

Untersuchungen zur Optimierung der protektiven Wirkung imprägnierter Moskitonetze

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Oliver Nehring

aus Braunschweig

Bonn, April 2012

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Michael K. Faulde
2. Gutachter: Prof. Dr. Klaus-Jürgen Steffens

Tag der Promotion: 17. Oktober 2012

Erscheinungsjahr: 2012

*„WENN DIE WISSENSCHAFT IHREN KREIS DURCHLAUFEN HAT,
SO GELANGET SIE NATÜRLICHER WEISE
ZU DEM PUNKTE EINES BESCHEIDENEN MISSTRAUENS,
UND SAGT, UNWILLIG ÜBER SICH SELBST,
WIE VIELE DINGE GIBT ES DOCH, DIE ICH NICHT EINSEHE.“*

*IMMANUEL KANT
TRÄUME EINES GEISTERSEHERS, 1766*

Abkürzungsverzeichnis

ADI	Acceptable Daily Intake (lebenslange tägliche Aufnahme durch den Menschen ohne gesundheitliche Schäden davonzutragen)
AIDS	Aquired immunodeficiency syndrom
amu	atomare Masseneinheiten
ARfD	Akute Referenzdosis (Substanzmenge pro kg Körpergewicht, die täglich ohne erkennbares Risiko aufgenommen werden kann)
ASE	Accelerated Solvent Extraction (Beschleunigte Lösungsmittelextraktion)
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CIPAC	Collaborative International Pesticides Analytical Council
CPM	Cis-Permethrin
CYFL	Cyfluthrin
DALY	Disability adjusted life years
DEET	Diethyltoluamid
DEHP	Diethylhexylphthalat
DG SANCO	Directorate General for Health and Consumers of the European Commission
DMT	Deltamethrin
DTG	Deutsche Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit e.V
ED₅₀	Mittlere Effektdosis (50 % der Individuen zeigen die gewünschte Wirkung)
EFPX	Etofenprox
EI	Elektronenstoß-Ionisation
EPA	Environmental Protection Agency (Amerikanische Umweltbehörde)
FAO	Food and Agriculture Organisation of the United Nations
FSME	Frühsommer-Meningoenzephalitis
FVL	Fenvalerat
GC	Gaschromatographie
HIV	Human immunodeficiency virus
IBP	Isobutylparaben, Parahydroxybenzoesäureisobutylester

ICH	International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use
IR 3535	Insect Repellent 3535
IRS	Indoor Residual Spraying
ITN	Insecticide-treated mosquito nets
IVM	Integriertes Vektorenmanagement
JRC	Joint Research Centre der Europäischen Kommission
KD₆₀	Konzentration an Insektizid oder Repellent, die für eine Knockdown-Zeit von 60 Minuten verantwortlich ist.
Kill₁₀₀	Konzentration an Insektizid oder Repellent, die für eine Kill-Zeit von 100 Minuten verantwortlich ist.
LC₅₀	Mittlere tödliche Konzentration (50% der Versuchstiere werden getötet)
LD₅₀	Mittlere tödliche Dosis (50% der Versuchstiere werden getötet)
LLIN	Long-lasting insecticide-treated mosquito nets
LLIRN	Long-lasting insecticide and repellent-treated mosquito nets
LLRN	Long-lasting repellent-treated mosquito nets
LOD	Limit of detection (Nachweisgrenze)
LOQ	Limit of Quantitation (Bestimmungsgrenze)
m	Männchen, männlich
MS	Massenspektrometrie
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level (Dosis bei der in chronischen oder subchronischen Studien keine nachteiligen Wirkungen erkennbar sind)
NOEL	No Effect Level (Dosis bei der keine Wirkungen erkennbar sind)
PBO	Piperonylbutoxid
Ph.Eur.	Europäisches Arzneibuch
RBM	Roll Back Malaria Partnership
RKI	Robert Koch Institut
RSD	Relative Standard Deviation (Standardabweichung in % bezogen auf den erwarteten Wert)
SAAD	Statistische Auswertung von Analysendaten
SD	Standard Deviation (Standardabweichung auch s oder sigma abgekürzt)

SIM	Single Ion Monitoring
TPM	Trans-Permethrin
VBD	Vector borne diseases
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation)
WHOPES	World Health Organisation Pesticide Evaluation Scheme

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Allgemeiner Teil.....	5
2.1. Infektionskrankheiten	5
2.1.1. Malaria.....	6
2.1.2. Gelbfieber.....	11
2.1.3. Dengue-Fieber	12
2.1.4. Leishmaniose	14
2.1.5. Lyme-Borreliose.....	15
2.1.6. Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME).....	16
2.2. Vektoren	17
2.2.1. Aedes aegypti (Stegomyia aegypti).....	21
2.2.2. Ixodes ricinus (Schildzecke).....	23
2.3. Insektizide, Akarizide und Repellentien	26
2.3.1. Pyrethroide.....	26
2.3.2. Repellentien.....	31
2.3.2.1. DEET.....	33
2.3.2.2. IR 3535	35
2.3.2.3. Picaridin.....	36
2.3.2.4. p-Menthan-3,8-diol (PMD).....	36
2.4. Integriertes Vektorenmanagement (IVM)	37
2.5. Imprägnierte Moskitonetze	42
3. Materialien und Methoden.....	46
3.1. Extraktion und gaschromatographische Bestimmung	46
3.1.1. Geräte und Hilfsmittel	47
3.1.2. Referenzsubstanzen und Chemikalien.....	48
3.1.3. Durchführung	49
3.1.4. Auswertung	53
3.2. Bestimmung der insektiziden Aktivität.....	53
3.2.1. Materialien und Hilfsmittel.....	54
3.2.2. Durchführung	54
3.2.3. Auswertung	55
3.3. Bestimmung der Repellentaktivität	56
3.3.1. Materialien und Hilfsmittel.....	56
3.3.2. Durchführung	58
3.3.3. Auswertung	58
3.4. Durchführung der Waschversuche	59
3.4.1. Materialien und Hilfsmittel.....	59
3.4.2. Durchführung	59
3.4.3. Auswertung	60
4. Ergebnisse	62

4.1. Entwicklung und Validierung einer Methode zur gaschromatographischen Bestimmung der aktiven Anteile von Repellentien und Insektiziden in textilen Bedarfsgegenständen	62
4.1.1. Methodenentwicklung	62
4.1.2. Methodvalidierung	67
4.1.2.1. Selektivität und Spezifität	67
4.1.2.2. Linearität und Arbeitsbereich	70
4.1.2.3. Nachweis- und Bestimmungsgrenze.....	75
4.1.2.4. Richtigkeit	77
4.1.2.5. Präzision	79
4.1.2.6. Robustheit.....	82
4.1.2.7. Messunsicherheit.....	84
4.1.3. Nachweis der quantitativen Extraktion aller aktiven Inhaltsstoffe	87
4.2. Untersuchungen von imprägnierten Moskitonetzen	91
4.2.1. Bestimmung der Aktivität unterschiedlicher Wirkstoffe	92
4.2.2. Bestimmung der Aktivität von Wirkstoffkombinationen	99
4.2.3. Vergleich der Eigenschaften unterschiedlicher Netzmaterialien bei der Imprägnierung mit dem neuen Polymerisationsverfahren	107
4.2.4. Durchführung von Waschversuchen an LLIN, LLRN und LLIRN.....	120
5. Diskussion	133
5.1. Analytische Methode.....	133
5.2. Untersuchungen an imprägnierten Moskitonetzen.....	139
6. Anhang	149
6.1. Anhang 1: Übersicht über die Malariagebiete 2011 (DTG).....	149
6.2. Anhang 2: Chromatogramme und Massenspektren der Analyten.....	150
6.3. Anhang 3: Kalibriergeraden der Analyten über den Arbeitsbereich	153
6.4. Anhang 4: Gehalte der Analyten in den einzelnen Proben der Präzisionsversuche in mg pro Quadratmeter Moskitonetz	155
6.5. Anhang 5: Datenblätter der Berechnung von Wiederhol- und Laborpräzision mit dem Programm SAAD	156
6.6. Anhang 6: Knockdown- und Kill-Aktivitäten einzelner Insektizide und Repellentien.....	160
7. Literaturverzeichnis	162
8. Abbildungsverzeichnis	176
9. Tabellenverzeichnis	181
10. Zusammenfassung	183
11. Publikationen	185

1. Einleitung

Infektionskrankheiten sind seit Jahrhunderten eine Geißel der Menschheit. Auch die fortschreitende Entwicklung der Industrienationen im 20. Jahrhundert hat nichts an der Tatsache geändert, dass Infektionskrankheiten nach wie vor die häufigste Todesursache darstellen. Nach Schätzung der World Health Organisation (WHO) starben 2001 etwa 14,9 Millionen Menschen an einer Infektionskrankheit, was insgesamt etwa 26% aller Todesfälle entsprach (KAUFMANN, 2009). Von den durch Infektionskrankheiten verursachten Todesfällen werden etwa 17% von vektorübertragenen Krankheiten verursacht, d.h. dass etwa 2,5 Millionen Menschen an vektorübertragenen Krankheiten starben (WHO, 2004). Wie bei nahezu allen Infektionskrankheiten sind die Entwicklungsländer auf Grund von schlechten sozioökonomischen und hygienischen Verhältnissen am stärksten von den durch Infektionskrankheiten verursachten Problemen betroffen. Dies sind neben den Todesfällen auch enorme wirtschaftliche Schäden, die den ohnehin schon armen Ländern nachhaltige Probleme bereiten. Ein Maß für die verursachten Schäden ist der Verlust an Lebenszeit in Gesundheit. Die „disability adjusted life years“ (DALY) bezeichnen die Summe der Lebensjahre, in denen Menschen durch Krankheit nicht in der Lage sind, einer Arbeit oder dem Familienleben nachzugehen und implementiert ebenfalls die Jahre, die sie früher als der Durchschnitt aus dem Leben scheiden (LOPEZ *et al.*, 2006).

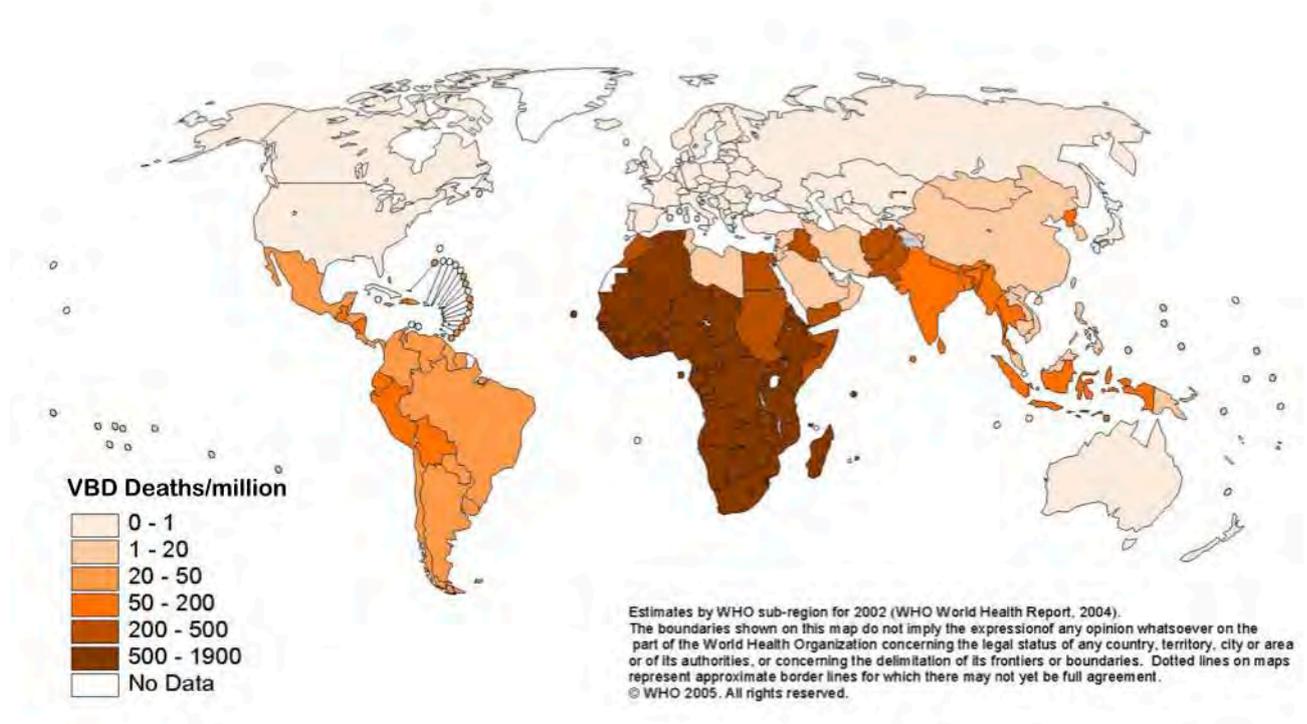


Abbildung 1: Anzahl der Todesfälle durch vektorübertragene Infektionskrankheiten (WHO, 2004)

Auch wenn die Folgen dieser Krankheiten die Entwicklungsländer am härtesten treffen, sind ebenso die weit entwickelten Industrieländer wieder verstärkt von Infektionskrankheiten betroffen. Der Fortschritt in Wissenschaft und Forschung zu Beginn des 20. Jahrhunderts und die

verbesserten Lebensbedingungen führten zu einer effektiven Reduktion vieler Krankheiten, wie z.B. der starke Rückgang bakterieller Infektionen durch die Entdeckung der Antibiotika und die Entwicklung effektiver Impfstoffe. Der starke Rückgang der Infektionskrankheiten hat jedoch abgenommen und in den letzten Jahrzehnten ist die Anzahl der Infektionskrankheiten in den Industrieländern wieder angestiegen (HELLENBRAND, 2003). Die Ursachen dafür liegen unter anderem an der Resistenzentwicklung gegen Antibiotika, jedoch ebenfalls an der weltweit fortschreitenden Globalisierung, die eine Ausbreitung der Krankheiten begünstigt, so dass auch im 21. Jahrhundert die Bekämpfung von Infektionskrankheiten eine der größten Herausforderungen der Menschheit bleiben wird.

Bei den durch Vektoren übertragenen Krankheiten ist nach wie vor die von der Anophelesmücke übertragene Malaria mit 39,9 Millionen DALY's die mit Abstand folgenreichste Erkrankung. Sie ist nach der HIV Infektion mit 70,1 Millionen DALY's die zweitschwerwiegendste Infektionskrankheit überhaupt und befindet sich hinsichtlich ihrer negativen Auswirkungen noch vor der Tuberkulose mit 35,8 Millionen DALY's (LOPEZ *et al.*, 2006).

Jedoch gewinnen auch andere vektorübertragene Krankheiten immer mehr an Bedeutung. Zu Ihnen gehören Dengue-Fieber (HUY *et al.*, 2010), Japanische Enzephalitis, Gelbfieber, Chagas-Krankheit und die Leishmaniose (DESJEUX, 2001). Die meisten dieser Krankheiten sind in den westeuropäischen Industrieländern von untergeordneter Bedeutung und haben überwiegend Relevanz als Reisekrankheiten oder bei Auslandseinsätzen militärischer oder auch humanitärer Organisationen (RKI, 2009).

Dennoch spielen auch in Mitteleuropa vektorübertragene Infektionskrankheiten eine nicht unerhebliche Rolle. Diese werden zu über 60 % durch Schildzecken (*Ixodes ricinus*) übertragen, wobei am häufigsten die Lyme-Borreliose mit einer Inzidenz von bis zu 10.000 Fällen in Deutschland und 100.000 Fällen in Europa übertragen wird (FAULDE, 2008). Weitere vektorübertragene Krankheiten in Mitteleuropa sind u.a. die Frühsommer-Meningoenzephalitis und die Ehrlichiose. In den letzten Jahren sind jedoch in einigen Ländern Südeuropas vermehrt auch Epidemien tropischer Infektionskrankheiten aufgetreten. Ursache für diese Epidemien sind, wie schon erwähnt, die zunehmende Globalisierung und den damit verbundenen vermehrten Reiseaktivitäten der Bevölkerung, was zu einem Einschleppen von Krankheiten führen kann, die originär nicht vorkommen. In Deutschland ist die häufigste Importerkrankung die Malaria mit 800 – 1000 Fällen pro Jahr. Weitere importierte Erkrankungen sind Lepra, Gelbfieber, Rückfallfieber, Typhus, Paratyphus und Diphtherie (RKI, 2009).

Neben der medikamentösen Therapie der Krankheiten oder Prophylaxe durch Impfungen sind Maßnahmen, welche die Exposition mit den Krankheitserregern verhindern, von entscheidender Bedeutung. So gilt es, die hygienischen Zustände insbesondere in den Entwicklungsländern zu verbessern, um den Erregern den Lebensraum zu nehmen. Im Rahmen eines effektiven „integrierten Vektorenmanagements“ bei vektorübertragenen Krankheiten ist die Vektorkontrolle von entscheidender Bedeutung (BEIER *et al.*, 2008). Studien haben gezeigt, dass durch den Einsatz von geeigneten Expositionsschutzmaßnahmen, wie geeigneter Kleidung, Repellents,

Raumsprays und Moskitonetzen die Prävalenz der Malaria deutlich gesenkt werden kann (TOWNSON *et al.*, 2005). Da viele Überträger von vektorassoziierten Krankheiten am Abend und in der Nacht aktiv sind, ist der Einsatz von Moskitonetzen beim Schlafen ein hocheffizienter Schutz gegen die Vektoren. Die Effektivität eines Moskitonetzes kann dadurch gesteigert werden, dass auf das Netz insektizid wirkende Agenzien aufgebracht werden (COURTENAY *et al.*, 2007), so dass das Netz nicht nur einen mechanischen Schutz vor den Mücken bietet, sondern sie bestenfalls auch am Durchstechen hindert, wenn man mit unbedeckten Körperpartien direkt am Netz liegt. Als Insektizide haben sich synthetische Pyrethroide bewährt, die auf verschiedene Arten auf das Netz aufgebracht werden. Die so imprägnierten Moskitonetze stellen dann eine effektive Barriere für die Überträger der Malaria und anderer Krankheiten wie Leishmaniose, Chagas-Krankheit und Dengue-Fieber dar. Problematisch bei der Imprägnierung der Netze ist bisher, dass mit den herkömmlichen Verfahren eine Wirksamkeit nicht über einen ausreichend langen Zeitraum gewährleistet ist und häufig notwendig werdende Nachimprägnierungen nicht durchgeführt werden. Neue Entwicklungen ermöglichen inzwischen eine längerfristige Imprägnierung, die im Idealfall über die gesamte Lebensdauer des Moskitonetzes wirksam ist. Diese „long-lasting insecticide treated bednets“ (LLIN) sind bisher der effektivste Schutz gegen die Vektoren. Trotz der verbesserten Wirksamkeit ist es bislang jedoch noch nicht gelungen, ein Netz herzustellen, das einen 100 %igen Durchstichschutz gewährleisten kann und darüber hinaus technisch so hergestellt ist, dass ein maximaler Durchstichschutz selbst nach mehrfachem Waschen des Netzes noch vorhanden ist.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, durch Optimierung der Wirksamkeit des Netzes eben diese Eigenschaften einem Moskitonetz zu verleihen. Um dieses Ziel zu erreichen wurden verschiedene Insektizide und Repellentien sowie ein Enhancer in eine Polymermatrix eingebunden, auf eine Faser aufgebracht und zur Herstellung von Moskitonetzen verwendet. Über den Vergleich der Wirksamkeit der Substanzen Einzeln und in Kombination soll die bestmögliche Kombination gefunden werden, mit dem Ziel, einen 100 %igen Durchstichschutz über die gesamte Lebensdauer des Moskitonetzes zu gewährleisten. Neben der Testung der biologischen Aktivität der Netze soll eine analytische Methode entwickelt werden, mit der die Bestimmung des Gehaltes der aktiven Substanzen in den Netzen ermöglicht wird. Über den Vergleich mit der biologischen Aktivität kann dann eine Aussage über den Gehalt an Insektiziden getroffen werden, der notwendig ist, um einen entsprechenden Durchstichschutz zu garantieren, so dass auch ohne Bestimmung der biologischen Aktivität eine Beurteilung der Wirksamkeit von imprägnierten Moskitonetzen möglich ist. Abweichend von der bisher gängigen Praxis werden nicht nur eindeutig insektizid wirkenden Substanzen eingesetzt, sondern über die Kombination mit repellent aktiven Substanzen soll herausgefunden werden, ob möglicherweise ein synergistischer Effekt der eingesetzten Wirkstoffe zu einer höheren Aktivität der Netze führt. Denkbar ist es darüber hinaus, die gewonnenen Erkenntnisse bei der Herstellung anderer Bedarfsgegenstände zu verwenden, z.B. um einen effektiven Schutz gegenüber Schildzecken zu gewährleisten. Im Sinne des Verbraucherschutzes sollte die Verwendung der imprägnierten Moskitonetze keine negative

Beeinflussung der menschlichen Gesundheit zur Folge haben, eine Eigenschaft die bei der prophylaktischen Einnahme von Antimalariamitteln häufig nicht erreicht werden kann. Die Unbedenklichkeit der Verwendung von mit Permethrin imprägnierten Uniformen wurde bereits nachgewiesen (ROßBACH *et al.*, 2005).

