

## Institution

LOEWE Biodiversität und Klima  
Forschungszentrum (BiK-F)



Biodiversität und Klima  
Forschungszentrum

Senckenberg Gesellschaft für Naturforschung  
Senckenberganlage 25  
60325 Frankfurt am Main

## Projekttitle

Präventives Tigermücken-Monitoring an Hauptverkehrsadern Südhessens und anderen hessischen Risikostandorten und Entwicklung von DNA-basierten Schnelltests zur Früherkennung von Eiern und Larven der Asiatischen Tigermücke (*Aedes albopictus*)

- Abschlussbericht -

## Laufzeit

August 2009 bis November 2012

## Projektleitung

Dr. Ulrich Kuch

## Projektbearbeitung

Mitarbeiter oder Partner des Biodiversität und Klima Forschungszentrums (BiK-F) bzw. Mitarbeiter des Senckenberg Forschungsinstitutes und Naturmuseums Frankfurt (SFN):

Dr. Jens Amendt	(BiK-F / Klinikum der Goethe-Universität)
Dipl.-Biol. Robert Berger	(BiK-F)
Dipl.-Biol. Julia Betz	(SFN)
Friederike Bock, M.Sc.	(BiK-F)
Dr. Ruth Jesse	(BiK-F)
Dipl.-Biol. Mandy Kronefeld	(BiK-F)
Dr. Ulrich Kuch	(BiK-F)
Dipl.-Biol. Arne Schulze	(SFN)
Dr. Richard Zehner	(BiK-F / Klinikum der Goethe-Universität)

## Auftraggeber

Fachzentrum Klimawandel Hessen  
im Hessischen Landesamt für Umwelt und Geologie

## Projektbetreuung

Fachzentrum Klimawandel Hessen

Frankfurt am Main, Dezember 2012



Forschungsprogramm INKLIM-A und weitere Projekte

## **Inhaltsverzeichnis**

1. Zusammenfassung
2. Beschreibung/Problemstellung
  - 2.1 Aufgabenstellung laut Projektvorschlag
  - 2.2 Abweichungen gegenüber dem Projektvorschlag
  - 2.3 Hintergrund
3. Ergebnisse
  - 3.1 Monitoring
  - 3.2 Molekulargenetischer Nachweis
4. Bewertung/Diskussion der Ergebnisse
5. Mögliche Anpassungsmaßnahmen
6. Ausblick und Forschungs-/Untersuchungsbedarf
7. Literaturverzeichnis

## 1. Zusammenfassung

Die Asiatische Tigermücke (*Aedes albopictus*) zählt zu den weltweit gefährlichsten invasiven Arten. Diese aggressive, tagaktive und anthropophile Stechmückenart ist insbesondere als Überträgerin von Chikungunya- und Dengue-Fieber-Viren gefürchtet. Durch die Globalisierung und Intensivierung des Waren- und Reiseverkehrs ist die Asiatische Tigermücke bereits in viele Teile der Erde verschleppt worden, wo sie sich rasch ausgebreitet hat. Von besonderer Bedeutung sind heute großflächige Vorkommen in Nord- und Südamerika, Westafrika und dem europäischen Mittelmeerraum. Hochrisikogüter bei der Verbreitung sind alte Autoreifen und bestimmte Zierpflanzen (als „Lucky Bamboo“ bekannte Drachenbaum-Stecklinge). Eine mit der Klimaerwärmung einhergehende Ausbreitung nach Norden wird bereits in Japan beobachtet.

Für Deutschland ist bisher keine etablierte Population der Asiatischen Tigermücke bekannt; Modellierungen legen jedoch eine baldige klimatische Eignung weiter Landesteile für eine potenzielle Besiedlung durch diese Art nahe (z.B. Fischer et al. 2011). Die geographisch nächstgelegenen flächig etablierten Populationen der Asiatischen Tigermücke liegen südlich der Alpen: im südlichen Tessin der Schweiz und dem angrenzenden Norden Italiens. Von dort können Tigermücken z.B. in Autos und Wohnwagen innerhalb weniger Stunden nach Deutschland eingetragen werden. Ein Nachweis von Eiern bzw. einer adulten Mücke dieser Art nahe einer Raststätte der Bundesautobahn (BAB) 5 in Baden-Württemberg in den Jahren 2007 (Pluskota et al. 2008) bzw. 2011 (Werner et al. 2012) wird hiermit ebenso erklärt wie weitere Fänge in Baden-Württemberg und Bayern, die im Rahmen zweier bundesweit tätiger Monitoring-Maßnahmen gelangen (Becker et al. 2013; Kampen et al. 2013).

Eine weitere invasive Stechmückenart mit ähnlicher Lebensweise und höherer Kälteresistenz, die Asiatische Buschmücke (*Aedes japonicus*), ist mittlerweile in der nördlichen Schweiz und angrenzenden Gebieten Baden-Württembergs sowie im Großraum Stuttgart und großen Gebieten von Rheinland-Pfalz und Nordrhein-Westfalen etabliert (Schaffner et al. 2009; Becker et al. 2011; Schneider 2011; Kampen et al. 2012). Mit ihrer Ausbreitung nach Hessen muss sowohl in der Fläche als auch mittels des Kraftfahrzeug- und Warenverkehrs gerechnet werden.

Ziele des Forschungsprojektes waren (1) die Überwachung der möglichen Einschleppung der Asiatischen Tigermücke nach Südhessen im Sinne eines „low-intensity monitoring“ an Risikostandorten und zu Zeiten besonderen Risikos bzw. der höchsten Nachweiswahrscheinlichkeit und (2) die Entwicklung molekulargenetischer Nachweisverfahren zur schnellen und Beobachter-unabhängigen Identifizierung der Asiatischen Tigermücke und ihrer unterschiedlichen Lebensstadien (Eier, Larven, Puppen, Adulte).

Die Monitoring-Maßnahme umfasste in den Jahren 2009, 2010 und 2011 jeweils am Ende der Sommerferien (im Zeitraum der größten Kraftfahrzeug-Rückreisewelle) das Aufstellen und Kontrollieren von Eiablage-Fallen an Parkplätzen und Raststätten der BAB 5 in Südhessen in Fahrtrichtung nach Norden, von der Landesgrenze zu Baden-Württemberg bis zum Bereich südlich Frankfurts. Darüber hinaus wurde eine stichprobenartige Suche in der Fläche mittels Fang und Aufzucht von Stechmückenlarven aus geeigneten Kleinstgewässern und Fang adulter Stechmücken auf oder an den Betriebsgeländen großer Altreifenhändler und anderen Standorten in Hessen durchgeführt. Bei keiner dieser Maßnahmen wurden Asiatische Tigermücken festgestellt.

Als „Gold-Standard“ für den molekulargenetischen Nachweis der Asiatischen Tigermücke wurde die Art-Identifizierung per DNA-Barcode etabliert. Mit dieser Methode können auch Eier, Larven und Teile von Stechmücken (wie einzelne Flügel, Beine oder an den Innenwänden von Räumen und Fahrzeugen zerquetschte und getrocknete Exemplare) zuverlässig identifiziert werden. Geschwindigkeitsbestimmende Schritte sind hierbei die DNA-Extraktion aus dem Tiermaterial, die Durchführung der PCR (Polymerase-Kettenreaktion) zur Vervielfältigung eines bestimmten Abschnittes des genetischen Materiales und die DNA-Sequenzanalyse dieser Genregion. Die Identifizierung erfolgt durch Datenbank-Vergleich der erhaltenen DNA-Sequenz mit publizierten oder internen Referenz-Sequenzen.

