

# Teilautomatisierte *in vitro* Fütterung adulter Schildzecken (*Amblyomma hebraeum*)

Frank Kuhnert, Achim E. Issmer und Jörg Grunewald  
Institut für Tropenmedizin, Universitätsklinikum Tübingen, D-Tübingen

## Zusammenfassung

Ein verringerter Einsatz von Labortieren (u.a. Kaninchen, Rinder) in der pharmazeutischen Industrie und anderen Einrichtungen zum Zwecke der Zucht medizinisch und ökonomisch bedeutender Arten der obligat blutsaugenden Schildzecken (Acari: Ixodidae) ist sehr wünschenswert. Wir berichten über die erfolgreiche Blutfütterung von Männchen und Weibchen der tropischen Zecke *Amblyomma hebraeum* in einem teilautomatisierten und daher wartungsarmen *in vitro* System. Die Fütterungsergebnisse unterschieden sich bezüglich der erreichten Körpermasse (1,85 g) dem Ei-Konversionsfaktor (0,37) und der Larvenschlupfrate (88%) nicht signifikant von Werten, die bei der Verwendung von Rindern als Wirte erzielt wurden.

*Summary: Partly automated in vitro feeding of adult Amblyomma hebraeum (Acari: Ixodidae)*

*A reduction in the use of laboratory animals, such as rabbits and bovines, in the pharmaceutical industry and other institutions for breeding medically and economically important species of obligatory bloodsucking hard ticks (Acari: Ixodidae) is highly desirable. We report the successful feeding of males and females of the tropical tick Amblyomma hebraeum in a partly automated, thus essentially maintenance-free in vitro system. The feeding data (body mass 1.85 g; egg conversion factor 0.37; larval hatch rate 88%) did not significantly differ from those achieved on bovine hosts.*

*Keywords: in vitro feeding, artificial feeding, Ixodidae, hard ticks*

## 1 Einleitung

Schildzecken (Acari: Ixodidae) sind in allen Regionen der Welt zu finden und spielen als Überträger (Vektoren) zahlreicher human- und tierpathogener Erreger wie Viren (z.B. Frühsommermeningoenzephalitis-Viren), Bakterien (z.B. Borrelien) oder Protozoen (z.B. Piroplasmen) eine große Rolle (Uilenberg, 1992). Zur Erforschung der von diesen Zecken übertragenen Krankheitserreger und der durch sie hervorgerufenen Krankheiten, sowie zur Suche nach neuen Akariziden ist ihre Zucht und Kultur im Laboratorium unverzichtbar. Da sie sich ausschließlich von Blut ernähren, müssen je nach Zeckenart Wirtstiere wie Mäuse, Kaninchen, Schafe oder Rinder gehalten werden. Diese werden durch den Saugakt stark belastet und reagieren mit Immunabwehr, so daß sie nur in größeren Zeitabständen bzw. nur ein- bis zweimal zur Fütterung eingesetzt werden können. Die Aufrechterhaltung von Zeckenkolonien im Laboratorium erfordert daher eine große Anzahl von Labortieren. Alternative Fütterungstechniken für Schildzecken sollen deren Blutfütterung am lebenden Wirt ersetzen oder zumindest

die Zahl der benötigten Wirtstiere stark reduzieren.

Bei Schildzecken muß jedes der drei Entwicklungsstadien (Larven, Nymphen, Adulte) mehrere Tage bis Wochen am Wirt Blut aufnehmen, wobei sich deren Mundwerkzeuge meist mit Hilfe eines Zements fest in der Haut des Wirtes verankern. Bei *in vitro* Versuchen muß das den Zecken angebotene Blut während der gesamten Dauer der Nahrungsaufnahme steril gehalten und vor Zersetzung bewahrt werden.

Issmer (1994) erreichte mit einem teilautomatisierten System, daß sich adulte Schildzecken der Arten *Hyalomma truncatum* und *Ixodes ricinus* mit Blut vollsaugten. Aus den abgelegten Eigelegen von *H. truncatum* schlüpften normale, sich entwickelnde Larven.

Für die sehr viel kleineren Larven und Nymphen, die ebenfalls Blut über mehrere Tage hinweg aufnehmen müssen, um sich weiterentwickeln zu können, ist diese Apparatur bisher nicht geeignet.

Kuhnert (1995) erzielte mit einem auf Schraubdeckelgläsern und Silikonmembranen basierendem Fütterungssystem vor allem bei Larven und Nymphen der Schildzeckenart *Amblyomma hebraeum*

ausgezeichnete Fütterungsergebnisse. Diese entwickelten sich normal und häuteten sich zum folgenden Entwicklungsstadium. Weniger gut eignete sich die Technik zur Fütterung adulter Zecken. Bei Männchen und Weibchen von *A. hebraeum* ließ sich eine starke Abnahme der Fortpflanzungsfähigkeit beobachten (Kuhnert et al., 1995; Kuhnert, 1996).