Im weiteren Verlauf der Arbeit werden zunächst die Substanzen und Krankheiten sowie deren Überträger kurz vorgestellt und es wird auf die Verfahren eingegangen, mit denen Moskitonetze bislang imprägniert werden. Im daran anschließenden Teil werden die Materialien und Methoden vorgestellt, mit denen die im Ergebnisteil dargestellten Daten erhoben worden sind. Da die Methodenentwicklung zur gaschromatographischen Bestimmung des biologisch wirksamen Gehaltes von Repellentien und Insektiziden in textilen Bedarfsgegenständen Bestandteil der Forschungsaufgabe war, wird die Validierung der Methode ebenfalls im Ergebnisteil dargestellt. Abschließend werden die Ergebnisse im Diskussionsteil besprochen und bewertet, sofern dies noch nicht im Ergebnisteil vorgenommen wurde.

2. Allgemeiner Teil

2.1. Infektionskrankheiten

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, stellen Infektionskrankheiten auf Grund ihrer hohen Inzidenz und ihres hohen Anteils an der weltweiten Mortalitätsrate eine enorme Herausforderung an die Menschheit dar. Abbildung 2 (WHO, 2004) gibt einen Überblick über die Verteilung der weltweiten Todesfälle und stellt die Anzahl der den einzelnen Infektionskrankheiten zugeordneten Todesfälle dar. Insbesondere neue und wieder vermehrt auftretende Infektionskrankheiten sind eine globale Bedrohung für die Bevölkerungen in allen Teilen der Welt.

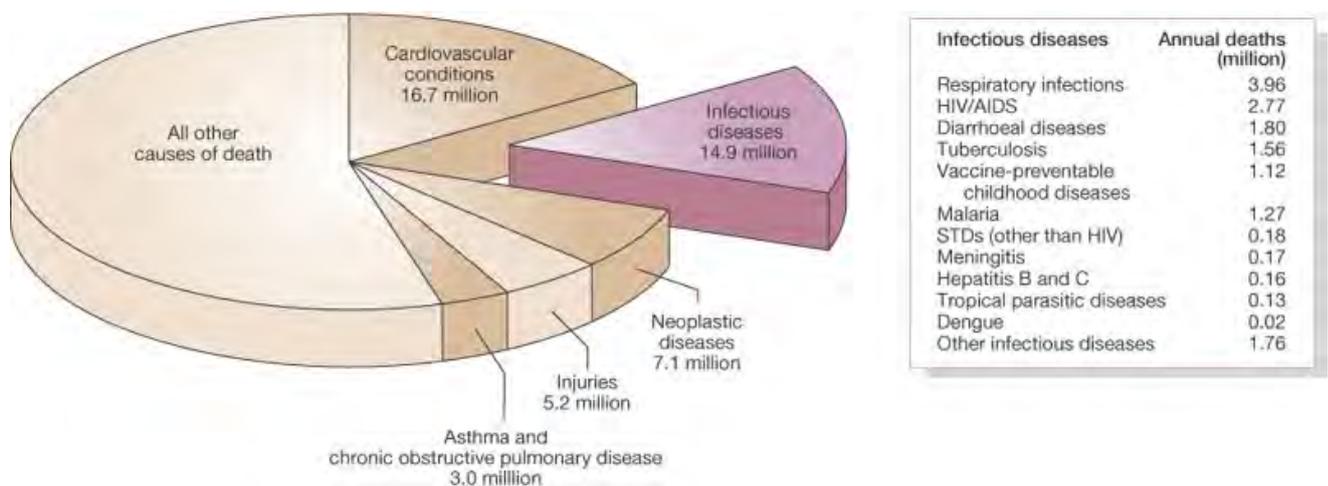


Abbildung 2: Anteil der durch Infektionskrankheiten hervorgerufenen Todesfälle an der gesamten Anzahl an Todesfällen (WHO, 2004).

Die Geschichte der Infektionskrankheiten ist dabei so alt wie die Menschheit selbst. Hinweise auf Infektionskrankheiten finden sich unter anderem bei den biblischen Plagen in Ägypten, dem beginnenden Untergang des „goldenen griechischen Zeitalters“ und dem Untergang des Aztekenreiches nach der Entdeckung der „Neuen Welt“ durch Christoph Kolumbus (MORENS *et al.*, 2004). Nachdem man den Infektionskrankheiten jahrhundertlang nahezu hilflos gegenüberstand, begannen große Fortschritte auf dem Gebiet der Mikrobiologie zu Beginn des 20. Jahrhunderts die Infektionskrankheiten zurückzudrängen. Durch weitere Entdeckungen wie dem Penicillin und verschiedenen Impfstoffen war man Mitte des 20. Jahrhunderts der Auffassung, dass der Kampf gegen die Infektionskrankheiten gewonnen sei (FAUCI, 2001). Skeptiker teilten diese Ansicht jedoch nicht und warnten zu Beginn der 80iger Jahre des 20. Jahrhunderts, dass die Anpassungsfähigkeit und der Evolutionsdruck von Mikroorganismen zu einem erneuten Aufblühen von Infektionskrankheiten führen würde (GELL, 1983). Die Bestätigung dieser Theorie war zu diesem Zeitpunkt schon in der Ausbreitung. Die durch das HI-Virus verursachte AIDS-Krankheit breitete sich rasend schnell über den Erdball aus und wurde zu einer der schlimmsten Pandemien der Geschichte. Bis heute ist es nicht gelungen HIV zu besiegen und AIDS steht in der Liste der Infektionskrankheiten, welche die meisten Todesfälle

verursachen immer noch an 2. Stelle (Abb.2). Neben AIDS sind aber auch weitere Infektionskrankheiten neu oder wieder verstärkt aufgetreten. Dabei ist das Auftreten dieser Krankheiten nicht auf die Entwicklungsländer beschränkt (Abb.3), diese leiden aber dennoch am stärksten unter den Folgen dieser Krankheiten.

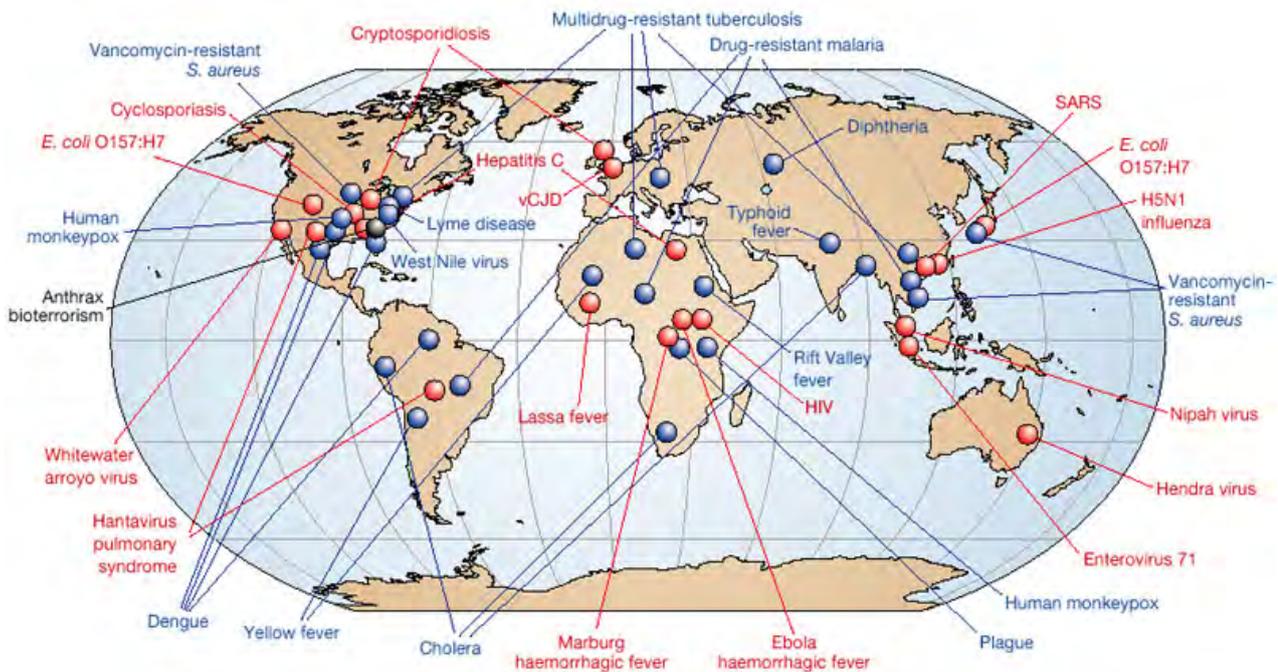


Abbildung 3: Dargestellt sind neu auftretende (rot) und wieder auftretende (blau) Infektionskrankheiten. Abbildung aus (MORENS *et al.*, 2004) in Nature.

Die Übertragung von Infektionskrankheiten erfolgt auf verschiedenen Wegen. Sie können z.B. direkt von Mensch zu Mensch, über die Luft oder durch Lebensmittel (insbesondere Trinkwasser) übertragen werden. Bei der Übertragung von Infektionskrankheiten durch Tiere wird von einer sogenannten vektorassoziierten Übertragung gesprochen, auf die im Kapitel 2.2. eingegangen wird. Die in dieser Arbeit vorgestellten Forschungen dienen der Unterbrechung des Übertragungsweges von Arthropoden auf den Menschen, weshalb die für diese Forschungsarbeit wichtigsten Arthropoden übertragenen Infektionskrankheiten im Folgenden kurz vorgestellt werden und deren Chemotherapie beschrieben wird.

2.1.1. Malaria

Die Malaria ist die am häufigsten auftretende durch Arthropoden übertragene Tropenkrankheit weltweit und eine der bedeutsamsten Infektionskrankheiten überhaupt (WHO, 2004). Der Name der Malaria, an der wahrscheinlich auch Alexander der Große starb, leitet sich vermutlich aus dem italienischen „mala aria“ (schlechte Luft) ab (HEMPELMANN *et al.*, 2009) und wurde durch die Römer geprägt, die glaubten, dass die verpestete Luft in den Sumpfgebieten die Krankheit hervorrufen würde (PAGANOTTI *et al.*, 2004). Eben diese Römer importierten die Malaria vermutlich

Tabelle 1: Darstellung der unterschiedlichen Symptomatik der Malaria in Abhängigkeit von dem auslösenden Erreger

Malaria	Erreger	Symptome
tertiana	<i>P. vivax</i> , <i>P. ovale</i>	regelmäßige Fieberschübe im Abstand von 48 Stunden
quartana	<i>P. malariae</i>	regelmäßige Fieberschübe im Abstand von 72 Stunden
tropica	<i>P. falciparum</i> , <i>P. knowlesi</i>	unregelmäßige Fieberschübe

Für das Überleben der Plasmodien sind also beide Wirte unerlässlich und der Mensch ist nicht, wie bei einigen anderen Erkrankungen, ein „Fehlwirt“. Der Kreislauf des Erregers (Abb.5) beginnt mit dem Stich einer Anophelesmücke, die mit dem Parasiten infiziert ist. Dabei wird der Erreger über das Speichelsekret der Anophelesmücke während des Stechaktes aktiv übertragen (FAULDE and HOFFMANN, 2001) und die Sporozoiten gelangen in die Blutbahn des Menschen. Von dort aus führt der Weg über die

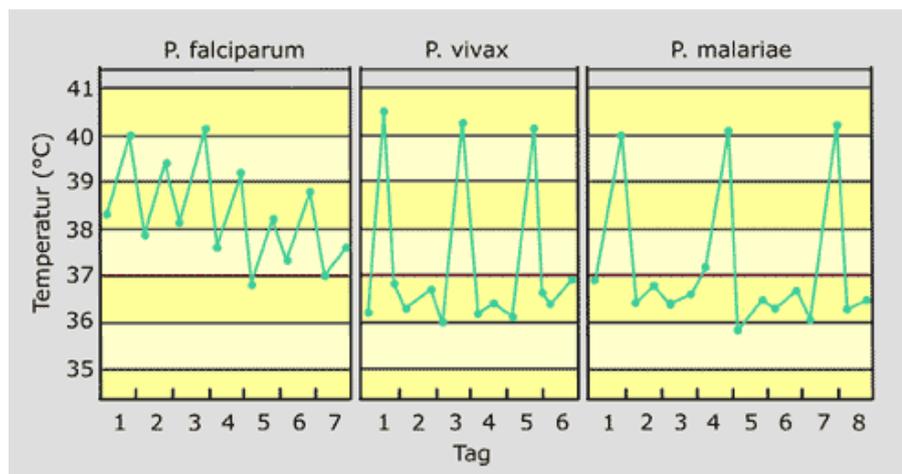


Abbildung 5: Temperaturverlauf bei Infektionen mit unterschiedlichen Malariaerregern (Quelle: www.infektionsbiologie.ch)

Blutbahn in die Leber, wo der Sporozoit im sogenannten präerythrozytären Stadium zum Gewebeschizonten heranreift. Das Heranreifen der Gewebeschizonten dauert bei *P. falciparum* etwa 5-7 und bei den anderen Arten 6-18 Tage. Dabei werden in den Schizonten Merozoiten gebildet, die bei der Ruptur der Leberparenchymzelle in die Blutbahn gelangen und sich an die Membran der Erythrozyten heften. Die Anzahl der gebildeten Merozoiten ist bei *P. falciparum* am größten, was die Schwere der Malaria tropica erklärt. Eine Besonderheit bei *P. vivax* und *P. ovale* ist die Bildung von Ruhestadien (Hypnozoiten), die sich erst nach Monaten oder Jahren zu Gewebeschizonten entwickeln und so zu den für die Malaria tertiana typischen Rezidiven führen. In den Erythrozyten entwickeln sich die Merozoiten über das Zwischenstadium der Trophozoiten zum reifen erythrozytären Schizonten (Blutschizont). Am Ende dieser erythrozytären Phase

werden beim Zerfall des Erythrozyten wieder Merozoiten freigesetzt und der Zyklus beginnt von neuem.

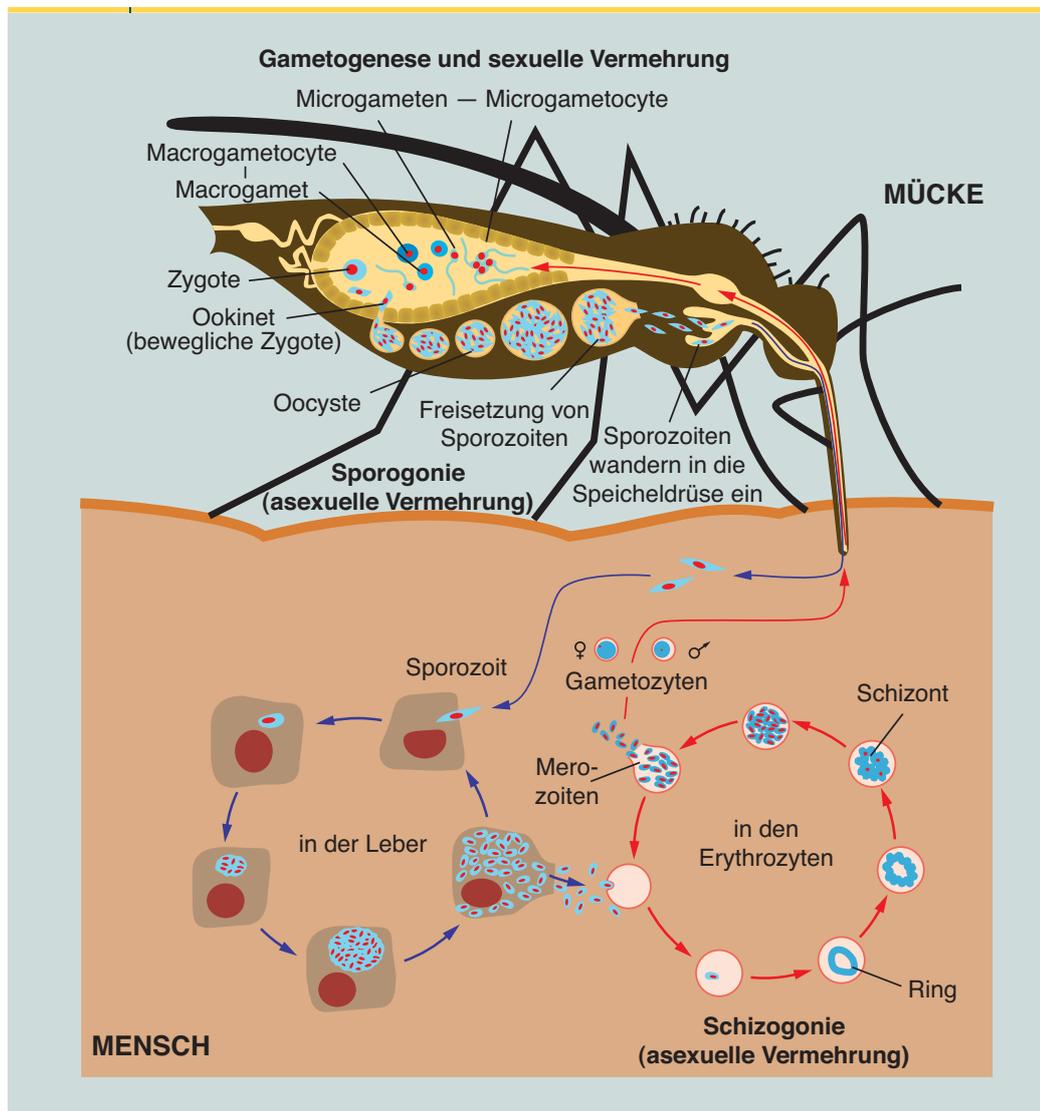


Abbildung 6: Lebenszyklus des Malariaerregers *P. falciparum* (HOLZGRABE, 2009)

Die Freisetzung der Merozoiten aus den Erythrozyten führt zu den charakteristischen Fieberanfällen. Während der erythrozytären Phase differenzieren sich einige Merozoiten zu geschlechtlichen Formen. Diese männlichen und weiblichen Gametozyten können sich allerdings nur in der Mücke zu den adulten Gameten entwickeln, so dass eine Infektion der Mücke durch den Menschen notwendig ist. In der Mücke entwickelt sich nach Kopulation der Gameten aus der Zygote ein Ookinete, der die Magenwand durchbricht, sich einkapselt und damit zur Oocyste wird. Diese bildet wiederum die Sporozoiten, die mit dem Speichel erneut auf den Menschen übertragen werden können.

Für die medikamentöse Therapie der Malaria stehen verschiedene Wirkstoffe, die gegen unterschiedliche Stadien der Plasmodien wirksam sind, zur Verfügung (Tabelle 2). Einen Wirkstoff, der gegen alle Entwicklungsstadien wirksam ist, gibt es bisher nicht. Grundsätzlich ist bei einer

rasch einsetzenden adäquaten Therapie eine Heilung der Malaria in nahezu allen Fällen möglich (MUTSCHLER, 2008). Das größte Problem bei der Therapie und Prophylaxe der Malaria stellen Resistenzentwicklungen dar. So sind beispielsweise viele Stämme von *Plasmodium falciparum* in Südostasien gegen Chloroquin resistent. Da die Arzneistoffe gegen Malaria nur auf bestimmte Formen des Erregers wirken, können die Wirkstoffe nach ihrer Hauptwirkung eingeteilt werden (Einteilung nach (MUTSCHLER, 2008)):

- **Gewebeschizontozide**, welche die Entwicklung der präerythrozytären Geweschizonten hemmen.
- **Hypnozoitozide**, welche die Ruheformen der Plasmodien in der Leber abtöten und somit eine Rezidiv-verhindernde Wirkung haben.
- **Blutschizontozide**, die durch das Unterdrücken der Vermehrung der Plasmodien in den Erythrozyten wirken und sowohl zur Therapie als auch zur Prophylaxe eingesetzt werden.
- **Gametozide**, die auf die geschlechtlichen Formen der Plasmodien wirken und den Infektionsweg vom Menschen auf den Vektor unterbinden.

Tabelle 2: Auflistung der verfügbaren Malariamittel mit Hauptangriffsziel und den am häufigsten auftretenden unerwünschten Wirkungen.

Wirkstoff	Handelsname	Hauptwirkung	Unerwünschte Wirkungen
Chinin	Chininum hydrochloricum Merck dura, Limptar N	Blutschizontozid	gastrointestinale Beschwerden, neurotoxische Reaktionen, Herzrhythmusstörungen, Blutdruckabfall, allergische Reaktionen
Chloroquin	Resochin, Weimerquin	Blutschizontozid	Magen- und Darmbeschwerden, Kopfschmerzen, zentralnervöse Störungen, Hautreaktionen
Mefloquin	Lariam	Blutschizontozid	zentralnervöse Störungen
Primaquin	A-PQ (NL ¹⁾)	Hypnozoitozid	Appetitlosigkeit, Brechreiz, Methämoglobinbildung
Lumefantrin	Riamet ²⁾	Blutschizontozid	Kopfschmerzen, gastrointestinale Beschwerden, QT-Zeit-Verlängerung (Lumefantrin)
Artemether		Blutschizontozid	
Proguanil	Paludrine	Gewebeschizontozid	gastrointestinale Beschwerden
Atvaquon	Wellvone	Blutschizontozid	gastrointestinale Beschwerden, Kopfschmerzen
Doxycyclin	Diverse Präparate	Blutschizontozid	irreversible Veränderungen der Zähne, Photosensibilisierungen, gastrointestinale Beschwerden, allergische Reaktionen

¹⁾ Zulassung in den Niederlanden

²⁾ im Handel nur als fixe Kombination verfügbar

Je nach Malariatyp und Resistenzlage ist die Art der Medikation zu wählen. Als „First-Line-Therapie“ werden Blutschizontozide gegeben, um die am stärksten belastenden Symptome zu bessern. Bei den Malariatypen ohne Rezidivgefahr ist mit diesen Maßnahmen auch eine Heilung der Krankheit zu erreichen. Bei Erkrankungen mit Plasmodien die Ruhestadien bilden, müssen im Anschluss an die Initialtherapie die Hypnozoiten durch die Gabe von Primaquin eliminiert werden, um das Auftreten von Rezidiven zu verhindern. Die medikamentöse Prophylaxe der Malaria wird durch die Gabe von Blutschizontoziden erreicht, welche die klinischen Symptome einer Infektion verhindern, jedoch im Fall einer Malaria tertiana nicht vor Rezidiven schützen. Darüberhinaus ist diese Prophylaxe nur über einen kurzen Zeitraum möglich und somit für die in Endemiegebieten lebende Bevölkerung nicht zielführend. Hier bietet der ganzheitliche Ansatz eines integrierten Vektorenmanagements, das unter 2.4. beschrieben wird, einen Lösungsweg.

