemessen.

Da kein Serum eines *C. burnetii*-infizierten Nagers als Positivkontrolle zur Verfügung stand, wurden humane Seren, die einen hohen Titer von *C. burnetii*-Phase2-IgG aufwiesen, als Kontrollen verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Sammeln von Zecken und Nagern

In den Jahren 2006 bis 2008 konnten insgesamt 666 Zecken der Gattung *Dermacentor* und 119 Nager für die Untersuchungen gesammelt werden (Tabelle 1 und 2). Die Zecken wurden auf Dämmen entlang des Rheins im Landkreis Lörrach, zwischen Efringen-Kirchen und Istein, sowie entlang des Mains bei Kleinostheim im Stadtkreis Aschaffenburg gesammelt. Die im Jahr 2006 gesammelten 440 Zecken wurden bis zur Gattung *Dermacentor* bestimmt, in den Jahren 2007 und 2008 wurde dagegen zwischen *D. marginatus* und *D. reticulatus* differenziert. Im Maintal bei Aschaffenburg wurden nur *D. marginatus*-Zecken gefunden (n = 26); in Lörrach konnten dagegen beide Arten gesammelt werden, wobei *D. reticulatus* mit 66,5 % (n = 133) der gefangenen Zecken deutlich häufiger vorkam als *D. marginatus* (n = 51).

Im Jahr 2006 konnten 29 Nager bei Ortenberg im Landkreis Ortenau gefangen werden, 2007 in Efringen-Kirchen im Landkreis Lörrach weitere 90 Tiere. Da das Fangen von Nagern direkt auf den Dämmen nicht möglich war, wurden die Fallen auf Wiesenflächen hinter den Dämmen gestellt. Um einen möglichst guten Fangerfolg zu erzielen, wurden, soweit möglich, zunächst Höhlenausgänge und Wege von Feldmäusen identifiziert und die Fallen anschließend gezielt an diesen Stellen platziert. Mit 92 % (n = 109) wurde der Großteil der gefangenen Nager als *Microtus arvalis* (Feldmaus) identifiziert, weiterhin wurden jeweils 3 *Arvicola terrestris* (Schermaus) und *Apodemus flavicollis* (Gelbhalsmaus) sowie jeweils 2 *Apodemus sylvaticus* (Waldmaus) und *Sorex* spp. (Spitzmaus) untersucht.

Tab. 1: *Anzahl der untersuchten Zecken aus den Kreisen Ortenau, Lörrach und Aschaffenburg in den Jahren 2006-2008*

	Ortenau	Lörrach		Aschaffenburg	Gesamt
	2006	**2006**	**2007**	**2008**	**2006-2008**
Dermacentor mariginatus			51	26	
Dermacentor reticulatus			133		
Dermacentor spp.		440	16		
Gesamt		**440**	**200**	**26**	**666**

Tab. 2: *Anzahl der untersuchten Nager aus den Kreisen Ortenau, Lörrach und Aschaffenburg in den Jahren 2006-2008*

	Ortenau	Lörrach		Aschaffenburg	Gesamt
	2006	**2006**	**2007**	**2008**	**2006-2008**
Microtus arvalis	26		83		
Arvicola terrestris	3				
Apodemus sylvaticus			2		
Apodemus flavicollis			3		
Sorex spp.			2		
Gesamt	**29**		**90**		**119**

Alle Sammelgebiete für Zecken und Nager lagen in Gebieten, die als Q-Fieber-Endemiegebiete bekannt sind.

3.2 Nachweis von *Coxiella burnetii*

Insgesamt wurden 666 Zecken der Gattung Dermacentor mit der in Kapitel 5.2.2 beschriebenen PCR auf *C. burnetii* untersucht; es konnten jedoch keine infizierten Zecken gefunden werden.

Die molekularbiologische Untersuchung der 119 Nager-Organpools ergab ebenfalls keinen Hinweis auf *C. burnetii*-infizierte Tiere. Dies wurde durch die serologischen Untersuchungen bestätigt, da bei keinem der untersuchten Nager IgG-Antikörper gegen *C. burnetii* nachgewiesen werden konnten.

3.3 Nachweis von *Rickettsia* spp.

Insgesamt konnten in 207 der 666 untersuchten *Dermacentor*-Zecken *Rickettsia* spp. nachgewiesen werden; das entspricht einer Gesamt-Prävalenz von 31,1 (Tab. 3). Die beiden PCR-Systeme, die einen Teil des gltA- bzw. rOmpA-Gens amplifizierten, brachten hierbei übereinstimmende Ergebnisse. Da beide PCR-Ansätze gattungsspezifisch für Rickettsien der Zeckenstichfieber-Gruppe waren, wurde zur Differenzierung der *Rickettsia*-Arten von allen positiven Proben ein Teil des *rOmpAGens* sequenziert. Dabei zeigte sich, dass an den beiden Sammelstellen jeweils nur eine Rickettsien-Art vorhanden war (Tab. 3).

Alle 202 positiven Proben aus Lörrach wurden als *Rickettsia raoultii* identifiziert, was einer Prävalenz von 30,3 % entspricht. In diesem Gebiet waren neben 157 undifferenzierten *Dermacentor*-

Zecken sowohl *D. marginatus* (n = 1) als auch *D. reticulatus* (n = 44) infiziert. Die DNA-Sequenzen all dieser Proben waren identisch und wiesen eine 100 %ige Übereinstimmung mit einer in der Genbank vorhandenen *R. raoultii*-Sequenz auf (accession number DQ365799).

Die fünf Rickettsien-positiven *D. marginatus* aus Aschaffenburg waren dagegen mit *Rickettsia slovaca* infiziert, was einer Prävalenz von 0,75 % entspricht. Auch hier waren alle DNA-Sequenzen untereinander identisch und zeigten zudem eine 100 %ige Übereinstimmung mit einer *R. slovaca*-Sequenz aus der Datenbank (accession number U43808).

Tab. 3: *Prävalenz von Rickettsia raoultii und Rickettsia slovaca in Dermacentor spp. aus Lörrach und Aschaffenburg, 2006-2008.*

	untersucht/mit Rickettsien infiziert (%)	**identifiziert als**	
		R. raoultii	***R. slovaca***
Lörrach	640/202 (31,6 %)	202	0
Aschaffenburg	26/5 (19,2 %)	0	5
Gesamt	**666/207 (31,1 %)**	**202 (30,3 %)**	**5 (0,75 %)**

4. Diskussion

4.1 *Coxiella burnetii*

In den molekularbiologischen und serologischen Untersuchungen von 666 Zecken und 119 Nagern erwies sich keine Probe als *C. burnetii*-positiv. Dies ist umso erstaunlicher, als es sich bei den Untersuchungsgebieten in den Kreisen Lörrach, Ortenau und Aschaffenburg um Q-Fieber-Endemiegebiete handelt, in denen regelmäßig Fälle von Q-Fieber gemeldet werden. So gab es z.B. in Aschaffenburg im Frühjar 2008 einen kleineren Ausbruch mit etwa 40 erkrankten Personen (RKI, Epidemiologisches Bulletin 25/2008).

Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die von Liebisch beschriebenen Naturherde, in denen *C. burnetii* zwischen Zecken und Nagern zirkuliert und die als Quelle für Q-Fieber-Ausbrüche gelten, zumindest an diesen Sammelstellen nicht existieren. Diese Vermutung wird durch eine Arbeit aus dem Jahr 2006 gestützt, bei der in 395 *Dermacentor*-Zecken aus dem Landkreis Ortenau ebenfalls keine *C. burnetii*-Infektionen festgestellt werden konnten (Dezfuli, 2006).

Allerdings konnten in früheren Studien in zwei *D. marginatus* aus dem Kreis Lörrach Coxiellen nachgewiesen werden (Liebisch, 1977 und Sting et al., 2004); in diesem Gebiet könnten also tatsächlich Naturherde vorhanden sein. Die sehr geringe Zahl positiver Zecken deutet allerdings darauf hin, dass die Naturherde nur sehr klein bzw. lokal sehr begrenzt sind und daher bei den durchgeführten Untersuchungen häufig nicht entdeckt werden. Dies bedeutet wiederum, dass Zecken bzw. die Naturherde in der Epidemiologie des Q-Fiebers, entgegen ursprünglicher Vermutungen, keine entscheidende Rolle spielen können, da ihr Vorkommen bzw. die Durchseuchung zu gering ist.

Interessanterweise konnten in Deutschland bisher keine mit *C. burnetii* infizierten Nager gefunden werden, was ebenfalls gegen die Existenz bzw. gegen eine weite Verbreitung der Naturherde spricht.

Eine wahrscheinlichere Rolle der Zecken liegt in der Verbreitung von *C. burnetii* über den Zeckenkot. Die beim Saugakt an einem infizierten Schaf oder anderen Wirt aufgenommenen Bakterien vermehren sich in den Zecken und werden in großer Menge mit dem Zeckenkot ausgeschieden. Dieser im Schafsfell haftende Kot ist hochinfektiös und vergrößert somit die Gefahr aerogener Infektionen. Das Vorkommen von Coxiellen im Zeckenkot konnte 2006 von Sting et al. anhand einer Probe aus Lörrach nachgewiesen werden. Zecken verstärken somit die Kontamination der Umgebung mit infektiösen *C. burnetii*-Partikeln; man kann daher von einer „Multiplikator-Funktion" der Zecken sprechen (Kahl, pers. Mitteilung).

Die im Zuge der globalen Erwärmung zu erwartenden trockenen und heißen Sommer bieten optimale Bedingungen für die aerogene Verbreitung von *C. burnetii*; daher muss in Zukunft mit steigenden Fallzahlen gerechnet werden, unabhängig von der Rolle und der Verbreitung der *Dermacentor*-Zecken. Aus diesem Grund gewinnt die Etablierung von präventiven Maßnahmen zunehmend an Bedeutung.

Für die Prävention von Q-Fieber-Ausbrüchen ist es entscheidend, die Rolle der Zecken in der Epidemiologie des Q-Fiebers zu kennen. Schafe stellen die Hauptinfektionsquelle für den Menschen dar, daher müssen alle Maßnahmen an dieser Stelle ansetzen. Wenn *Dermacentor*-Zecken in hohem Maße Coxiellen auf Schafe übertragen und auf diese Weise für die Verbreitung der Bakterien sorgen, liegt die geeignete Maßnahme in der Behandlung der Schafe mit Akariziden. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse deuten allerdings auf eine geringe Bedeutung der Zecken hin; in diesem Fall verspricht die Impfung von Schafen gegen *C. burnetii* größere Erfolge bei der Vermeidung von Q-Fieber-Ausbrüchen.

4.2 *Rickettsia* spp.

Insgesamt konnten in der vorliegenden Arbeit in 31 % der 666 untersuchten *Dermacentor*-Zecken Rickettsien nachgewiesen werden. In Lörrach waren 202 Zecken (30,3 %) mit Rickettsien infiziert. Mit Hilfe der Sequenzierung konnten alle positiven Proben als *Rickettsia raoultii* identifiziert werden. Diese Art konnte bereits früher mit einer Prävalenz von 23 % in *D. reticulatus* aus dem Nordosten Deutschlands nachgewiesen werden (Dautel et al., 2006). Bisher ist unklar, ob es sich um eine humanpathogene Art handelt. Da *R. raoultii* jedoch in *Dermacentor* spp. weit verbreitet zu sein scheint, sollte die epidemiologische und klinische Rolle dieser Rickettsien-Art weiter untersucht werden.

Bei fünf *Rickettsia*-positiven *D. marginatus* aus Aschaffenburg ergab die Sequenzierung Infektionen mit *Rickettsia slovaca*. Diese Art wurde bereits 1977 im südlichen Baden-Württemberg in 8 *Dermacentor marginatus* beschrieben (Rehacek et al., 1977), seither gab es jedoch in Deutschland keine Nachweise dieser Art mehr. *R. slovaca* ist der Erreger der zeckenübertragenen Lymphadenopathie (TIBOLA), einer mild verlaufenden Rickettsiose. Zu den Hauptsymptomen gehören geschwollene und schmerzhafte Lymphknoten in der Umgebung des Zeckenstichs, eine lokale entzündliche Hautreaktion (eschar), Fieber und lokaler Haarausfall. Der für Rickettsiosen typische Hautauschlag tritt nur sehr selten auf. Unter Antibiotika-Therapie (Doxycyclin) heilt die Erkran-

kung vollständig aus, als Spätfolge kann allerdings der Haarausfall über mehrere Wochen bestehen bleiben.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, dass *R. slovaca* in *D. marginatus* in Süddeutschland vorkommt; wie weit die Art tatsächlich verbreitet ist, ist jedoch bisher nicht bekannt. Da es sich um eine humanpathogene Art handelt, sind weitere Untersuchungen bezüglich der Verbreitung in Deutschland dringend erforderlich. Der kürzlich erfolgte Nachweis einer *R. slovaca*-Infektion bei einer Patientin im südlichen Rheinland-Pfalz (Pluta et al., zur Veröffentlichung eingereicht) unterstreicht die Wichtigkeit zukünftiger Untersuchungen.