Als noch schnelleres Nachweisverfahren für die Asiatische Tigermücke wurde im Rahmen des Forschungsprojektes ein spezifischer Schnelltest entwickelt, für dessen Durchführung keine PCR oder DNA-Sequenzierung benötigt werden und damit auch nicht die entsprechenden Geräte. Dieser Test beruht auf der LAMP-Methode (‘loop mediated isothermal amplification’), die bei positiver Reaktion mit extrahierter DNA der Asiatischen Tigermücke innerhalb von 25 Minuten eine mit dem bloßen Auge ablesbare Farbreaktion hervorruft. Die Spezifität des Tests wurde exemplarisch an multiplen Proben zehn verschiedener Stechmückenarten überprüft. Die Anwendung des LAMP-Tests erlaubt im Bedarfsfall eine erheblich schnellere Identifikation von Tigermücken-Material mit geringerer apparativer Ausstattung. Beide molekulargenetisch basierten Methoden sind dazu geeignet, solche Tigermücken-Materialien (z.B. Eier, Überreste) schnell zu identifizieren, die für eine morphologische Bestimmung nicht zuverlässig oder erst nach langwieriger Anzucht geeignet sind.

Die vordringlichsten Anpassungsmaßnahmen für Hessen betreffen neben der Einrichtung einer langfristigen Überwachungsstrategie die Verringerung geeigneter Brutgewässer an Risikostandorten. Als wichtigstes kurzfristiges Ziel wird die Verbesserung der Abfallbeseitigung an Parkplätzen, aber auch von Tank- und Raststätten der Autobahnen empfohlen.

Wichtigstes mittelfristiges Ziel sollte eine Regelung sein, welche den gewerbsmäßigen Handel mit Altreifen und deren Lagerung untersagt, wenn diese nicht durch Überdachung mit Wasserabfluss vor Regen- und Spritzwasser sowie ggf. durch erhöhte Lagerung vor Überflutung geschützt sind, da solche Altreifenlager weltweit als die wichtigsten Brutstätten und Zentren der Tigermücken-Ausbreitung erkannt worden sind.

Auch Blumenvasen auf Friedhöfen sollten als vom Menschen künstlich geschaffene Brutstätten für invasive und einheimische Stechmücken in alle Risikobetrachtungen mit einbezogen und Strategien zur Bekämpfung von Stechmücken auf Friedhöfen bereits experimentell erprobt werden, bevor es zur Ansiedlung einer der „exotischen“ Stechmückenarten kommt.

Da frisch eingeschleppte oder punktuell etablierte Asiatische Tigermücken in Deutschland durch lokal begrenzte Insektizid-Einsätze und Begleitmaßnahmen wahrscheinlich noch kosteneffektiv eliminiert werden können, kommt neben dem Monitoring auch der Untersuchung der temperaturabhängigen und artspezifischen Wirkungen von Insektiziden auf Tigermücken und mit ihnen in Konkurrenz um Brutgewässer stehende einheimische Arten eine wichtige Rolle zu.

## **2. Beschreibung/Problemstellung**

### 2.1 Aufgabenstellung laut Projektvorschlag

Ziel des Projektes war es, die Gebiete des größten Risikos einer Tigermücken-Einschleppung in Hessen (Raststätten und Parkplätze entlang der großen Autobahnen in Südhessen, speziell der A5; Altreifen-Händler; Flughafen Frankfurt) mittels engmaschig aufgestellter Tigermücken-Eiablagefallen zu überwachen. Abgelegte Stechmücken-Eier sollten dann mittels zu entwickelnder schneller DNA-Identifikationsverfahren bestimmt werden. Dadurch steht (anders als bisher) innerhalb weniger Stunden eine definitive, kostengünstige, in jedem Labor auch ohne taxonomische Expertise reproduzierbare Diagnose zur Verfügung, was eine umgehende Bekämpfung erlaubt.

### 2.2 Abweichungen gegenüber dem Projektvorschlag

In der Saison 2009 wurde das Monitoring in Erwartung der Projektbewilligung bereits durchgeführt. In der Saison 2012 wurde die Monitoring-Maßnahme dagegen nicht weitergeführt, um Doppelungen mit den drei bundesweiten Monitoring-Projekten (koordiniert vom Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin mit Förderung durch die Leibniz-Gemeinschaft und das Umweltbundesamt sowie vom Friedrich-Loeffler-Institut mit Förderung durch das Robert-Koch-Institut) zu vermeiden.

Von Herbst 2010 bis Herbst 2011 wurde die Monitoring-Maßnahme ergänzt durch die Auswertung der Aufsammlungen von Larven und adulten Stechmücken, die Robert Berger im 2. Halbjahr 2010 in einem größeren Gebiet Mittel- und Südhessens (Abb. 8) in geeigneten Kleinstgewässern (z.B. Blumenvasen auf Friedhöfen, Regentonnen, alte Autoreifen) und weiteren Standorten mittels CO<sub>2</sub>-Lockstoff-Fallen gemacht hatte (BG-Sentinel-Fallen mit CO<sub>2</sub> und BG-Lure-Lockstoff, Biogents AG, Regensburg).

Eine zusätzliche Ergänzung in der Fläche Hessens erfuhr die Monitoring-Maßnahme durch die Aufsammlungen adulter Stechmücken, die Friederike Bock von Juli bis September 2011 an weiteren 12 Standorten (Abb. 6) mittels BG-Sentinel-Fallen mit CO<sub>2</sub> und UV-Licht durchführte.

Fünf dieser Standorte befanden sich im urbanen Stadtgebiet von Frankfurt am Main und sieben im Gebiet des Rhein-Main-Observatoriums. Das Rhein-Main-Observatorium ist eine der deutschen Langzeit-Untersuchungsflächen für ökologische und Biodiversitäts-Forschung und umfaßt eine Fläche von 100 km<sup>2</sup> östlich von Frankfurt, zwischen Mühlheim, Hanau und dem unteren Kinzig-Tal. Dort wurden Fallen an den folgenden Orten aufgestellt: Wohngebiet "Zur Römerbrücke" in Hanau-Steinheim; Erlensee-Rückingen; Langenselbold (Noltensee); Rodenbach (2 x); Gründau-Lieblös; Gelnhausen. Im Stadtgebiet Frankfurt wurden Fallen auf dem Hauptfriedhof aufgestellt, in Hinterhof-Gärten nahe des Westbahnhofs, im Botanischen Garten der Universität am Grüneburgpark und im Zoo Frankfurt nahe des Pelikan-Geheges.

Der Flughafen Frankfurt wurde nach Rücksprache mit dem Hessischen Ministerium für Umwelt, Energie, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (Herr Dr. Fröhlich) durch dieses Projekt nicht überwacht, da dort bereits vom Friedrich-Loeffler-Institut bundesweit koordinierte Anstrengungen zum Fang von Mücken mit analoger Methodologie stattfinden.

Unter der Annahme einer vergleichbaren Fängigkeit der verwendeten Fallen auch für die Asiatische Buschmücke (*Aedes japonicus*) wurde eine Suche nach dieser Art im Rahmen der Projektaktivitäten ebenfalls durchgeführt.