Obwohl die Malaria mit den zur Verfügung stehenden Wirkstoffen therapiert werden kann, ist die Gesamtkonstellation für einen Erfolg gegen die Malaria ungünstig (STICH, 2009). Dies gilt insbesondere für die arme Bevölkerung in den tropischen Ländern, deren Zugang zu einer adäquaten medizinischen Versorgung in den meisten Fällen nicht gewährleistet ist. Eine Verbesserung der Lebensbedingungen ist bei Betrachtung der aktuellen politischen und wirtschaftlichen Lage in den am stärksten betroffenen Gebieten zur Zeit nicht absehbar. Vielmehr besteht die Gefahr, dass im Rahmen einer globalen Erwärmung die Lebensbedingungen für die Vektoren besser werden und dies zu einem noch höheren Infektionsdruck führt (FRIMMEL *et al.*, 2009)

2.1.2. Gelbfieber

Im Gegensatz zu der durch Protozoen hervorgerufenen Malaria, ist das Gelbfieber eine durch Viren ausgelöste Erkrankung. Das Gelbfieber-Virus gehört taxonomisch zum Genus Flavivirus aus der Familie der Flaviviridae. Eine Einteilung der WHO fasst durch Gliederfüßer übertragene Viren unter dem Begriff Arboviren (*arthropod-borne*) zusammen.

Gelbfieber ist als Krankheit schon seit Jahrhunderten bekannt und verhinderte sogar über lange Zeit den Bau des Panamakanals, bis man nach Aufklärung des Übertragungsweges und konsequenter Bekämpfung der Stechmücken den Bau des Kanals zu Ende bringen konnte (PREISER, 2010).

Das Auftreten von Gelbfieber beschränkt sich bislang auf die tropischen Gebiete Mittel- und Südamerikas sowie Afrikas. Die Anzahl der jährlichen Erkrankungen in den Endemiegebieten beläuft sich auf etwa 200.000 Fälle, von denen ca. 30.000 letal enden (RKI, 2001). Ursprüngliche Wirte des Gelbfieber-Virus sind Primaten und Stechmücken der Gattungen *Aedes* und *Haemagogus*, die sich wechselseitig infizieren. In diesem sylvatischen Zyklus (Busch- oder Dschungelgelbfieber) ist der Mensch als Wirt eigentlich nicht vorgesehen und infiziert sich nur, wenn er in den Kreislauf aus Primat und Vektor eindringt. Durch die Verschleppung von Viren in urbane Gegenden kann sich ein Infektionskreislauf (urbaner Zyklus) zwischen Menschen und

Stechmücken der Art *Aedes aegypti* bilden, die in kleinen Wasseransammlungen wie Pfützen oder in alten Autoreifen ideale Brutbedingungen finden (FRIMMEL *et al.*, 2009), was in empfänglichen Populationen zu schweren Epidemien führen kann. Eine weitere Variante stellt der intermediäre Zyklus dar, der als Mischform der beiden vorher genannten Zyklen angesehen werden kann und durch ein enges Zusammenleben der verschiedenen Wirte und der Vektoren entsteht. Eine Unterbrechung des Kreislaufs wird dadurch erschwert und die Verbreitung der Krankheit erleichtert.



Abbildung 7: *Aedes aegypti* (CDC, 2011)

Der Verlauf der Krankheit ist nach einer kurzen Inkubationszeit von 6-8 Tagen sehr unterschiedlich. Ein Teil der Infizierten zeigt asymptomatische oder milde Verläufe, jedoch kommt es häufig zu schweren Erkrankungen, die zunächst mit einer akuten Phase und damit verbundenem hohem Fieber, Schüttelfrost, Kopf- und Gliederschmerzen sowie Erbrechen beginnen. Bei etwa 85 % der Erkrankten heilt die Krankheit danach aus, doch bei etwa 15 % kommt es nach einem kurzen Rückgang der klinischen Symptome zu einem wiederholten Fieberanstieg und zum Beginn der sogenannten toxischen Phase (RKI, 2001). Neben dem erneuten Fieberanstieg bei fallendem Puls kommt es zu kaffeesatzartigem Bluterbrechen, blutigen Durchfällen, Blutungen aus verschiedenen Körperöffnungen und Blutungen in Organe sowie der Haut. Unter Beteiligung der Leber kommt es zum Ikterus (namensgebend für die Familie der Flaviviridae (FRIMMEL *et al.*, 2009)), gestörter Nierenfunktion und teilweise zu zentralnervösen Störungen. Die Letalität bei den Betroffenen, die in die toxischen Phase gelangen, liegt bei etwa 50 %; die Gesamtletalität beläuft sich auf etwa 10-20 % (CDC, 2011).

Gegen die Gelbfiebererkrankung gibt es keine spezifische Therapie; die Behandlung kann demnach nur symptomatisch erfolgen. Allerdings verschafft eine überstandene Gelbfiebererkrankung lebenslange Immunität und zur Prophylaxe steht ein sicherer und gut verträglicher Lebendimpfstoff zur Verfügung, der bei einmaliger Gabe nach 7-10 Tagen einen mindestens 10jährigen Impfschutz garantiert (RKI, 2001). Trotz dieser Impfmöglichkeit rückt die Gelbfiebererkrankung immer wieder in den Mittelpunkt, da eine mangelnde Durchimpfungsrate in den endemischen Gebieten immer wieder zu Epidemien führt.

2.1.3. Dengue-Fieber

Vorgestellt wird mit Dengue-Fieber eine weitere, überwiegend durch *Aedes aegypti* übertragene, Arthropoden übertragene Viruserkrankung. Beim Dengue-Fieber handelt es dabei um die weltweit bedeutendste Erkrankung dieser Art, deren Inzidenz insbesondere in den letzten Jahrzehnten

stark angestiegen ist. Zur Zeit erkranken jährlich etwa 50 Millionen Menschen, von denen circa 500.000 stationär aufgenommen werden müssen (PREISER, 2010) und mindestens 21.000 sterben (GIBBONS, 2010). Weltweit wird die Anzahl der durch Dengue-Fieber bedrohten Menschen auf 2,5 Milliarden geschätzt, von denen ungefähr 975 Millionen in urbanen Gebieten leben (GUZMAN *et al.*, 2010).

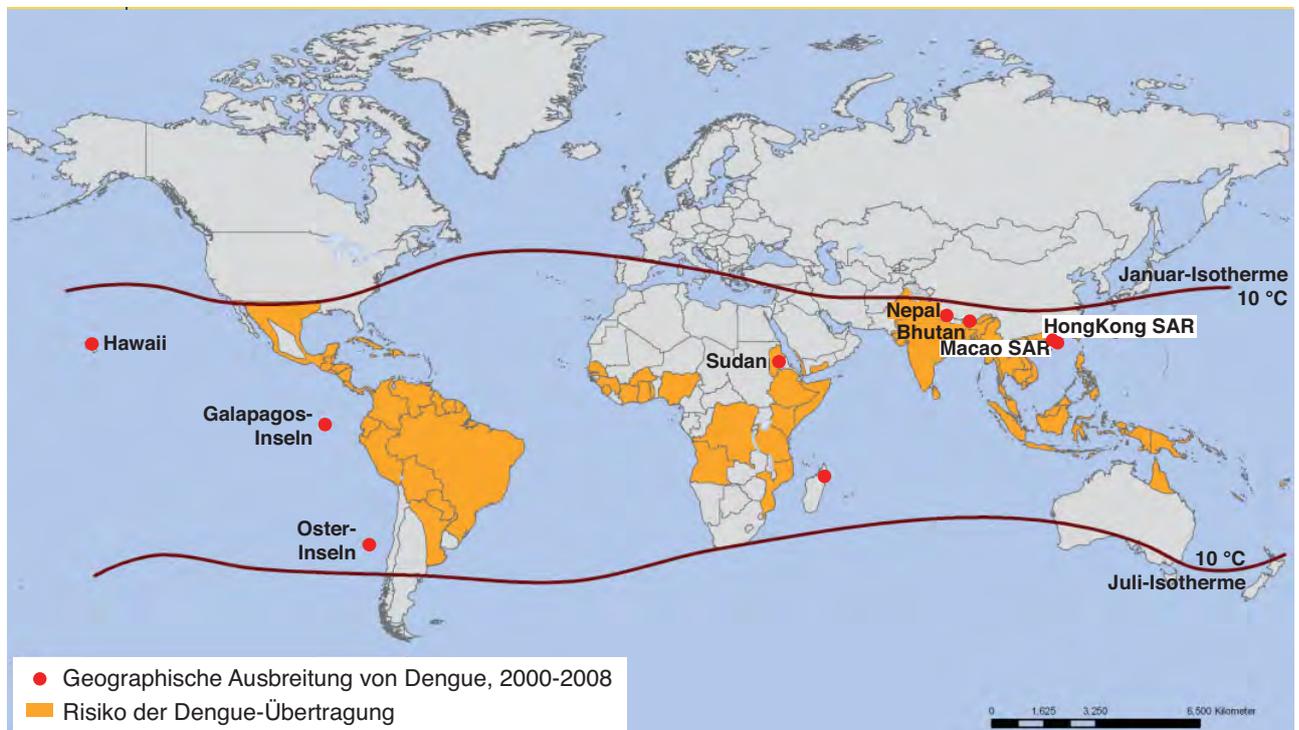


Abbildung 8 Länder und Gebiete die von Dengue-Fieber bedroht sind. Die Linien markieren das mögliche Ausbreitungsgebiet von *Aedes aegypti* (FRIMMEL *et al.*, 2009).

Die Zahl der von Dengue-Fieber bedrohten Menschen dürfte in den kommenden Jahren weiter steigen, insbesondere wenn man das Ausbreitungspotential des Hauptvektors *Aedes aegypti* betrachtet (Abb.8), dem eine zunehmende Urbanisierung entgegenkommen dürfte. Darüber hinaus könnte die globale Klimaerwärmung einen zusätzlichen Vorteil für diesen zur Zeit noch überwiegend tropischen Vektor darstellen.

Auslöser der eigentlichen Krankheit ist wie beim Gelbfieber auch ein Virus aus der Familie der Flaviviridae. Bislang sind von diesem Denguevirus vier Serotypen bekannt (DEN-1 bis DEN-4) (WILDER-SMITH *et al.*, 2010), die alle als humanpathogen gelten. Die Krankheit selbst kann unterschiedliche Verläufe nehmen. Man unterscheidet das sogenannte Dengue-Fieber (DF) und das Dengue-Hämorrhagische-Fieber (DHF), wobei das DHF durch die deutlich schwereren Verläufe gekennzeichnet ist. Beim DF beginnt nach einer Inkubationszeit von 4-5 Tagen der symptomatische Verlauf der Erkrankung, der durch Fieber, Allgemeinsymptome und typischen schweren Schmerzen (Muskeln, Gelenke) gekennzeichnet ist (GIBBONS, 2010) und innerhalb einiger Tage ausheilt. Das DHF weist einen ähnlichen Verlauf auf, kennzeichnet sich aber zusätzlich durch Blutungen, Thrombozytopenie und eine erhöhte Permeabilität der Blutgefäße, die in den meisten Fällen einen Krankenhausaufenthalt erforderlich machen. Besondere Gefahr geht

hierbei von der erhöhten Permeabilität der Blutgefäße aus, die zu einem hypovolämischen Schock und damit verbundenen schweren Komplikationen führen können. Unbehandelt führt das DHF in etwa 50 % der Fälle zum Tod. Diese Zahl kann aber durch eine gute symptomatische Therapie auf unter 1 % gesenkt werden.

Ähnlich wie beim Gelbfieber gibt es zur Behandlung des Dengue –Fiebers bislang keine kausale Therapie. Auch ein Impfstoff steht bislang noch nicht zur Verfügung. Allerdings befindet sich eine tetravalente Vakzine in der 3. Phase der klinischen Prüfung und könnte in den nächsten Jahren als Impfstoff gegen Gelbfieber und Dengue-Fieber zugelassen werden (WILDER-SMITH *et al.*, 2010).

2.1.4. Leishmaniose

Leishmaniosen werden durch begeißelte Protozoen der Gattung *Leishmania* hervorgerufen, von denen 30 Arten Säugetiere infizieren und davon 21 den Menschen (CDC, 2010). Überträger dieser Einzeller sind Sandmücken (engl. „sand flies“) der Gattungen *Lutzomyia* (Mittel- und Südamerika) und *Phlebotomus* (Mittelmeerraum, Naher Osten, Indien Afrika), die jährlich bis zu 2 Millionen Erkrankungen verursachen (HEMMER *et al.*, 2007). Bei den Leishmaniosen sind drei Formen bekannt, deren Auftreten größtenteils einzelnen Endemiegebieten zugeordnet werden kann. Die kutane Leishmaniose, die auch in den Einsatzgebieten deutscher Soldaten in Afghanistan endemisch ist (FAULDE *et al.*, 2006), betrifft ausschließlich die Haut und beginnt häufig erst nach mehreren Wochen mit einer Rötung an der Einstichstelle, die sich zu einem meist schmerzlosen, flachen Ulkus entwickelt. Diese



Abbildung 9: typisches Bild einer kutanen Leishmaniose (CDC, 2011)

Ulzeration kann solitär bleiben, es kommen auch multiple Ulzera mit einer diffusen Ausbreitung vor. Die Ausheilung der kutanen Leishmaniose erfolgt nach mehreren Monaten unter Narbenbildung, wobei eine sachgerechte Therapie das Ausmaß der Narbenbildung reduzieren kann. Die mukokutane Form der Leishmaniose beginnt auch mit einem Ulkus, setzt sich aber dann meistens mit einem Befall der Schleimhäute des Nasenrachenraumes fort, wobei auch Mundhöhle, Rachen und Kehlkopf befallen sein können. Die Dritte und schwerwiegendste Form ist die viszerale Leishmaniose (Kala-Azar). Sie geht meistens mit Bauchschmerzen, Appetitlosigkeit, Durchfällen, Schwächegefühl und Fieberepisoden einher und kann bei schweren Verläufen insbesondere in Kombination mit opportunistischen Infektionen tödlich sein. Die Therapie gestaltet sich schwierig, da je nach Komplexität und Spezies unterschiedliche Therapieansätze verfolgt werden sollten (BOECKEN *et al.*, 2009). Zum Einsatz in der medikamentösen Therapie kommen unter anderem fünfwertige Antimonverbindungen,

Azolantimykotika (z.B. Ketoconazol), Miltefosin und Amphotericin B sowohl lokal als auch systemisch (BOECKEN *et al.*, 2009). Die Standardtherapie gemäß den Leitlinien der WHO (WHO, 1990) sind die Antimonverbindungen, die aber auf Grund ihrer Toxizität insbesondere bei systemischer Anwendung schwerwiegende Nebenwirkungen hervorrufen können (BOECKEN *et al.*, 2009; SCHURIGT and MOLL, 2009).

Zu Beginn des Einsatzes der Bundeswehr kam es im Norden Afghanistans zu einer Vielzahl an Infektionen mit Leishmaniose (FAULDE *et al.*, 2008). Um diese zu verhindern, wurden beim Bau des deutschen Feldlagers in Mazar-e-Sharif umfangreiche Präventionsmaßnahmen ergriffen, die den Schutz der deutschen Soldaten gewährleisten sollten (FAULDE *et al.*, 2009). Durch ein ganzheitliches Konzept beginnend mit der weitestgehenden Vertreibung des großen Gerbils, als Wirtstier der Sandmücke, über den Bau von mechanischen Hindernissen (Mauern die von den Mücken nicht überflogen werden können) bis hin zur persönlichen Ausrüstung des Soldaten (imprägnierte Uniformen, Hautrepellentien) wurde das Infektionsrisiko für die deutschen Soldaten im Feldlager auf ein Minimum reduziert (FAULDE *et al.*, 2009).

2.1.5. Lyme-Borreliose

Benannt nach dem Ort Lyme in Connecticut, wo die Krankheit zum ersten Mal beschrieben wurde und dem verursachenden Bakterium aus dem Genus *Borrelia*, ist die Lyme-Borreliose die häufigste durch Zecken übertragene Erkrankung in Europa. Geschätzt werden pro Jahr etwa 60.000 Fälle, die überwiegend im zentralen und östlichen Europa auftreten (O'CONNELL *et al.*, 1998). Genaue Fallzahlen für Deutschland sind nicht bekannt, da es keine generelle Meldepflicht nach Infektionsschutzgesetz gibt, sondern nur eine Meldepflicht in 9 Bundesländern (Baden-Württemberg, Berlin, Brandenburg, Mecklenburg-Vorpommern, Rheinland-Pfalz, Saarland, Sachsen-Anhalt, Sachsen, Thüringen) auf der Basis von Landesverordnungen (RKI, 1999, akt. 2010). Die aus dieser Meldepflicht gewonnenen Daten zeigen eine mittlere Inzidenz von 37,7 Fällen pro 100.000 Einwohnern in den 6 Bundesländern im Jahr 2006, die Vergleich zum Jahr 2002 um 110 % (17,8 Fälle pro 100.000 Einwohner) gestiegen ist (FULOP and POGGENSEE, 2008), was zu der Annahme führen muss, dass die Bedeutung der Lyme-Borreliose in Deutschland weiter zunehmen wird. Übertragen wird die Lyme-Borreliose hauptsächlich durch *Ixodes ricinus* (FAULDE and HOFFMANN, 2001), von denen 5-35 % mit Borrelien infiziert sind. Die Wahrscheinlichkeit einer Infektion nach einem Zeckenstich liegt bei 1,5-6 % und die Wahrscheinlichkeit einer manifesten Erkrankung bei 0,3-1,4 % (RKI, 1999, akt. 2010). Auch wenn bislang nur in 9 Bundesländern eine Meldepflicht existiert, ist von einer Infektionsgefährdung in allen Teilen Deutschlands auszugehen.

Mit einem Auftreten von Symptomen ist üblicherweise innerhalb von Tagen bis Wochen nach einer Infektion mit Borrelien zu rechnen. Die Erkrankung zeichnet sich durch 3 Stadien aus, die einzeln aber auch in Kombination vorkommen können, wobei die klinischen Symptome ausgesprochen vielfältig sind, da es sich bei der Lyme-Borreliose um eine Multisystemerkrankung

handelt. In den meisten Fällen charakteristisch für die Borrelieninfektion ist das Auftreten einer scharf abgegrenzten, sich zentrifugal ausbreitenden Rötung an der Stelle des Zeckenstiches (Erythema migrans), die von unspezifischen Allgemeinsymptomen begleitet werden kann. Bei weiter fortschreitender Erkrankung, kommt es dann zu Organbeteiligungen, die das zentrale Nervensystem oder auch das Herz betreffen können. Nach Monaten bis Jahren ist zudem das Auftreten von chronischen Arthritiden möglich.

Die Therapie der Borreliose sollte so früh wie möglich beginnen, allerdings wird eine prophylaktische Gabe von Antibiotika nicht empfohlen (RKI, 1999, akt. 2010). Antibiotika sind aber bei der Therapie das Mittel der Wahl. Als geeignet hat sich hierbei die Gabe von Tetracyclinen erwiesen, mit denen eine Heilung innerhalb von 4 Wochen möglich ist. Üblich in der Therapie ist die Verwendung von Doxycyclin, das auf Grund seiner Nebenwirkungen bei Kindern und Schwangeren kontraindiziert ist und durch Amoxicillin oder Cefuroxim substituiert wird. Bei fortgeschrittenen Krankheitsbildern werden vorwiegend Cephalosporine der 3.Generation (z.B. Ceftriaxon) eingesetzt. Borreliose ist nicht vom Menschen auf den Menschen übertragbar, so dass eigene Schutzmaßnahmen im Umgang mit infizierten Personen nicht notwendig sind. Da eine Impfprophylaxe zur Zeit nicht zur Verfügung steht und auf Grund der Heterogenität der Borrelienstämme schwer zu entwickeln ist, kommt den Präventiv- und Bekämpfungsmaßnahmen eine große Bedeutung zu (RKI, 1999, akt. 2010). So sollte zum Beispiel nach einem Aufenthalt in Gebieten mit Zecken der gesamte Körper sorgfältig nach Zecken abgesucht und diese bei Anwesenheit umgehend entfernt werden, da die Infektionsgefahr mit der Dauer des Saugaktes deutlich steigt (BERNHARD-NOCHT-INSTITUT, 2009).