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Vorteile beider Fütterungstechniken zu kombinieren und die Fortpflanzungsleistung adulter *A. hebraeum* derjenigen von auf Labortieren saugenden Zecken anzugleichen.

## 2 Tiere, Material und Methoden

### 2.1 Die Zecke *Amblyomma hebraeum*

Für die Versuche wurden nüchterne Weibchen und Männchen eingesetzt, die aus der auf zeckenempfindlichen weiblichen Rindern durchgeführten Zucht der Bayer AG, Geschäftsbereich Tiergesundheit, stammten. *A. hebraeum* wird in der chemisch-pharmazeutischen Industrie, neben anderen Arten, für Akarizidprüfungen gezüchtet. Die Zecken lagerten 5-8 Monate bei 29°C / 80% relativer Feuchte und einem

Tag/Nacht-Rhythmus von 13:11 Stunden. In der Regel wurden jeweils 30 Männchen zum Zwecke der Vorfütterung in eine Fütterungseinheit gesetzt. Mindestens zwei dieser Fütterungseinheiten bildeten eine Behandlung, wurden also gleichbehandelt, d.h. gleichen Versuchsbedingungen ausgesetzt. Ein Versuchsblock bestand aus Behandlungen, bei denen alle Zecken Blut desselben wöchentlichen Spendetermins erhielten. Je nach Versuchsblock dauerte die Vorfütterung der Zeckenmännchen mit dem Ziel ihrer sexuellen Reifung eine oder zwei Wochen (siehe Tab. 1). Danach wurden entsprechend der Anzahl fixierter Männchen die gleiche Zahl nüchternen Weibchen hinzugefügt (Versuchsblock I, Behandlung 1) oder zusammen in eine frische Fütterungseinheit überführt (Versuchsblock II, Behandlung 2 / Versuchsblock III, Behandlung 3) (Tab. 1).

**2.2 Die Fütterungseinheiten**

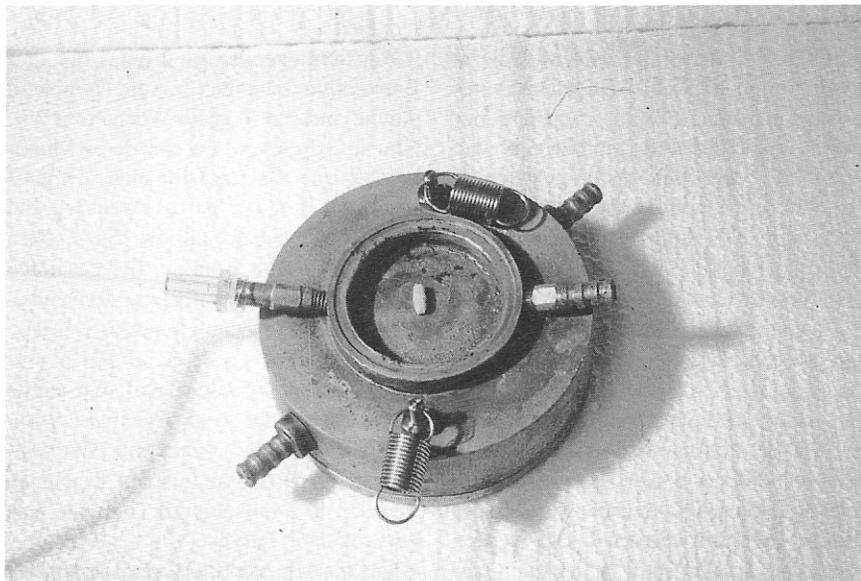
Es wurde großer Wert darauf gelegt, die gesamte Fütterungsapparatur möglichst steril zu halten. Daher wurden sämtliche Handgriffe, die das Zusammenbauen und Befüllen der autoklavierten oder mit Trockenhitze sterilisierten Fütterungseinheiten (siehe Abb. 1 und Abb. 2) und das Blut betrafen, unter einem sterilen Abzug oder unter Einsatz von Kodan® Desinfektions-spray (Schülke & Mayr GmbH, D-22846 Norderstedt) durchgeführt. Die für die Zecken nutzbare Membranoberfläche betrug je Fütterungseinheit etwa 10 cm<sup>2</sup>.

Eine Fütterungseinheit bestand aus einer in regelmäßigen Abständen automatisch durch Silikonschläuche mit neuem Blut versorgten Blutkammer aus Aluminium, unter der sich ein von warmem Wasser (38°C) durchströmter Hohlraum anschloß (Abb. 1). Vor dem Einbau der Membran wurde die Blutkammer der Fütterungseinheit mit einem Antihafmittel (Teflon-Spray, Norton Pampus GmbH, BRD) eingesprüht. Die komplette Fütterungseinheit stand auf einem Magnetrührer (Metrohm Typ E349), der einen teflonbeschichteten Magnetrührstab kontinuierlich mit etwa 300-400 U/min im Blut bewegte. Die Bluttemperatur unterhalb der Membran lag bei 37,5°C. Nachdem das Blut die Kammer einmal durchflossen hatte, tropfte es in eine steril gehaltene Glasflasche (Abb.3). Die Lufttemperatur in der Umgebung der Fütterungseinheiten lag bei 21-27°C (Sommer). Um die Luft-