Die vorliegende Untersuchung brachte keinen Hinweis auf das Vorhandensein von *R. conorii*, dem Erreger des Mittelmeerfleckfiebers, in *Dermacentor* spp. In Deutschland. Eine Einschleppung dieses Erregers, der im mediterranen Raum weit verbreitet ist, ist jedoch jederzeit möglich und zunehmend wahrscheinlich. Eine besondere Gefahr stellen dabei unkontrollierte Transporte von Hunden dar, die im Mittelmeerraum der wichtigste Reservoirwirt für *R. conorii* sind. Über infizierte Hunde können die Erreger nach Deutschland gelangen und in den heimischen Zeckenpopulationen stabile Naturherde ausbilden, woraus sich wiederum eine neue Infektionsgefahr für den Menschen ergibt.

5. Ausblick

Bei einer im Zuge der globalen Erwärmung steigenden Durchschnittstemperatur besteht die Gefahr, dass sich Zecken der Gattung *Dermacentor* weiter in Deutschland ausbreiten. Dies wurde für *D. reticulatus* bereits nachgewiesen (Dautel et al., 2006) und ist für *D. marginatus* ebenfalls wahrscheinlich. Bei einer Ausbreitung der Zeckenpopulationen werden sich auch die bereits nachgewiesenen Pathogene ausbreiten, zudem erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass sich Naturherde eingeschleppter Erreger wie *R. conorii* etablieren.

Der Einfluss des Klimawandels auf die Verbreitung zeckenübertragener Krankheiten kann nur durch kontinuierliche Untersuchungen der Zeckenpopulationen abgeschätzt werden. Für die Einschätzung des zukünftigen Infektionsrisikos für den Menschen ist es daher absolut notwendig, die aktuelle Verbreitung dieser Erreger in Zecken und Reservoirwirten weitergehend zu untersuchen.

Literatur

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. Int. J. Med. Microbiol., 296, Suppl.1, 149-156.
Dezfuli, 2006. Untersuchung zur Epidemiologie von Coxiellen und Rickettsien in *Dermacentor* Zecken. Diplomarbeit, Universität Tübingen, Deutschland.
Fenollar F, Fournier PE, Raoult D, 2004. Molecular detection of *Coxiella burnetii* in the sera of patients with Q-fever endocarditis or vascular infection. J. Clin. Microbiol. 42(11), 4919-4924.
Gray JS, Dautel H, Estrada-Pena A, Kahl O, Lindgren E, 2009. Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. Interdiscip. Perspect. Infect. Dis. Volume 2009, Article ID 593232.

Hartelt K, Oehme R, Frank H, Brockmann SO, Hassler D, Kimmig P, 2003. Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of Anaplasma phagocytophilum (Ehrlichia sp.), Wolbachia sp., Rickettsia sp., and Babesia sp. in Southern Germany. Int. J. Med. Microbiol. 293, Suppl. 37, 86-92.

Liebisch, A und Rahman, MS, 1976. Zum Vorkommen und zur vektoriellen Bedeutung der Zecken *Dermacentor marginatus* (Sulzer, 1776) und *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794) in Deutschland. Tropenmed. Parasit. 27, 393-404.

Liebisch A, 1977. Das Q-Fieber als Naturherdinfektion in Süddeutschland. Bundesgesundheitsblatt 20(14), 185-191.

Maurin M und Raoult D, 1999. Q Fever. Clin. Microbiol. Rev. 12(4), 518-553.

Parola P und Raoult D, 2001. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. Clin. Infect. Dis. 32(15), 897-928.

Parola P, Paddock CD, Raoult D, 2005. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. Clin. Microbiol. Rev. 18(4), 719-756.

Raoult D und Roux V, 1997. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. Clin. Microbiol. Rev. 10(4), 694-719.

Regnery RL, Spruill C, Plikaytis BD, 1991. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. J. Bacteriol.173(5), 1576-1589.

Rehacek J, Liebisch A, Urvölgyi J, Kovacova E, 1977. Rickettsiae of the spotted fever group isolated from *Dermacentor marginatus* ticks in South Germany. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A, 239, 257-281.

RKI, 2008. Q-Fieber: Vermehrtes Auftreten im Frühjahr 2008. Epidemiologisches Bulletin 25, erhältlich unter http://www.rki.de/cln_161/nn_969736/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2008/25__08

Sting R, Breitling N, Oehme R, Kimmig P, 2004. The occurence of *Coxiella burnetii* in sheep and ticks of the genus *Dermacentor* in Baden-Wuerttemberg. Dtsch. Tieraerztl. Wochenschr. 111(10), 390-394.

Wölfel R, Essbauer S, Dobler G, 2008. Diagnosis of tick-borne rickettsioses in Germany: a modern concept for a neglected disease. Int. J. Med. Microbiol. 298 Suppl. 1, 368-374.

Teilprojekt „Sandmücken als Überträger von Leishmaniosen (Leishmania infantum) und Sandmückenfieber (Phleboviren“

innerhalb des Forschungsprogramms
Herausforderung Klimawandel Baden-Württemberg

Torsten Naucke

Institut für Zoologie, Fachrichtung Parasitologie
Universität Hohenheim

2009

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 19
1.1 Einteilung 19
1.2 Morphologie und Biologie 19
1.3 Medizinische Bedeutung 20
1.4 Sandmückenzuchtaufbau 22
2 Material und Methoden 23
2.1 Fangmethode 23
2.2 Einfangen lebender Sandmücken 23
2.3 Töten der gefangenen Arthropoden 23
2.4 Transport toter Sandmücken 24
2.5 Transport und Haltung lebender Sandmücken 24
2.6 Präparation und Bestimmung der Sandmücken 24
2.7 Die Bestimmung der präparierten Phlebotomen 25
2.8 Herstellung des Larvenfutters 25
2.9 Kapillare Blutfütterung von Sandmücken 26
2.9.1 Aufbau der Apparatur 26
2.9.2 Methodik der kapillaren Blutfütterung 27
3 Ergebnisse 28
3.1 Untersuchungszeitraum und Fanggebiete 28
3.2 Beschreibungen der Standorte 29
3.2.1 Standorte 2007 29
3.2.2 Standorte 2008 37
3.3 Zuchtaufbau von *Phlebotomus mascittii* 50
3.4 Kapillare Blutfütterung von Sandmücken 50
3.5 Verbreitung von Sandmücken in Deutschland 50
Literatur 54
Anhang 57

1 Einleitung

1.1 Einteilung

Systematische Einordnung der Phlebotomen (nach WHO, 1990):

Klasse: Insecta

Ordnung: Diptera

Unterordnung: Nematocera

Familie: Psychodidae

Unterfamilie: Phlebotominae

1.2 Morphologie und Biologie

Der ca. 1,3 bis 4 mm große Körper der Phlebotomen, sowie die langen Beine und die Flügel sind dicht mit Haaren bedeckt. Phlebotomen lassen sich leicht an ihrer charakteristischen Flügelhaltung erkennen: Die Flügel stehen in einem 60°-Winkel nach oben und werden nicht dachartig, wie z. B. bei *Psychoda*- Arten über den Thorax gelegt (Theodor, 1958).Ihren Namen verdanken sie ihrer sandfarbenen Färbung.

Die Geschlechter sind von außen relativ einfach zu unterscheiden: während die Weibchen ein abgerundetes Abdomen besitzen, verfügen die Männchen über einen kräftigen, auffallend großen Klammerapparat zur Kopulation (Abonnenc, 1972).

Sandmücken sind besonders abhängig von Temperatur und Luftfeuchtigkeit. Das ist vermutlich der Grund, dass Sandmücken in Europa vorwiegend nachtaktiv sind, da bei sinkenden Temperaturen die für Sandmücken wichtige Luftfeuchtigkeit steigt (Cross & Hyams, 1996).

Individuen der Gattung Phlebotomus erreichen bei ihrer Nahrungssuche eine z. T. sehr hohe Fluggeschwindigkeit. Besonders Weibchen, die nicht mit Blut vollgesogen sind, zeigen eine hohe Flugaktivität. Sie erreichen Geschwindigkeiten von 1 m/sec., was 3,6 km/h entspricht (Killick-Kendrick et al. 1999).

Im Vergleich dazu erreichen Culiciden der Gattung Anopheles eine Geschwindigkeit von 5-6 km/h, was unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Körpergrößen um ein Vielfaches langsamer ist (Gilles & Wilkes, 1981).

Befruchtete Weibchen legen nach jedem Blutmahl 30 bis 150 netzartig gemusterte, 0,3 bis 0,4 mm große Eier ab (Irungu et al., 1986). Die Weibchen legen ihre Eier in gut geschützte Bodenvertiefungen mit viel organischem Material und dauerhafter Feuchtigkeit ab. Entsprechende Bedingungen für die Eiablage finden die Sandmücken vor allem in unterirdischen Tierbauten (Fairchild & Harwood, 1961), in Termitenbauten (Basimike & Mutinga, 1990), in Löchern von Bäumen (Modi et al., 1977), im Boden von Tierställen (Hanson, 1961), Ruinen usw.

Die ersten Sandmückenbrutplätze auf Malta und in Indien wurden bereits Anfang des 19. Jahrhunderts detailliert beschrieben (Newstead, 1911; Howlett, 1913; King, 1914).

Die Entwicklung der Eier ist abhängig von den klimatischen Bedingungen und dauert bei 30°C etwa eine Woche. Es folgen 4 Larvenstadien (L1 – L4). Die Larven ernähren sich von dem organischen Material an den Eiablageplätzen. Sie sind auf die Aufnahme von Wasser als Flüssigkeit angewiesen. Kapillar gebundenes Wasser ist ausreichend, ohne Wasser gehen die Larven selbst bei einer 100 %igen Luftfeuchtigkeit ein (Theodor, 1958).

In Europa überwintern Sandmücken in der Regel im vierten Larvenstadium (Killick-Kendrick & Killick-Kendrick, 1999). Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass zumindest Sandmücken der Art *Ph. ariasi* in den heißen Regionen Europas (z. B. Provinz Granada, Gibraltar) auch ganzjährig aktiv sind (Morillas Marquez et al., 1983; Gil Collado et al., 1989).

Nach 19 bis 60 Tagen, abhängig von der Artzugehörigkeit, den klimatischen Bedingungen und dem Nahrungsangebot, häutet sich die vierte Larve zur Puppe. Dabei bleibt die letzte Larvenhülle am Abdomen der Puppe haften und verbindet diese mit dem Substrat. Die Entwicklung zur Imago dauert bei 30°C etwa 5 bis 10 Tage.

Insgesamt dauert der gesamte biologische Zyklus 7 bis 10 Wochen.

1.3 Medizinische Bedeutung

Phlebotomen sind Ektoparasiten und haben eine große medizinische Bedeutung als Vektoren für z. B. protozooische Endoparasiten, Bakterien und Viren.

Das wichtigste durch Sandmücken übertragene Virus ist der Erreger des Pappataci-Fiebers. Das Fieber war die erste humanpathogene Erkrankung, von der bekannt wurde, dass sie von Sandmücken übertragen wird (Doerr, 1909). Im mediterranen Raum und in Indien ist es weit verbreitet. Der historische Überträger dieses Virus ist *Phlebotomus papatasi*.

Heute kennt man viele verschiedene Serotypen des Pappataci-Fiebers. Bei Untersuchungen in der Provinz Granada in Spanien kam man zu dem Ergebnis, dass 26,2 % von 1181 getesteten Erwachsenen Antikörper gegen einen Serotyp des Virus im Blut hatten (Mendoza Montero et al., 1998). Auch bei deutschen Touristen, die ihren Urlaub in Italien verbrachten, ist in den letzten Jahren ein deutlicher Anstieg importierter Sandmücken-Virus-Infektionen zu beobachten (Schwarz et al., 1996).

Als bakterielle, von Sandmücken übertragene Erkrankung ist die Bartonellose zu nennen, die auch unter dem Namen Carrion's disease bekannt ist. Sie kommt in zwei unterschiedlichen Ausprägungen in den bergigen Regionen feuchter Regenwälder in Südamerika, als Oroya-Fieber und Verruga peruana vor.

Das Oroya-Fieber ist ein fast immer tödlich verlaufendes Fieber mit Anämie. Die Inkubationszeit beträgt drei Wochen. Die Verruga peruana ist eine nicht tödlich verlaufende Hautkrankheit, deren Inkubationszeit mehr als einen Monat beträgt. Der Erreger beider Krankheiten ist das Bakterium *Bartonella bacilliformes* mit dem Vektor *Lutzomyia verrucarum* (Townsend, 1914). Ent-

scheidend für die Ausprägungsform der Krankheit scheint der Immunstatus des Patienten zu sein (Hertig, 1942).