2.1.6. Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME)

Ebenso wie die Borreliose wird die FSME von Zecken der Art *Ixodes ricinus* übertragen. Verursacher der Krankheit ist in diesem Fall ein Virus, das wie auch das Gelbfieber- und Denguevirus der Familie der Flaviviridae angehört. FSME tragende Zecken (in Deutschland ca. 0,1-5 % der Zecken (RKI, 1999, akt. 2011)) kommen in vielen europäischen Ländern vor und auch Deutschland gehört zu den Gebieten, in denen das Virus endemisch ist. Die Endemiegebiete sind allerdings nicht wie bei der Borreliose über ganz Deutschland verbreitet, sondern sind zur Zeit noch überwiegend auf die südlichen Bundesländer (Bayern, Baden-Württemberg, Hessen, Rheinland-Pfalz, Thüringen) beschränkt. Gemeldet wurden im Jahr 2010 insgesamt 260 FSME-Erkrankungen, welche die Referenzdefinitionen des RKI erfüllten (RKI, 2011), womit die FSME eher zu den selten auftretenden Viruserkrankungen in Deutschland (maximale Fallzahl circa 500 in 2006, sonst 200-400 pro Jahr) gehört (RKI, 2011).

Die klinischen Symptome einer FSME sind zunächst grippeähnlich, d.h. Fieber, Kopfschmerzen, Schwindel und Erbrechen. Bei etwa 90 % der Erkrankten ist danach die Erkrankung ausgeheilt und nur bei etwa 10 % tritt nach einer fieberfreien Zeit die Meningoenzephalitis auf, die von der Gefahr dauerhafter neurologischer Ausfälle begleitet ist und bei etwa 1 % der Erkrankten zum

Tode führt. Die Therapie der Erkrankung erfolgt wie bei vielen viralen Infektionskrankheiten ausschließlich symptomatisch, da keine antivirale Therapie zur Verfügung steht. Allerdings ist eine aktive Immunisierung gegen das Virus in Form einer Impfung verfügbar, die von der Ständigen Impfkommission für Personen, die sich in Endemiegebieten aufhalten und gegenüber Zecken exponiert sind, empfohlen wird (RKI, 2011). Diese Empfehlung gilt ebenfalls für deutsche Soldaten auf dem Balkan, da die FSME auch dort endemisch ist. Obwohl die FSME auf Grund ihrer geringen Fallzahl und des räumlich begrenzten Vorkommens nicht von herausragender Bedeutung zu sein scheint, sollte das Risiko nicht unterbewertet werden. Verschiedene Faktoren, wie die Durchseuchungsrate der Zecken oder eine Erhöhung der Zeckenpopulationen können leicht zu einer deutlichen Ausbreitung der Erkrankung führen.

2.2. Vektoren

Wie bereits erwähnt wird eine Vielzahl von Infektionskrankheiten durch sogenannte Vektoren übertragen. Dieser Abschnitt beschäftigt sich mit der Definition dieses Begriffes und stellt die Vektoren vor, die im Rahmen dieser Arbeit besondere Bedeutung aufweisen.

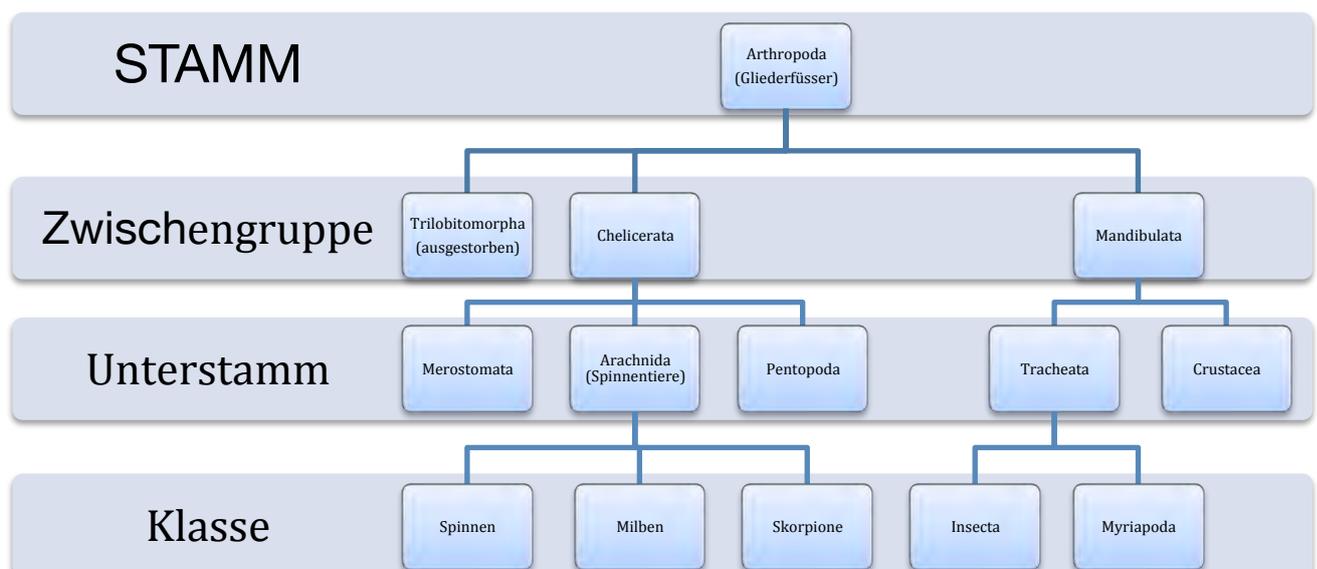


Abbildung 10: Taxonomie der Gliederfüßer nach (REMANE *et al.*, 1976; STORCH *et al.*, 2002)

Historisch gesehen bezeichnet der Begriff Vektor eigentlich den tierischen Überträger einer Krankheit auf den Menschen. Da der Großteil der übertragenen Krankheiten durch Arthropoden übertragen wird, wird die Verwendung des Begriffs Vektor übertragene Krankheit häufig mit Arthropoden übertragene Krankheit gleichgesetzt. Bei den im Rahmen dieser Arbeit nennenswerten Vektoren handelt es sich ausschließlich um Arthropoden, die ihre Krankheitserreger aktiv auf den Menschen übertragen. Aus diesem Grund wird den Verschleppern von Krankheitserregern wie Nagetieren (passive Vektoren) und Zwischenwirten von Parasiten keine weitere Beachtung geschenkt.

Arthropoden (Gliederfüßer) sind der wahrscheinlich erfolgreichste Stamm des Tierreiches mit einer Vielzahl an Vertretern, wie z.B. den Spinnen und Insekten. Etwa drei Viertel der lebenden Tiere gehören zum Stamm der Gliederfüßer, deren ursprüngliche Charakteristika segmentierte Körper mit einem Paar Gliedmaßen (Beine, Mundwerkzeuge, Antennen) pro Körpersegment und ein sklerotisierte Körper waren (UCMP.BERKELEY, 2011).

Dieser Grundaufbau ist bis heute nur teilweise erhalten geblieben, da bei diversen Spezies Glieder miteinander verschmolzen sind und den Eindruck eines anderen Aufbaus vermitteln. Einen Überblick über die Taxonomie der Arthropoden ist Abb. 10 zu entnehmen. Auch wenn nur ein Bruchteil des Stammes der Arthropoden als Vektor für Infektionskrankheiten dient, so sind doch fast alle relevanten vektorassoziierten Erkrankungen dem Stamm der Arthropoden zuzuordnen (FAULDE and HOFFMANN, 2001). Die Bedeutung dieser Erkrankungen für die Menschheit ist enorm, was bei Betrachtung der in Kapitel 2.1. vorgestellten Infektionskrankheiten deutlich wird. Alle Vektoren der dargestellten Krankheiten gehören zu den hämophagen tierischen Ektoparasiten und sind als primär parasitär anzusehen. Nach (FAULDE and HOFFMANN, 2001) unterscheiden sich die primär parasitierenden Arthropoden noch danach, welche parasitäre Form zugrunde liegt (Abb. 11).

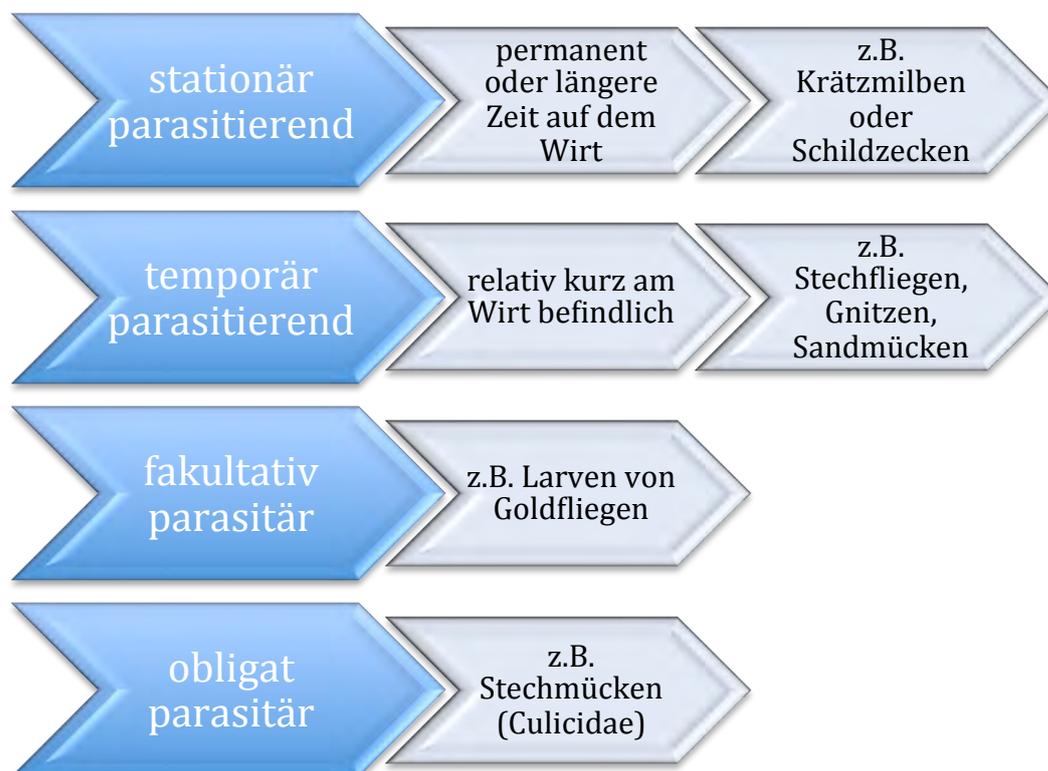


Abbildung 11: Unterscheidungsmöglichkeiten parasitärer Arthropoden

Neben den primär parasitären Vektoren treten auch sekundär parasitierende Vektoren auf, die z.B. kleine Wunden von Insekten Milben oder Zecken befallen und auf diesem Wege häufig passiv Krankheitserreger übertragen können. Um die Infektionskette unterbrechen zu können, sind nach (FAULDE and HOFFMANN, 2001) weitere ektoparasitäre bionomische Eigenschaften der Vektoren

von großer Bedeutung (Abb. 12). Unterschiede gibt es auch bei der Übertragung der Krankheitserreger vom Vektor auf den Menschen. So erfolgt die Erregerübertragung bei Malaria, Gelbfieber, Borreliose und FSME durch die Inokulation des Erregers über das Speichelsekret des Vektors während des eigentlichen Stech- bzw. Bissaktes, wohingegen andere Vektoren, wie Flöhe und Bremsen, im Gastrointestinaltrakt befindliche Erreger in erster Linie über physiologisch notwendige Hilfs- und Verdauungsstoffe auf den Menschen übertragen. Ein entscheidender Erfolgsfaktor der Arthropoden ist ihre hervorragende Anpassungsfähigkeit an verschiedene Lebensbedingungen, weshalb sie sowohl zu Land, als auch zu Wasser und in der Luft in großer Vielfalt anzutreffen sind. Diese Anpassungsfähigkeit führt häufig auch zu einer ausgeprägten Spezialisierung, so dass z.B. viele Krankheiten nur von einer oder nur wenigen Spezies übertragen werden können.

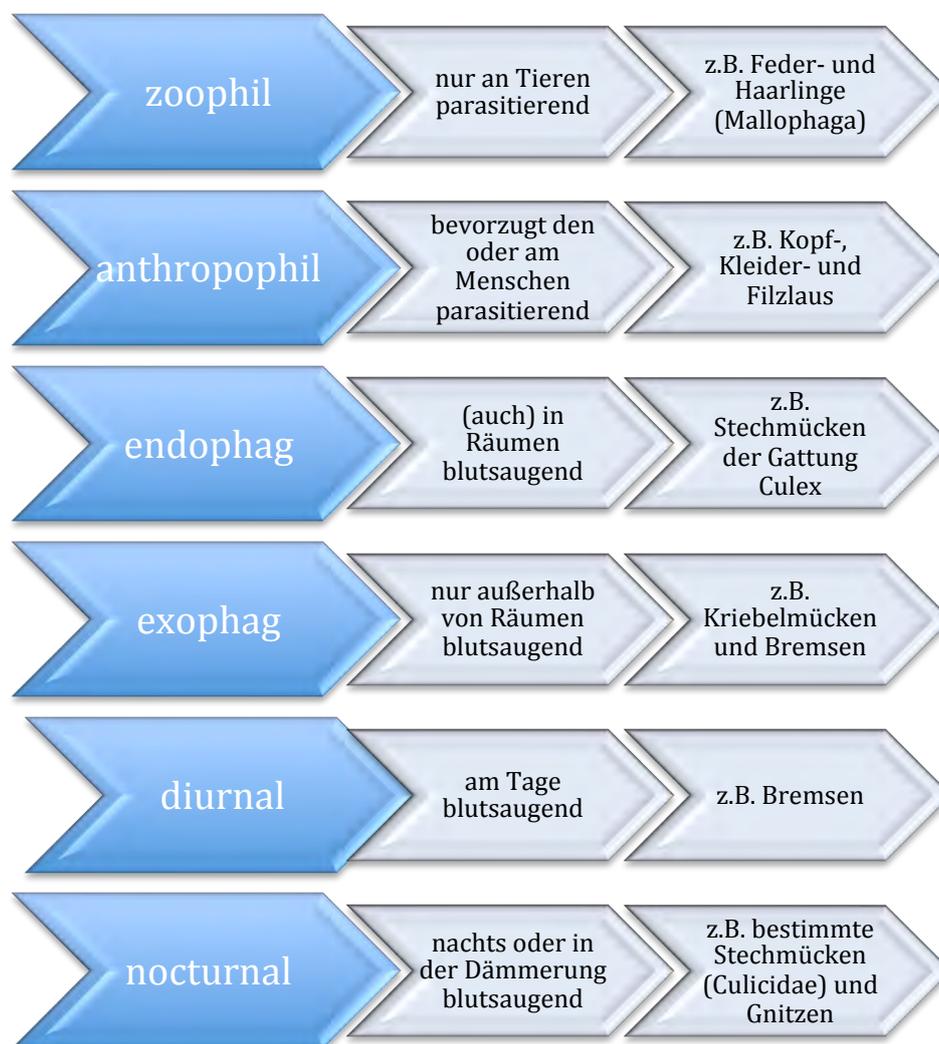


Abbildung 12: Wichtige Eigenschaften hämophager Vektoren nach (FAULDE and HOFFMANN, 2001)

Auf Grund ihrer meist geringen Körpergröße und einer nicht auf große Strecken ausgelegten Mobilität, treten zudem die meisten Spezies nur in mehr oder weniger großen begrenzten Gebieten auf, wodurch es bei vielen Krankheiten bei endemischen Erscheinungen bleiben sollte. Hier spielt aber die Entwicklung der Menschheit eine zunehmend fatale Rolle. Im Rahmen einer

expandierenden Globalisierung werden Waren und Personen in alle Winkel der Welt transportiert. Waren früher Transporte über tausende von Kilometern mit großen Anstrengungen verbunden, so geschieht dies heute in wenigen Stunden. Mit Menschen und Waren werden aber häufig auch Krankheitserreger oder Vektoren transportiert und somit die Gefahr der Ausbreitung von Krankheiten erhöht (RKI, 2009).

Die Untersuchungen an imprägnierten Moskitonetzen erforderten zwingend das Studium des Verhaltens und der toxikologischen Eigenschaften der Moskitonetze gegenüber Arthropodenspezies. Durchgeführt wurden diese Versuche überwiegend an der Stechmücke *Aedes aegypti* und teilweise auch an der Schildzecke *Ixodes ricinus*, die im Folgenden kurz vorgestellt werden.

2.2.1. *Aedes aegypti* (*Stegomyia aegypti*)

Die Stechmücke *Aedes aegypti*, die seit 2004, mit Einführung der Gattung *Stegomyia*, *Stegomyia aegypti* heißt (REINERT *et al.*, 2004), gehört zur Familie der Culicidae (Stechmücken) und dort in der Unterfamilie Culicinae zum Tribus Aedes (Abb. 13). Der Übersichtlichkeit halber wird im Folgenden der Name *Aedes aegypti* weiter verwendet.

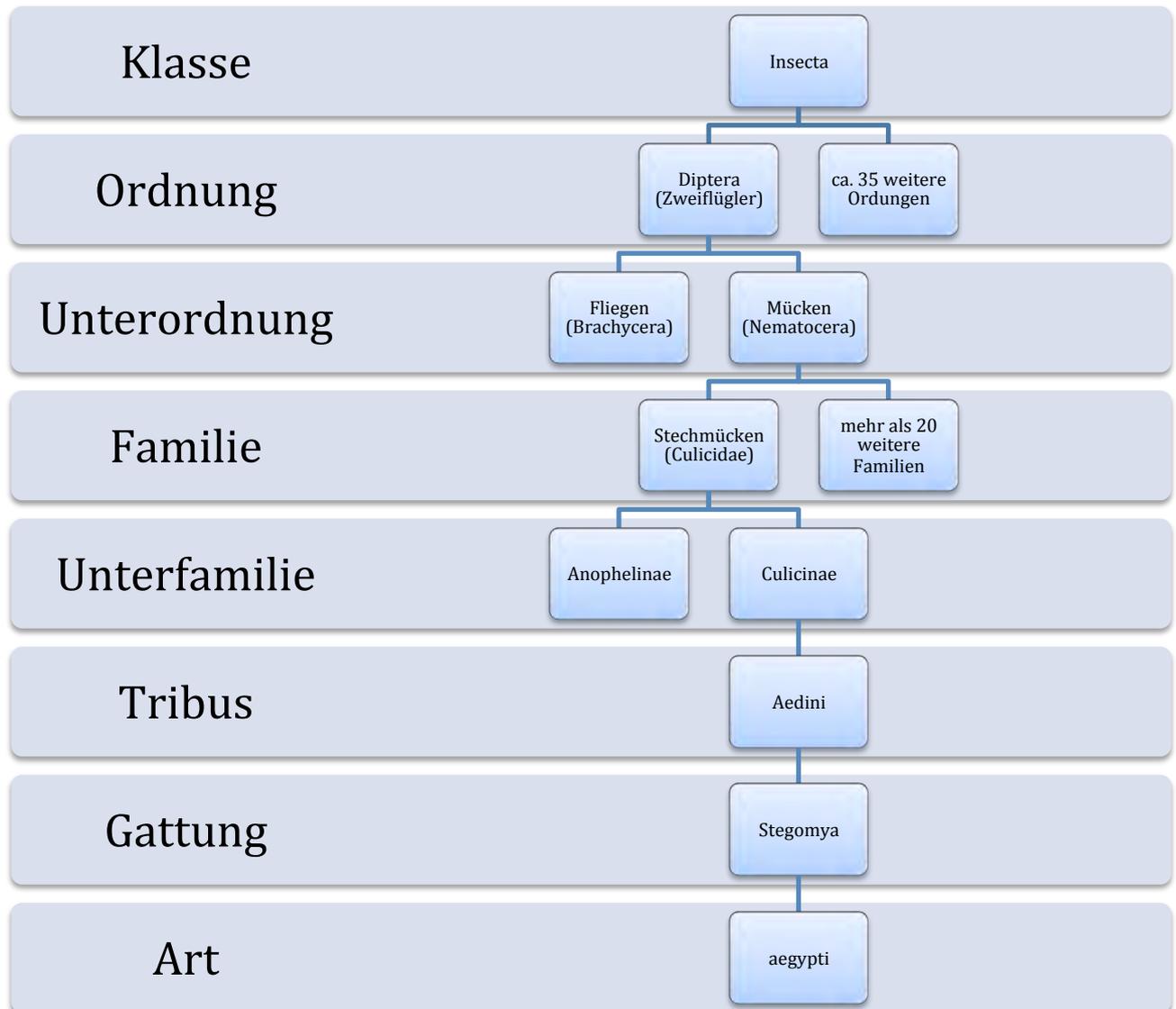


Abbildung 13: Stammbaum von *Stegomyia aegypti* (REINERT *et al.*, 2004; REMANE *et al.*, 1976; STORCH *et al.*, 2002). Der Übersichtlichkeit halber vereinfacht dargestellt

Die adulte Mücke ist klein bis mittelgroß (etwa 4-7 mm) und dunkelbraun bis schwarz gefärbt. Auffällig sind die weißen Streifen auf dem Thorax und den Beinen; der Stechrüssel ist schwarz (Abb. 14). Die Unterscheidung von männlichen und weiblichen Mücken ist über ihre Größe und Behaarung möglich. Weibliche Individuen sind in der Regel größer und die Fühler sind weniger buschig. Wie bei den meisten Mücken, ist nur das Weibchen blutsaugend, da es essentielle Aminosäuren aus dem Säugetierblut für die Produktion der Eier benötigt. Das Männchen ernährt

sich überwiegend von zuckerhaltigen pflanzlichen Säften, um seinen Energiebedarf zu decken. Auch das Weibchen könnte sich von diesen pflanzlichen Säften ernähren, allerdings ist die Blutmahlzeit eine deutlich bessere Nahrungsquelle, so dass z.B.