**Tabelle 1: Behandlungsübersicht für *Amblyomma hebraeum* Adulte.**

Versuchsblock Nr.	I	II	III	
<b>Teil I</b>				
<b>nüchterne Männchen</b>				
<b>Behandlung</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>
<b>Dauer der Vorfütterung</b>	eine Woche	zwei Wochen		
<b>Bakterizid</b>	GEN 5 / GEN 100	PEN 1000 / STR 100	GEN 100	PEN 1000 / STR 100, ab d11 auch GEN 100
<b>Tägl. spülen mit physiologischer Kochsalzlösung</b>	nein			ja
<b>Teil II</b>				
<b>vorgefütterte Männchen zusammen mit nüchternen Weibchen (zwei Wochen)</b>	fixierten Männchen nüchterne Weibchen hinzugefügt	vorgefütterte Männchen auf frische Membran übertragen und nüchterne Weibchen hinzugefügt		
<b>Behandlung</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	
<b>Bakterizid</b>	GEN 5 / GEN 100	PEN 1000 / STR 100	PEN 1000 / STR 100 / GEN 100	
<b>Tägl. spülen mit physiologischer Kochsalzlösung</b>	nein		ja	

Die Spalten A bis D in Teil I und Spalten 1 bis 3 in Teil II zeigen die Versuchsparameter jeweils einer Behandlung. Teil II der Fütterung folgte direkt auf Teil I. Allen Behandlungen wurde 1x pro Tag Nystatin 100 IE / ml und Adenosintriphosphat (10<sup>-3</sup> mol / l) in den Blutvorrat gegeben. GEN 5: Gentamicin 5 µg / ml, GEN 100: Gentamicin 100 µg / ml, PEN 1000: Penicillin 1000 IE / ml, STR 100: Streptomycin 100 µg / ml, d: Tag



**Abbildung 1: Fütterungskammer, geöffnet. Der Blick fällt von oben auf die noch leere Blutkammer (ohne Membran), in der ein weißes Magnetrührstäbchen liegt. Links und rechts davon sieht man Ein- und Ausflußstutzen für das Futterblut, links unten und rechts oben Ein- und Auslaß für das Heizwasser.**

feuchtigkeit oberhalb der Membranen zu erhöhen, wurden feuchte Wattestopfen auf die Fütterungseinheit gelegt. Das Labor hatte einen zwölfstündigen Tag/Nacht-

Rhythmus bei normaler CO<sub>2</sub>-Konzentration.

Als Membran, durch welche die adulten Zecken Blut aufnahmen, diente eine durch

ein Kunststoffnetz verstärkte, grobe Silikonmembran (Dicke: ca. 500 µm).

### 2.3 Das Futterblut

In allen Versuchsblöcken wurde mit 10 IE Na-Heparin / ml versetztes, steriles Vollblut vom selben männlichen Spenderrind verfüttert (Fiebig Nährstofftechnik, D-65510 Idstein-Niederauoff). Beim täglichen Befüllen jeder 50 ml-Perfusorspritze einer Fütterungseinheit mit neuem Blut wurden Adenosintriphosphat (ATP) als Saugstimulanz ( $10^{-3}$  mol / l) und entsprechend der jeweiligen Behandlung die Bakteriostatika Penicillin / Streptomycin (1000 IE bzw. 100 µg / ml), Gentamicin (5 bzw. 100 µg / ml) und das Fungistatikum Nystatin (100 IE / ml) hinzugefügt. Einen Überblick über die Behandlungen zeigt die Tab. 1. Sämtliche Lösungen wurden keimfrei bei  $-18^{\circ}\text{C}$  gelagert. Ein zeitschaltuhrgesteuerter Perfusor versorgte mit seinen zwei Blutvorratspritzen ( $+4^{\circ}\text{C}$ ) alle sechs Stunden zwei Fütterungseinheiten mit je etwa 12 ml vorbereitetem Blut.

Nach der *in vitro* Blutfütterung wurden bei den Zeckenweibchen die Körpermasse, die Prä-Ovipositionsdauer, der Ei-Konversionsfaktor, der prozentuale Larvenschlupf und der Anteil larvenproduzierender Weibchen bezogen auf die am Tag 4 fixierten Weibchen ermittelt.