Unter den protozoischen von Sandmücken übertragenen Endoparasiten sind Plasmodien, Trypanosomen und Leishmanien zu finden. Die von einigen Arten der Gattung *Lutzomyia* übertragenen Plasmodien, sind ausschließlich Erreger der Reptilienmalaria (Fialho & Schall, 1995).

Trypanosomen können auch in Europa von Sandmücken übertragen werden (Gramiccia et al., 1989). Da nur einige der als Vektoren agierenden Sandmückenarten auch anthropophil sind, wird eine Übertragung von Trypanosomen auch auf den Menschen noch diskutiert (Desjeux & Waroquy, 1981).

Die wahrscheinlich wichtigste von Sandmücken übertragene Krankheit ist die Leishmaniose. Sie wird von Protozoen der Gattung *Leishmania* verursacht, und von mindestens 30 Sandmückenarten aus verschiedenen Genera übertragen. Die Leishmaniose kann in drei verschiedenen Ausprägungen auftreten: die Hautleishmaniose, die Schleimhautleishmaniose und die viszerale Leishmaniose.

Die Hautleishmaniose tritt vor allem im Süden der paläarktischen Region auf, wo sie von Mücken des Genus *Phlebotomus* übertragen wird. In den feuchten Regenwäldern Zentral- und Südamerikas von Chile bis Mexiko wird sie von *Lutzomyia ssp.* übertragen.

An der Einstichstelle entwickelt sich ein Geschwür mit mehreren Zentimetern Durchmesser. Nach einigen Monaten heilt dieses ohne Behandlung ab und hinterlässt meist eine langanhaltende Immunität, aber auch eine deutlich sichtbare Narbe.

Die Schleimhautleishmaniose ist in Mittel- und Südamerika verbreitet. Hervorgerufen durch die Protozoen erfolgt eine Geschwürbildung in den Gesichtsschleimhäuten rund um die Einstichstelle, was oft zu Entstellungen führt. Es kann auch zu einer Ausbreitung der Erkrankung auf das Lymphsystem, sowie Knorpel und Knochen kommen. Bei der Schleimhautleishmaniose, die ausschließlich von *Lutzomyia ssp.* übertragen wird, erfolgt keine spontane Ausheilung und die Krankheit kann ohne Behandlung zum Tode führen.

Die viszerale Leishmaniose ist hauptsächlich im Süden der paläarktischen Region der alten Welt verbreitet und wird dort von *Phlebotomus ssp.* übertragen. Man findet auch in Nordostbrasilien die viszerale Leishmaniose, wo sie von *Lutzomyia ssp.* übertragen wird. Diese Form der Leishmaniose befällt vor allem die reticuloendothelialen Zellen von Milz und Leber. Es erfolgt ebenfalls keine spontane Ausheilung. Die Krankheit führt ohne Behandlung zum Tod.

Ebenfalls durch einen Sandmückenstich wird die Harara (arab. = Hitze) verursacht. Dabei handelt es sich um eine Immunreaktion auf Toxine aus den Speicheldrüsen der Mücken. Sie rufen eine bläschenförmige oder bulböse Dermatitis und kleine, stark juckende Papeln hervor, die nach einigen Wochen völlig abheilen.

1.4 Sandmückenzuchtaufbau

Zur Inzuchtnahme von Sandmücken wird in der Regel mit blutvollgesogenen Weibchen begonnen, die zuvor z. B. mit Lichtfallen aus der Natur gefangen wurden (Naucke, 1998). Die blutgesogenen eiertragenden Weibchen werden zunächst in Larvalbrutbehälter zur Eiablage überführt, mit nicht toxischem Gips ausgegossene Plastikgefäße die von einer Gaze bedeckt sind. Um optimale Zuchtbedingungen zu schaffen, werden die Brutgefäße in einer haushaltsüblichen Plastikdose fest verschlossen.

Da ein Blutmahl für die Eierproduktion von Sandmückenweibchen erforderlich ist, muss vor der Zucht sichergestellt sein, dass der natürliche Wirt bzw. ein geeigneter Ersatzwirt zur Verfügung steht. Ferner wurden erste experimentelle Versuche einer künstlichen Blutfütterung von Hertig & Hertig (1927) durchgeführt. Aber auch das eigenständige Blutmahl von Sandmücken durch Membranen konnte bereits erzielt werden (Ward et al. 1992).

Als Kohlenhydratquelle, die sowohl von männlichen als auch weiblichen Sandmücken benötigt wird, dient in erster Linie mit Zuckerlösung getränkte Watte, erfahrungsgemäß hat sich aber auch überreifes Obst, wie das Fruchtfleisch einer Kaktusfrucht, bewährt. Die Kurzlebigkeit der Sandmücken ohne angebotene Zuckerquelle lässt vermuten, dass die Aufnahme des Zuckers bereits vor dem Blutmahl und der Kopulation erfolgt (Naucke, 1998). Im Labor überlebt eine Sandmücke der Art *Lutzomya trapidoi* höchstens 4 Tage ohne Zuckerverwertung, so zeigt *Lutzomya trapidoi* bei Angebot einer Saccharose- oder Fructoselösung hingegen eine Lebenserwartung von bis zu 35 Tagen (Chaniotis 1974).

Eine weitere wichtige Vorrausetzung zum Aufbau einer Zucht ist die Zusammensetzung des Larvenfutters. Diese sind z. T. nicht nur schwer nachvollziehbar, sondern weisen auch eine sehr zeitaufwendige Herstellung auf (Young et al. 1981). Bei der Herstellung ist vor allem auf eventuelles Pilzwachstum zu achten, besonders bei der Überwinterung der Larven (Marchais et al. 1991). Dabei eignet sich am besten fermentiertes Larvenfutter, da es vermindertes Pilzwachstum zeigt. Die Herstellung des aerob und anaerob fermentierten Larvenfutters erfolgt nach einer veränderten Methode von Killick- Kendrick & Killick-Kendrick (1991) (siehe Kap. 2.7, Larvenfutterherstellung). Sobald die L1- Larven schlüpfen kann mit der Fütterung des Larvenfutters begonnen werden.

Zum Aufbau der Zucht wurde die Sandmückenart *Phlebotomus mascittii* aus Korsika verwendet. Gefangen wurden die Sandmücken in einem alten, 400 m langen Eisenbahntunnel in der Region von Porto- Vecchio (Fautea) im Südosten Korsikas. Der Standort ist für Sandmücken schon seit Mitte des letzten Jahrhunderts bekannt (Toumanoff & Chassignet, 1954). Zu den dort vorkommenden Arten gehört überwiegend auch die in Deutschland vertretene Art *Phlebotomus* (*Transphlebotomus*) *mascittii*. In dem Tunnel herrscht ganzjährlich eine gleich bleibende Temperatur von 19°C und die Mücken können dort weitgehend witterungsunabhängig leben. Unter diesen Umständen sind diese Sandmücken teilweise auch tagaktiv. Anhand molekularbiologischer Untersuchungen wurde bestätigt, dass *Phlebotomus mascittii* sowohl aus Korsika (Frankreich) als auch aus Belgien, exakt die gleiche genetische Identität derjenigen aus Deutschland aufweisen (Depaquit et. al, 2005). Daher ist es möglich die Zucht mit Sandmücken aus Korsika, bei eventuell geringerem Fangerfolg in Deutschland, zu erweitern.

2 Material und Methoden

2.1 Fangmethode

Es wird mit Lichtfallen des Typs CDC Miniature Light Trap 512 gearbeitet. Sie werden mit Bleiakkus der Firma Panasonic betrieben.

Die Fallen werden an geeigneten Standorten in Höhen von rund 100 cm abends auf gehangen und morgens wieder eingesammelt. Zwecks späterer Identifikation werden die Fänge in 70 % Ethanol überführt und gelagert.

Zum Aufbau einer Zucht, werden möglichst viele Sandmücken lebendig gefangen und in dafür vorgesehene Brutgefäße überführt.

Fang mit Lichtfallen des Typs „CDC Miniature Light Trap 512“

CDC-Lichtfallen locken Sandmücken bis zu einem Abstand von 2m zur Glühbirne an (Killick-Kendrick et al., 1985). Blutvollgesogene Weibchen werden kaum von Lichtfallen attrahiert (Grimm et al., 1993; Schrey et al., 1989).

An die Fallen wird jeweils ein Fangsack gehängt. Diese bestehen aus einem kegelförmigen Sack aus sehr feinmaschiger Gaze (Maschenweite unter 0,5 x 0,5 mm) der an der spitzen Seite eine Öffnung aufweist. Diese wird über das untere Ende der Lichtfalle gestülpt und mit einem Klettverschluss befestigt. Der Durchmesser der Unterseite der Fangsäcke beträgt etwa 20 cm, die Höhe des Kegels ungefähr 50 cm. Die Öffnung muss mindestens einen Durchmesser von 10 cm haben, um ein leichtes Überstülpen der Falle zu gewährleisten.

2.2 Einfangen lebender Sandmücken

Zu Zuchtzwecken können Sandmücken möglichst schonend mit dem Handaspirator gesammelt werden. Hierbei handelt sich um einen Glaszylinder, der am hinteren Ende mit einer Gaze überzogen ist. Jener wird wiederum in einen Gummischlauch gesteckt. Durch Ansaugen können die Sandmücken durch den entstehenden Unterdruck in den Zylinder gesaugt werden. Dabei verhindert die Gaze, bei einem möglicherweise zu festem Ansaugen, das Gelangen der Sandmücke in den Gummischlauch. Anschließend können die Phlebotomen durch die entsprechende Öffnung in ein Brutgefäß überführt werden.

2.3 Töten der gefangenen Arthropoden

Die gefangenen Arthropoden und übersehenen Sandmücken werden durch Verdrängen des Sauerstoffs erstickt (Naucke, 1998).

Die Fangsäcke werden von den Fallen abgenommen, mit einem Gummi verschlossen und in einen antistatischen Plastiksack gelegt. In den Sack wird die Öffnung einer CO_2- Gasflasche gehalten und der Plastiksack um die Flasche herum verschlossen.

Das Ventil der Flasche wird geöffnet. Der Sack muss mit CO_2 prall gefüllt sein. Nach etwa 30 Minuten kann der Sack geöffnet werden, die narkotisierten Arthropoden werden aus dem Fangsäcken geschüttelt und in 70 %igem Alkohol konserviert.

2.4 Transport toter Sandmücken

Die toten Sandmücken werden in Reagiergefäßen aufbewahrt. Diese werden für diesen Zweck mit 70 % Ethanol befüllt.

2.5 Transport und Haltung lebender Sandmücken

Lebende Mücken sind sehr anfällig für Hitze, Austrocknung und Sonneneinstrahlung. Sie sollten daher möglichst abgedeckt, kühl und in einer Umgebung mit hoher Luftfeuchte transportiert und gehalten werden.

Den Sandmücken wird als Zuckerquelle mit Zuckerwasser getränkte Watte oder Apfelstücke ohne Schale zur Verfügung gestellt. Die Zuckerquelle muss nach zwei Tagen ausgetauscht werden, da ein sehr schnelles Schimmelpilzwachstum erfolgt. Der Transport und die Haltung der Phlebotomen erfolgt in mit Gips ausgegossenen und mit einer Gaze überzogenen Plastikbehältern, die auch anschließend direkt zur Zucht als Brutgefäße genutzt werden können. Dabei werden die Phlebotomen innerhalb der Transportgefäße in einer elektrischen Kühlbox untergebracht, die über den Zigarettenanzünder des Autos betrieben werden kann. Die Kühlbox bietet im geschlossenen Zustand eine gute Isolierung gegen Licht, Hitze und Verdunstung. Außerdem fallen die Sandmücken bei einer Temperatur von 10-12°C in eine Kältestarre, was ihre Überlebenschancen verbessert.

2.6 Präparation und Bestimmung der Sandmücken

Die Phlebotomen werden in KOH überführt und für 3 Stunden mit 6 % KOH behandelt.

Durch die KOH- Mazerierung verlieren die Mücken fast vollständig ihre Haare und der Chitinpanzer wird sehr weich. Dies erleichtert die spätere Präparation.

Es folgen 4 Waschschritte in destilliertem Wasser für jeweils 15 Minuten.

Zur Bestimmung werden die Mücken wie folgt ausgerichtet:

Zuerst werden die Flügel nach oben gerichtet und entfaltet. Die Beine werden glatt nach unten gezogen. Antennen und Palpen werden sorgfältig und vorsichtig gestreckt und nach vorne ausgerichtet.