Abbildung 14: Weiße Markierung auf dem Thorax von *Aedes aegypti* (CDC, 2011)

die Anzahl der gelegten Eier mit der Größe der Blutmahlzeit korreliert (NELSON, 1986). *Aedes aegypti* hat sich im Laufe der Zeit erstaunlich gut an den Menschen, der das bevorzugte Opfer ist, und seinen Lebensraum angepasst. Je nach bevorzugtem Lebensraum kann man eine domestische (urbane Gegenden), sylvane (Wälder) und peridomestische (Farmen, Kokosnussplantagen) Form unterscheiden, die global in allen tropischen und subtropischen Gebieten vorkommen (UoF, 2011). Ein großer Vorteil von *Aedes aegypti* ist die Tatsache, dass sie nur kleinste Wasseransammlungen für die Eiablage benötigt und so gerade in urbanen Gegenden (Autoreifen, Flaschen, Wassertonnen) hervorragend zurecht kommt. Ein weiterer Faktor ist die weite Verteilung der Eier durch das weibliche Tier und die Tatsache, dass die Eier monatelang in Trockenheit überleben können. Diese geringe Empfindlichkeit, die kurze Entwicklungsphase von etwa 10 Tagen bei guten Bedingungen und die Bereitschaft zu jeder Tageszeit sehr aggressiv den Menschen zu stechen, machten die Mücke zum idealen Versuchstier für die durchgeführten Untersuchungen. Die Entwicklung der Mücke erfolgt in vier Stadien (Abb. 15). Nach der Ablage entwickelt sich das Ei innerhalb von etwa 2 Tagen zur Larve. Diese Entwicklung ist temperaturabhängig und kann bei kälteren Temperaturbedingungen bis zu einer Woche dauern. Das Larvenstadium, das wiederum je nach Temperatur zwischen 4 Tagen aber auch bei schlechten Bedingungen bis zu mehreren Monaten dauern kann, ist in drei sehr kurze und eine längere Phase unterteilt. Während dieser Zeit atmet die Larve Sauerstoff über ein Atemrohr und ernährt sich von Algen oder Mikroorganismen (UoF, 2011). Männliche Larven entwickeln sich in diesem Stadium schneller als die Weiblichen und die Larven erreichen in diesem Stadium eine Größe von bis zu 8 mm. Im Anschluss an das Larvenstadium folgt das Puppenstadium, in welchem keine Nahrung mehr aufgenommen wird und das etwa zwei Tage dauert. Danach brechen die inzwischen adulten Mücken das Puppengehäuse auf, indem sie Luft einatmen und das anschwellende Abdomen die Umhüllung sprengt.

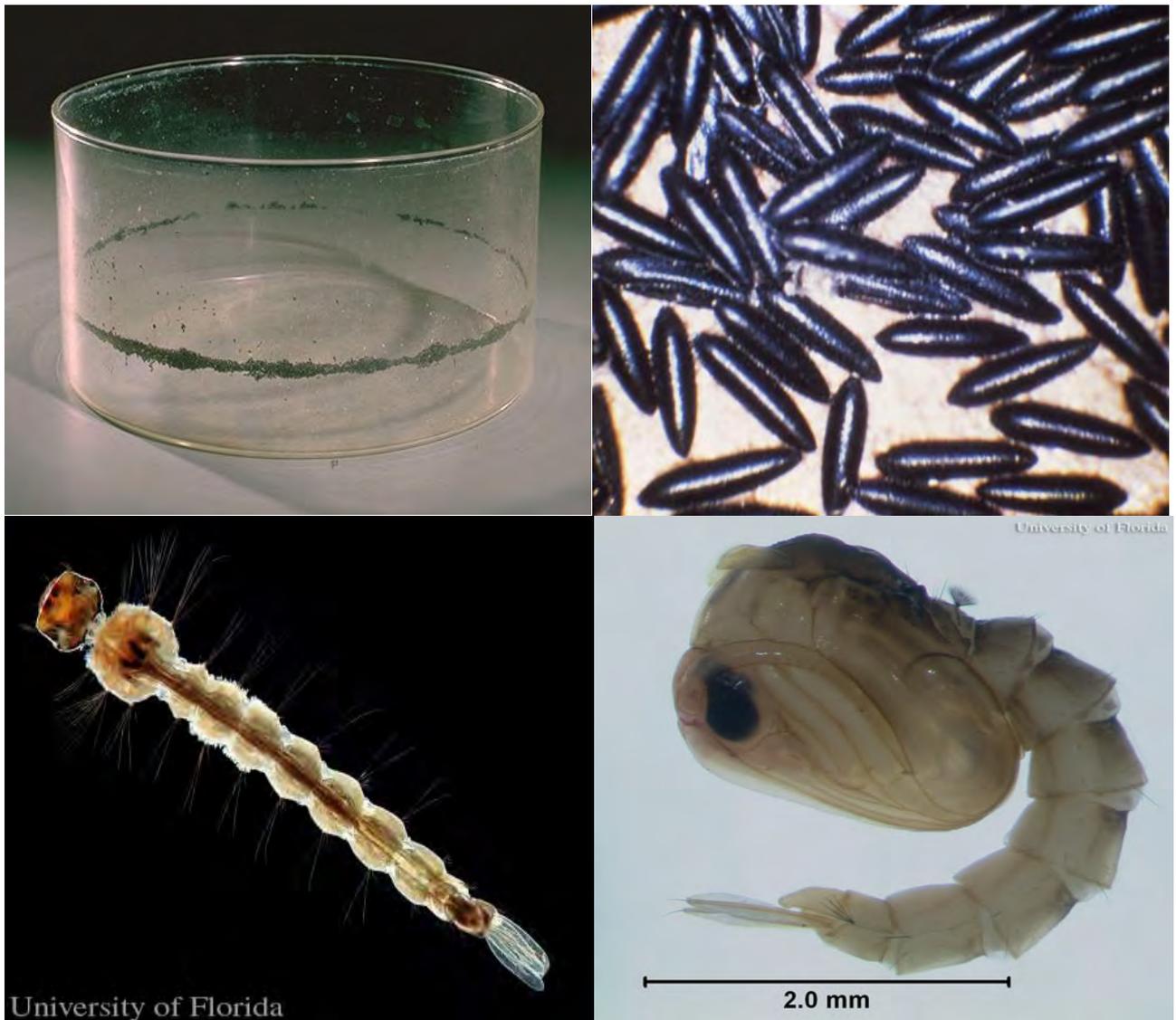


Abbildung 15: Entwicklungsstadien von *Aedes aegypti* (oben links: Eier in Glasbehälter, oben rechts: Eier in Vergrößerung, unten links: Larve, unten rechts: Puppe); Bilder: CDC und University of Florida

Aedes aegypti ist als Vektor für gefährliche Infektionskrankheiten ein ernstzunehmendes Problem, das sich auf Grund seines flexiblen Entwicklungszyklusses trotz verschiedener Eradizierungsversuche bislang nicht eliminieren lässt. Die zu erwartende Klimaerwärmung dürfte *Aedes aegypti* einen weiteren Vorteil verschaffen, da mit steigenden Temperaturen die Entwicklungsgeschwindigkeit steigt und auch in bisher nicht besiedelten Gebieten *Aedes aegypti* heimisch werden könnte.

2.2.2. *Ixodes ricinus* (Schildzecke)

Zecken sind weltweit verbreitete Arthropoden, die innerhalb des Unterstammes der Arachnida (Spinnentiere) zur Klasse der Acari (Milben) gehören (Abb. 10). Von den weltweit etwa 850 Zeckenarten sind in Mitteleuropa nur siebzehn Schildzecken- und zwei Lederzeckenarten

heimisch, von denen der „Gemeine Holzbock“ (*Ixodes ricinus*) am weitesten verbreitet und gleichzeitig der bedeutendste Überträger von Infektionskrankheiten ist (WIRTZ, 2001). Charakteristisch für die Schildzecken ist ein Schild auf dem Rücken, der bei Weibchen den Körper zur Hälfte und beim Männchen den gesamten Körper bedeckt. *Ixodes ricinus* erreichen eine Größe von 2,5 (Männchen) respektive 3,5 (Weibchen) Millimetern im nüchternen Zustand und bis zu 12 mm im vollgesogenen Zustand. Im Gegensatz zu den Stechmücken sind beide Geschlechter und alle Stadien blutsaugend und benötigen die Blutmahlzeit nicht für die Produktion von Nachkommen, sondern für die eigene Entwicklung. Der Lebenszyklus der Zecke (Abb. 16) gliedert

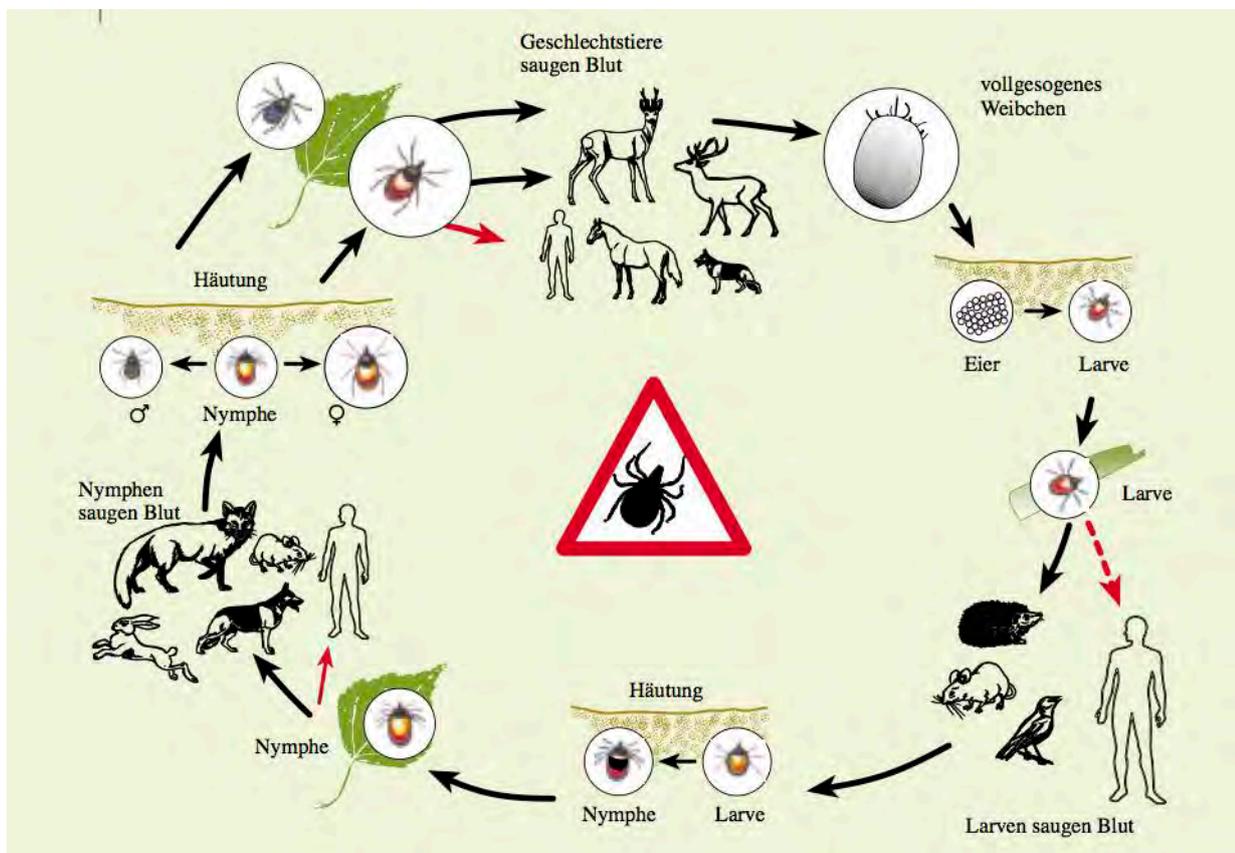


Abbildung 16: Lebenszyklus von *Ixodes ricinus* (WIRTZ, 2001)

sich in drei Abschnitte, die alle eine über mehrere Tage andauernde Blutmahlzeit benötigen. Das erste Stadium ist dabei das Larvenstadium, aus dem, ein bis vier Monate nach der Blutmahlzeit, im Anschluss an eine Häutung, eine Nymphe entsteht. Auch diese Nymphe benötigt wiederum einen Wirt bei dem sie Blut saugen kann, um sich dann innerhalb von vier bis acht Wochen in eine adulte Zecke zu verwandeln. Das Leben der adulten Zecken kennt nur ein Ziel: Fortpflanzung. Nach der letzten Blutmahlzeit des adulten Männchens, kann es einige Weibchen befruchten und stirbt kurz danach. Das Weibchen beginnt einige Tage bis Wochen nach Blutmahlzeit und Befruchtung (erfolgen oft parallel) mit der Eiablage, um nach der Eiablage zu sterben (WIRTZ, 2001).

Da die Blutmahlzeiten der entscheidende Faktor im Leben der Zecke sind, hat die Zecke einige außergewöhnliche Fähigkeiten entwickelt, um das Auffinden eines Opfers zu erleichtern. So sind sie in der Lage mit ihrem ausgeprägten Geruchssinn geringste CO_2 – Konzentrationsunterschiede zu bemerken. Darüberhinaus verfügen sie über ein feines Gespür für Erschütterungen und Temperaturunterschiede, wodurch sie das Herannahen eines Wirtes bemerken (WIRTZ, 2001). Bei der Wahl des Wirtes haben die Zecken keine besonderen Vorlieben. Es ist jedoch so, dass mit zunehmendem Entwicklungsstadium der Zecke die Wirte größer werden, was dem steigenden Blutbedarf aber auch der größeren erreichbaren Höhe der fortgeschritteneren Entwicklungszyklen geschuldet sein dürfte (KUNZ, 1994; LIEBISCH and LIEBISCH, 1997; WIRTZ, 2001). Den größten Teil ihres Lebens (ca. 99 %) verbringt die Zecke mit Warten und Überleben. Auch hierfür ist sie ein Spezialist. Zecken können monatelang ohne Nahrung auskommen und bei nicht zu extremer Kälte können sie gut im Boden überwintern. Die größte Gefahr für die Zecke ist Trockenheit, da sie eine relative Luftfeuchte von 85 bis 95 % benötigt und ausgesprochen empfindlich gegen Austrocknung ist (WIRTZ, 2001). All diese Eigenschaften machen feuchte pflanzendominierte Lebensräume zu bevorzugten Aufenthaltsorten der Zecken, deren Aktivitätsgipfel der Stechaktivität in den Monaten April bis Juni und Ende August bis Oktober liegen (LIEBISCH and LIEBISCH, 1997).

Die Zecke verbleibt als stationär parasitierender Vektor (Abb. 11) je nach Stadium von 2 bis zu 11 Tagen an der Stichstelle und bietet den Erregern dabei ausreichend Zeit das Opfer zu infizieren. Je nach zu übertragendem Krankheitserreger gibt es allerdings Unterschiede in der Übertragung. Das Flavivirus, das die FSME auslöst, kann während des gesamten Stichvorganges über den Speichel übertragen werden (WIRTZ, 2001). Bei der Borreliose wird das Bakterium hingegen zunächst durch aufgenommenes Blut aus der Mitteldarmwand mobilisiert und dringt nach seiner Vermehrung in die Speicheldrüsen der Zellen ein, von wo es dann auf den Wirt übertragen wird (WIRTZ, 2001). Dies führt dazu, dass in den ersten 24 bis 48 Stunden nach einem Zeckenstich eine Borrelieninfektion selten auftritt. Neben den hier erwähnten Krankheiten übertragen Zecken weltweit noch eine Vielzahl weiterer viraler (z.B. Krim-Kongo-Hämorrhagisches-Fieber) und bakterieller (z.B. Q-Fieber) Krankheiten (WIRTZ, 2001) und durch den zwingend erforderlichen Wirtswechsel, die fehlende Spezialisierung auf bestimmte Wirte und die geringen Einschränkungen in Bezug auf den Lebensraum sind sie ein potentieller gefährlicher Vektor für weitere bedrohliche Infektionskrankheiten (LUTZ, 2010; RANDOLPH, 2004; WIRTZ, 2001).

Da *Ixodes ricinus*, als Überträger der Borreliose und der FSME, der wichtigste Überträger vektorübertragener Infektionskrankheiten in Europa ist, ist die Wirkung imprägnierter Moskitonetze auf diesen Vektor ebenfalls Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

2.3. Insektizide, Akarizide und Repellentien

Im Kampf gegen Insekten werden Insektizide, Akarizide und Repellentien entweder einzeln oder in Kombination miteinander eingesetzt. Sie müssen in ihrer Wirkung zuverlässig Insekten töten oder vertreiben, dürfen aber für den menschlichen Organismus und die Ökosysteme keine inakzeptable Belastung darstellen (FAULDE, 2010). Auf Grund der Vielzahl der auf dem Markt befindlichen insektiziden Wirkstoffklassen (z.B. natürliche wie Naturpyrethrum, Rotenoide, Abamectine und synthetische wie chlorierte Kohlenwasserstoffe, Carbamate, Organophosphate, Pyrethroide und Benzamide) (FAULDE, 2010), wird anschließend nur die für diese Arbeit relevante Wirkstoffgruppe der Pyrethroide vorgestellt. Ebenso wird bei den Repellentien nur auf Wirkstoffe eingegangen, die zur Abwehr von Insekten dienen. Repellentien, die zur Abwehr von Nagetieren dienen, werden nicht betrachtet.

2.3.1. Pyrethroide

Pyrethroide wie Permethrin (Abb.18), das auf Grund der Abwesenheit einer Cyanogruppe in α -Stellung zum Ester als Typ I Pyrethroid bezeichnet wird, sind synthetische Verbindungen, die von den natürlich in Chrysanthemen vorkommenden Pyrethrinen (Abb.17) abgeleitet sind. Pyrethrinextrakte wurden schon in Persien und im alten China auf Grund ihres insektiziden Potentials genutzt (KLAASSEN, 2008). Dem hohen insektiziden Potential der Pyrethrine steht eine relativ geringe Toxizität für Säugetierorganismen gegenüber, allerdings ist die Stabilität der natürlich vorkommenden Pyrethrine gegenüber Lichteinwirkung und Umwelteinflüsse sehr begrenzt.

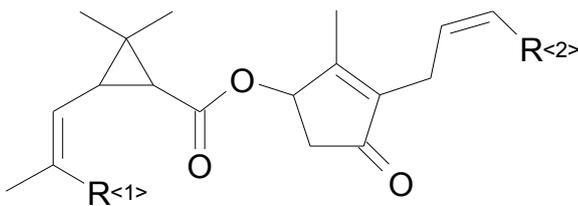


Abbildung 17: Pyrethrin

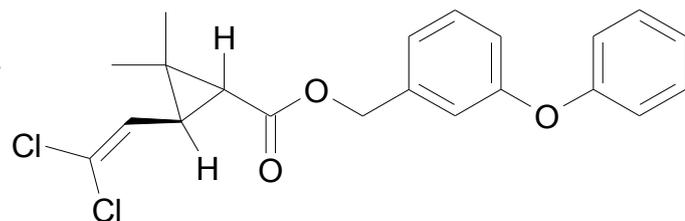


Abbildung 18: Permethrin (Typ I Pyrethroid)

Mit Entwicklung der Pyrethroide in den 70er Jahren standen Strukturen zur Verfügung, die bei stärkerer Wirkung deutlich stabiler waren, als ihre natürlichen Vorbilder (REICHL, 2002). Dabei bleibt die Persistenz in der Umwelt gering, da sie innerhalb weniger Tage durch Hydrolyse, Photolyse und Mikroorganismen abgebaut werden. Weitere Vertreter der Substanzklasse der Pyrethroide sind Deltamethrin und Cyfluthrin (Abb.19 und 20), die auf Grund ihrer Cyanogruppe in α -Stellung zum Ester als Typ II Pyrethroide bezeichnet werden.

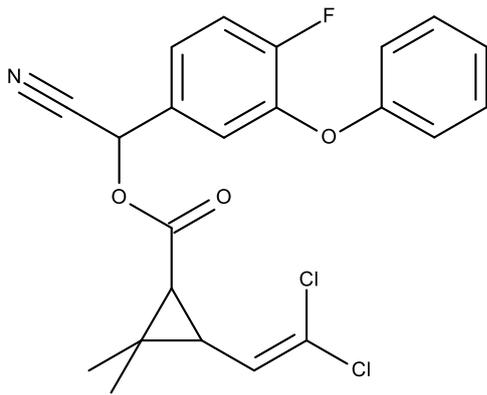


Abbildung 19: Cyfluthrin (Typ II Pyrethroid)

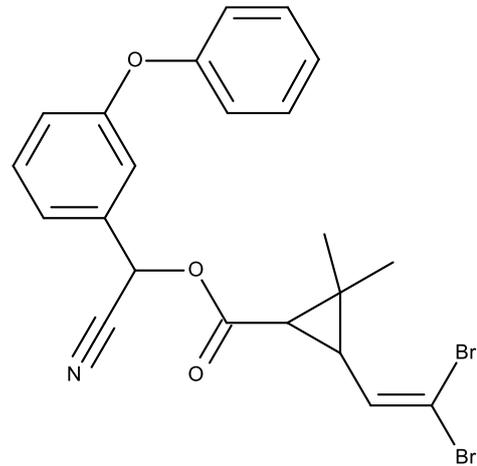


Abbildung 20: Deltamethrin (Typ II Pyrethroid)

Permethrin und seine Verwandten weisen grundsätzlich den gleichen Wirkmechanismus auf. Primärer Angriffsort von Pyrethrinen und Pyrethroiden sind spannungsabhängige Natriumkanäle an Nervenzellmembranen (SODERLUND *et al.*, 2002) (Abb.21), wo die Pyrethroide zum einen die Öffnungszeit des spannungsabhängigen Natriumkanals verlängern und einen fortgesetzten Einstrom von Natriumionen ermöglichen, wodurch es bei Typ I Pyrethroiden zu wiederholten schnell aufeinanderfolgenden Erregungen kommt und bei Typ II Pyrethroiden, auf Grund einer noch stärkeren Depolarisation der Nervenzellmembran, nach einigen schnell aufeinanderfolgenden Aktionspotentialen eine vollständige Blockade der Nervenzelle ausgelöst wird (SHAFER *et al.*, 2005) (Abb.22).