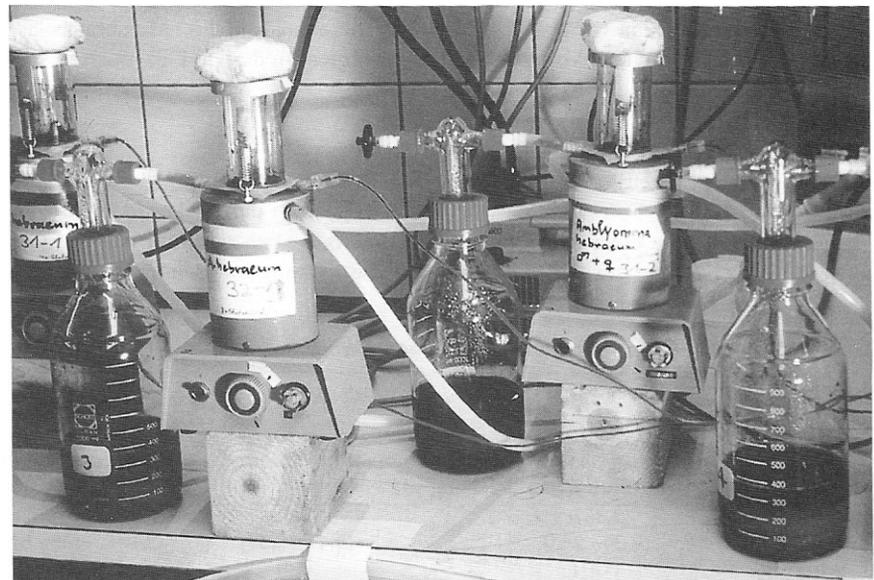
Von der Berechnung dieser Parameter wurden Weibchen ausgenommen, die bestimmte Kriterien nicht erfüllten: Körpermasse  $< 200$  mg, Weibchen am Versuchsende oder binnen einer Woche danach gestorben, keine Eier gelegt oder Eigelege vertrocknet (die beiden letzten Kriterien führten nicht zum Ausschluß bezüglich der „Körpermasse“). Aus Gründen der Vergleichbarkeit mit anderen Arbeiten wurden Weibchen, die am Ende des Versuchs noch auf der Membran fixiert, also noch nicht selbständig abgefallen waren, von der Berechnung „Körpermasse“ und „Ei-Konversionsfaktor“ ausgeschlossen. Entsprechendes galt für die Kontrollzecken am Rind.

### 2.4 Einsatz von Stimulanzien auf den Membranen

Um die Membranen für die Zecken attraktiv zu machen, wurden eine phosphatgepufferte Salzlösung und ein künstliches Gemisch in Dichlormethan gelöst, aggregations- und fixierungsfördernder Substanzen (ortho-Nitrophenol 1 µg, Benzaldehyd 0,1 µg, iso-Buttersäure 1 µg pro



**Abbildung 2:** Komplettes Fütterungssystem, zerlegt. Das Bild zeigt die zur *in vitro* Fütterung in dieser Arbeit benötigten Teile mit Ausnahme von Membran, Magnetprüher, Perfusor, Heizwasserbad und Kühlschrank zur Blutlagerung. Erkennbar sind, neben der eigentlichen Fütterungskammer, die Blutvorratspritze mit Schlauchverbindungen, darüber der Glaszylinder mit Silikon-Dichtungsring, metallendem Halter und Siebdeckel, sowie die Sammelflasche für das verbrauchte Blut inklusive roten Verbindungsstutzen und Schraubdeckel.



**Abbildung 3:** Fütterungssystem in Funktion. In der Bildmitte sieht man zwei der vier parallel betriebenen Fütterungseinheiten. Auffällig sind die großen Magnetprüher unterhalb der Fütterungskammern sowie die mit verbrauchtem Blut gefüllten Sammelflaschen. Die dicken weißen Silikonschläuche dienen zur Erwärmung der Fütterungskammern mit  $38^{\circ}\text{C}$ -temperiertem Wasser.

Fütterungseinheit) angewendet. Diese drei flüchtigen Verbindungen werden normalerweise von männlichen *A. hebraeum* nach einigen Tagen des Saugens abgegeben (Apps et al., 1988; Price et al., 1994). Den frisch auf die Membran gesetzten

Zecken wird damit das Vorhandensein saugender Artgenossen und so ein geeigneter Wirt „vorgetäuscht“. Zudem wurden auch Zeckenexkremente vorheriger *in vitro* Blutmahlzeiten und frische Rinderhaare aufgebracht.



Tabelle 2: *In vitro* Fixierungsraten adulter *Amblyomma hebraeum*.

	nüchterne Männchen	nüchterne Männchen		in vitro vorgefütterte Männchen nach Umsetzen auf frische Membran		Weibchen	Weibchen
	d2	d4		d1	d2	d3	d4
Kontrolle auf Rind	70 - 90	keine Daten	Kontrolle auf Rind	-	-	keine Daten	keine Daten
Behandlung A	20 (11-33) [12/59]	47 (34-61) [28/59]	Behandlung 1	-	-	9 (1-29) [2/22]	59 (36-79) [13/22]
Behandlung B	20 (11-32) [12/60]	37 (24-51) [22/60]	Behandlung 2	87 (70-96) [27/31]	94 (79-99) [29/31]	26 (12-45) [12/45]	48 (30-67) [15/31]
Behandlung C	10 (4-20) [6/60]	42 (29-55) [25/60]	Behandlung 3	82 (63-94) [23/28]	96 (82-100) [27/28]	25 (11-45) [7/28]	64 (44-82) [18/28]
Behandlung D	19 (10-31) [11/58]	43 (32-58) [26/58]					