Dem Weibchen wird der Kopf abgetrennt und mit der ventralen Seite nach oben neben den Thorax gelegt. Außerdem werden die Segmente 8-10 des Thorax abgetrennt und aus ihnen die stark sklerotisierte Furca heraus präpariert. An ihr sind die Spermatheken mit ihren Ausführgängen befestigt. Bei den Männchen wird der arttypische Klammerapparat glatt nach hinten gestreckt.

Die Sandmücken werden auf dem Objektträger in Hoyer-Lösung eingedeckt. Sie setzt sich folgendermaßen zusammen:

Aqua dest. 50 ml

Chloralhydrat 50 g

Glycerin 20 ml

Gummi arabikum 30 g

Die Substanzen werden bei 80°C im Wasserbad gelöst. Vor dem Gebrauch lässt man die fertige Lösung abkühlen.

2.7 Die Bestimmung der präparierten Phlebotomen

Sowohl die deutsche als auch die korsische Phlebotomenfauna wurde nach den Bestimmungsschlüsseln von Theodor, 1985 bestimmt. Die Sandmücken wurden ausschließlich in Form von Dauerpräparaten bestimmt. Anhand folgender morphologischer Kriterien wurden die Phlebotomen taxonomisch eingegliedert:

Gestaltung von Pharynx und Cibarium sowie deren Bezahnung der weiblichen und männlichen Sandmücken; Gestaltung der Spermatheken und deren basalen Endabschnitt des Weibchens; Gestaltung von Aedoeagus, Anzahl der Dornen am Stylus und Anordnung der Borsten auf dem Coxit des männlichen Kopulationsapparates. Vertreter der Gattung *Sergentomyia* lassen sich sehr gut anhand ihrer Bezahnung des Cibariums von *Phlebotomus*- Arten unterscheiden. So zeigen *Sergentomyia*- Arten eine stark ausgeprägte Bezahnung, hingegen *Phlebotomus*- Arten eine reduzierte bis fehlende Bezahnung im Cibarium aufweisen. Des Weiteren kann man sie anhand der Anzahl und Anordnung der Dornen auf dem Stylus des männlichen Kopulationsapparates voneinander unterscheiden.

2.8 Herstellung des Larvenfutters

Zur Fermentation des Larvenfutters werden trockener Kaninchenkot und Nagetierfutter 1:1 vermischt und mit Hilfe einer Kaffeemühle pulverisiert. Auf den Böden mehrerer ineinander gestapelter Plexiglasaquarien (35 x 20 x 20 cm) wird eine dünne Schicht des pulverisierten Larvenfutters verteilt und mit einem Feinzerstäuber befeuchtet (Naucke, 1998). Folgende Herstellungsprozesse sind sehr zeitintensiv und beanspruchen eine Zeitspanne von etwa 8 Monaten. Umgedreht werden die Plexiglasaquarien mit dem Pulver etwa 3 Monate bei einer Temperatur von 21-26°C belassen. In diesem Zeitraum kommt es zunächst zum Wachstum anaerober Pilze auf dem Larvenfutter. Anschließend wird der Abstand mit Hilfe von Zahnstochern zwischen den Plexiglasaquarien vergrößert. Dabei gelangt nun mehr und mehr Sauerstoff an das Pulver, anaerobes Pilzwachstum geht zu Grunde und ein aerobes Pilzwachstum entsteht. In diesem Zustand wird das Larvenfutter für weitere 3 Monate belassen und täglich mit dem Feinzerstäuber nachgefeuchtet. Schließlich wird das Larvenfutter nach der aeroben Fermentation für weitere 2 Monate getrocknet. Nach dem Trocknungsprozess wird das Larvenfutter erneut in der Kaffeemühle pulverisiert. Das auf diese Weise gewonnene Larvenfutter kann trocken und unsteril mindestens 3 Jahre eingesetzt werden und mit Hilfe eines Salzstreuers den Larven angeboten werden.

2.9 Kapillare Blutfütterung von Sandmücken

Erste historische Versuche einer künstlichen Blutfütterung mit Hilfe von Kapillaren wurden von Hertig & Hertig (1927) durchgeführt. Für die kapillare Blutfütterung wurde im Rahmen dieser Untersuchungen die Methoden nach Hertig & Hertig (1927) und Napier (1930) angewandelt. Wichtige Kriterien der Methodik sind vor allem der korrekte Aufbau der Apparatur sowie die Technik der künstlichen Fütterung. Als große Schwierigkeit erweist sich vor allem die Fixierung der filigranen Sandmücke und das Überstülpen der Kapillare über die stechenden Mundwerkzeuge des Saugrüssels. Aus diesem Grund ist es wichtig, den Sandmücken eine schonende und angemessene Einspannhilfe zu bieten.

2.9.1 Aufbau der Apparatur

Einspannen der Sandmücke:

Mittels einer aus Holz und Kork angefertigten Pinzette wird ein schonendes Einspannen der Sandmücken ermöglicht (siehe Abb. 1b). Dazu wurde ein Holzzylinder der Länge nach auf gespalten. An deren glatten Seite (Innenseite) wurde jeweils eine 1 mm dicke Korkschicht festgeklebt. Zum selbstständigen Öffnen wurde ein Stück Federstahl an beiden Holz/Kork- Fragmenten mit Garn befestigt. Es ist von Vorteil, wenn diese Einspannhilfe aus einem Gemisch aus Holz und Kork gefertigt wird. Das Holz gibt dem Konstrukt die Festigkeit, während die Korkschicht zum Schutz der Flügel eine gewisse Elastizität bietet (Napier, 1930). Der Umfang wurde so abgemessen, dass sie beim Zusammendrücken in einen Glaszylinder (Durchmesser: 1 cm; Länge: 3 cm) passt (siehe Abb. 1a). Dadurch wird ein Zusammenhalten der Einspannhilfe bewerkstelligt.

Fütterungskapillaren:

Die Kapillaren sollten einen Außendurchmesser von nicht größer als 1 mm besitzen (Napier, 1930). Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden Kapillaren mit einem Fassungsvolumen von 5 µl, 10 µl und 20 µl getestet. Zusätzlich zur Apparatur gehörte ein Kunststoffkügelchen, welches ein Loch entlang der Achse besaß. Dieses Kügelchen hatte einen Durchmesser um in die gegenüberliegende Seite des Glaszylinders mit der sich darin befindlichen Einspannhilfe zu passen. Durch dieses Loch wurde die Kapillare geführt und zusätzlich mit Watte ausgestopft um einen festen Sitz zu gewährleisten (siehe Abb. 1c und d). Das Kunststoffkügelchen selbst besaß eine Beweglichkeit in alle Richtungen innerhalb des Glaszylinders. Dadurch wird eine Bewegung der Kapillare ermöglicht, dennoch weist diese Methode eine gewisse Stabilität auf.

Um dem Glaszylinder unter dem Binokular zu fixieren wurde eine aus Plastellin bestehende Vorrichtung dafür geformt. Mit dem Plastellin ist es möglich die Höhe der Apparatur zu variieren. Auch die Kapillare wurde auf einer höhenverstellbaren Plastellin-Vorrichtung platziert.

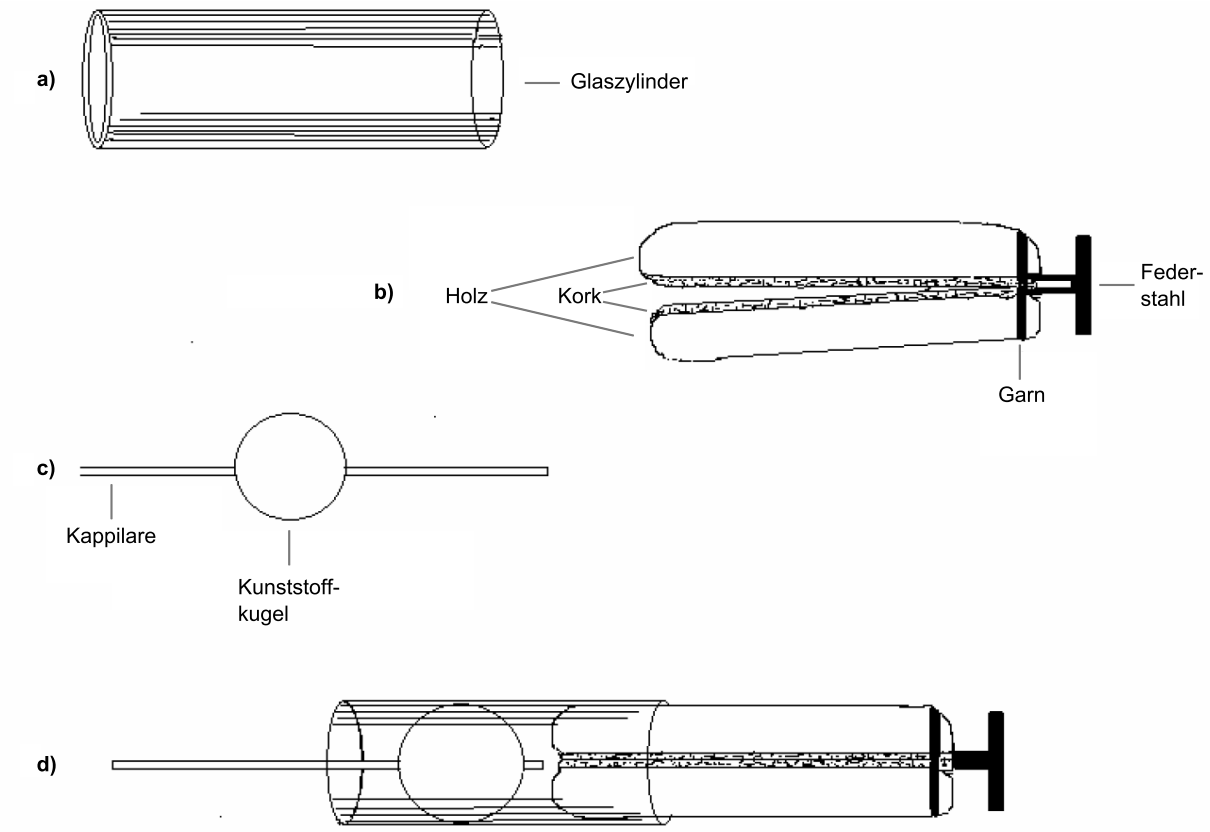

Abb. 1: *Vereinfachte Darstellung der separaten Bestandteile der Fütterungsapparatur. a: Glaszylinder; b: Pinzette aus Holz und Kork; c: Fütterungskapillare mit Kunststoffkugel; d: separate Bestanteile der Fütterungsapparatur zusammengefügt*

2.9.2 Methodik der kapillaren Blutfütterung

Um sich mit der Apparatur vertraut zu machen, wurden die Fütterungsversuche zuvor an größeren Mücken der Gattung Culex erprobt. Die eigentlichen Versuche erfolgten an Sandmücken der Art *Phlebotomus duboscqi* und *Phlebotomus mascittii.*

Die Sandmücken wurden für jeweils 10 min mit CO_2 narkotisiert (Perrotti & Maroli, 1993). Durch die Narkose wird die Verletzungsgefahr beim Einspannen der Sandmücke auf ein Minimum reduziert. Für gewöhnlich sind die Beine der narkotisierten Phlebotomen zusammen liegend und ausgestreckt (Napier, 1930). Auch die Flügel sind in diesem Zustand nach oben gerichtet. Mit Hilfe einer feinen Federstahlpinzette werden die Beine der Sandmücke ergriffen und die Flügel zwischen die Korkschichten der Holz/Kork- Konstruktion fixiert. Somit haben die Sandmücken eine gute Bewegungsfreiheit der Beine, der Thorax ist allerdings unbeweglich. Unter dem Binokular wird nach dem Andauern der Narkose die mit Blut gefüllte Kapillare über den Saugrüssel gestülpt. Dabei sollte die Kopfneigung der Sandmücke zur Kapillarachse einen Winkel von 160° einnehmen (Alekseev & Saf' Janova, 1966).

Bei der Fütterung wurde mit EDTA- Blut (mit Gerinnungshemmer versehenes Blut) von Hund und Mensch gearbeitet. Die Kapillare musste mehrfach während eines Fütterungsvorganges gewechselt werden, da es schnell zum Trocknen des Blutes auf Grund des geringen Durchmessers der Kapillare kam. Damit wurde zusätzlich ein Verkleben der zarten Mundwerkzeuge verhindert.

Untersuchungen von Alekseev & Saf' Janova (1968) beschreiben, dass es zu einer deutlichen Beschleunigung des Saugaktes kommt, wenn während der Fütterung zusätzlich mit warmen Licht einer starken Lichtquelle stimuliert wird.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungszeitraum und Fanggebiete

Im Sommer 2007 wurden 41 Sandmücken der Art *P. mascittii* an acht verschiedenen Standorten in fünf Orten in Baden-Württemberg und in Cochem (Rheinland-Pfalz) gefangen. Es handelte sich hierbei um bereits bekannte und neue Standorte. Die Fangdaten, zugehöriger Standort sowie Anzahl der gefangenen Sandmücken sind tabellarisch im Anhang dargestellt.