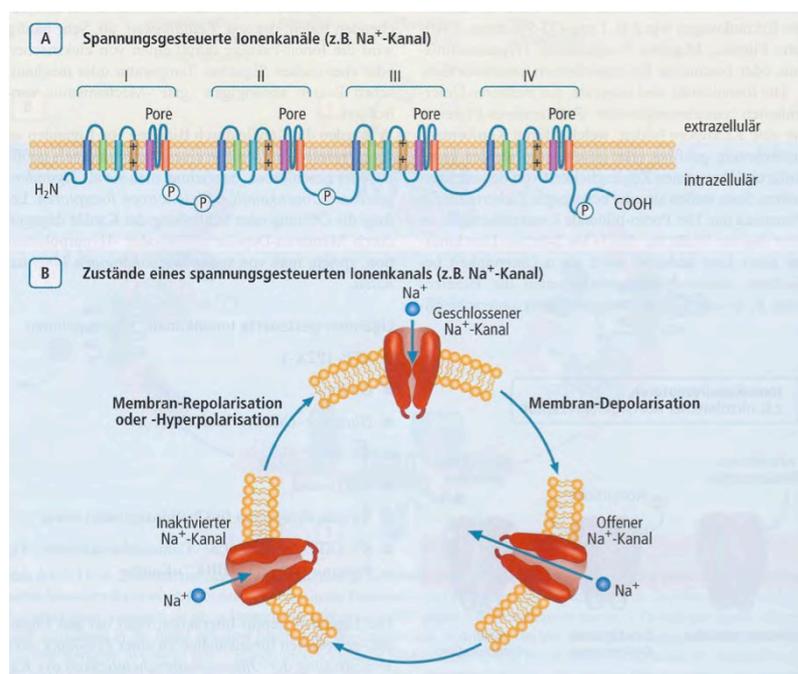


Abbildung 21: A: Proteinstruktur eines spannungsgesteuerten Ionenkanals. B: Mögliche Zustände eines spannungsabhängigen Natriumkanals (MUTSCHLER, 2008).

Als weitere Wirkung wird die Freisetzung verschiedener Neurotransmitter (Noradrenalin, Acetylcholin, Dopamin, GABA) vermutet (ROBBACH *et al.*, 2005). Prinzipiell greift auch im Säugetierorganismus der gleiche Wirkmechanismus, aber dennoch ist die akute Toxizität gering. Der Grund für diese geringe Toxizität gegenüber Säugetieren ist auf die höhere Affinität der Pyrethroide zu den Ionenkanälen der Insekten, deren niedrigerer Körpertemperatur (Pyrethroide weisen einen negativen Temperaturkoeffizienten in Bezug auf ihre Aktivität auf) und die schnellere Metabolisierung und Elimination der Substanzen im Säugetierorganismus zurückzuführen.

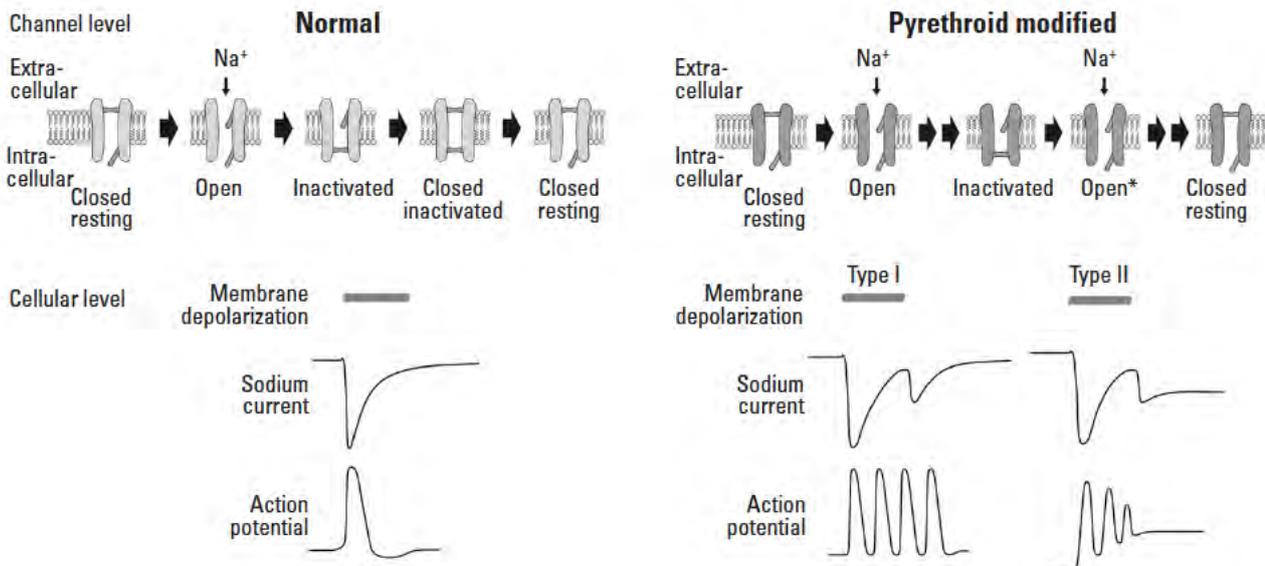


Abbildung 22: Wirkmechanismus von Pyrethroiden (SHAFFER *et al.*, 2005). Durch die verlängerte Öffnungszeit des spannungsabhängigen Natriumkanals wird die Repolarisation der Membran gestört und das normale Ruhepotential nicht erreicht. Die Folge sind schnell aufeinander folgende Aktionspotentiale, die entweder zu einer starken wiederholten Exzitation der betroffenen Neurone führen (Typ I) oder nach einigen schnell aufeinanderfolgenden Aktionspotentialen eine Blockade der Neurone hervorrufen (Typ II).

Permethrin kommt, wie viele andere Pyrethroide auch, in 2 diastereomeren Formen vor, von denen üblicherweise das cis-Isomer deutlich toxischer und wirksamer ist als das trans-Isomer (KLAASSEN, 2008).

Die Aufnahme kann grundsätzlich inhalativ, oral oder dermal erfolgen, wobei bei der Anwendung von Permethrin in textilen Bedarfsgegenständen üblicherweise die dermale und inhalative Aufnahme im Vordergrund steht. Bei dermalen Exposition beträgt die Resorptionsrate beim Menschen etwa 0,5 % (ROBBACH *et al.*, 2005).

LD₅₀ – Werte für Permethrin wurden an Ratten ermittelt. Diese betragen bei oraler Aufnahme 400 mg/kg in Öl und 4000 mg/kg in Wasser, bei dermalen Applikation 2000 mg/kg. Der ermittelte no observed adverse effect level (NOAEL) beträgt 5 mg/kg pro Tag, der daraus abgeleitete acceptable daily intake (ADI) 0,05 mg/kg Körpergewicht/Tag für den Menschen. Die acute reference dose (ARfD) wurde von der WHO 2002 mit 1,5 mg/kg Körpergewicht festgelegt. Eine Übersicht über die Toxizität weiterer Pyrethroide gibt Tabelle 1.

Tabelle 3: Toxikologische Kenndaten einiger Pyrethroide; Quelle:(Industrieverband AGRAR, 2000)

	LD ₅₀ oral ¹⁾ (mg/kg)	LD ₅₀ dermal ¹⁾ (mg/kg)	LC ₅₀ inhalativ ¹⁾ (mg/l)	Haut- reizung ²⁾	Augen- reizung ²⁾	Dermale Sensi- bilisierung ³⁾
Alpha-Cypermethrin	64	> 2000	> 1,59 ⁴⁾	reizend	reizend	nicht sensibilisierend
Beta-Cyfluthrin	380 m	> 5000	0,53 (Staub)	nicht reizend	nicht reizend	nicht sensibilisierend
Cyfluthrin	590	> 5000	0,405 (Aerosol)	nicht reizend	nicht reizend	nicht sensibilisierend
Cypermethrin	287	> 1600	> 2,5 ⁴⁾	nicht reizend	nicht reizend	nicht sensibilisierend
Deltamethrin	138 m	>2940	0,6 (6h)	reizend	reizend	nicht sensibilisierend
d-Tetramethrin	> 5000	> 5000	> 1,18 ⁴⁾	nicht reizend	nicht reizend	nicht sensibilisierend
Fenvalerat	88,5	> 5000	0,48 m	nicht reizend	nicht reizend	nicht sensibilisierend
Lambda-Cyhalothrin	79 m	632 m	0,06	nicht reizend	nicht reizend	nicht sensibilisierend
Pyrethrum Extrakt	700-2140	> 2000	3,4	nicht reizend	nicht reizend	nicht sensibilisierend

¹⁾an der Ratte ²⁾am Kaninchen ³⁾am Meerschweinchen ⁴⁾techn. max. zuführbare Konzentration m: male

Beobachtete systemische Effekte bei der Aufnahme von Permethrin beruhen auf der oben beschriebenen Neurotoxizität der Pyrethroide. Bei akzidentieller oder suizidaler Aufnahme von Pyrethroiden wurden u.a. Symptome wie Atemwegsreizungen, Atembeschwerden, Geruchs -, Geschmacksstörungen, Konvulsionen, Muskellähmungen, Erbrechen und Ataxie festgestellt. Bei direktem Hautkontakt kann es zu vorübergehenden Parästhesien der betroffenen Hautpartien (Kribbeln, Brennen, Jucken) kommen, die 3 - 6 Stunden nach Exposition ihren Höhepunkt erreichen und innerhalb von 12 - 24 Stunden vollständig reversibel sind. Allergische Hautreaktionen sind ebenfalls bekannt, jedoch sehr selten. Eine Einteilung der Pyrethroide wird häufig nach den vorherrschenden Symptomen bei übermäßiger Pyrethroidexposition vorgenommen. Dabei zeigen Pyrethroide ohne Cyanogruppe, wie Permethrin, einen Tremor des Gesamtorganismus als Leitsymptom (T-Syndrom), während Pyrethroide mit Cyanogruppe, wie Deltamethrin, durch Choreoathetose und Salivation (CS-Syndrom) gekennzeichnet sind. Der Metabolismus von Permethrin erfolgt überwiegend in der Leber, wobei bei dermalen Aufnahme auch eine Metabolisierung in der Haut angenommen wird (ROBBACH *et al.*, 2005). Bei den in Abbildung 23 dargestellten Metabolisierungsreaktionen erfolgt eine Spaltung des Carbonsäureesters mit Bildung von cis - und trans - 3-(2,2-Dichlovinyl)-2,2-dimethylcyclopropancarbonsäure (cis-Cl₂CA und trans- Cl₂CA) einerseits und 3-

Phenoxybenzylalkohol (3-PBOH) andererseits. Ein weiterer Schritt ist anschließend die Oxidation des Phenoxybenzylalkohols zur 3-Phenoxybenzoesäure (3-PBA).

Die Ausscheidung erfolgt in freier Form oder auch nach Glucuronidierung (Phase 2 Metabolisierung) überwiegend renal.

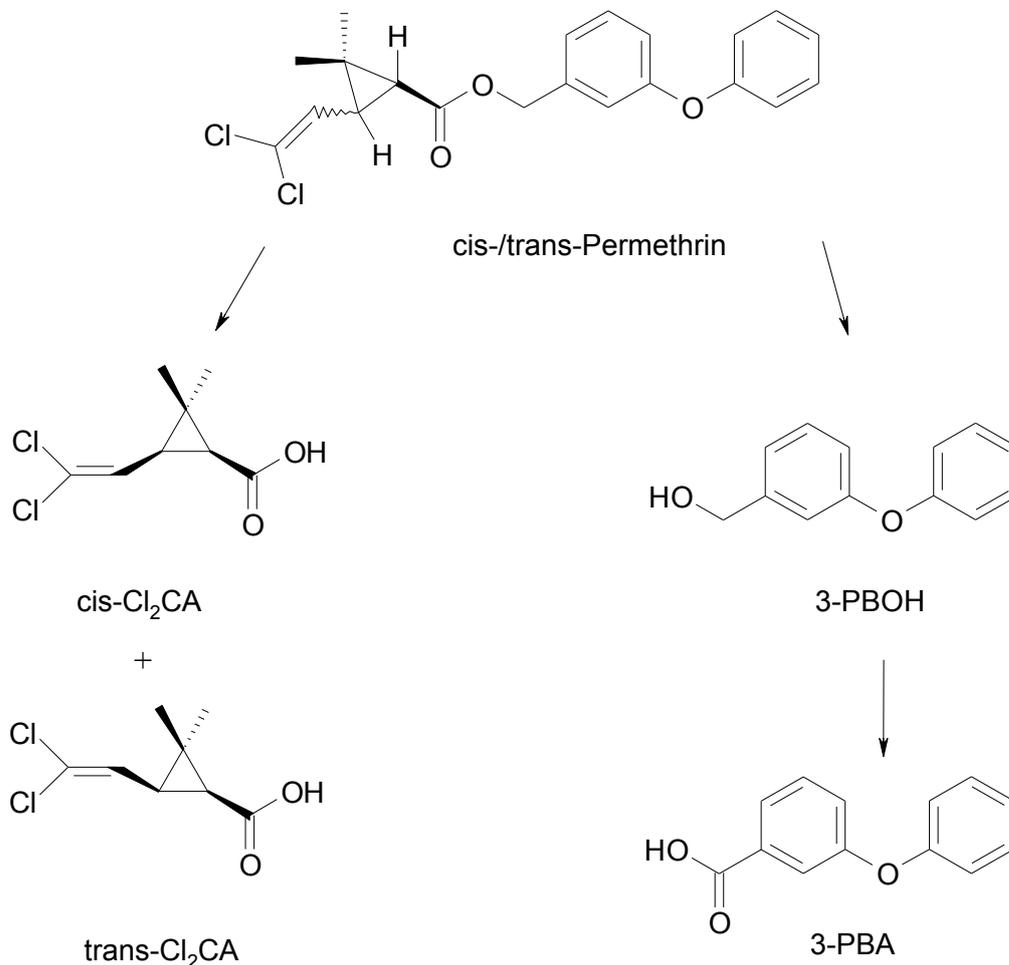


Abbildung 23: Phase 1 Metabolismus von Permethrin

Neben der Verwendung als Insektizide in Bedarfsgegenständen werden Pyrethroide als Pestizide im Haushalt und der Landwirtschaft eingesetzt, aus der eine orale Aufnahme der Allgemeinbevölkerung resultiert (UMWELTBUNDESAMT, 2005). Diese mit der Nahrung aufgenommene Menge wird auf unter 1 µg/ Tag geschätzt (HEUDORF, 2003), so dass sich die Belastung der Allgemeinbevölkerung mit Pyrethroiden über die Nahrungsaufnahme in überschaubaren Grenzen hält.

2.3.2. Repellentien

Das Wort Repellent leitet sich vom lateinischen *repellere* (vertreiben, zurückstoßen) ab und wird für Substanzen verwendet, die überwiegend auf Grund ihrer olfaktorischen Wirkung abschreckend auf sensible Individuen wirken, ohne sie dabei zu töten. Für einige als klassische Insektenrepellentien angenommene Substanzen wurden inzwischen aber auch toxische Eigenschaften für ihre Ziele nachgewiesen (FAULDE *et al.*, 2010).

Tabelle 4: Anforderungen an ein ideales Repellent; nach (KATZ *et al.*, 2008)

1.	Hohe Wirksamkeit gegen ein breites Spektrum an Vektoren
2.	Bei der dermalen Applikation werden keine Hautirritationen hervorgerufen
3.	Geruchlos oder angenehmer Geruch
4.	Keine negativen Auswirkungen auf textile Bedarfsgegenstände
5.	Hinterlässt keinen öligen Rückstand auf der Haut, ist wasser- und schweißfest
6.	Inert gegenüber Kunststoffen
7.	Chemisch stabil
8.	Kostengünstige Verfügbarkeit
9.	Nicht toxisch
10.	Langanhaltende Wirkdauer

Der Versuch, Insekten zu vertreiben, wurde schon seit vielen Jahrhunderten unternommen. In früheren Zeiten wurden dafür Pflanzenöle, Teere, Rauch und mitunter Kamelurin verwendet (PETERSON and COATS, 2001). Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde durch die zunehmende Kenntnis im Bereich der Naturwissenschaften die Entwicklung respektive die Verwendung von chemisch definierten Substanzen vorangetrieben. Vor dem zweiten Weltkrieg kamen Zitronenöl, Dialkylphthalate, Indalon® und Rutgers 612 (Abb.24) einzeln oder in Kombination zum Einsatz (BROWN and HEBERT, 1997).

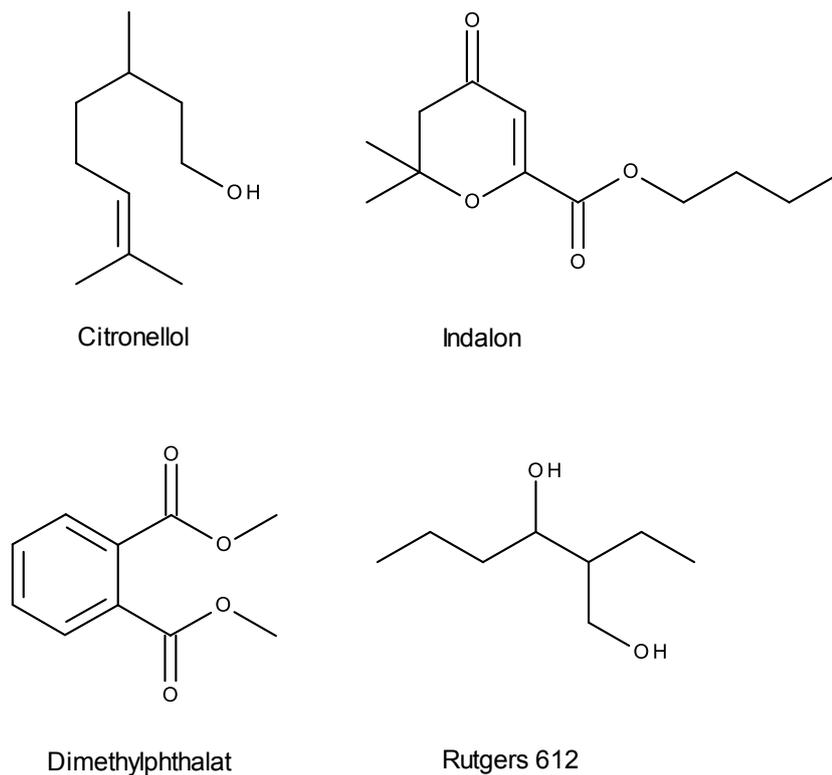


Abbildung 24: Strukturen der vor dem zweiten Weltkrieg allein oder in Kombination verwendeten Repellentien. Citronellol ist stellvertretend als Leitsubstanz des Zitronenöls abgebildet.

Während und im Anschluss an den zweiten Weltkrieg wurde die Forschung an repellent aktiven Substanzen insbesondere durch die Militärs der Vereinigten Staaten vorangetrieben. Im Rahmen dieser Forschungen wurden über 20.000 Substanzen auf ihre Eignung als Repellent, über deren Anforderungen Tabelle 2 einen Überblick gibt, untersucht (PETERSON and COATS, 2001). Diese Suche führte zum N,N-diethyl-3-methylbenzamid oder N,N-Diethyl-m-toluamid (DEET) (Abb.25), das 1946 durch die US Army entwickelt und 1957 in den USA als Repellent registriert wurde. DEET entwickelte sich im Verlauf der nächsten Jahrzehnte zum Goldstandard bei den Repellentien und keines der im Anschluss entwickelten Repellentien konnte einen ähnlichen Erfolg aufweisen. Zu den in der Folgezeit entwickelten Substanzen gehören N-N-diethylphenylacetamid (DEPA), Ethylbutylacteylaminopropionat (IR 3535[®], Merck), MKG Repellent 11 oder p-Menthan-3,8-diol, die häufig strukturelle Verwandtschaften mit DEET aufweisen. Als erfolgreichste Entwicklung nach DEET gilt das durch die Firma Bayer entwickelte Picaridin (KBR 3023), das unter dem Handelsnamen BayRepel[®] vertrieben wird und unter anderem in dem bekannten Mittel Autan[®] enthalten ist. Die Skepsis in einigen Teilen der Bevölkerung gegenüber synthetisch hergestellten Wirkstoffen, führt immer wieder zu Versuchen möglichst natürliche Wirkstoffe als Repellents zu verwenden. Neben dem schon erwähnten Zitronenöl werden Öle von Lamiaceae (z.B. Minze, Salbei) oder Myrtaceae (Teebaum, Eukalyptus) genutzt. Die Wirkung der Öle ist jedoch schwächer als die der synthetisch hergestellten Substanzen und von kürzerer Dauer. Die effektivste Wirkung der „natürlichen“ Repellentien weist p-Menthan-3,8-diol auf, das in Blättern

und Zweigen des Zitroneneukalyptusbaumes *Corymbia citriodora* vorkommt und bei der US Environmental Protection Agency (EPA) als Biopestizid registriert ist (CARROLL and LOYE, 2006; EPA, 2011). Der Wirkstoff wird aber für die kommerzielle Verwendung synthetisch hergestellt (MOORE *et al.*, 2007).