Dargestellt sind %-Werte (fettgedruckt) mit dem 95%-Vertrauensintervall des Verhältnisses „fixierte Zecken / auf die Membran gebrachte Zecken“ in runden, sowie die Anzahl der Zecken in eckigen Klammern. Weibchen der Behandlung 2 waren mit Männchen aus Behandlung B und C zusammen. d: Tag

3 Ergebnisse

3.1 *In vitro* Fixierung

Einen Tag nach Versuchsbeginn hatten sich 10-20% der hungrigen Männchen auf den Membranen festgesetzt (Rind: 70-90%), am Tag 4 waren es 37-47% (Tab. 2). Wurden diese, wie in Behandlung B, C und D, nach zweiwöchiger Vorfütterung abgezupft und auf frische Membranen gebracht (Behandlung 2 und 3), so fixierten sie sich dort nach einem Tag zu 82-87%, nach vier Tagen zu 94-96% (Tab. 2).

Die Weibchen, die etwa eine Stunde nach den vorgefütterten, sexuell gereiften

Männchen auf diese Membranen gesetzt wurden, waren dort nach einem Tag zu einem Viertel (Behandlung 2 und 3), am Tag 4 zur Hälfte (Behandlung 2) und zu zwei Drittel (Behandlung 3) fixiert (Tab. 2). Weibchen der Behandlung 1 kamen zu Männchen, welche nur eine Woche lang vorgefüttert und auf ihrer Membran belassen wurden. In diesem Fall fixierten sich am Tag 1 9%, am Tag 4 59% der Weibchen.

3.2 *In vitro* Fütterung

Die Männchen der Zeckenart *Amblyomma hebraeum* benötigen zur Vorbereitung auf die Paarung mit den Weibchen eine

Blutmahlzeit, die *in vivo* 3-5 Tage dauern kann. Äußerlich sichtbares Zeichen ihrer sexuellen Reifung ist das typische Greifverhalten (*claspig*), mit dem sie ein von ihren Duftstoffen angelocktes Weibchen zu erhaschen und festzuhalten suchen, bevor es zur Kopulation kommen kann (Diehl et al., 1991). In der vorliegenden Arbeit wurde auf das Auftreten dieses Greifverhaltens *in vitro* geachtet, um einen günstigen Zeitpunkt zum Hinzusetzen der Weibchen zu finden. Während der Vorfütterung trat *Claspig* der ersten Männchen zwischen Tag 6 und Tag 8 auf (*in vivo*: ab Tag 5; Kuhnert, 1995). Verbreitet kam es jedoch erst ab Tag 12 vor: 53% der Männchen in Behandlung C, 8% in Behandlung B und 97% in Behandlung D zeigten dann dieses Verhalten.

Die Blutaufnahme von Weibchen in einem Vorversuch ohne Fungistatikum wurde durch ungehemmtes Pilzwachstum in den beiden Fütterungseinheiten nahezu vereitelt und der Versuch nach zwölf Tagen abgebrochen. In Behandlung 1 unterdrückten Gaben von Nystatin die Pilzentwicklung. Das hier anfänglich niedrig dosierte Bakteriostatikum Gentamicin (5 µg/ml) konnte jedoch eine Bakterienvermehrung nicht verhindern. Diese klang erst ab Tag 4 nach 20facher Erhöhung der Gentamicin-Dosis ab. Die fünf selbständig von der Membran abgefallenen Weibchen dieser Behandlung 1 zeigten mit 0,69 g die niedrigste mittlere Körpermasse (Tab. 3). In Behandlung 2, von Anbeginn mit Ny-

Tabelle 3: Entwicklung von *Amblyomma hebraeum* Weibchen *in vitro*.

	Weibchen					Mikrobizide		
	Körpermasse [g] nach Blutaufnahme	Prä-Ovipositionsdauer [d]	Ei-Konversionsfaktor (ECF)	% Larvenschlupf	% larvenproduzierende Weibchen	Gentamicin [µg/ml]	Penicillin [IE/ml]	Streptomycin [µg/ml]
Kontrolle auf Rind	2,33 a (2,24 - 2,43) [131]	nicht gemessen	0,50 a (0,47 - 0,53) [78]	56 a (47 - 65) [43]	51 (38 - 64) [1 Rind]	-	-	-
Behandlung 1	0,69 c (0,54 - 0,84) [5]	13,8 a (10,3 - 17,3) [5]	0,20 c (0,17 - 0,23) [4]	80 a (70 - 90) [5]	38 (14 - 68) [2 FE]	5 / 100	-	-
Behandlung 2	1,37 b (0,91 - 1,83) [5]	12,5 a (10,8 - 14,2) [4]	0,35 b (0,33 - 0,37) [3]	75 a (47 - 100) [3]	50 (12 - 88) [2 FE]	-	1000	100
Behandlung 3	1,85 ab (1,52 - 2,18) [4]	10,8 a (9,9 - 11,7) [4]	0,37 ab (0,30 - 0,44) [3]	88 a (63 - 100) [4]	25 (7 - 52) [3 FE]	100	1000	100