## 2.3 Hintergrund

Durch den Klimawandel (hier vereinfacht im Sinne zunehmender Erwärmung in Mitteleuropa) werden immer größere Teile Deutschlands für eine **dauerhafte Besiedlung durch Asiatische Tigermücken** geeignet werden. Höhere Temperaturen begünstigen außerdem die **Replikation bzw. Generationszeit von Viren und Parasiten** (z.B. Hunde-Herzwurm, *Dirofilaria immitis*), die auch durch diese Stechmücken übertragen werden können. Die schwieriger zu modellierenden Niederschläge der Zukunft in Deutschland sind für Asiatische Tigermücken von geringerer Bedeutung, da sich die Tiere in den neu besiedelten Gebieten **primär in anthropogenen Kleinstgewässern** (z.B. Blumentopf-Untersetzer, weggeworfene Plastikflaschen oder Getränkedosen) vermehren. Obwohl für die potenzielle Besiedlung Deutschlands durch die **Asiatische Buschmücke** noch keine Modell-Szenarien vorliegen, muss aufgrund der höheren Kälteresistenz dieser Art und ihres flächigen Vorkommens im Tiefland der nördlichen Schweiz und im Südwesten und Westen Deutschlands davon ausgegangen werden, dass sie bereits unter gegenwärtigen Klimabedingungen weite Teile Deutschlands besiedeln kann.



**Abb. 1.** Asiatische Tigermücke (*Aedes albopictus*) bei der Blutmahlzeit am Menschen.  
Foto: J. Gathany/CDC.

Neben ihrer Bedeutung als **tagaktive Lästlinge**, die z.B. in Italien als sehr häufige und sehr **aggressiv beißende Stechmücken in Städten** in Erscheinung treten (z.B. Kuch et al. 2010), besteht das primäre Risikopotenzial der Asiatischen Tigermücke in ihrer Funktion als **kompetenter Vektor im „stand-by“-Modus**. Treffen z.B. die immer zahlreicher werdenden **Reiserückkehrer mit Dengue-Fieber**, von denen viele nur leicht erkrankt sind und nicht bzw. fehldiagnostiziert werden, in ihrer Heimat auf Asiatische Tigermücken, so können diese das Dengue-Virus auf andere Menschen übertragen.

Gleichzeitig besteht aber auch die Möglichkeit der **„vertikalen Übertragung“ des Dengue-Virus von infizierten Tigermücken über ihre Eier an die nächste Generation**, wodurch infektiöse Tigermücken auch ohne die Notwendigkeit „frischer“ Infektionen durch erkrankte Menschen entstehen und zur Verbreitung des Virus beitragen können. Aus diesen Gründen spielt nicht nur die Stechmücken-sichere Isolation entsprechender infizierter Personen, sondern auch die Eliminierung der Vektor-Populationen in deren Umgebung (seit Einreise/Infektion) eine besonders wichtige Rolle. Während aus Deutschland in Abwesenheit bekannter Vektoren des (bei seiner Replikation in der Stechmücke temperaturabhängigen) Dengue-Virus solche Fälle noch nicht bekannt

geworden sind, ist dieses Szenario in von Tigermücken stark besiedelten Städten wie Rom oder Genua schon heute im Bereich des Möglichen.

Erste Fälle von **Dengue-Fieber in Europa** in der jüngsten Geschichte, die allem Anschein nach auf Infektionen zurückgehen, die sich vor Ort ereigneten, wurden **2010** aus Südfrankreich, Kroatien und Portugal gemeldet (La Ruche et al. 2010; Schmidt-Chanasit et al. 2010). Auf der portugiesischen Atlantik-Insel Madeira ist es im Herbst **2012** zu einem Ausbruch von Dengue-Fieber gekommen, an dem bis dahin offenbar über 1000 Menschen erkrankt sind (Sousa et al. 2012); Überträger sind dort eingeschleppte Gelbfieber-Mücken (*Aedes aegypti*). Im Zusammenhang mit Asiatischen Tigermücken am bekanntesten ist nach wie vor der **Ausbruch des Chikungunya-Fiebers 2007** in der italienischen Region Emilia-Romagna, während dessen über 200 Menschen erkrankten. Ursächlich dabei war offenbar ein einzelner erkrankter **Reiserückkehrer aus Indien** - wo eine große, durch Tigermücken vermittelte Chikungunya-Epidemie herrschte -, der in Italien auf hohe Populationsdichten von Tigermücken traf. Im Gegensatz zum Dengue-Virus ist die vertikale Übertragung des Chikungunya-Virus auf die Nachkommen infizierter Tigermücken noch nicht nachgewiesen.

Die **Asiatische Buschmücke (*Aedes japonicus*, Abb.2)** wird vor allem als potenzieller „**Brückenvektor**“ zwischen verschiedenen Wirbeltieren (z.B. Vögel, Menschen) und möglicher Überträger des **West-Nil-Virus** diskutiert; in Asien ist sie als möglicher Vektor des **Japan-Enzephalitis-Virus** bekannt. **In der Schweiz**, wo sie 2009 in 38 Gemeinden der Kantone Aargau, Zürich, Solothurn, Luzern und Basel-Land **auf einer Fläche von auf 1400 km<sup>2</sup> nachgewiesen** wurde, ist sie offenbar in der Lage, die einheimische Hausstechmücke *Culex pipiens* aus bestimmten Bruthabitaten (Blumenvasen auf Friedhöfen) zu verdrängen. Welche Bedeutung dies möglicherweise für das potenzielle Risiko von West-Nil-Virus-Übertragungen haben könnte, für die insbesondere auch *Culex pipiens* ein kompetenter und in Europa (z.B. Italien: Emilia-Romagna) sowie den USA nachgewiesener Vektor ist, ist noch unklar. Aufgrund ihrer hohen Invasionsfähigkeit –seit ihrer Einschleppung in die USA 1998 hat sie sich in 22 Staaten der USA und Teilen Kanadas etabliert – muss das Vorkommen der Asiatischen Buschmücke in Deutschland jedoch mit Sorge betrachtet werden.



**Abb. 2.** Asiatische Buschmücke (*Aedes japonicus*) bei der Blutmahlzeit. Foto: J. Gathany/CDC.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Monitoring

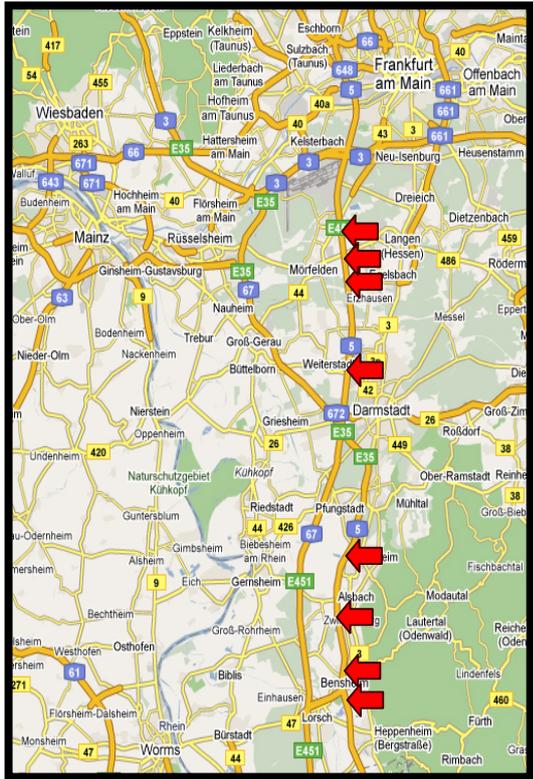
Im Projektzeitraum war die Monitoring-Maßnahme von 2009 bis 2011 über das Aufstellen und Kontrollieren von Eiablage-Fallen an Parkplätzen und Raststätten der BAB 5 in Südhessen hinaus auf den Fang und die Aufzucht von Larven aus geeigneten Kleinstgewässern (z.B. Blumenvasen auf Friedhöfen, Regentonnen, alte Autoreifen) und den Fang adulter Stechmücken (mittels CO<sub>2</sub>-Lockstoff-Fallen) auf oder an den Betriebsgeländen großer Altreifenhändler und anderen Standorten in Hessen ausgedehnt worden.