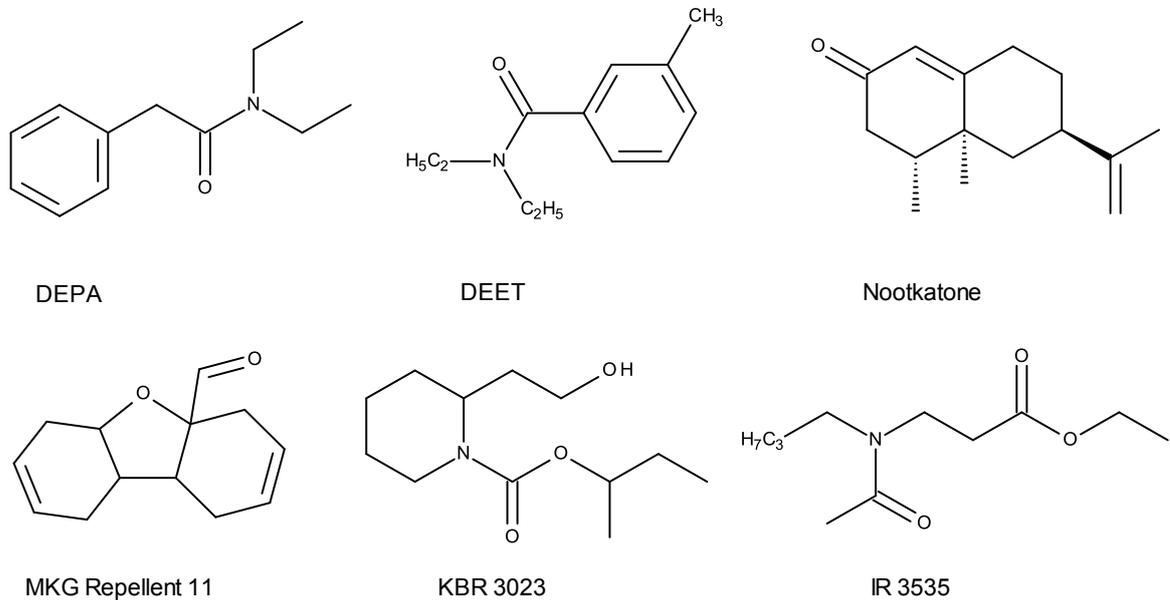


Abbildung 25: Strukturen verschiedener synthetischer Repellentien

Ein weiterer Ansatz, Insekten abzuwehren, ist der Verzehr spezieller Lebensmittel bzw. Lebensmittelinhaltsstoffe. Der wissenschaftliche Nachweis der Wirksamkeit einer effizienten repellent aktiven Wirkung durch die orale Aufnahme von Vitamin B₁, Knoblauch- oder Petersilienöl ist bisher jedoch noch nicht erbracht (KATZ *et al.*, 2008).

In den folgenden Abschnitten werden die in dieser Arbeit benutzten Repellentien sowie Picaridin kurz einzeln vorgestellt, wobei der Fokus auf dem nach wie vor als Goldstandard anzusehenden DEET liegen wird, das über die mit Abstand detaillierteste Datenlage verfügt.

2.3.2.1. DEET

DEET ist das weltweit am meisten verwendete Repellent und in über 200 Formulierungen enthalten, die einen Gehalt zwischen 5 und 90 % DEET (ALTENKÄMPER, 2008) aufweisen. Der größte Teil der Entwicklung wurde, wie schon erwähnt, durch die US Army durchgeführt, deren Soldaten in bewaffneten Auseinandersetzungen wie dem 2. Weltkrieg, dem Koreakrieg und dem Vietnamkrieg vielfältigen durch Vektoren hervorgerufenen Krankheiten ausgesetzt waren (BROWN and HEBERT, 1997). Im Vergleich mit vielen anderen untersuchten Substanzen erwies sich DEET als der Wirkstoff mit der höchsten Aktivität gegen ein breites Spektrum an Vektoren bei einem hervorragenden Nutzen-Risiko-Verhältnis bei sachgemäßer Anwendung (KATZ *et al.*, 2008).

Der Wirkmechanismus von DEET und anderen Repellentien ist bis heute Gegenstand der Forschung und noch nicht abschließend geklärt. Es wird davon ausgegangen, dass DEET die Milchsäure sensiblen Geruchsrezeptoren in Nervenzellen von Vektoren beeinflusst, die in den

Antennen der Gelbfiebermücke *Aedes aegypti* nachgewiesen wurden (DAVIS and SOKOLOVE, 1976). Mit Hilfe dieser Rezeptoren lokalisieren die Vektoren ihre Opfer, wobei die Aktivität der Rezeptoren nach der Blutmahlzeit abnimmt (DAVIS, 1984). DEET blockiert bzw. hemmt diese neuronalen Rezeptoren dahingehend, dass die Attraktivität des Geruchs der Milchsäure auf das Niveau nach einer Blutmahlzeit herabgesetzt wird und das Opfer an Reiz verliert (DAVIS, 1985). Diese Wirkung allein erklärt aber nicht vollkommen die abschreckende Wirkung auf die Vektoren, da bei der Anwendung von DEET ein „Space-Effekt“ zu beobachten ist, der die Vektoren offensichtlich daran hindert, näher an das Opfer heranzukommen. Dies lässt sich nur dadurch erklären, dass die Vektoren DEET riechen und den Geruch aktiv meiden (SYED and LEAL, 2008). Darüberhinaus verändert das Auftragen von DEET auf die Haut die Zusammensetzung der über die Haut abgegebenen flüchtigen Substanzen, was ebenfalls zu einer verminderten Attraktivität des Opfers führt (SYED and LEAL, 2008). Neben der repellent aktiven Wirkung wurde für DEET eine insektizide Wirkung (LICCIARDI *et al.*, 2006) und bei ausreichender Kontaktmenge eine akarizide Wirkung auf Zecken und Milben festgestellt (FAULDE, 2001). Als Wirkmechanismus für diese Eigenschaft wird eine Hemmung der Acetylcholinesterase angenommen, die zu neurologischen Erscheinungen und bei entsprechender Dosis zum Tod der untersuchten Vektoren führt (CORBEL *et al.*, 2009).

Grundsätzlich gilt die Anwendung von DEET, das von etwa 30 % der amerikanischen Bevölkerung (KATZ *et al.*, 2008) und weltweit von über 200 Millionen Menschen (SYED and LEAL, 2008) angewendet wird, als sicher. Dennoch werden Fälle berichtet, bei denen die Anwendung von DEET zu adversen Effekten am Menschen geführt hat. Insgesamt gibt es 43 Fallstudien, die eine toxische Wirkung von DEET beschreiben; 25 davon stehen in Zusammenhang mit zentralnervösen, 1 mit kardiovaskulären und 17 mit dermalen Erscheinungen (KATZ *et al.*, 2008). Bei den Fällen mit Beteiligung des zentralen Nervensystems wurden Symptome wie Kopfschmerzen, Desorientierung, Apathie und Krämpfe berichtet sowie Krankheitsbilder wie manische Psychosen und Enzephalopathien. Insgesamt werden 6 Todesfälle mit der Verwendung von DEET in Verbindung gebracht, von denen 3 durch eine orale Aufnahme von DEET hervorgerufen wurden (TENENBEIN, 1987). Die anderen Todesfälle betrafen ein Kind mit einem Defekt der Ornithin-Carbamoyl-Transferase (HEICK *et al.*, 1980) und zwei Kinder mit zentralnervösen Defekten (BRIASSOULIS *et al.*, 2001). Trotz dieser seltenen berichteten Fälle wird die Anwendung von DEET von der EPA als sicher angesehen. Voraussetzung für die Sicherheit ist in jedem Fall eine bestimmungsgemäße Anwendung, die in den meisten der berichteten Vergiftungen nicht eingehalten wurde.

Wie schon zu Anfang erwähnt, wird DEET in einer schier unendlichen Vielzahl an Produkten in unterschiedlichsten Konzentrationen verwendet. Die Konzentration von DEET im Endprodukt hat einen entscheidenden Einfluss auf die Wirkstärke und Wirkdauer. So steigt die Effizienz DEET-haltiger Präparate mit steigender Konzentration logarithmisch an (RUTLEDGE *et al.*, 1985) und erreicht bei 50 % ein Plateau (FRADIN, 1998), so dass weitere Steigerungen der Konzentrationen zu keiner akzeptablen Verbesserung der Repellentaktivität führen. Ebenfalls wichtig für die

Wirkdauer ist die Art der Rezeptur, so dass durch eine geeignete Matrix die gleiche Wirkung bei reduzierter Konzentration erreicht werden kann (FRADIN, 1998). Die übliche Anwendungskonzentration von DEET im Fertigprodukt liegt bei 10-30 %. In Produkten, die für den Einsatz in Gebieten mit einer sehr hohen Vektorendichte vorgesehen sind, werden Konzentrationen von 40 % und mehr eingesetzt.

Im Hinblick auf die Anforderungen an ein ideales Repellent (Tabelle 2), erfüllt DEET die meisten der Anforderungen. Problematisch ist allerdings das Verhalten von DEET gegenüber vielen Kunststoffen, die angelöst und beschädigt werden können.

2.3.2.2. IR 3535

Insect Repellent 3535 oder Merck IR3535[®] (Struktur Abb.25) wird seit über 30 Jahren als Repellent gegen Stechmücken, Zecken und Läuse eingesetzt (MERCK_KGAA, 2011). Es ist seit 1999 bei der EPA als Biopesticide Repellent registriert und wird in Endproduktkonzentrationen von 7,5 – 20 % verwendet (EPA, 2011). Trotz der langen Zeit der Anwendung gibt es kaum verfügbare Daten zur Toxikologie von IR 3535. Die EPA stuft IR 3535 als sicher ein und es gibt bisher keine Fallstudien, die über adverse Effekte bei der Anwendung berichten. IR 3535 wird als Repellent zur dermalen Applikation durch die Firma Merck beworben. Laut Hersteller zeichnet es sich durch eine sehr gute Wirksamkeit gegen eine Vielzahl von krankheitsübertragenden Vektoren aus und ist für eine große Anzahl kosmetischer Formulierungen geeignet.

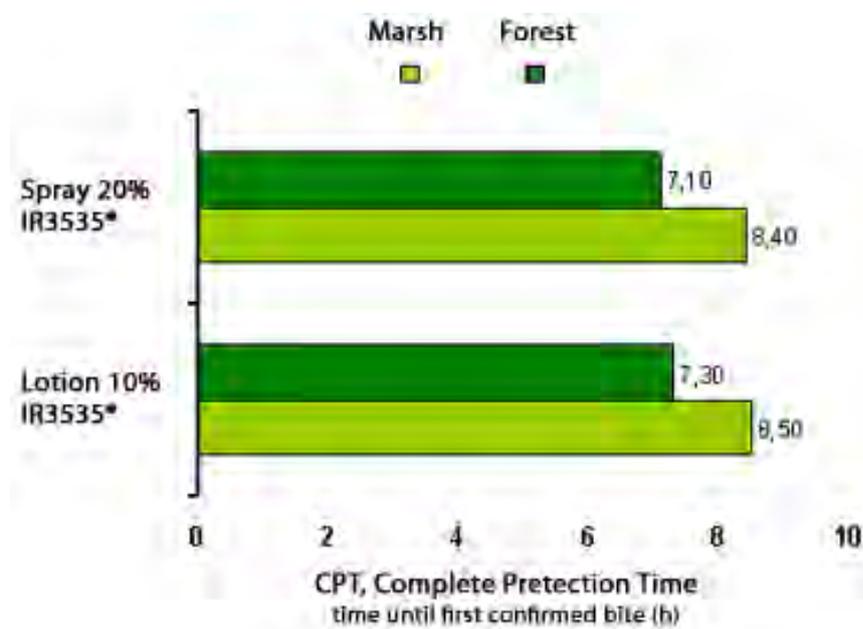


Abbildung 26: Wirksamkeit von IR 3535 als Lotion und Spray gegen Stechmücken (MERCK_KGAA, 2011)

Die Einsatzkonzentration wird mit 10-30 % angegeben. Ähnlich wie DEET ist auch IR 3535 nicht mit allen Kunststoffen kompatibel. Hinsichtlich der Wirkstärke im Vergleich mit anderen

Repellentien erweist sich IR 3535 als etwas besser wirksam als pflanzliche Repellents, aber deutlich weniger aktiv als DEET (FRADIN and DAY, 2002). Da die Wirkstärke von IR 3535 im Vergleich mit DEET auch bei der Verwendung auf textilen Bedarfsgegenständen geringer ist, wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit gezeigt.

2.3.2.3. Picaridin

Auch unter den Namen Icaridin oder KBR 3023 bekannt, wird der Wirkstoff seit 1998 durch die Firma Bayer unter dem Namen BayRepel® in Europa und Australien als Repellent vertrieben. Picaridin ist nahezu geruchlos und farblos. Es wird in Konzentrationen zwischen 5 und 20 % eingesetzt. Hinsichtlich seiner Eigenschaften kommt es den Anforderungen an das ideale Repellent ziemlich nah. Insbesondere gegenüber Kunststoffen zeigt sich Picaridin inert. Seine toxikologischen Eigenschaften wurden durch die EPA mit der Schlussfolgerung bewertet, dass von der Substanz bei vorgesehener Anwendung keine Gefahr für die menschliche Gesundheit ausgeht, so dass der Wirkstoff auch für den amerikanischen Markt zugelassen wurde. So ist die akute orale und dermale Toxizität sehr gering (>2000 mg/kg Körpergewicht Ratte) und es gibt bislang keine Hinweise auf Kanzerogenität, Mutagenität oder Reproduktionstoxizität (EPA, 2005). Im Vergleich mit DEET in Bezug auf die Risikobewertung der Sicherheit der Anwendung sind beide Wirkstoffe als vergleichbar sicher anzusehen (ANTWI *et al.*, 2008). Ein Vergleich der Wirkung von Icaridin und DEET wurde von (BADOLO *et al.*, 2004) durchgeführt. Das Ergebnis dieser Studie zeigte, dass keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der relativen Potenz der beiden Wirkstoffe bestehen und dass die Dosis-Wirkungs-Beziehungen der Substanzen an den untersuchten Spezies *Aedes aegypti* und *Anopheles gambiae* vergleichbar waren. Allerdings ist bisher für Picaridin keine insektizide Wirkung wie bei DEET festgestellt worden (LICCIARDI *et al.*, 2006), so dass diesbezüglich DEET eine größere Effektivität aufweist. Dennoch ist Picaridin eine mögliche Alternative zu DEET und weitere Forschungen werden zeigen, ob Picaridin das Potential hat, DEET als Goldstandard bei den Repellentien abzulösen. Untersuchungen mit dem Wirkstoff in der vorliegenden Arbeit waren nicht möglich, da der Wirkstoff als technische Substanz nicht frei verfügbar ist und von Hersteller nicht für die durchgeführte Forschung zur Verfügung gestellt wurde.

2.3.2.4. p-Menthan-3,8-diol (PMD)

PMD ist Bestandteil des ätherischen Öls des Zitroneneukalyptus (*Corymbia citriodora*), dessen Öl schon seit langem als Repellent verwendet wird und erstmals 1948 bei der EPA als Insektizid registriert wurde. PMD wurde bei der EPA im Jahr 2000 zum ersten Mal als Einzelsubstanz registriert (EPA, 2011). PMD weist einen charakteristischen mentholartigen Geruch auf und verursacht auf der Haut ein kühlendes Gefühl. Für kommerzielle Produkte wird PMD überwiegend synthetisch, z.B. aus Citronellal (Abb.27), hergestellt.

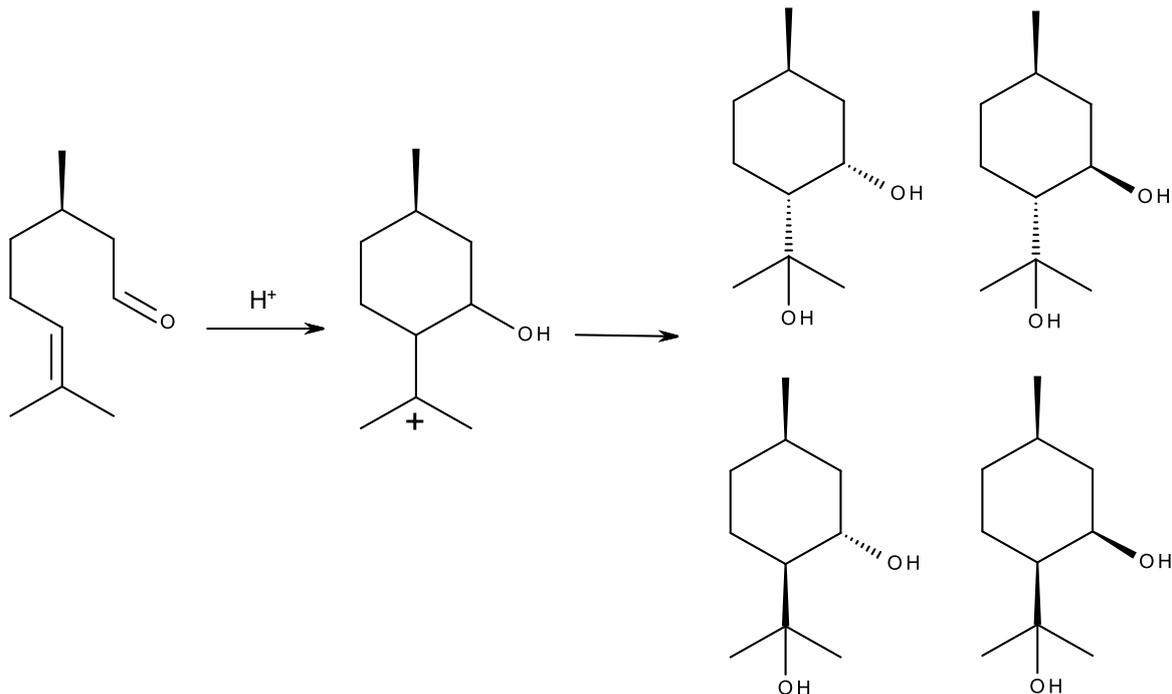


Abbildung 27: Synthese von cis/trans(±)-p-Menthane-3,8-diol aus (+)-Citronellal (nach (DRAPEAU *et al.*, 2011))

Die toxikologischen Eigenschaften betreffend, sind für PMD keine adversen Effekte außer einer reizenden Wirkung auf die Augen bekannt, so dass bei der Applikation darauf geachtet werden muss, dass die Formulierung nicht in die Augen gerät (EPA, 2011). Hinsichtlich der Wirksamkeit von PMD differieren die Aussagen deutlich. Manche Publikationen konstatieren PMD eine gleiche oder sogar bessere Wirkung wie DEET (TRIGG, 1996), (MOORE *et al.*, 2007), während andere Publikationen eine schwächere Wirkung als DEET postulieren (BARNARD *et al.*, 2002), (DRAPEAU *et al.*, 2011). Prinzipiell wird aber angenommen, dass PMD das bislang einzige pflanzenbasierte Repellent ist, das sich tatsächlich zur Vermeidung von Vektoren eignet. Die Ursache dafür wird dem geringeren Dampfdruck gegenüber anderen repellent aktiven pflanzlichen Wirkstoffen gesehen (MOORE and MAIA, 2011). PMD wurde für die Verwendung als Repellent auf imprägnierten Moskitonetzen in Erwägung gezogen und im Rahmen dieser Arbeit auf seine Verwendbarkeit geprüft.

2.4. Integriertes Vektorenmanagement (IVM)

Wenn von integriertem Vektorenmanagement gesprochen wird, dann beziehen sich fast alle Ausführungen und Forschungen auf die Malaria als weltweit wichtigste vektorübertragene Infektionskrankheit. Dennoch können die Vorgehensweisen und Intentionen selbstverständlich auch für die Bekämpfung anderer Infektionskrankheiten herangezogen werden.