Angegeben sind Mittelwerte (fettgedruckt) mit 95%-Vertrauensintervall (in runden Klammern). Eine schwankende Anzahl Weibchen [n] in einer Reihe ergab sich aus den bei Berechnungen jedes Parameters zugrundegelegten und im Methodenteil erklärten Kriterien. Sämtliche dargestellten Behandlungen erhielten Nystatin 100 IE / ml. Ergebnisse innerhalb Spalten ohne einen gemeinsamen Buchstaben waren signifikant unterschiedlich (P < 0,05; Mann-Whitney U-Test). FE: Fütterungseinheiten

statin und hochdosiertem Penicillin / Streptomycin durchgeführt, erreichten die Weibchen 1,37 g ( $n = 5$ ). Behandlung 3 im dritten Versuchsblock erbrachte eine mittlere Körpermasse von 1,85 g ( $n = 4$ ), die sich nicht mehr signifikant von der Körpermasse der auf Rindern vollgesogenen Weibchen (2,33 g;  $n = 131$ ) unterschied ( $P < 0,05$ ; Mann-Whitney *U*-Test) (Tab. 3).

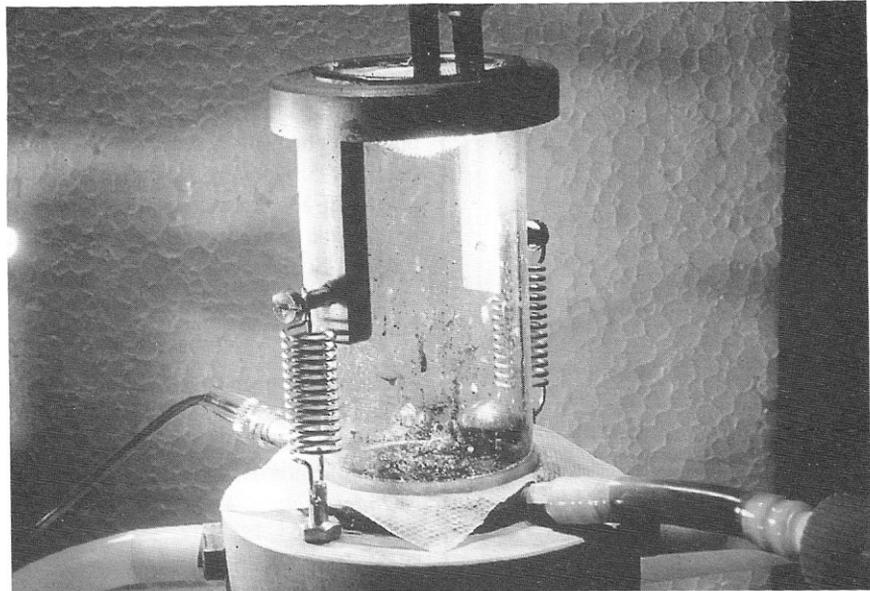
Die Anzahl Tage zwischen Abfallen eines vollgesogenen Weibchens und Beginn der Eiablage (Prä-Ovipositionsdauer) war *in vitro* mit 10,8 bis 13,8 Tagen zwischen den Behandlungen sehr ähnlich (Tab. 3). *In vivo* wurden 7,8 Tage gemessen (Kuhnert et al., 1995).

Der Ei-Konversionsfaktor beschreibt die Fähigkeit der weiblichen Zecke, aufgenommenes Blut in Eimasse umzusetzen. Er war mit 0,20 ( $n = 4$ ) in Behandlung 1 am niedrigsten und bei Behandlung 2 und Behandlung 3 mit 0,35 ( $n = 3$ ) resp. 0,37 ( $n = 3$ ) etwa gleich hoch (Tab. 3). Bei den am Rind gesogenen Weibchen ( $n = 78$ ) wurden 0,50 beobachtet, was sich nicht signifikant vom *in vitro* Ergebnis der Behandlung 3 unterschied ( $P < 0,05$ ; Mann-Whitney *U*-Test).

Der Schlupferfolg der Larven war *in vivo* mit 56% tendenziell der niedrigste, die *in vitro* Werte lagen zwischen 75% und 88% (Tab. 3). Auf dem Rind sowie in Behandlung 2 produzierte etwa die Hälfte der am Tag 4 fixierten Weibchen nach Ende des Blutmahls vitale Larven, bei Behandlung 3 war es nur ein Viertel (Tab. 3).