Entlang eines Transekts der BAB 5 in Südhessen (von Heppenheim bis Frankfurt; Abb. 3) wurden ab Beginn der Rückreisewelle der Schulferien im Spätsommer **Eiablagefallen** an für Tigermücken geeigneten Standorten der Autobahn-Parkplätze und –Raststätten ausgebracht. Hierfür wurden schwarze 500-ml-Kunststoffbecher eingesetzt. Diese wurden je nach Witterung zur Hälfte bis zu zwei Dritteln mit abgestandenem Regenwasser befüllt, mit einem schräg im Wasser stehenden medizinischen Holzspatel und einem Streifen Baumwolltuch um den oberen inneren Rand des Bechers als Eiablagesubstrat bestückt und zur Hälfte im Boden eingegraben oder in niedrigen Astgabeln befestigt (Abb. 4).

Kleine, wenig frequentierte Parkplätze wurden dabei mit mindestens drei Eiablagefallen versehen; große, von PKW, Wohnwagen/-mobilen und LKW gleichermaßen stark genutzte Raststätten-Parkplätze mit Tankstellen, Restaurant(s) und langen Aufenthaltszeiten (z.T. über Nacht; durch Kraftfahrer-Ruhezeiten, Motels) wurden mit bis zu 12 Eiablagefallen entlang ihres Geländes bestückt. Eiablagefallen wurden ausschließlich entlang der östlichen Seite der BAB 5, also in Süd-Nord-Richtung aufgestellt: Ein Transport von Tigermücken von Nord nach Süd auf diesem Abschnitt ist sehr unwahrscheinlich, ebenso ein Überfliegen der offenen, mehrspurigen Autobahn nach „Ausstieg“ auf der östlichen Seite, da dort unmittelbar geeignete Ruheplätze und Brutplätze für diese Tiere zur Verfügung stehen.

Von Süden nach Norden wurden entlang der BAB 5 die folgenden Parkplätze und Raststätten mit Eiablagefallen kontrolliert: Kälberpfad, Scheidweg/Rasthof Bergstraße, Nachtweide, Rasthof Alsbach, Erlensee, Rolandshöhe, Weiterstadt, Rasthof Gräfenhausen, Rosemeyer; außerdem auch die Raststätte Pfungstadt an der BAB 67.

Die Fallen wurden in Abhängigkeit vom Wetter (öfter bei warmem Wetter, zur Sicherstellung einer teilweisen Füllung mit Wasser und wegen der schnelleren Entwicklung der Stechmückenlarven bei höherer Temperatur) in Abständen von 2-4 Wochen ausgetauscht und ihr Inhalt (Wasser; Eiablagesubstrate; Innenwände des Bechers; Abb. 4) im Labor auf das Vorhandensein von Stechmücken-Eiern oder –Larven untersucht. Hierbei wurden keine Asiatischen Tigermücken festgestellt. Vorbehaltlich einer wahrscheinlich ähnlichen Fängigkeit der Eiablagefallen für die Asiatische Buschmücke kann dieser Befund auch für die letztgenannte Art gelten.



← **Fallenstandorte**

**Abb. 3.** Standorte von Eiablagefallen für Asiatische Tigermücken und Asiatische Buschmücken entlang der BAB 5 in Südhessen. Kartendaten: © 2013 Geo-Basis-DE/BKG, © 2009 Google.

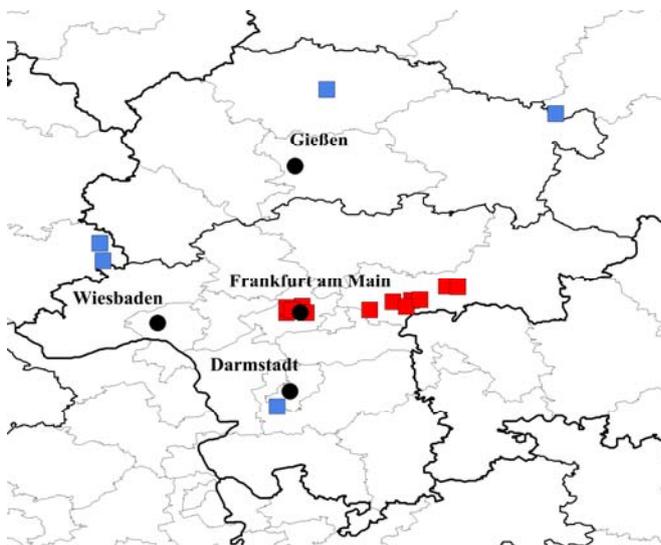


**Abb. 4.** Eiablagefallen für Asiatische Tigermücken und Asiatische Buschmücken.

CO<sub>2</sub>-Lockstoff-Fallen (**BG-Sentinel-Fallen mit CO<sub>2</sub>**, bei Altreifenhändlern zusätzlich auch mit speziell für Asiatische Tigermücken und Gelbfiebermücken entwickeltem BG-Lure-Lockstoff, Biogents AG, Regensburg; Abb. 5) wurden an den folgenden Orten eingesetzt: Alzenau, Bad Homburg, Bad Soden, Berkersheim, Friedrichsdorf, Idstein, Kälberau, Mörfelden, Niederneisen, Oberkarben, Pfungstadt, Reichelsheim (Abb. 6). Hierbei wurden weder Asiatische Tigermücken noch Asiatische Buschmücken gefangen.



**Abb. 5.** BG-Sentinel-Lockstoff-Falle (Biogents AG, Regensburg), hier mit UV-Lichtquelle zum Fang von Gnitzen statt mit CO<sub>2</sub>-Quelle.



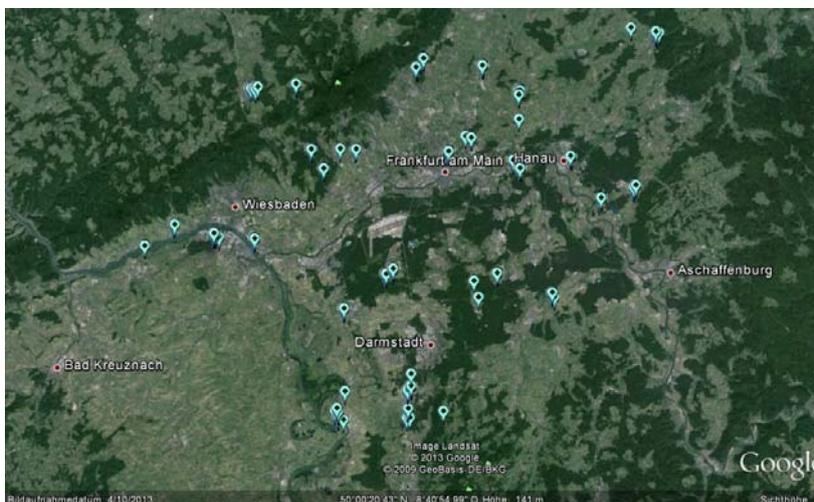
**Abb. 6.** Karte der Orte, an denen zusätzliche Fänge mit BG-Sentinel-Lockstoff-Fallen durchgeführt wurden (rote Quadrate) bzw. die Lager von Altreifen-Großhändlern beprobt wurden (blaue Quadrate).