Von Juli bis August 2008 wurden 13 neue Standorte für Deutschland innerhalb von Baden-Württemberg der Sandmücke *Phlebotomus mascittii* nachgewiesen werden. Es wurden insgesamt 24 Sandmücken der Art *Phlebotomus mascittii* an 15 verschiedenen Standorten in zwölf Orten gefangen. Zusätzlich wurden an zwei weiteren Standorten in Rheinland- Pfalz drei Individuen der Sandmückenart *Phlebotomus perniciosus* nachgewiesen. Die Fangdaten, zugehöriger Standort sowie Anzahl der gefangenen Sandmücken sind ebenfalls tabellarisch im Anhang dargestellt.

3.2 Beschreibungen der Standorte

3.2.1 Standorte 2007

Bremgarten

Bereits im Jahr 1999 konnten an diesem Standort mit den Koordinaten: 47° 55' 0.3" N; 07° 37' 18.0" O Sandmücken gefangen werden (Abb. 2). Hier befinden sich ein Schweine- und ein Hühnerstall. Der am Dorfrand gelegene Stall wird von rissigen Mauern umgeben und besitzt einen Lehmboden. Hier gelang es, Sandmücken in einer Höhe von etwa 5 m auf einem Heuboden zu fangen. An diesem Standort wurden 6-12 weibliche und möglicherweise 1 männliches Tier gefangen (nicht eindeutig zuzuordnen, da zusammen mit Sandmücken aus Obereggenen „Lämmlins“ in einem Brutgefäß aufbewahrt).

Abb. 2: *Scheune Bremgarten*

Cochem (Dortebachtal)

Mit dem Dortebachtal und seinen Trockenrasenhängen wurde 1930 das erste Naturschutzgebiet an der Mosel geschaffen (Abb. 3). Hier findet man seltene Tier- und Pflanzenarten, die sonst nur im mediterranen Raum vorkommen.

Bei den Koordinaten 50° 19' 41.2" N; 07°15' 36.9" O wurde eine männliche und eine weibliche Sandmücke gefangen.

Abb. 3: *Cochem – Dortebachtal*

Liel, Pferdehof

Es handelt sich um einen kleinen Reiterhof mit zusätzlicher Kleintierhaltung (Abb. 4). Die Koordinaten betragen 47° 44' 23.0" N; 07° 36' 1 5.5" O. An diesem Standort wurde eine weibliche Sandmücke gefangen und gilt somit als neuer Fundort für Phlebotomen.

Abb. 4: *Liel – Pferdehof*

Neuenburg (Mühlenstraße)

Hier handelt es sich um einen innerstädtischen Standort mit den Koordinaten: 47° 48' 34.7" N; 07° 33' 42.8" O (Abb. 5). Der Lehm boden der Scheune ist teilweise gepflastert. Eine Falle wurde in der Nähe eines Kleintiergeheges aufgehängt. Zusätzlich wurde eine Falle an einem Haufen von Holzscheiten platziert, eine weitere bei der Tür zur Wiese. Hier wurde eine weibliche Sandmücke gefangen. Dieser Ort wird somit als neuer Standort dokumentiert.

Abb. 5: *Scheune Neuenburg – Mühlenstraße*

Neuenburg Rudolf-Diesel-Straße

Bei diesem neuen Standort mit den Koordinaten: 47° 36' 27.0" N 07° 33' 39.4" O handelt es sich um eine große Scheune, an der außerhalb in einem Gebüsch Sandmückenfallen platziert wurden (Abb. 6). Es konnten fünf weibliche Sandmücken gefangen werden.

Abb. 6: *Scheune Neuenburg – Rudolf-Diesel-Straße*

Obereggenen (Lämmlins)

Dieser Standort mit den Koordinaten: 47° 45' 22.6" N 07° 38' 46.5" O ist bereits seit 2003 bekannt und konnte erneut bestätigt werden. Es handelt sich hier um eine familienbetriebliche Schnapsbrennerei bestehend aus einem Wohnhaus, einem leerstehenden Kuhstall, sowie einer zweigeteilten Scheune (Abb. 7). Der linke mit dem Kuhstall verbundene Teil der Scheune beherbergt die Behälter und Geräte für den Obst- bzw. Weinanbau. Der Boden der Scheune ist über eine Treppe oder Leiter zu erreichen, hier wurden ebenfalls Fallen platziert. Der Boden der Scheune ist zum Teil gepflastert und zum anderen Teil besteht er aus festgetretenem Sand bzw. Lehm. Des Weiteren gehört zu der Scheune auf der rechten Seite ein kleiner, betonierter Werkzeugschuppen. Auch jener konnte als positiver Standort bestätigt werden. Hier wurden insgesamt 4-5 männliche und 9-15 weibliche Phlebotomen gefunden werden (nicht eindeutig zuzuordnen, da zusammen mit Sandmücken aus Bremgarten in einem Brutgefäß aufbewahrt).

Abb. 7: *Scheune Obereggenen – „Lämmlins“*

Obereggenen (Lämmlins Mieter)

Auch dieser seit 2003 bekannte Standort mit den Koordinaten 47° 45' 24.4" N; 07° 38' 40.5" O konnte ein weiteres Mal bestätigt w erden. Hierbei handelt sich um eine alte Scheune mit einem Lehmboden und einer kleinen Werkzeugecke (Abb. 8). Zusätzlich wurden auch Fallen im Foyer der Scheune auf gehangen. Es wurden eine weibliche und eine männliche Sandmücke gefangen.

Abb. 8: *Scheune Obereggenen – „Lämmlins Mieter“*

Zienken (Obere Dorfstraße)

Dieser neue Standort mit den Koordinaten: N 47° 50' 26.6" N 07° 34' 46.5" O umfasst eine kleine einseitig geöffnete Scheune auf einem Hof einer Wohnsiedlung und ist teilweise gepflastert, teilweise von Lehmboden bedeckt (Abb. 9). Platziert wurden die Fallen in unterschiedlichen Höhen an einem Haufen aus Holzscheiten innerhalb der Scheune. Es wurden vier weibliche Sandmücken gefangen.

Abb. 9: *Scheune in Zienken – Obere Dorfstraße 9*

3.2.2 Standorte 2008

Auggen, Am Erzbuck 14

In einer Gerätescheune dieses Standortes wurde mit Hilfe einer Lichtfalle ein weibliches Individuum der Sandmückenart *Phlebotomus mascittii* gefangen (Abb.10). Die Koordinaten dieses Standortes betragen 47° 47' 09" N; 07° 35' 33" O. Die Scheune gehört zu einem großen Wohnhaus, deren Besitzer mehrere Ferienwohnungen zur Vermietung geben. Des Weiteren ist sie durch einen naturbelassenen Boden aus Lehm gekennzeichnet und beherbergt eine Vielzahl landwirtschaftlicher Geräte. Ein Hund und einige Katzen, als mögliche Wirte, zählen ebenfalls zum Anwesen.

Abb. 10: *Scheune in Auggen – Am Erzbuck 14*

Eschbach, Rebweg 1

Bei diesem neuen Standort mit den Koordinaten 47° 5 3’ 18” N; 7° 39’ 32“ O handelt es sich um einen innerdörflichen alten Holzschuppen, der in erster Linie der Gerätelagerung dient (Abb.11). Der Boden besteht aus festgetretenem Lehm. Tierhaltung wurde an diesem Standort nicht beobachtet. Hier wurden in einer Nacht mit Hilfe einer Lichtfalle eine männliche und vier weibliche Sandmücken der Art *Phlebotomus mascittii* gefangen. An diesem Standort gelang es nicht nur die meisten, sondern auch Sandmücken beider Geschlechter nachzuweisen.

Abb. 11: *Schuppen in Eschbach – Rebweg 1*

Eschbach, Hauptstr. 55

In einer Durchfahrt mit angrenzenden Schuppeneingängen konnte mit Hilfe von Lichtfallen ein weibliches Individuum der Sandmückenart *Phlebotomus mascittii* nachgewiesen werden. Die Koordinaten dieses Standortes betragen 47° 53' 22" N; 07° 39' 23" O.

Die Lichtfalle wurde außerhalb des Schuppeneinganges in der Durchfahrt an der Tür platziert (Abb.12). Sowohl in dem Holzschuppen als auch außerhalb ist der Boden teils von lehmiger und teils von betonierter Beschaffenheit. Der Holzschuppen dient ausschließlich dem Gebrauch zur Lagerung von Holzspeermüll. Darüber hinaus wurde der kleine Schuppen kaum genutzt. Tierhaltung konnte nicht beobachtet werden.

Abb. 12: *Standort in Eschbach – Hauptstraße 55*

Hochstetten (Breisach am Rhein), Klosteräcker 2

Bei diesem Anwesen handelt es sich um ein Pferdegehöft mit drei Pferdestellen, Hof und Wohnhaus (Abb.13). Die Koordinaten dieses Standortes betragen 48° 01' 16" N; 07° 36' 42" O. Eine Lichtfalle wurde über Nacht in eine am Pferdestall angrenzende Gerätescheune platziert. Diese zum Hof hin offene Scheune dient lediglich zur Deponierung von altem Holz- und Speermüll. Zusätzlich wird aber auch ein Heuwagen dort untergestellt. Bei dem Boden handelt es sich um Sand- bzw. Lehmboden. Neben den Pferden, als mögliche Blutwirte, wurden auch Hunde und Katzen auf dem Hof gesichtet. Vor Ort wurde ein männliches Individuum der Sandmückenart *Phlebotomus mascittii* nachgewiesen.

Abb. 13: *Pferdehof in Hochstetten – Klosteräcker 2*

Eschbach, Hauptstr. 1

An diesem Standort mit den Koordinaten 47° 53' 30" N; 07° 39' 05" O wurde eine weibliche Sandmücke der Art *Phlebotomus mascittii* gefangen. Bei diesem Bauernhof handelt es sich um einen am Stadtrand gelegenen Familienbetrieb mit Kartoffelanbau. Eine Lichtfalle wurde im oberen Teil der Scheune bei einer Höhe von ungefähr fünf Metern platziert (Abb.14). Dieser Bereich besteht aus einem betonierten Boden und wird von einem steinernen Gemäuer mit Holzbalken umfasst. Der Boden dient hauptsächlich der Lagerung von landwirtschaftlichen Geräten und Holzsperrmüll. Neben der Familie und Angestellten, befindet sich auch ein Hund auf dem Bauernhof.

Abb. 14: *Bauernhof in Eschbach – Hauptstraße 1*

Breisach (Niederrimsingen), Merdingerstr. 25

Dieser Standort mit den Koordinaten 47° 59' 18" N; 7° 40' 14" O zeichnet sich durch eine gemauerte aber auch aus Holz bestehende Scheune im innerdörflichen Bereich aus (Abb.15). Diese teils mit sandigen Naturboden versehene aber auch teils betonierte Scheune wird hauptsächlich zur Lagerung von Geräten, Fahrrädern und Speermüll genutzt. Die Lichtfalle wurde direkt neben der Scheunetür platziert. Vor Ort wurde eine männliche Sandmücke der Art *Phlebotomus mascittii* gefangen.

Abb. 15: *Scheune in Niederrimsingen – Merdingerstraße 25*

Hartheim (Feldkirch), Dorfstr. 22

Bei diesem Standort mit den Koordinaten 47° 56' 11" N; 7°38' 50" O handelt es sich um eine alte kaum genutzte Holzscheune mit teils betoniertem und teils sandigem Untergrund (Abb.16). Die Scheune befindet sich im innerdörflichen Bereich. An diesem Standort wurde 1 weibliche Sandmücke der Art *Phlebotomus mascittii* mit Hilfe einer Lichtfalle gefangen.

Abb. 16: *Scheune in Feldkirch – Dorfstraße 22*

Zienken, Obere Dorfstr. 9

Dieser Standort mit den Koordinaten 47° 50' 26" N; 07° 34' 47" O wurde bereits im Jahr 2007 mit dem Vorkommen von Sandmücken bekannt. Mit dem Fang eines männlichen Individuums der Sandmückenart *Phlebotomus mascittii* konnte dieser Standort erneut bestätigt werden. Es handelt sich hierbei um eine kleine einseitig geöffnete Scheune auf einem Hof einer Wohnsiedlung und ist teilweise gepflastert, teilweise aber auch von Lehmboden bedeckt. Platziert wurde die Falle an einem Haufen aus Holzscheiten innerhalb der Scheune (Abb.17).