#### 4 Diskussion

Die Blutaufnahme adulter Schildzecken der Art *Amblyomma hebraeum* mit ihren großen Mundwerkzeugen, die für den lebenden Wirt (Rind) recht schmerzhaft sein kann, wurde in dieser Arbeit erfolgreich an einem teilautomatisierten und damit wartungsarmen *in vitro* Fütterungssystem getestet. Fütterungseinheiten dieses Typs wurden bisher nur für adulte *Hyalomma truncatum* und *Ixodes ricinus* verwendet (Issmer, 1994; Issmer et al., 1994). Wo es gelang, durch geeignete Mikrobizidkombinationen die Kontamination des Futterblutes mit Pilzen und Bakterien einzuschränken, erreichten Körpermasse (1,85 g), Ei-Konversionsfaktor (0,37) und Larvenschlupfrate (88%) Werte (Behandlung 3), die sich von Kontrollzecken auf Rin-



**Abbildung 4:** *Amblyomma hebraeum* Weibchen beim Vollsaugen *in vitro*. Zu sehen ist eine Fütterungskammer, in deren Glaszylinder sich ein Zeckenweibchen vollgesaugt hat. Die Innenseite des Glases ist durch Zeckenexkremate verschmutzt.

dern statistisch nicht unterschieden (2,33 g, 0,50, 56%). Einschränkend muss hier die geringe Anzahl *in vitro* gesogener Zeckenweibchen pro Behandlung genannt werden. Die genannten Parameter lagen 20-40% über den Ergebnissen, die in einem auf Schraubdeckelgläsern basierendem *in vitro* System erreicht wurden (Kuhnert et al., 1995; Kuhnert, 1996). Dies wird auf den zusätzlichen vierten und zudem die Zecken weniger störenden, automatisierten Blutwechsel zurückgeführt. Wahrscheinlich ist auch ein positiver Einfluß durch das heparinisierte Vollblut gegenüber defibriniertem Blut, wie es bereits für *Amblyomma variegatum* bekannt ist (Voigt et al., 1993).

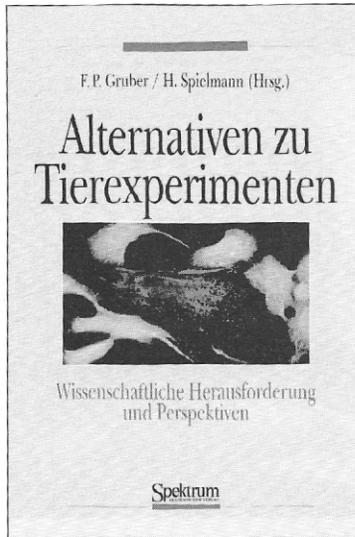
Wie schon zuvor (Kuhnert et al., 1995; Kuhnert, 1996) variierte auch in der vorliegenden Arbeit der Anteil larvenproduzierender Weibchen zwischen den Behandlungen und *in vivo* stark und trug maßgeblich zur geringen durchschnittlichen Zahl an Nachkommen bei. Obwohl nach zwölf Tagen Vorfütterung 97% der Männchen das typische *Clasping*-Verhalten zeigten, war deren sexuelle Reifung und die Fähigkeit zu ordnungsgemäßer Kopulation individuell möglicherweise sehr unterschiedlich ausgeprägt. Zum Erreichen einer bestimmten Zahl eilegender Weibchen werden *in vitro* mehr weibliche und vor allem männliche Zecken benötigt als bei der Fütterung am Rind. Grund hier-

für ist, neben der variablen Larvenproduktion der Weibchen, die Fixierung nüchternen Männchen von *A. hebraeum* *in vitro*, die erst am vierten Tag mit Raten zwischen 37% und 47% zufriedenstellende Ergebnisse brachte, jedoch nicht vergleichbar war mit Werten, wie sie am Rind erreicht werden (70-90% bereits am Tag 1). Nach zweiwöchiger Vorfütterung der Männchen *in vitro* (*in vivo*:  $< 7$  Tage) lagen deren Wiederfixierungsraten nach Abzupfen von der alten und Aufbringen auf eine neue Membran schon am ersten Tag bei 82-87%. Hinzugesetzte Weibchen fixierten zu einem Viertel am Tag 1, steigerten sich jedoch am Tag 4 auf bis zu zwei Drittel. Das Festsetzen der Zecken auf den Silikonmembranen lag insgesamt gleichauf mit Werten vorangegangener Arbeiten (Kuhnert et al., 1995; Kuhnert, 1996), bei denen keine phosphatgepufferte Salzlösung als zusätzlicher Stimulus benutzt wurde.

Voigt et al. (1993) zeigten den positiven Effekt von 5% CO<sub>2</sub> in der Umgebungsluft auf Fixierung und Fertilität adulter *A. variegatum*. Hier können zukünftige Versuche anknüpfen, um das Festsaugen nüchternen *A. hebraeum* Männchen sowie die Fruchtbarkeit der Paare zu steigern. So modifiziert, ist der Einsatz der vorgestellten Methode denkbar z.B. zur Gewinnung infektiöser Larven, zur Verfütterung markierter Substanzen und

# Alternativen?

Es gibt sie!



Franz P. Gruber /  
Horst Spielmann (Hrsg.)