**Altreifen-Großhändler mit Import-Export-Handel** wurden in Grebenau, Marburg (Abb. 7), Niederneisen und Pfungstadt aufgesucht und auf oder neben ihrem Betriebsgelände beprobt (Abb. 6). Hierbei wurden Larven aus Wasserrückständen in Altreifen gefangen und im Labor herangezüchtet und/oder adulte Stechmücken mit BG-Sentinel-Fallen gefangen. Darunter befanden sich weder Asiatische Tigermücken noch Asiatische Buschmücken. Ein in Frankfurt ansässiger Betrieb dieser Art verweigerte offenbar aus Furcht vor möglichen behördlichen Auflagen den Zugang zu seinem Betriebsgelände.



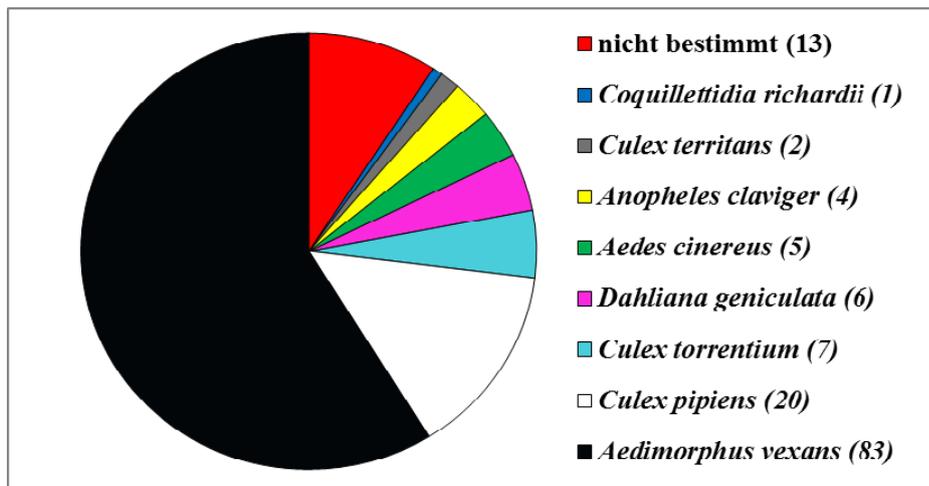
**Abb. 7.** Verkauf von Altreifen unter freiem Himmel in Marburg an der Lahn. Wasseransammlungen in Altreifen sind bevorzugte Brutstätten von Asiatischen Tigermücken und anderen exotischen Stechmücken. Die interkontinental gehandelten Altreifen sind das wichtigste Transportmedium für die trockenheitsresistenten Eier dieser Überträger gefährlicher Virus-Infektionen.

Eine großflächige **Aufsammlung von Stechmückenlarven** aus natürlichen und künstlichen Gewässern (vor allem Kleinstgewässern wie Regentonnen, kleine Gartenteiche, Viehtränken, Pfützen auf und neben Straßen und Wegen) in verschiedenen urbanen und ländlichen Biotopen wurde ebenfalls im zweiten Halbjahr 2010 durchgeführt (Abb. 8). Hierbei wurden insbesondere mikroökologische Daten der Brutgewässer erhoben und die Larven im Labor zur morphologischen und molekulargenetischen Bestimmung der adulten Stechmücken herangezüchtet. An keinem der Fundorte wurden Asiatische Tigermücken (*Aedes albopictus*) oder Asiatische Buschmücken (*Aedes japonicus*) festgestellt.



**Abb. 8.** Karte der Aufsammlungsorte von Stechmückenlarven aus Kleinstgewässern im Berichtszeitraum (2010). Karte: Google earth, Image Landsat © 2013 Google, © 2009 Geo-Basis-DE/BKG.

Auch die Aufsammlungen adulter Stechmücken von Juli bis September 2011 an weiteren 12 Standorten mittels BG-Sentinel-Fallen mit CO<sub>2</sub> und UV-Licht (Stadtgebiet Frankfurt am Main und Gebiet des Rhein-Main-Observatoriums, siehe oben) führten nicht zum Nachweis dieser oder anderer "exotischer" Stechmücken-Arten (Abb. 9). Beide Aufsammlungen in der Fläche lieferten aber wichtige Daten zu Vorkommen und Verbreitung von Stechmücken in Hessen und benötigte genetische Daten zur Entwicklung verbesserter molekularer Tests zur Diagnose von Asiatischen Tigermücken (siehe unten).



**Abb. 9.** Diversität und Häufigkeit von Stechmücken-Arten, die von Juli bis September 2011 an 12 Standorten in Frankfurt am Main und dem Rhein-Main-Observatorium mittels BG-Sentinel-Fallen mit CO<sub>2</sub> und UV-Licht gefangen wurden. Zahlenangaben entsprechen gefangenen Exemplaren.

### 3.2 Molekulargenetischer Nachweis

Als „Gold-Standard“ für den molekulargenetischen Nachweis der Asiatischen Tigermücke wurde die **Art-Identifizierung per „DNA-Barcode“** (automatisierte DNA-Sequenzierung eines durch Polymerase-Kettenreaktion [PCR] vervielfältigten Abschnittes des mitochondrialen Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheit-I-Gens) etabliert. Mit dieser Methode konnten auch Eier, Larven und Teile von Stechmücken (wie einzelne Flügel, Beine oder an den Innenwänden von Räumen und Fahrzeugen zerquetschte und getrocknete Exemplare) identifiziert werden. Die Bearbeitungsdauer bis zum Ergebnis der Sequenzanalyse beträgt dabei unter prioritärer Behandlung mindestens 6-7, üblicherweise aber 24-48 Stunden und bedarf umfangreicher apparativer Ausstattung.

Ein weiteres Ziel des Projektes war daher die Entwicklung eines noch schnelleren, von der DNA-Sequenzierung unabhängigen Nachweisverfahrens für die Asiatische Tigermücke. Hierfür wurde die LAMP-Methode („loop mediated isothermal amplification“) ausgewählt, mit der bei gleichmäßiger Reaktionstemperatur eine im Reaktionsgefäß für das bloße Auge sichtbar werdende Vervielfältigung eines spezifischen Genabschnittes innerhalb kurzer Zeit erzielt werden kann (Njiru 2012). Hier galt es zunächst, definierte Genabschnitte für die Initiierung und Fortsetzung der LAMP-Reaktion (sog. Primer) speziell für die Asiatische Tigermücke auszuwählen. Diese Primer wurden so gewählt, dass sie in ihrer Nukleotidsequenz eine maximale Abweichung zu anderen relevanten Stechmückenarten hatten. Um eine möglichst breite Vergleichbarkeit zu erreichen, wurden die Primer-Sequenzen aus der Sequenz der „Barcode-Region“ des mitochondrialen Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheit-I-Gens abgeleitet, für welche die umfangreichsten Datensätze vorliegen. Hierfür wurde auf Grundlage der Fänge 2010-2011 aus der Monitoring-Maßnahme eine **Referenzbibliothek von DNA-Barcodes** der nachgewiesenen Stechmücken-Arten Hessens und ihrer genetischen Varianten erstellt. Diese wurde um publizierte und unpublizierte DNA-Barcode-Sequenzen der restlichen für Deutschland gemeldeten Stechmücken-Arten ergänzt. Hierfür mussten größtenteils in internationalen Datenbanken (z.B. European Nucleotide Archive, GenBank) deponierte