Abb. 17: *Scheune in Zienken – Obere Dorfstraße 9*

Neuenburg, Gutnauweg

In einer Scheune, gehörend zu einem Einfamilienhaus im innerstädtischen Bereich, konnte ein weibliches Individuum der Sandmückenart *Phlebotomus mascittii* nachgewiesen werden. Die Koordinaten dieses Grundstücks sind 47° 48' 36" N, 07° 33' 52" O. Mit Ausnahme einer kleinen Ecke im vorderen Teil der Scheune, ist die komplette Scheune mit Zementboden versehen. In der besagten Ecke mit lehmartigem Naturboden, wurde eine Lichtfalle zum Fang von Sandmücken platziert (Abb.18). In unmittelbarer Nähe zur Lichtfalle war ein Käfig mit Kaninchen untergebracht, die möglicherweise zum Blutmahl von den Sandmücken angeflogen werden können.

Abb. 18: *Scheune in Neuenburg – Gutauweg*

Heuweiler, Dorfstr. 23

Dieser neue Standort für das Vorkommen von *Phlebotomus mascittii* befindet sich im innerdörflichen Bereich (Abb.19). Die Koordinaten dieses Bauernhofes sind: 48° 03' 07" N, 07° 54' 09" O. Platziert wurde die Lichtfa lle in einem kleineren Teil der Scheune, die zur Lagerung von Mehl und Sägespäne dient. Der Boden besteht aus Holzdielen. Des Weiteren ist zu bemerken, dass in einem weiteren Teil der Scheune nebenan Kühe gehalten werden. Zusätzlich wurden mehrere Katzen auf dem Hof gesichtet. An diesem Standort wurde eine weibliche Sandmücke gefangen.

Abb. 19: *Bauernhof in Heuweiler – Dorfstraße 23*

Gündlingen, Hauptstr. 32

Ein weiterer neuer Fundort für Sandmücken befindet sich in Gündlingen (Breisach am Rhein) im innerdörfliche Bereich mit den Koordinaten 48° 00' 47" N, 07° 38' 29" O. Platziert wurde die Lichtfalle auf dem Speicher der Holzscheune in ca. 3 Meter Höhe (Abb.20). Auf dem Speicher wird überwiegend Holz- und Sperrmüll, aber auch Stroh gelagert. Vor Ort wurde ein weibliches Individuum der Sandmückenart *Phlebotomus mascittii* gefangen.

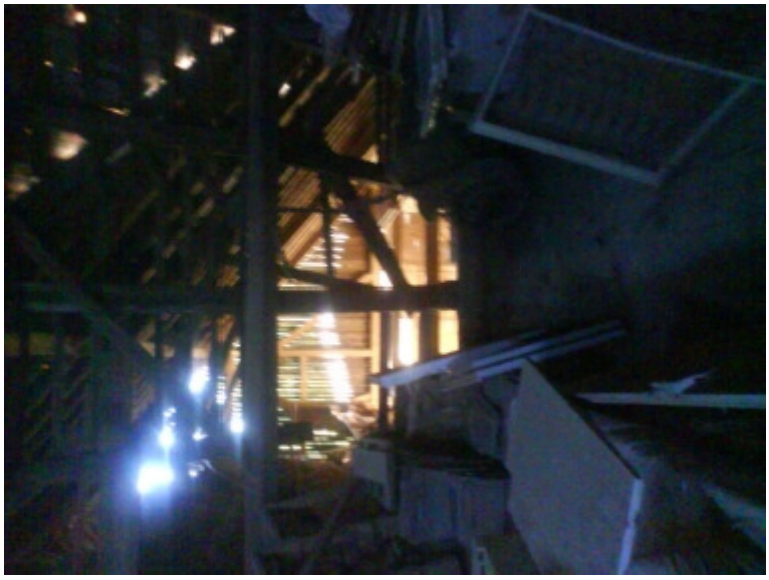

Abb. 20: *Scheune in Gündlingen – Hauptstraße 32*

Rust, Fischerstr. 47

In einem kleinen Stall gehörend zu einem Grundstück mit den Koordinaten 48° 16' 02" N, 07° 43' 29" O konnte das Vorkommen zweier weiblicher Sandmücken der Art *Phlebotomus mascittii* nachgewiesen werden (Abb.21). Mittlerweile gibt es in diesem Stall keine Tierhaltung mehr. Er dient lediglich zur Lagerung von Stroh und Sperrmüll. Der Stall gehört zu einer größeren Scheune aus altem Gemäuer. Als Blutmahl können nur die auf dem Grundstück lebenden Menschen in Frage kommen, da keine Tierhaltung beobachtet wurde.

Abb. 21: *Stall in Rust – Fischereistraße 47*

Kappel- Grafenhausen, Rathausstr. 32

Bei diesem Standort mit den Koordinaten 48° 17' 26' ' N, 07° 44' 44" O handelt es sich um eine einseitig geöffnete Scheune mit Lehmboden, teilweise aber auch betoniert. Die Scheune diente ausschließlich der Lagerung von großen Mengen Brennholz, an deren Stelle eine Lichtfalle platziert wurde (Abb.22). Als nötiger Blutwirt könnte der zur Familie gehörige Hund dienen. Vor Ort wurden 2 weibliche Sandmücken der Art *Phlebotomus mascittii* nachgewiesen.

Abb. 22: *Scheune in Kappel-Grafenhausen – Rathausstraße 32*

Nanzdietschweiler (Rheinland- Pfalz)

An diesem Standort mit den Koordinaten 49° 26' 25" N, 07° 26' 12" O konnte ein weibliches Individuum der Art *P. perniciosus* nachgewiesen werden.

Schmittweiler (Rheinland- Pfalz)

Die Koordinaten dieses Standortes betragen 49° 24' 32" N, 07° 20' 28" O. Vor Ort konnten eine weibliche und eine männliche Sandmücke der Art *P. perniciosus* gefangen werden.

3.3 Zuchtaufbau von *Phlebotomus mascittii*

Zum Aufbau einer Zucht von *Phlebotomus mascittii* wurden aus Korsika stammenden Lebendfänge in die dafür vorgesehenen Brutgefäße überführt und bei einer konstanten Luftfeuchtigkeit und Raumtemperatur von 19°C gehalten. Begonnen wurde die Inzuchtnahme mit sechs Sandmücken, davon vier weibliche und zwei männliche, sowie zehn Eiern. Aus den abgelegten Eiern sind Larven geschlüpft, die mit dem speziell hergestellten Larvenfutter ernährt wurden. Nach anfänglichen Schwierigkeiten besteht die Zucht derzeit aus ca. 400 Larven aller vier Stadien und zwei adulten Sandmücke der bereits zweiten Generation. Daraus wird ersichtlich, dass der gesamte Zyklus bei *P. mascittii* zweimal im Jahr unter Laborbedingungen durchlaufen wird. Die Zucht ist derzeit soweit stabil, dass in naher Zukunft Übertragungsexperimente mit *L. infantum* in einem S3- Labor bzw. im Ausland geplant werden können.

3.4 Kapillare Blutfütterung von Sandmücken

Getestet wurde diese unter Kapitel 2.9 beschriebe Methode erfolgreich mit neun Mücken der Gattung *Culex*. Hierbei wurden Kapillaren mit einem Fassungsvolumen von 20 µl verwendet. Neben Weibchen konnten sogar auch die männlichen Individuen zum Blutmahl animiert werden. Dabei zeigten sie zum Teil ein mit Blut prall gefülltes Abdomen. Durchgeführt wurde die kapillare Blutfütterung insgesamt bei 13 Individuen der Sandmückenart *P. duboscqi* und vier der Sandmückenart P. *mascittii*. Hierbei konnte nur zur zum Teil eine zwanghafte Blutfütterung erzielt werden. So zeigten vier weibliche Individuen der Art *P. duboscqi* und ein weibliches Individuum der Art *P. mascittii* eine mehr oder weniger gut ausgeprägte Rotfärbung durch Blutansammlung im Bereich des Thorax. Auch durch länger andauernde Fütterungszeiten konnten die Sandmücken nicht zum vollständigen Blutmahl angeregt werden. Während eines Fütterungsvorganges mussten die Kapillaren mehrfach gewechselt werden, da das Blut aufgrund des geringen Durchmessers der Kapillare sehr schnell trocknete. Daher wurden die Sandmücken des Öfteren während des Blutmahls gestört. Aus diesem Grund wurden bevorzugt Kapillaren mit einem Fassungsvolumen von 10 µl verwendet. Der Nachteil hierbei allerdings war, dass der Durchmesser nicht nur die Stechwerkzeuge sondern den gesamten Kopf der Phlebotomen umfasste. Nichtsdestotrotz konnte mittels dieser Methode eine von außen induzierte Blutfütterung erzielt werden. Allerdings ist die Methodik bei dieser Art der Fütterung noch nicht völlig ausgereift. Es stellt sich die Frage, inwieweit die Methode der Verbesserung bedarf, um eine vollständige Blutfütterung zu ermöglichen. Bei *P. mascittii* wurde bisher noch keine Vektorkompetenz zur Übertragung von Leishmaniose nachgewiesen. Allerdings wird *P. mascittii* Genera zugeordnet, deren Arten sehr wohl als bekannte Vektoren fungieren. Um eine eventuelle Vektorkompetenz zu klären, soll diese Fütterungstechnik im Rahmen von Übertragungsexperimenten bei *P. mascittii* angewandt werden. Somit könnten jegliche Art von Tierversuchen, wie das Blutsaugen an Hunden, unterbunden werden. Im Rahmen dieses Projektes sind in Zukunft noch einige grundlegende Fragen bezüglich der Methodik zu klären.

3.5 Verbreitung von Sandmücken in Deutschland

Die Verbreitung von *P. mascittii* in Deutschland konzentriert sich bisher auf Regionen innerhalb von Baden- Württemberg entlang des Rheingrabens. Ein weiterer Standort konnte weiter nörd-

lich in einer Region von Rheinland-Pfalz (Cochem- Dortebachtal) nachgewiesen werden. Zwei Standorte der Sandmückenart *P. perniciosus* wurden ebenfalls in Rheinland-Pfalz nachgewiesen. Bemerkenswert ist, dass in dieser Region seit 2001 bereits drei autochton erworbene Erkrankungen an Leishmaniose bei Hunden dokumentiert wurden. Sandmücken werden nur in einem Umkreis von etwa zwei Metern durch Lichtfallen angelockt. Daher basieren die Fänge auf einem Zufallsprinzip. Nicht jeder negative Fang beweist die Abwesenheit von Sandmücken am untersuchten Standort. Zusätzlich wurden die Fangaktionen bisher noch nicht auf ganz Deutschland ausgeweitet, sondern nur lokal auf Gebiete begrenzt, in deren Nähe bereits Sandmücken bzw. autochton erworbene Leishmaniose-Fälle nachgewiesen wurden. Somit kann über die momentane Verbreitung von Sandmücken in Deutschland keine endgültige Aussage getroffen werden.

Die Abbildungen 23 und 24 zeigen die für 2008 aktuellen Verbreitungsgebiete von Sandmücken in Deutschland. Das Vorkommen von *P. mascittii* wurde in den Abbildungen rot, das Vorkommen von *P. perniciosus* in blau dargestellt.