## Alternativen zu Tierexperimenten

Wissenschaftliche Herausforderung  
und Perspektiven

Dieses von kompetenten deutschsprachigen Wissenschaftlern aus Universitäten und Industrie verfaßte Buch gibt einen verständlichen Überblick über den aktuellen Stand der Forschung und über den momentanen Einsatz von Ersatz- und Ergänzungsmethoden – inklusive der damit verbundenen Vor- und Nachteile. Es zeigt auch deren Zukunftspotential sowie juristische und ethische Implikationen auf.

1996, 352 S., geb.  
DM 78,- / 65 570,- / sFr 75,-  
ISBN 3-86025-195-3

### Stichworte zum Inhalt:

Alternativen in der Toxikologie und in der pharmakologischen Forschung / Ökotoxikologie / Computermodelle / Tierversuchsfreie Ausbildungsmethoden u.v.m.

### Jetzt bestellen!

(Tel.-Nr.) 06221-91260  
(Fax-Nr.) 06221-912638  
<http://www.spektrum-verlag.com>

**Spektrum**  
AKADEMISCHER VERLAG

Vangerowstr. 20, D-69115 Heidelberg

zum Auffangen der von dieser Zeckenart emittierten Pheromone während der Blutaufnahme. In Kombination mit der *in vitro* Methodik zur Fütterung von Larven und Nymphen von *A. hebraeum* (Kuhnert et al., 1995; Kuhnert, 1996) ergeben sich langfristig Möglichkeiten zu tierversuchsreduzierten Studien an dieser dreiwirtigen „Modell-Schildzecke“.

### Literatur

Apps, P. J., Viljoen, H. W. und Pretorius, V. (1988). Aggregation pheromones of the bont tick *Amblyomma hebraeum*: identification of candidates for bioassay. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 55, 135-137.

Diehl, P. A., Guerin, P. M., Vlimant, M. und Scullet, P. (1991). Biosynthesis, production site, and emission rates of aggregation-attachment pheromone in males of two *Amblyomma* ticks. *Journal of Chemical Ecology* 17, 833-847.

Issmer, A. (1994). Künstliche Blutfütterung der Schildzecken *Hyalomma truncatum* und *Ixodes ricinus* (Acari, Ixodidae). Diplomarbeit, Universität Tübingen, 1-73.

Issmer, A. E., Schilling, T. H., Vollmer, A. und Grunewald, J. (1994). Replacement of laboratory animals in the management of blood-sucking arthropods. In C. A. Reinhardt (Hrsg.), *Alternatives to animal testing. New ways in the biomedical sciences, trends and progress* (125-129). Weinheim: Verlag Chemie.

Kuhnert, F. (1995). *Untersuchungen zur in vitro Zucht von Schildzecken (Acari: Ixodidae)*. Universität de Neuchâtel: Dissertation. Göttingen: Cuvillier Verlag.

Kuhnert, F., Diehl, P. A. und Guerin, P. M. (1995). The Life-cycle of the Bont tick *Amblyomma hebraeum* In Vitro. *International Journal for Parasitology* 25, 887-886.

Kuhnert, F. (1996). Feeding of Hard Ticks In Vitro: New Perspectives for Rearing and for the Identification of Systemic Acaricides. *ALTEX* 13, 76-87.

Price Jr, T. L., Sonenshine, D. E., Norval, R. A. I., Yunker, C. E. und Burrige, M. J. (1994). Pheromonal composition of two species of African *Amblyomma* ticks: similarities, differences and possible species specific components. *Experimental and Applied Acarology* 18, 37-50.

Uilenberg, G. (1992). Veterinary Significance of Ticks and Tick-Borne Diseases. In B. Fivaz, T. Petney and I. Horak (Ed.), *Tick Vector Biology - Medical and Veterinary Aspects* (23-33). Berlin: Springer-Verlag.

Voigt, W. P., Young, A. S., Mwaura, S. N., Nyaga, S. G., Njihia, G. M., Mwakima, F. N. and Morzaria, S. P. (1993). In vitro feeding of instars of the ixodid tick *Amblyomma variegatum* on skin membranes and its application to the transmission of *Theileria mutans* and *Cowdria ruminantium*. *Parasitology* 107, 257-263.

### Danksagung

Unser Dank gilt der Stiftung zur Förderung der Erforschung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zur Einschränkung von Tierversuchen SET, Mainz, für die Finanzierung des Projektes und dem Ministerium für Wissenschaft und Forschung des Landes Baden-Württemberg für das Ermöglichen von Vorarbeiten. Wir danken Herrn Dr. Andreas Turberg (Bayer AG, Landwirtschaftszentrum Monheim) für die freundliche Überlassung von Zecken. Auch möchten wir uns bedanken bei Herrn Detlef Labusch für den Bau der Fütterungsgeräte und bei den Damen Silvelia Grummes und Andrea Steinhuber für ihre technische Unterstützung (Institut für Tropenmedizin, Tübingen).

### Korrespondenzadresse

Priv. Doz. Dr. Jörg Grunewald  
Institut für Tropenmedizin  
Universitätsklinikum Tübingen  
Wilhelmstraße 2  
D-72074 Tübingen