DNA-Sequenzen zu Stechmücken anderer europäischer Länder und z.T. aus Übersee verwendet werden, weil eine vollständige DNA-Barcode-Referenzbibliothek für Deutschland sich erst im Aufbau befindet. Der kombinierte Datensatz wurde dann dazu genutzt, Sequenzregionen mit maximaler Unterschiedlichkeit zwischen der Asiatischen Tigermücke einerseits und der Konsens-Sequenz der Gesamtheit der für Deutschland gemeldeten Stechmücken-Arten andererseits zu identifizieren. Auf Grundlage dieser Information wurden mit Hilfe der Software Primerexplorer fünf **neue, artspezifische Oligonukleotid-Primer** abgeleitet, deren Fähigkeit zur ausschließlichen Vermehrung des Tigermücken-DNA-Abschnittes in PCR- und LAMP-Experimenten getestet wurde.

Aa-FIP:

5'-TGCTAAATCAACTGAAGCCCCAGTGGAACAGGGTGAACGGTTTATCCTCCTC-3'

Aa-BIP:

5'-AGCGGGAATCTCATCTATTTTAGGAAGAGTAATACCAGCTGATCGT-3'

Aa-F3:

5'-GTTCTATAGTAGAAAACGGAGC-3'

Aa-B3:

5'-CACACAAATAAAGGTAGTCGA-3'

Aa-loopF:

5'-ATGAGCTGTTCCAGAAGAA-3'

(Abkürzungen der Nukleobasen: A–Adenin, G–Guanin, C–Cytosin, T–Thymin)

Mit diesen Primern wurden LAMP-Tests (LoopAMP-DNA-Kit, Mast Diagnostica GmbH) mit Tigermücken-Proben verschiedener geographischer Herkunft sowie Proben anderer Arten zur Untersuchung der Spezifität, Sensitivität und Schnelligkeit der Methode durchgeführt. Die dafür verwendete DNA wurde aus einzelnen Mückeneiern, Teilen von Stechmücken oder ihrer Larven oder auch aus ganzen Mücken extrahiert. Bei der DNA-Extraktion der Mückeneier wurden im Vergleich mehrerer Extraktionsmethoden die besten Ergebnisse erzielt, wenn die Eier unter Zugabe von flüssigem Stickstoff mit einem Mörser zerstoßen und dann einer gewöhnlichen Lyse mit Proteinase K und nachfolgender Extraktion mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol unterzogen wurden. Insgesamt kamen die folgenden Arten und Individuenzahlen zur Verwendung: *Aedes albopictus* (N=28), *Aedes aegyptii* (N=7), *Aedimorphus vexans* (N=18), *Culex pipiens* (N=19), *Culex torrentium* (N=3), *Aedes cinereus* (N=3), *Dahlia geniculata* (N=2), *Anopheles claviger* (N=1), *Culex territans* (N=1) und *Coquillettidia richardii* (N=1).

Die LAMP-Tests wurden z.T. ohne gekoppelte Farbreaktion durchgeführt; in diesen Fällen wird eine positive Reaktion durch Trübung der Lösung im Reaktionsgefäß sichtbar. Die Zusammensetzung bestand hier aus 12,5 µl Reaction Mix (RM), 1 µl FIP, 1 µl BIP, 1 µl F3, 1 µl B3, 1 µl loopF, 1 µl *Bst* DNA Polymerase, 4,5 µl H<sub>2</sub>O und 2 µl DNA-Lösung (Gesamtvolumen 25 µl).

Die Durchführung der Tests mit Zusatz von Hydroxynaphtolblau im LAMP-Mastermix (1,5 µl bei entsprechender Reduktion des Wasseranteils) erlaubt ein noch einfacheres Ablesen einer positiven Reaktion, da es zu einem deutlichen Farbumschlag der Lösung im

Reaktionsgefäß kommt. Diese Variante wurde daher als Standard bei der Testdurchführung gewählt.

Die Proben wurden nach Zusammenführung aller Reagenzien für 45 Minuten bei 63°C auf einem Heizblock inkubiert. Dann wurde die Reaktion gestoppt, indem die Proben für 3 Minuten auf eine Temperatur von 95°C erhitzt wurden. Die anschließende Ablesung der Testergebnisse erfolgte mit bloßem Auge bei normaler Raumbelichtung gegen einen hellen Hintergrund. Zusätzlich wurden die Reaktionslösungen einer Gel-Elektrophorese (1% Agarose) unterzogen, in der positive LAMP-Reaktionen nach Visualisierung der DNA mittels SybrGreen- oder Ethidiumbromid-Fluoreszenz charakteristische leuchtende Bereiche aufweisen. Zur Kontrolle der Qualität der eingesetzten DNA-Lösungen und ihrer Eignung für die Vervielfältigung von Genabschnitten aus der Zielregion des Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheit-I-Gens wurden alle Proben auch mittels konventioneller PCR und Sequenzierung mit den Standard-Barcoding-Primern analysiert.

Bei allen außer zwei Proben trat die mit dem Auge ablesbare Reaktion wie erwartet ein (negativ = keine Trübung bzw. violette Farbe ohne Farbumschlag; positiv = deutliche Trübung bzw. deutlicher Farbumschlag zu blau). Unter den 28 Proben von *Aedes albopictus* erschien eine violett (falsch-negativ bei der Ablesung der Farbreaktion); bereits die Untersuchung derselben Probe in der Gel-Elektrophorese ergab aber ein klar positives Ergebnis. Unter den 18 Proben von *Aedimorphus vexans* erschien eine blau-violett und mit Banden auf dem Gel (falsch-positiv); eine Wiederholung des Tests mit dieser Probe unter gleichen Bedingungen ergab aber ein negatives Ergebnis (violett) und keine Bande auf dem Gel, was auf eine mögliche Verwechslung oder Kontamination bei der ersten Durchführung im Labor hindeutet. Eine Ablesung der Farbreaktion mit dem bloßen Auge ist bereits ab 25 Minuten Reaktionszeit möglich.