Abb. 23: *Die Verbreitung von Sandmücken in Deutschland 2008 (1)*

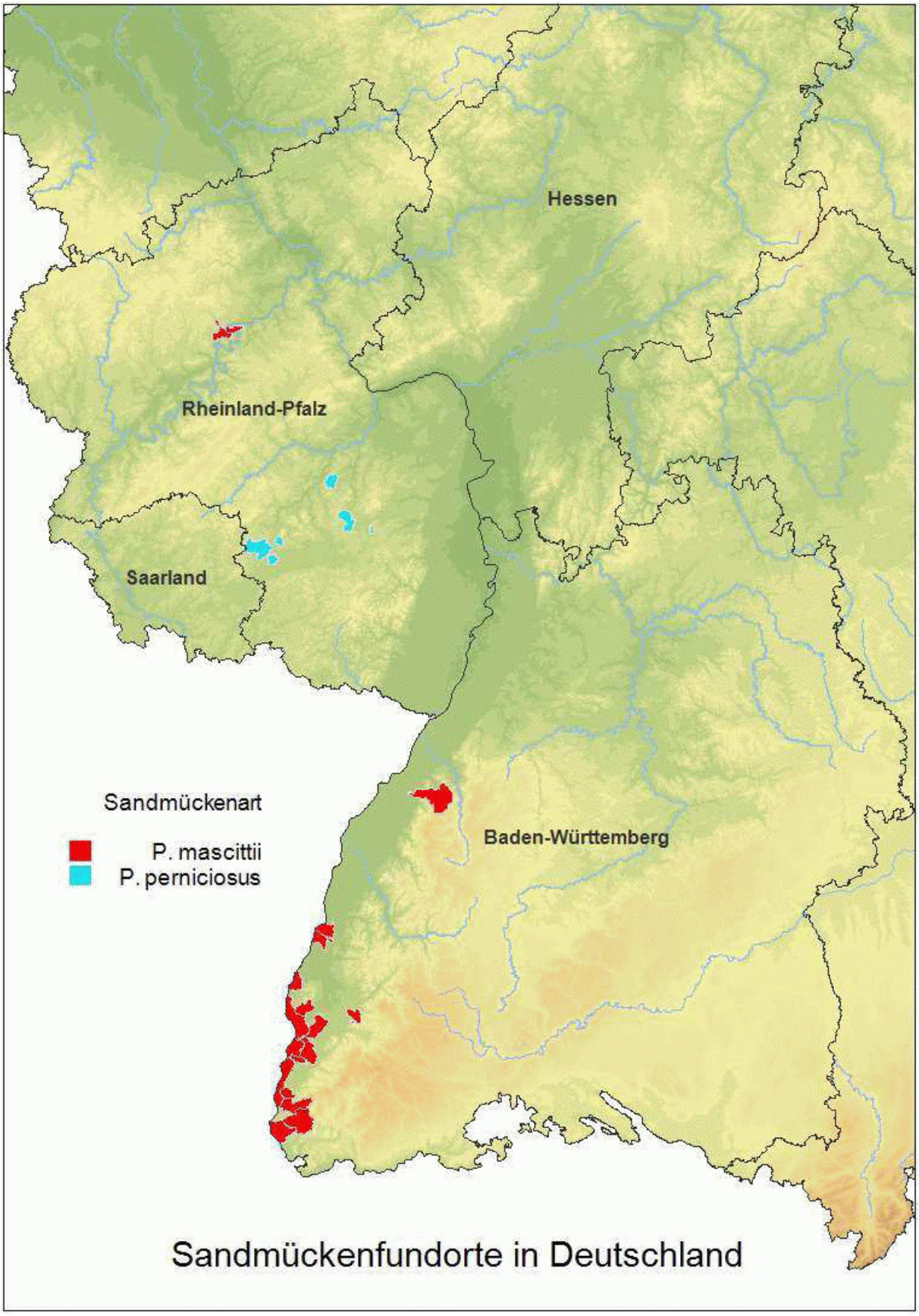

Abb. 24: *Die Verbreitung von Sandmücken in Deutschland 2008 (2)*

Abbildung 25 zeigt die Verbreitungsgebiete von *Phlebotomus mascittii* und *Phlebotomus perniciosus* in Deutschland in dem Zeitraum von 2001 bis 2005 mit angegebener Jahresdurchschnittstemperatur. Zusätzlich sind Gebiete von autochton erworbenen Leishmaniosefällen in der Abbildung dargestellt.

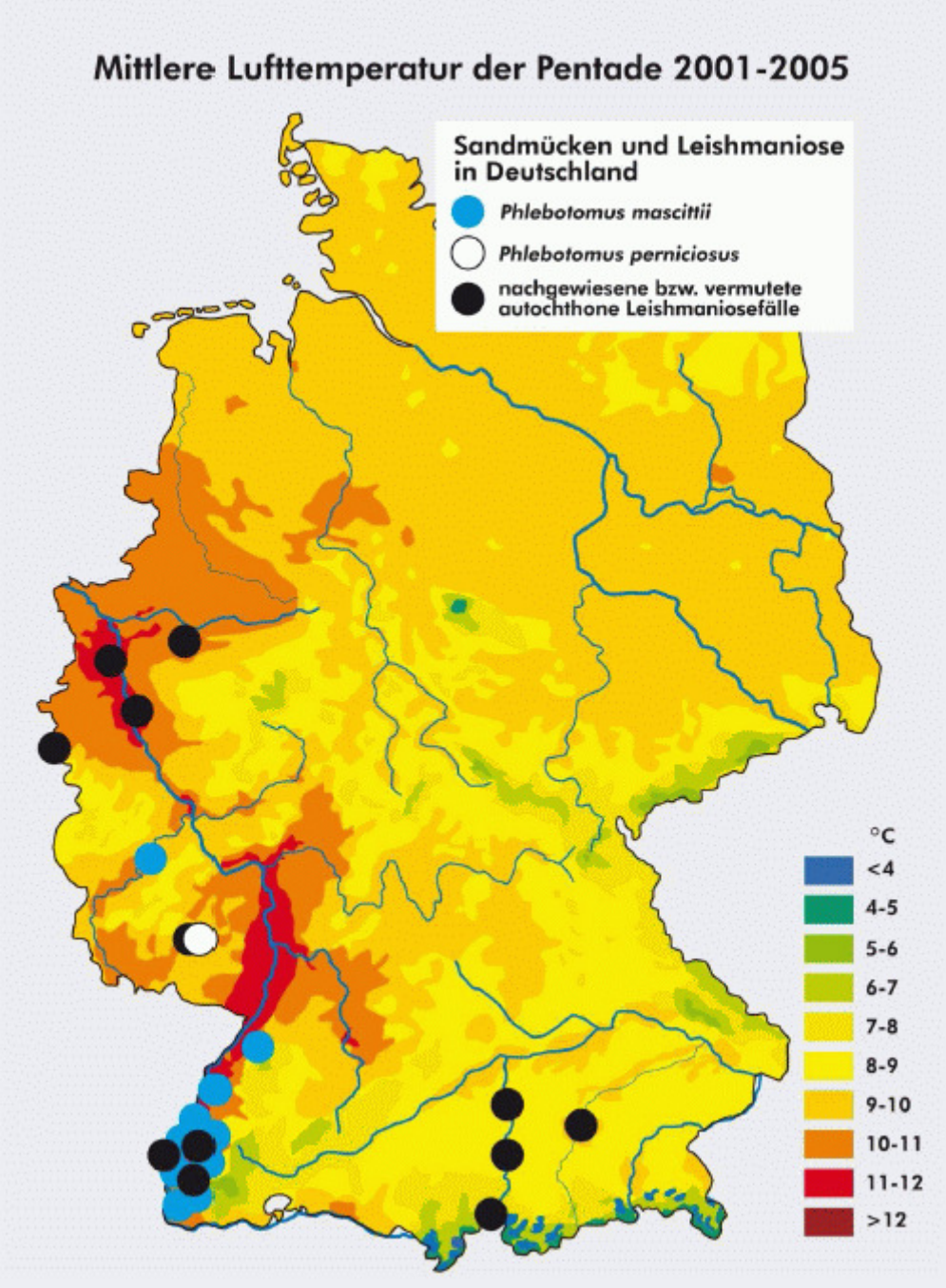

Abb. 25: *Verbreitungskarte von Sandmücken in Deutschland (2001 bis 2005)*

Literatur

ABONNENC, E. & PASTRE, J. (1972): Récoltes de phlébotomes en République Sud-Africaine, avec description de *P. macintoshi*, n. sp. (Diptera, Psychodidae). Bulletin de la Société de Pathologie Exotique, **65**, 721-725

ALEKSEEV, A.N. & SAF'JANOVA, V.M. (1966): A method for forced infecting feeding of sandflies (subfamily Phlebotominae) with dosed amounts of leptomonad cultures (in Russian). Medicinskaja Parazitologija I Parazitarnye Bolezni, Moskva, **35**, 49-55

ALEKSEEV, A.N. & SAF'JANOVA, V.M. (1968): Some observations compulsory feeding of sandflies (Diptera, Phlebotominae) with the culture of leptomonads (in Russian). Zoologiceskij Zurnal, Moskva, **47(1)**, 91-98

BASIMIKE, M. & MUTINGA, M.J. (1990): Temperature and moisture content of soils in termite mounds and animal burrows in relation to relative abundance of adult phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in Margat semiarid area, Baringo District, Kenya. Environmental Entomology, **19**, 487- 489

CHANIOTIS, B.N. (1974): Sugar- feeding behaviour of *Lutzomyia trapidoi* (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. Journal of Medical Entomology, **11**, 73-79

CROSS, E. R. & HYAMS, K. C. (1996): The potential Effect of Global Warming on the Geographic and Seasonal Distribution of *Phlebotomus papatasi* in Southwest Asia. Environmental Health Perspectives, **104**, (7), 724-727

DEPAQUIT, J., NAUCKE, T.J., SCHMITT, C., FERTÉ, H. & LÉGER, N. (2005): A molecular analysis of the subgenus *Transphlebotomus* Artemiev, 1984 62 (*Phlebotomus*, Diptera, Psychodidae) inferred from ND4 mtDNA with new northern records of *Phlebotomus mascittii* Grassi, 1908. Parasitology Research, **95 (2)**, 113 -6

DÉSJEUX, P. & WAROQUY, L. (1981): Etude entomologique de 3000 phlébotomes (Diptera, Psychodidae) du Sénégal. Infestation spontanée par Trypanosomatidae. Afrique Médicale, Sénégal, **20**, 347- 352

DOERR, R., FRANZ, K. & TAUSSIG, S. (1909): Das Pappatacifieber, ein epidemisches Drei-Tage- Fieber im adriatischen Küstengebiet Österreich- Ungarns. Wiener Klinische Wochenschrift, **22**, 609- 610

FAIRCHILD, G.B. & Harwood, R.F. (1961): *Phlebotomus* sandflies from animal burrows in Eastern Washington. Proceedings of the Entomological Society of Washington, **63**, 239-245

FIALHO, R.F. & SCHALL, J.J. (1995): Thermal ecology of a malaria parasite and it's insect vector. Consequences for the parasites transmission success. Journal of Animal Ecology, **64**, 553-562

GIL COLLADO, J., MORILLAS MARQUEZ, F. & SANCHIS MARIN, M.C. (1989): Los flebotomos en Espana. Revista de Sanidad e Higiene Publica, Madrid, **63 (5-6)**, 15-34

GILLES, M.T. & WILKES, T.J. (1981): Field experiments with a wind tunnel on the flight speed of some West African mosquitos (Diptera: Culicidae). Bulletin of Entomological Research, **71**, 65-70

GRAMICCIA, M., GRADONI, L.& MAROLI, M. (1989): Caractérisation enzymatique de *Trypanosoma platydactyli* Catouillard, 1909, isolé de *Sergentomyia minuta minuta* Rondani, 1843, en Italie. Annales de Parasitologie Humaine et Comparée, **64**, 154-156

GRIMM, F., GESSLER, M. & JENNI, L. (1993): Aspects of sandfly biology in southern Switzerland. Medical and Veterinary Entomology, **7**, 170- 176

HANSON, W.J. (1961): The breeding places of *Phlebotomus* in Panama (Diptera, Psychodidae). Annals of the Entomological Society of America, **54**, 317-322

HERTIG, A.T. & HERTIG, M. (1927): A technique for artificial feeding of sandflies (*Phlebotomus*) and mosquitoes. Science, **65**, 328-506

HERTIG, M. (1942): Phlebotomus and Carrion's disease. American Journal of Tropical Medicine, **22**, 1-75

HOWLETT, F.M. (1913): The breeding places of Phlebotomus. The Journal of Tropical Medicine and Hygiene, **16,** 255-256

IRUNGU, L.W., MUTINGA, M.J. & KOKWARO, E. D. (1986): Chorionic scultering of eggs of some Kenyan phlebotomine sandflies. Insect Science and its Application, **7**, 45-48

KILLICK- KENDRICK, R., WILKES, T.J., ALEXANDER, J., BRAY, R.S., RIOUX, J.-A.

& BAILLY, M. (1985): The distance of attraction of CDC light traps to phlebotomine sandflies. Annales de Parasitologie Humaine et Comparée, **60, 2**, 763- 767
KILLICK- KENDRICK, M. & KILLICK- KENDRICK, R. (1991): The initial establishment of sandfly colonies. Parassitologia, **33 (Suppl.)**, 315-320
KILLICK- KENDRICK, M., KILLICK- KENDRICK, R. (1999): Biology of sandfly vectors of Mediterranean canine leishmaniasis. Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum, Barcelona, Spain, 26-31
KING, H.H. (1914): Observations on the breeding place of sandflies (*Phlebotomus ssp.)* in the Anglo- Egyptian Sudan. The Journal of Tropical Medicine and Hygiene, **17**, 2-3
MARCHAIS, R., BOUCHET, F. & BOUCHET, P. (1991): Laboratory rearing of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae) and fungal growth problems. Parassitologia, **33 (Suppl.)**, 393-397
MENDOZA MONTERO, J., GAMEZ RUEDA, M. I., NAVARRO MARI, J.M., DE LA ROSA FRAILE, M. & OYONARTE, G. (1998): Infections due to sandfly fever virus serotype Toscana in Spain. Clinical Infectious Diseases, **27**, 434- 436
MODI, G.B., SOMAN, R.S., MISHRA, A.C., GURU, P.Y. & SHETTY, P.S. (1977): A report on phlebotomid sandflies (Diptera: Phlebotomidae) from Bankura district, West Bengal. Indian Journal of Medical Research, New Delhi, **66**, 373-378
MORILLAS MARQUEZ, F., GUEVERA BENITEZ, D.C., UBEDA ONTIVEROS, J.M. & GONZALES CASTRO, J. (1983): Fluctuations annuelles des populations de phlebotomes (Diptera, Phlebotomidae) dans la province de Grenade (Espagne). Annales de Parasitologie Humaine et Comparée, **58**, 625-632
NAPIER, L.E. (1930): The artificial feeding of sandflies. Indian Journal of Medical Research, New Delhi, **18**, 699- 706
NAUCKE, T.J. (1998): Untersuchungen zur Vektorkontrolle von Sandmücken (Diptera; Psychodidae) in Nordostgriechenland. Regensburg, S. Roderer Verlag, 1-205
NEWSTEAD, R. (1911): The papataci flies (*Phlebotomus*) of the Maltese Islands. Bulletin of Entomological Research, **2**, 47-78
PERROTTI, E. & MAROLI, M. (1993): Carbon dioxide anesthesia in phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae): CO_2 effect upon two laboratory colonies. Journal of the American Mosquito Control Association, **9**, 94-96
SCHREY, C.F., PIRES, C.A. & MACVEAN, D.W. (1989): Distribution of phlebotomine sandflies and the rate of their infection with *Leishmania* promastigotes in the Algarve, Portugal. Medical and Veterinary Entomology, **3**, 125- 130
SCHWARZ, T.F., JAEGER, G., GILCH, S., PAULI, C., EISENHUT, M., NITSCHKO, H. & HEGENSCHEID, B. (1996): Travel- related vector borne virus infections in Germany. Archives of Virology, Wien, **Suppl. 11**, 57- 65
THEODOR, O. (1958): Psychodidae- Phlebotominae. Stuttgart, Schweizerbert`sche Verlagsbuchhandlung, 1-55
TOUMANOFF, C. & CHASSIGNET, R. (1954): Contribution à l'étude des phlébotomes en Corse. Bulletin de l'Institut Nationale d' Hygiène, **9 (3)**, 664-687
TOWNSEND, C.H.T. (1914): The conquest of Verruga. A brief statement of the results of the investigation. Peru Today, Lima, **6**, 57- 57
WARD, R.D., LAINSON, R. & SHAW, J.J. (1978): Some methods for membrane feeding of laboratory reared, neotropical sandflies (Diptera: Psychodidae). Annals of Tropical Medicine and Parasitology, **72**, 269-276
WHO (1990): Control of the leishmaniasis. Genf, WHO, 1-158
YOUNG, D.G., PERKINS, P.V. & ENDRIS, R.G. (1981): A larval diet for rearing phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). Journal of Medical Entomology, **18**, 446

Anhang

Tab. 1: *Übersicht der Fundorte in Deutschland 2007*

Datum	Ort	Standort der Falle	Koordinaten	Geschlecht	Art
17.07.2007	Obereggenen	Lämmlins	47° 45' 22.6" N 07° 38' 46.5" O	m	P. mascittii
17.07.2007	Obereggenen	Lämmlins	47° 45' 22.6" N 07° 38' 46.5" O	f	P. mascittii
17.07.2007	Obereggenen	Lämmlins	47° 45' 24.4" N 07° 38' 40.5" O	m	P. mascittii
17.07.2007	Neuenburg	Rudolf-Diesel-Str.	47° 36' 27" N 07° 33' 39.4" O	f	P. mascittii
17.07.2007	Neuenburg	Rudolf-Diesel-Str.	47° 36' 27" N 07° 33' 39.4" O	f	P. mascittii
17.07.2007	Neuenburg	Rudolf-Diesel-Str.	47° 36' 27" N 07° 33' 39.4" O	f	P. mascittii
17.07.2007	Neuenburg	Rudolf-Diesel-Str.	47° 36' 27" N 07° 33' 39.4" O	f	P. mascittii
17.07.2007	Neuenburg	Rudolf-Diesel-Str.	47° 36' 27" N 07° 33' 39.4" O	f	P. mascittii
19.07.2007	Obereggenen	Lämmlins	47° 45' 22.6" N 0 7° 38' 46.5" O	f	P. mascittii
19.07.2007	Obereggenen	Lämmlins	47° 45' 22.6" N 0 7° 38' 46.5" O	m	P. mascittii
19.07.2007	Neuenburg	Mühlenstrasse	47° 48' 34.7" N 07° 33' 42.8" O	f	P. mascittii
19.07.2007	Zienken	Obere Dorfstr. 9	47° 50' 26.6" N 07° 34' 46.5" O	f	P. mascittii
19.07.2007	Zienken	Obere Dorfstr. 9	47° 50' 26.6" N 07° 34' 46,5" O	f	P. mascittii
19.07.2007	Zienken	Obere Dorfstr. 9	47° 50' 26.6" N 07° 34' 46.5" O	f	P. mascittii
20.07.2007	Liel	Pferdehof	47° 44' 23.0" N 07° 36' 15.5" O	f	P. mascittii
20.07.2007	Zienken	Obere Dorfstr. 9	47° 50' 26.6" N 07° 34' 46.5" O	f	P. mascittii
23.- 24.07.07	Cochem	Dortebachtal	50° 19' 41.2" N 07° 15' 36.9" O	m	P. mascittii
23.- 24.07.08	Cochem	Dortebachtal	50° 19' 41.2" N 07° 15' 36.9" O	f	P. mascittii
25.07.2007	Bremgarten		47° 55' 0.3" N 07° 37' 18.0" O	f	P. mascittii
26.07.2007	Bremgarten		47° 55' 0.3" N 07° 37' 18.0" O	f	P. mascittii
26.07.2007	Bremgarten		47° 55' 0.3" N 07° 37' 18.0" O	f	P. mascittii
26.07.2007	Bremgarten		47° 55' 0.3" N 07° 37' 18.0" O	f	P. mascittii
26.07.2007	Bremgarten		47° 55' 0.3" N 07° 37' 18.0" O	f	P. mascittii
26.07.2007	Bremgarten		47° 55' 0.3" N 07° 37' 18.0" O	f	P. mascittii
26.07.2007	Bremgarten/ Lämmlins		47° 55' 0.3" N 07° 37' 18.0" O / 47° 45' 22.6" N 07° 38' 46.5" O	m	P. mascittii

Tab. 1: *Übersicht der Fundorte in Deutschland 2007 (Fortsetzung)*

Datum	Ort	Standort der Falle	Koordinaten	Geschlecht	Art
26.07.2007	Bremgarten/ Lämmlins		47° 55' 0.3" N 07° 37' 18.0" O / 47° 45' 22.6" N 07° 38' 46.5" O	f	P. mascittii
26.07.2007	Bremgarten/ Lämmlins		47° 55' 0.3" N 07° 37' 18.0" O / 47° 45' 22.6" N 07° 38' 46.5" O	f	P. mascittii
26.07.2007	Bremgarten/ Lämmlins		47° 55' 0.3" N 07° 37' 18.0" O / 47° 45' 22.6" N 07° 38' 46.5" O	f	P. mascittii
26.07.2007	Bremgarten/ Lämmlins		47° 55' 0.3" N 07° 37' 18.0" O / 47° 45' 22.6" N 07° 38' 46.5" O	f	P. mascittii
26.07.2007	Bremgarten/ Lämmlins		47° 55' 0.3" N 07° 37' 18.0" O / 47° 45' 22.6" N 07° 38' 46.5" O	f	P. mascittii
26.07.2007	Bremgarten/ Lämmlins		47° 55' 0.3" N 07° 37' 18.0" O / 47° 45' 22.6" N 07° 38' 46.5" O	f	P. mascittii
26.07.2007	Obereggenen	Lämmlins	47° 45' 22.6" N 07 ° 38' 46.5" O	f	P. mascittii
26.07.2007	Obereggenen	Lämmlins	47° 45' 22.6" N 07 ° 38' 46.5" O	f	P. mascittii
26.07.2007	Obereggenen	Lämmlins Mieter	47° 45' 24. 4" N 07° 38' 40.5" O	m	P. mascittii
26.07.2007	Obereggenen	Lämmlins Mieter	47° 45' 24. 4" N 07° 38' 40.5" O	f	P. mascittii
31.07.-02.08.07	Obereggenen	Lämmlins	47° 45' 22.6" N 07° 38' 46.5" O	m	P. mascittii
02.08.2007	Obereggenen	Lämmlins	47° 45' 22.6" N 07 ° 38' 46.5" O	f	P. mascittii
02.08.2007	Obereggenen	Lämmlins	47° 45' 22.6" N 07 ° 38' 46.5" O	f	P. mascittii
04.08.2007	Obereggenen	Lämmlins Scheune	47° 45' 22. 6" N 07° 38' 46.5" O	f	P. mascittii
04.08.2007	Obereggenen	Lämmlins Scheune	47° 45' 22. 6" N 07° 38' 46.5" O	f	P. mascittii
04.08.2007	Obereggenen	Lämmlins Scheune	47° 45' 22. 6" N 07° 38' 46,5" O	f	P. mascittii

Tab. 2: *Übersicht der Fundorte in Deutschland 2008*

Datum	Ort	Standort der Falle	Koordinaten	Geschlecht	Art
10.07.2008	Obereggenen (Schliengen)	Lämmlins Mieter	47° 45' 24 " N 07° 38' 41" O	f	P. mascittii
10.07.2008	Obereggenen (Schliengen)	Lämmlins Mieter	47° 45' 24 " N 07° 38' 41" O	f	P. mascittii
10.07.2008	Obereggenen (Schliengen)	Lämmlins Mieter	47° 45' 24 " N 07° 38' 41" O	f	P. mascittii
10.07.2008	Obereggenen (Schliengen)	Lämmlins	47° 45' 23" N 07° 38' 47" O	f	P. mascittii
10.07.2008	Obereggenen (Schliengen)	Lämmlins	47° 45' 23" N 07° 38' 47" O	f	P. mascittii
10.07.2008	Auggen	Am Erzbuck 14	47° 47' 09" N 07° 35' 33" O	f	P. mascittii
11.07.2008	Eschbach	Rebweg 1	47° 53' 18" N 07° 39' 32" O	m	P. mascittii
11.07.2008	Eschbach	Rebweg 1	47° 53' 18" N 07° 39' 32" O	f	P. mascittii
11.07.2008	Eschbach	Rebweg 1	47° 53' 18" N 07° 39' 32" O	f	P. mascittii
11.07.2008	Eschbach	Rebweg 1	47° 53' 18" N 07° 39' 32" O	f	P. mascittii
11.07.2008	Eschbach	Rebweg 1	47° 53' 18" N 07° 39' 32" O	f	P. mascittii
11.07.2008	Eschbach	Hauptstr. 55	47° 53' 22" N 07° 39' 23" O	f	P. mascittii
16.07.2008	Eschbach	Hauptstr. 1	47° 53' 30" N 07° 39' 05" O	? (Abd. fehlt)	P. mascittii
17.07.2008	Hochstetten (Breisach am Rhein)	Klosteräcker 2	48° 01' 16" N 07° 36' 42" O	m	P. mascittii
17.07.2008	Niederrimsingen (Breisach am Rhein)	Merdinger Str. 25	47° 59' 18" N 07° 40' 14" O	m	P. mascittii
17.07.2008	Feldkirch (Hartheim)	Dorfstr. 22	47° 56' 11" N 07 ° 38' 50" O	f	P. mascittii
17.07.2008	Zienken (Neuenburg am Rhein)	Obere Dorfstr. 9	47° 5 0' 26" N 07° 34' 47" O	m	P. mascittii
17.07.2008	Neuenburg	Gutnauweg	47° 48' 36" N 07° 33' 52" O	f	P. mascittii
23.07.2008	Heuweiler	Dorfstr. 23	48° 03' 07" N 07° 54' 09" O	f	P. mascittii
24.07.2008	Gündlingen (Breisach am Rhein)	Hauptstr. 32	48° 00' 47" N 07° 38' 29" O	f	P. mascittii
25.07.2008	Rust	Fischerstr. 47	48° 16' 02" N 07° 43' 29" O	f	P. mascittii
25.07.2008	Rust	Fischerstr. 47	48° 16' 02" N 07° 43' 29" O	f	P. mascittii
25.07.2008	Kappel (Kappel-Grafenhausen)	Rathausstr. 32	48° 1 7' 26" N 07° 44' 44" O	f	P. mascittii
25.07.2008	Kappel (Kappel-Grafenhausen)	Rathausstr. 32	48° 1 7' 26" N 07° 44' 44" O	f	P. mascittii
26.07.2008	Nanzdietschweiler		49° 26' 25" N 07° 26' 12" O	f	P.perniciosus
28.07.2008	Schmittweiler		49° 24' 32" N 07° 20' 28" O	f	P.p erniciosus
29.07.2008	Schmittweiler		49° 24' 32" N 07° 20' 28" O	m	P.p erniciosus