#### 4. Bewertung/Diskussion der Ergebnisse

Die Durchführung von Monitoring-Maßnahmen an der BAB 5 in niedriger Intensität mit Eiablagefallen und mit Beschränkung auf den Spätsommer und Herbst (ab Beginn der Rückreisewelle am Ende der Sommer-Schulferien) erscheint weiterhin sinnvoll. Hier muss nach wie vor mit der Eintragung geringer Individuen-Zahlen von Asiatischen Tigermücken z.B. aus der südlichen Schweiz und Italien gerechnet werden. In diesen Herkunftsländern bauen sich die Tigermücken-Populationen im Jahresverlauf auf und erreichen ihre maximale Häufigkeit im Spätsommer und Herbst, bis sie zum Winter hin wieder abnehmen. Im italienischen Tessin konnten wir Tigermücken Anfang Oktober bei 10°C Lufttemperatur beim aktiven Anflug auf geparkte PKW mit Insassen und auf im Freien sitzende „menschliche Köder“ beobachten; ähnliche Erfahrungen mit dem Bereich der unteren Aktivitätstemperatur dieser Art im europäischen Freiland liegen aus Barcelona vor. Die Wahrscheinlichkeit einer Verschleppung nach Deutschland ist also sowohl aufgrund der Populationsdynamik der Tigermücken südlich der Alpen als auch aufgrund des Spitzenaufkommens von PKW in Süd-Nord-Richtung im Spätsommer und Herbst am größten. Zugleich erscheint die Annahme plausibel, dass einzelne, möglicherweise früher im Jahresverlauf eingeschleppte Tigermücken im Falle einer erfolgreichen Fortpflanzung entlang der BAB 5 bis zum Herbst in einer Individuen-Zahl auftreten könnten, die dann ihre Detektion und damit Eliminierung erlaubt.

Nach gegenwärtiger Kenntnis kann davon ausgegangen werden, dass Tigermücken aus der Schweiz und Italien nicht infektiös sind oder „nur“ mit Larvenstadien des Hunde-Herzwurms infiziert sind, der bei Übertragung auf immunkompetente Menschen üblicherweise vom Immunsystem schnell erkannt und abgekapselt wird, ohne dass es zu Krankheitsbeschwerden kommt (bei Hunden verläuft diese auch als Dirofilariose bekannte Infektion ohne regelmäßige Chemoprophylaxe/-therapie allerdings tödlich).

Eine andere Situation liegt im Falle von Tigermücken (und Stechmücken allgemein) vor, die als Adulte durch den Flugverkehr transportiert werden (vgl. sporadische Fälle von „Flughafen-Malaria“ bei Anwohnern von an Flughäfen angrenzenden Gemeinden, die selbst nie in Malaria-Gebiete gereist waren). Nach eigenen Beobachtungen überleben Stechmücken aus Dengue-Endemiegebieten wie z.B. Bangladesch oder Nepal in den Passagierkabinen der gängigen Airbus- und Boeing-Modelle zum Teil zahlreich mindestens sechs Stunden Flugzeit (bis zum Stop in den Golf-Staaten); dies entspricht in etwa der Flugzeit zwischen Frankfurt und vielen Zielen in Westafrika. Die Transitbereiche verschiedener internationaler Flughäfen wie z.B. Rom-Fiumicino sind außerdem zumindest zeitweise massiv mit Stechmücken besiedelt.

Aus diesen Gründen sollte zusätzlich eine permanente **Überwachung besonderer Risikobereiche im Inneren des Flughafens Frankfurt** wie Tierhäuser, Frachtbereiche für Pflanzen u.ä. in Erwägung gezogen werden. Als kosteneffektive Variante kommt hier der Dauerbetrieb einiger weniger BG-Sentinel-Fallen in Frage, die mit Lockstoff (ohne CO<sub>2</sub>) auch in Innenräumen aufgestellt werden können und je nach Fangergebnis mehrere Wochen wartungsfrei laufen können, dabei allerdings nicht das ganze Spektrum möglicher Stechmücken fangen, sondern speziell Asiatische Tigermücken, Gelbfiebermücken und einige weitere Arten anlocken.

Die **Risikostandorte Altreifenhändler** sollten verstärkt überwacht werden, nach Möglichkeit mittels direkter Larvensammlung und **Langzeitbetrieb von BG-Sentinel-Fallen mit Lockstoff**. Durch **interkontinentale Handelswege** der Altreifen und **fehlende**

**behördliche Auflagen oder Kontrollen** besteht hier jederzeit die Möglichkeit der Einfuhr auch größerer Mengen von Eiern der Asiatischen Tigermücke, Gelbfiebermücke und anderer „exotischer“ Stechmückenarten. Erschwert wird dieses Vorhaben durch die mangelnde Kooperationsbereitschaft der Altreifenhändler; zum Teil sind auch die Reifenlager selbst nur schwer zu lokalisieren, da sie sich u.U. an anderen Orten befinden als der Meldeadresse des Unternehmens.

## 5. Mögliche Anpassungsmaßnahmen

Die Fortsetzung von **Monitoring-Maßnahmen** in niedriger Intensität wird empfohlen, da frisch eingeschleppte oder punktuell etablierte Asiatische Tigermücken in Deutschland durch lokal begrenzte Insektizideinsätze und Begleitmaßnahmen wahrscheinlich kosteneffektiv eliminiert werden können.

Spätestens nach Ablauf der gegenwärtigen bundesweiten Forschungsprojekte über die Verbreitung von Stechmücken in Deutschland muss mit einer gravierenden **Überwachungslücke in Hessen** gerechnet werden, wenn keine weiterführenden Maßnahmen durch das Land ergriffen werden. Mittel- und langfristig bietet sich hier die Integrierung von Überwachungsmaßnahmen speziell für die Asiatische Buschmücke, Asiatische Tigermücke und Gelbfiebermücke (alle drei Arten können mit denselben Methoden gefangen werden) in ein kombiniertes Biomonitoring an, da so personelle und logistische Ressourcen mit wichtigen Synergie-Effekten und daher voraussichtlich besonders wirtschaftlich genutzt werden könnten.

Hinsichtlich der gegenwärtigen flächigen Ausbreitung der Asiatischen Buschmücke in Rheinland-Pfalz, Baden-Württemberg und Nordrhein-Westfalen wird eine enge Koordination mit den dort zuständigen Landesbehörden empfohlen.

Die vordringlichsten **Anpassungsmaßnahmen für Hessen** betreffen neben der Überwachung beide den Bereich der „**source reduction**“, d.h. der Verringerung geeigneter Brutgewässer an Risikostandorten. Als wichtigstes kurzfristiges Ziel wird hier eine **Verbesserung der Abfallbeseitigung** insbesondere in Gebüsch- und Waldbereichen von Parkplätzen, aber auch von Tank- und Raststätten der BAB 5 und anderer wichtiger Süd-Nord-Autobahnen empfohlen. Wichtigstes mittelfristiges Ziel sollte eine Regelung sein, welche den gewerbsmäßigen **Handel mit Altreifen und deren Lagerung** unterbinden kann, wenn diese nicht durch **Überdachung mit Wasserabfluss** vor Regen- und Spritzwasser sowie ggf. durch erhöhte Lagerung vor Überflutung geschützt sind – denn ohne Wasser in den Altreifen können sich dort auch keine Stechmückenlarven (welcher Art auch immer) entwickeln.

## 6. Ausblick und Forschungs-/Untersuchungsbedarf

Der LAMP-Schnelltest bedarf noch einer breiteren Überprüfung der Spezifität (idealerweise sollten alle in Deutschland vorkommenden Stechmückenarten auf ihre Reaktivität hin getestet werden). Wenn sich die vielversprechenden Ergebnisse mit dem LAMP-Test in einer größer angelegten **Validierungsstudie** bestätigen, kann diese Methode die komplizierten, zeit- und kostenaufwendigen Schritte der PCR und DNA-Sequenzierung erübrigen bzw. in den Bereich der Qualitätskontrolle der Tests verlagern.

Weiterer Forschungsbedarf besteht außer im Bereich der Nachweisverfahren besonders bei der experimentellen **Untersuchung des Einflusses von Temperatur und anderen Umweltfaktoren** (z.B. chemische Umweltverschmutzung, Insektizid-Stress) auf einheimische ebenso wie einwandernde Stechmückenarten (Asiatische Tigermücke, Asiatische Buschmücke). Eine besonders wichtige Frage betrifft dabei, wie diese Arten miteinander in Konkurrenz treten und wie sich diese **Konkurrenz-Verhältnisse unter Klimawandel-Szenarien und dem Einfluss verschiedener Krankheitserreger** verändern.

Zusätzlich im Laborexperiment zu klären ist die **Wirksamkeit verschiedener Insektizide** auf die invasiven „exotischen“ Stechmückenarten im Vergleich zu den einheimischen Stechmücken und relevanten ökotoxikologischen Indikator-Arten aquatischer und terrestrischer Lebensräume. Hierbei müssen insbesondere **Temperatureffekte** und mögliche bereits jetzt bestehende Unterschiede (z.B. **Resistenzentwicklung**) zwischen verschiedenen Populationen der invasiven Arten in Europa berücksichtigt werden, um bei der Bekämpfung einer lokalen Population in Hessen (auch unter Beachtung biologischer Konkurrenz und Kontrolle, s.o.) das „ideale“ Insektizid auswählen zu können.

In kontrollierten **Freilandexperimenten** sollte bereits vor der Ansiedlung invasiver Stechmückenarten erprobt werden, mit welchen Methoden **Stechmückenpopulationen auf Friedhöfen** am besten und umweltverträglichsten kontrolliert und im Bedarfsfall kurzfristig eliminiert werden können. Eine wissenschaftlich begleitete Erprobung solcher Maßnahmen ist im Sinne einer Vorbereitung auf den Fall einer Besiedlung durch die Japanische Buschmücke oder die Asiatische Tigermücke von großer Bedeutung, da die zahlreichen **Blumenvasen** auf Friedhöfen unzählige Brutmöglichkeiten für diese Arten darstellen. Neben der gesellschaftlichen Akzeptanz von Bekämpfungsmaßnahmen sollten hierbei besonders Aspekte der Nachhaltigkeit und möglicher unerwünschter Nebeneffekte wie z.B. die Wirkung der Maßnahmen auf einheimische Stechmücken im Mittelpunkt stehen, die als **ökologische Nischen-Konkurrenz** zu den invasiven Stechmückenarten in Frage kommen.

Im Falle der Asiatischen Tigermücke und der Asiatischen Buschmücke gilt es zudem, (1) die **Kälteanpassungen der aktuellen Quellpopulationen in Europa** und (2) ihre Populationsdynamik unter verschiedenen Temperatur-Regimes experimentell zu ermitteln sowie (3) ihre **tatsächliche Ausbreitungsfähigkeit im Freiland** experimentell zu bestimmen, um dann (4) auf Grundlage dieser verbesserten biotischen Daten und aktueller regionaler Klimamodelle realistischere und **detailliertere Projektionen über ihre mögliche zukünftige Ausbreitung** in Hessen/Deutschland zu erhalten.

Die Kommunikation, Koordination und Zusammenarbeit zwischen Institutionen und Projekten in Deutschland, die sich mit Vektor-Arthropoden beschäftigen, kann weiter verbessert werden, um einen zielgenauen und kosteneffektiven Einsatz der Ressourcen sicherzustellen. Eine wichtige Rolle sollten hier neben den wissenschaftlichen Fachgesellschaften wie der Deutschen Gesellschaft für allgemeine und angewandte Entomologie (DGaaE) und der Deutschen Gesellschaft für Medizinische Entomologie und Acarologie (DGMEA) mit ihren Tagungen und Arbeitsgruppen insbesondere die staatlichen Akteure spielen, die auf Bundes- und Landesebene mit der Organisation und Durchführung von Arbeitstreffen wie z.B. des vom Fachzentrum Klimawandel Hessen im HLUG 2013 veranstalteten Vektoren-Workshops wichtige Beiträge leisten können.

## 7. Literaturverzeichnis

- Becker, N., Huber, K., Pluskota, B. & Kaiser, A. (2011): *Ochlerotatus japonicus japonicus* - a newly established neozoan in Germany and a revised list of the German mosquito fauna. - *European Mosquito Bulletin* **29**: 88-102.
- Becker, N., Geier, M., Balczun, C., Bradersen, U., Huber, K., Kiel, E., Krüger, A., Lühken, R., Orendt, C., Plenge-Bönig, A., Rose, A., Schaub, G. A. & Tannich, E. (2013): Repeated introduction of *Aedes albopictus* into Germany, July to October 2012. - *Parasitology Research* **112**: 1787-1790.
- Fischer, D., Thomas, S., Niemitz, F., Reineking, B. & Beierkuhnlein, C. (2011): Projection of climatic suitability for *Aedes albopictus* Skuse (Culicidae) in Europe under climate change conditions. - *Global and Planetary Change* **78**(1-2): 54-64.
- Kampen, H., Zielke, D., & Werner, D. (2012): A new focus of *Aedes japonicus japonicus* (Theobald, 1901) (Diptera, Culicidae) distribution in Western Germany: rapid spread or a further introduction event? *Parasites & Vectors* **5**: 284.
- Kuch, U., Jesse, R., Kronefeld, M. & Amendt, J. (2010): Klimawandel und Krankheiten - Welche Rolle spielen neue Erreger und Überträger? - *Natur und Museum* **140**(9/10): 238-241.
- La Ruche, G., Souarès, Y., Armengaud, A., Peloux-Petiot, F., Delaunay, P., Desprès, P., Lenglet, A., Jourdain, F., Leparç-Goffart, I., Charlet, F., Ollier, L., Mantey, K., Mollet, T., Fournier, J.P., Torrents, R., Leitmeyer, K., Hilairet, P., Zeller, H., Van Bortel, W., Dejour-Salamanca, D., Grandadam, M. & Gastellu-Etchegorry, M. (2010): First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. - *EuroSurveillance* **15**(39): 19676.
- Njiru, Z.K. (2012): Loop-mediated isothermal amplification technology: towards point of care diagnostics. - *PLoS Neglected Tropical Diseases* **6**(6): e1572.
- Pluskota, B., Storch, V., Braunbeck, T., Beck, M. & Becker, N. (2008): First record of *Stegomyia albopicta* (Skuse)(Diptera: Culicidae) in Germany. - *European Mosquito Bulletin*, **26**: 1-5.
- Schmidt-Chanasit, J., Haditsch, M., Schöneberg, I., Günther, S., Stark, K. & Frank, C. (2010): Dengue virus infection in a traveller returning from Croatia to Germany. - *EuroSurveillance* **15**(40): 19677.
- Schneider, K. (2011): Breeding of *Ochlerotatus japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae) 80 km north of its known range in southern Germany. - *European Mosquito Bulletin* **29**: 129-132.
- Sousa, C.A., Clairouin, M., Seixas, G., Viveiros, B., Novo, M.T., Silva, A.C., Escoval, M.T. & Economopoulou, A. (2012): Ongoing outbreak of dengue type 1 in the Autonomous Region of Madeira, Portugal: preliminary report. - *EuroSurveillance* **17**(49): 20333.
- Werner, D., Kronefeld, M., Schaffner, F. & Kampen, H. (2012): Two invasive mosquito species, *Aedes albopictus* and *Aedes japonicus japonicus*, trapped in south-west Germany, July to August 2011. - *EuroSurveillance* **17**(4): 20067.