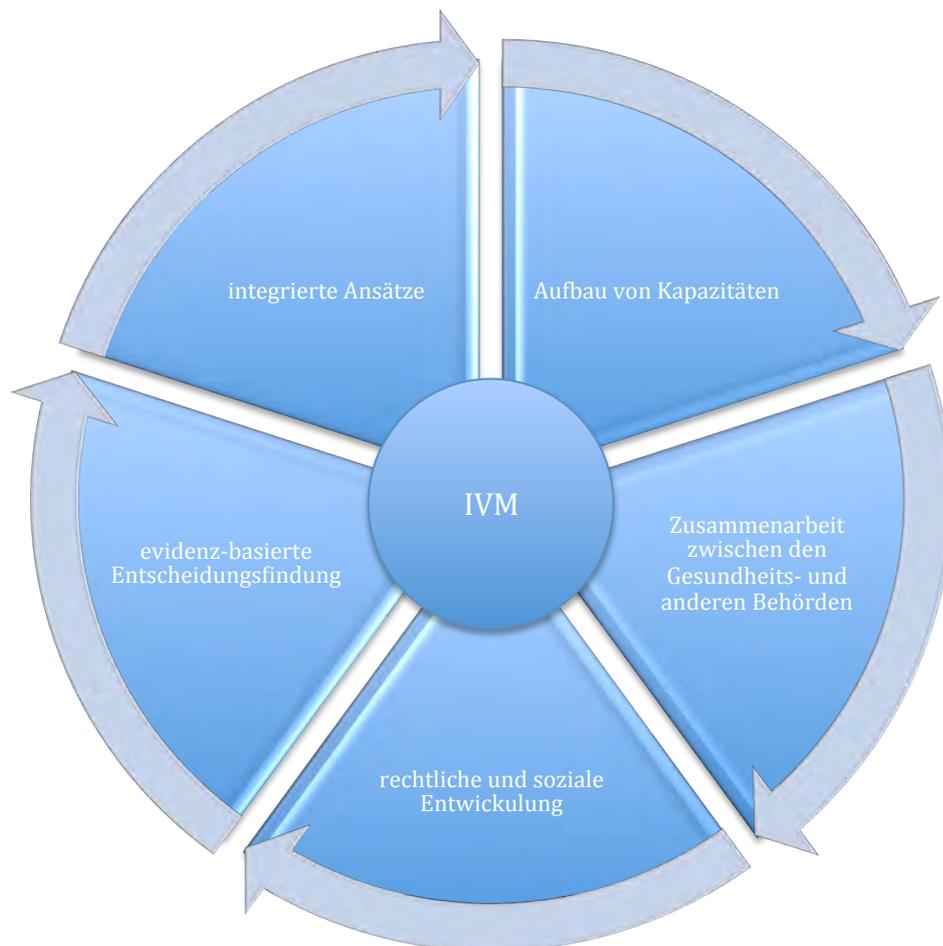
Nachdem gegen Ende des 19. Jahrhunderts die Ursachenforschung, z.B. durch die Entdeckung von Plasmodien und die Rolle von Stechmücken als Vektor bei Malaria, in Bezug auf

Infektionskrankheiten große Fortschritte machte (RAGHAVENDRA *et al.*, 2011), begann man nach der Entdeckung von Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) 1939 mit den ersten Versuchen Malaria und andere vektorübertragene Infektionskrankheiten durch Kontrolle ihrer Vektoren zu bekämpfen (RTI, 2007). Die großflächig angelegten Programme in den 50er und 60er Jahren des 20. Jahrhunderts erwiesen sich zunächst als große Erfolge und bis auf Malaria in Afrika galten die vektorassoziierten Infektionskrankheiten zum Ende der 60er Jahre als besiegt (TOWNSON *et al.*, 2005), was für viele ehemalige Malariaendemiegebiete in Europa und den Vereinigten Staaten von Amerika bis heute gilt. Allerdings ist aus heutiger Sicht dieser Erfolg bei weitem nicht so umfassend gelungen, wie zunächst angenommen. Nach den erfolgreichen Anfängen mit dem Einsatz von DDT schlugen die Stechmücken mit zunehmenden Resistenzen gegen DDT und gegen die medikamentöse Malariatherapie zurück. Neben den erhöhten Kosten für die Vektorenbekämpfung nahm auch das Desinteresse der großen Industrienationen (hier waren die Vektoren eradiziert) an den Programmen zu. Weitere Probleme tauchten auf, als man bemerkte, dass das vermeintliche Wundermittel DDT zu erheblichen ökologischen Problemen führt. Durch seine Persistenz in der Umwelt reichert sich DDT in den Nahrungsketten an und verursacht durch seine endokrinen Wirkungen vielfältige ökologische Schäden, so dass DDT heute nur noch zur Bekämpfung von Malaria eingesetzt werden darf. Die Vernachlässigung der Bekämpfung von Vektoren in den folgenden Jahrzehnten führte dazu, dass die vektorübertragenen Infektionskrankheiten wieder in den Fokus gerückt sind. Im Laufe der Zeit wurden unterschiedliche Ansätze verfolgt, um die Verbreitung der Vektoren einzudämmen. Zu ihnen gehören, neben altbekannten ökologischen Maßnahmen wie Wassermanagement und Verbesserung der allgemeinen Lebensbedingungen (KEISER *et al.*, 2005; RTI, 2007), der großflächige Einsatz von Pestiziden, medikamentöse Therapien, auch seit den 90er Jahren vermehrt eingesetzte Maßnahmen wie die Verwendung von mit Insektiziden imprägnierten Moskitonetzen, die als die effektivste Neuentwicklung auf dem Gebiet der Vektorkontrolle seit 50 Jahren anzusehen sind (TOWNSON *et al.*, 2005). All diese Maßnahmen reduzieren die Verbreitung und das Aufkommen der Vektoren, aber eine effektive Bekämpfung der Vektoren erfordert eine Kombination verschiedener Methoden (BEIER *et al.*, 2008). Solche Programme des Vektorenmanagements haben sich als effizient erwiesen, aber in den meisten Fällen ist ein solides Management und eine Nachhaltigkeit der Programme nicht vorhanden, so dass z.B. ein unkontrollierter Einsatz von Pestiziden zu erhöhten Resistenzentwicklungen führt (WHO, 2004). Im Zeitalter des Wissens um die Notwendigkeit von prozessorientierten Managementsystemen, wurde der Einsatz von integrierten Vektorenmanagementsystemen durch die WHO 2004 als hoffnungsvolles Mittel postuliert (WHO, 2004), wobei das Prinzip natürlich keine neue Erfindung ist und selbstverständlich alle Verfahren der bisherigen Vektorkontrolle beinhaltet. Integriertes Vektormanagement ist definiert als ein rationaler Entscheidungsprozess, der die verfügbaren Ressourcen für die Vektorenkontrolle optimal nutzt (BEIER *et al.*, 2008), um die Eliminierung von Infektionskrankheiten zu erreichen.

Tabelle 5: Ziele und Prinzipien eines IVM nach (BEIER *et al.*, 2008)

1.	Reduzierung der Vektorpopulationen und der Übertragung von Erregern
2.	Maßnahmen sollten ökonomisch, ökologisch, sozial und politisch vertretbar sein
3.	Tätigkeiten sollten nicht zu negativen Auswirkungen auf die Gesundheit von Menschen, Tieren und nützlichen Insekten führen. Ebenso wenig sollten Resistenzen gefördert oder Ökosysteme belastet werden
4.	Kenntnisse in Bezug auf den Übertragungsweg der Krankheiten, die Entwicklung der Vektoren und die natürlichen Regelmechanismen der Vektorenpopulationen müssen vorhanden sein
5.	Flexibilität für Strategieänderungen bei neuer Datenlage
6.	Dynamische Anpassung des Systems an Ergebnisse von Überwachungsprogrammen

Das IVM ist für alle vektorübertragenen Krankheiten einsetzbar und verfolgt das Ziel, die Effizienz, die wirtschaftliche und ökologische Belastung und die Nachhaltigkeit der Vektorenkontrolle zu verbessern (Tabelle 5), indem es einen ganzheitlichen Ansatz verfolgt,

Abbildung 28: Kernelemente des IVM nach (BEIER *et al.*, 2008)

der nicht nur die Verantwortlichen aus dem Gesundheitsbereich einbezieht, sondern alle politisch und wirtschaftlich Verantwortlichen als Teil eines Gesamtprozesses betrachtet. Das IVM beinhaltet fünf ineinandergreifende Kernelemente, die in Abb. 28 dargestellt sind und hier kurz erläutert werden.

- **Rechtlich und soziale Entwicklung.** Die Entwicklung und Verankerung der Prinzipien des IVM in die Politik und das Denken aller wichtigen Kreise, Organisationen und die Bevölkerung, inklusive des Aufbaus rechtlicher Rahmenbedingungen zur Durchführung und Überwachung der initiierten Programme.
- **Zusammenarbeit zwischen Gesundheits- und anderen Behörden.** Enge Vernetzung aller an den Programmen Beteiligten und enge Zusammenarbeit von privaten und staatlichen Stellen im In- und Ausland.
- **Integrierte Ansätze.** Stellen die rationale Verwendung der Ressourcen zur Bekämpfung verschiedener Krankheiten sicher und bedienen sich dabei Kombinationen aus chemischen als auch nicht-chemischen Methoden.
- **Evidenz-basierte Entscheidungsfindung.** Auf Ergebnissen aus Forschungen und Studien abgestützte Entscheidungen ermöglichen eine Anpassung von Strategien und bieten Eingriffsmöglichkeiten, um die Effizienz zu steigern.
- **Aufbau von Kapazitäten.** Der Aufbau von Infrastruktur, die Verfügbarkeit finanzieller Mittel und personeller Ressourcen ist zwingend notwendig, um die IVM Programme durchführen zu können.

Tabelle 6: Übersicht über die in einem IVM kombiniert angewandten Vektorbekämpfungsmaßnahmen, mit den Punkten 1 und 2, die gegen die adulten Stechmücken gerichtet sind und den Punkten 3 bis 5, die sich gegen die Larven der Stechmücken richten (RTI, 2007).

1.	Indoor residual spraying (IRS) mit Pestiziden, die von der WHO empfohlen sind
2.	Imprägnierte Moskitonetze
3.	Larvenabtötende Agenzien wie Bakterien (z.B. <i>Bacillus thuringiensis</i>), Chemikalien (z.B. Temephos) oder monomolekulare Filme oder Öle
4.	Umweltveränderungen wie die Veränderung von Infrastrukturen, das Trockenlegen von Wassergräben oder Aufforstung.
5.	Umweltmodifikationen wie die Veränderung der Vegetation, der Reduktion von Algen oder dem Einsatz von larvenfressenden Fischen (z.B. <i>Gambusia affinis</i>)

Auf den ersten Blick erscheint das IVM sehr theoretisch und der Nutzen dieser Programmatiken wird sicherlich deutlich unterschätzt (VAN DEN BERG and TAKKEN, 2009), aber ein Blick auf die Tatsache, dass Krankheiten wie Malaria nicht nur einen menschlichen, sondern auch einen enormen ökonomischen Aspekt, der die wirtschaftliche Entwicklung ganzer Staaten verhindert, haben (SACHS and MALANEY, 2002), führt einen schnell zu der Erkenntnis, dass mehr als die bisher

praktizierten Vektorbekämpfungsmaßnahmen erforderlich sind. Der Nutzen solcher Systeme lässt sich auch daran erkennen, dass alle global erfolgreichen Industriekonzerne mit prozessorientierten Qualitätsmanagementsystemen ihre Produktivität steigern.

Wie schon erwähnt, stellt dieses Managementsystem keine neuen Methoden zur praktischen Vektorbekämpfung zur Verfügung, aber es sorgt durch den gezielteren kombinierten Einsatz der bisher verfügbaren Methoden gegen Larven und adulte Stechmücken (Tabelle 6) für eine größere Effektivität im Kampf gegen die Infektionskrankheiten und liefert darüberhinaus statistische Daten, die anderen die Implementierung ihrer Programme erleichtern. Erste Beispiele der Anwendung des IVM, z.B. in Sambia, zeigen große Erfolge (VAN DEN BERG and TAKKEN, 2009) und zur Zeit unterstützt die WHO weitere afrikanische Staaten beim Aufbau von IVM's.

2.5. Imprägnierte Moskitonetze

Die Verwendung von Netzen oder netzartigen Gebrauchsgegenständen zur Abwehr von Arthropoden lässt sich bis in das 6. Jahrhundert vor Christus zurückverfolgen und zieht sich wie ein roter Faden durch die weitere Geschichte der Menschheit. Von den Ägyptern über die Römer bis hin zu den Zeiten der Kolonialisierung und den Weltkriegen ist die Verwendung von Moskitonetzen dokumentiert (LINDSAY and GIBSON, 1988). Der Einsatz von Moskitonetzen, die mit Insektiziden imprägniert waren, beginnt während des 2. Weltkrieges, wo die Nutzung von derartigen Netzen von russischen, amerikanischen und deutschen Soldaten beschrieben ist (CURTIS *et al.*, 1991). In den 50er Jahren wurden Moskitonetze mit DDT imprägniert, als man versuchte, die Malaria zu eliminieren. Nachdem man aber diese Programme weitgehend in der Annahme einstellte, dass die Malaria ausreichend bekämpft sei, gerieten die imprägnierten Moskitonetze bis zur Entdeckung der synthetischen Pyrethroide in Vergessenheit (LENDELER, 2004). Mit dem verstärkten Bemühen der WHO, zu Beginn der 90er Jahre, präventive Maßnahmen zur Bekämpfung der Malaria stärker zu etablieren, erwiesen sich mit Pyrethroiden imprägnierte Moskitonetze als eine der vielversprechendsten Maßnahmen zur Reduktion der Infektionsinzidenz (TAKKEN, 2002). Heute ist die Anwendung von imprägnierten Moskitonetzen eine der wichtigsten Säulen der Malariabekämpfung (WHO, 2003). Da insbesondere bei Kindern und schwangeren Frauen die Mortalität besonders hoch ist, wird von der WHO das Ziel verfolgt, jeweils ein Netz für zwei Kinder im Alter von 0-5 Jahren und ein Netz für jede schwangere Frau zur Verfügung zu stellen.

Die Wirksamkeit imprägnierter Moskitonetze wurde in vielen Studien nachgewiesen (WHO, 2007). So wurde der Rückgang der Mortalität von Kindern im Alter von 1-59 Monaten um 42 % in einer Studie in Gambia 1991 berichtet (ALONSO *et al.*, 1991). Auch der Vergleich zwischen herkömmlichen und imprägnierten Moskitonetzen wurde untersucht, mit dem Ergebnis, dass die imprägnierten Moskitonetze zu einer signifikant niedrigeren Mortalität führen als die nicht imprägnierten und dass durch den Tod der Vektoren auch Personen, die nicht über ein Moskitonetz verfügen, profitieren (D'ALESSANDRO *et al.*, 1995). Neue Studien zeigen allerdings auch, dass die Wirksamkeit der Insektizide durch Resistenzen nachlässt und der Auswahl des zur Imprägnierung verwendeten Insektizides große Bedeutung zukommt (GU and NOVAK, 2009). An dieser Problematik setzen auch die Forschungen, die in dieser Arbeit dargestellt werden, mit dem Ziel an, neue und verbesserte Wirkungen auf die Vektoren zu erzielen. Neben der herausragenden Wirksamkeit von imprägnierten Moskitonetzen, sind diese darüberhinaus ausgesprochen kosteneffizient und mit Kosten von 1,05 US Dollar pro geschützter Person z.B. deutlich günstiger als IRS, das Kosten von 3,60 Dollar pro Person verursacht (WHO, 2007).

Zur Herstellung von Moskitonetzen können verschiedene Materialien verwendet werden. Die häufigsten sind Baumwolle, Nylon, Polyester, Polyethylen, Polypropylen und Mischgewebe aus Baumwolle und den synthetischen Fasern. Zur weiteren Charakterisierung der Gewebe wird die Maschenweite des Gewebes in Mesh und die Stärke resp. das Gewicht des Garnes in Denier

angegeben. Die Angabe der Maschenweite erfolgt gemäß WHO nach dem angloamerikanischen System und gibt die Anzahl der Löcher pro „square inch“ an (1 inch = 25,4 mm). Denier bezeichnet das Gewicht von 9000 Metern Garn in Gramm. In Abhängigkeit von Gewebetyp, Maschenweite und Garngewicht weisen die Netze unterschiedliche Eigenschaften auf:

- Die verschiedenen Fasern haben eine unterschiedliche Kapazität in Bezug auf die applizierbare Insektizidmenge.
- Weitere Maschenweiten erlauben eine bessere Luftzirkulation, erhöhen aber auch die Gefahr, dass Stechmücken und andere kleine Vektoren wie Sandmücken und Stechgnitzen durch die Maschen durchschlüpfen können und sind meistens physikalisch weniger belastbar.
- Größere Garngewichte machen die Netze haltbarer, verursachen aber höhere Herstellungskosten.

Das Ziel bei der Entwicklung der Netzmaterialien muss es sein, eine gelungene Kombination aus Haltbarkeit, Atmungsaktivität und Inkorporierbarkeit von Insektiziden zu finden.

Für die Imprägnierung der Moskitonetze werden verschiedene Pyrethroide und unterschiedliche Methoden der Imprägnierung eingesetzt. Tabelle 7 stellt die bislang von der WHO empfohlenen und als sicher geltenden Pyrethroide dar, die sich in der Anwendung für die konventionelle Imprägnierung bewährt haben. Aufgelistet sind die Konzentrationen der Wirkstoffe in den Imprägnierlösungen und die Zielkonzentrationen der Wirkstoffe angegeben als aktiver Inhaltsstoff in mg/m² auf dem getrockneten Netzmaterial. Die unterschiedlichen Zielkonzentrationen auf dem Netz liegen an den unterschiedlichen Wirkstärken der Substanzen, die i.A. auch mit ihrer Humantoxizität korrelieren.

Tabelle 7: Von der WHO empfohlene Insektizide für die konventionelle Imprägnierung von Moskitonetzen (WHO, 2007)

Insektizid	Formulierung ¹⁾	Dosierung ²⁾
Alpha-Cypermethrin	SC 10%	20-40
Cyfluthrin	EW 5%	50
Deltamethrin	SC 1%; WT 25% + binder ³⁾	15-25
Etofenprox	EW 10%	200
Lambda-cyhalothrin	CS 2,5%	10-15
Permethrin	EC 10%	200-500

¹⁾ EC = emulsifiable concentrate; EW = emulsion, oil in water; CS = capsule suspension; SC = suspension concentrate; WT = water dispersible tablet.

²⁾ Milligrams of active ingredient per square metre of netting.

³⁾ K-O TAB 1-2-3®

Bei der konventionellen Imprägnierung werden die Netze entweder in eine wirkstoffhaltige Lösung getaucht oder mit dem Wirkstoff besprüht (FAULDE *et al.*, 2010). Beim Tauchen können die Netze entweder einzeln oder mehrere Netze gleichzeitig imprägniert werden. Grundsätzlich sollten die Netze vor der Imprägnierung gewaschen und getrocknet werden. Während des

Imprägniervorgang ist darauf zu achten, dass alle Teile des Netzes vollständig mit der Flüssigkeit in Berührung kommen und beim Auswringen ist es wichtig, dass nicht zu viel Druck ausgeübt wird, da dadurch wieder Wirkstoff ausgepresst wird (WHO, 2002). Die Trocknung der Netze kann ausgebreitet auf dem Boden oder hängend erfolgen. Mit derartig imprägnierten Netzen wird eine effiziente Nutzungsdauer von 6- 12 Monaten (oder 3 Wäschen) erreicht, bevor eine Reimprägnierung erforderlich ist (WHO, 2007). Problematisch bei dieser Form der Imprägnierung ist die Sicherstellung des Verfahrens und der regelmäßigen Reimprägnierung durch den Anwender. Ohne konkrete Hilfen, sowohl hinsichtlich der logistischen Versorgung mit den Materialien als auch im Hinblick auf die Schulung die Anwender, sind fehlerhafte Anwendungen vorprogrammiert und gefährden den Erfolg der Maßnahme. Dies sicherzustellen, ist im übrigen eine der vielen Aufgaben eines integrierten Vektorenmanagements (siehe 2.4.).

Eine Weiterentwicklung auf dem Gebiet der imprägnierten Moskitonetze stellen die langwirkenden Moskitonetze (LLIN) dar. Diese werden schon bei der Herstellung mit den Wirkstoffen imprägniert und sind für die Anwendung von bis zu 5 Jahren ohne Reimprägnierung ausgelegt (WHO, 2007).

Tabelle 8: Von der WHO empfohlene LLIN (WHO, 2011)

Produktname	Produktbeschreibung	Status der WHO-Empfehlung	Publikationsstatus der WHO-Spezifikation
DawaPlus®2.0	Deltamethrin coated on polyester	Interim	Published
Duranet®	Alpha-cypermethrin incorporated into polyethylene	Interim	Published
Interceptor®	Alpha-cypermethrin coated on polyester	Interim	Published
LifeNet®	Deltamethrin incorporated into polypropylene	Interim	-
MAGNet®	Alpha-cypermethrin incorporated into polyethylene	Interim	Published
Netprotect®	Deltamethrin incorporated into polyethylene	Interim	Published
Olyset®	Permethrin incorporated into polyethylene	Full	Published
PermaNet®2.0	Deltamethrin coated on polyester	Full	Published
PermaNet®2.5	Deltamethrin coated on polyester with strengthened border	Interim	Published
PermaNet®3.0	Combination of deltamethrin coated on polyester with strengthened border (side panels) and deltamethrin and PBO incorporated into polyethylene (roof)	Interim	Published
Royal Sentry®	Alpha-cypermethrin incorporated into polyethylene	Interim	Published
Yorkool®LN	Deltamethrin coated on polyester	Interim	Published

Die in Tabelle 8 aufgeführten LLIN stellen die mit Stand Juli 2011 von der WHO empfohlenen Netze dar und zeigen die zur Zeit verwendeten Insektizide und Netzmaterialien. Alle LLIN

bestehen aus synthetischen Fasern und der überwiegende Teil verwendet Typ II Pyrethroide wie Deltamethrin oder Alpha-Cypermethrin als Insektizid. Die angewandten Verfahren der Hersteller zum Aufbringen der Wirkstoffe auf die Netze sind nicht genau bekannt, da es sich üblicherweise um patentierte Verfahren handelt. Wie schon erwähnt, sind diese Netze bereits imprägniert wenn sie den Anwender erreichen und müssen von ihm selbst nicht mehr behandelt werden. Wenn man von einer Nutzungsdauer für ein solches Netz von etwa 5 Jahren ausgeht, ist im Idealfall auch keine Reimprägnierung mehr erforderlich. Dies erhöht die Compliance der Anwender deutlich und auch der logistische Aufwand wird reduziert, da nur die Netze an den Anwender abgegeben werden müssen und nicht noch zusätzliche Materialien zu Imprägnierung und Reimprägnierung. Zusammenfassend ist zu konstatieren, dass die Verwendung von LLINs deutliche Vorteile gegenüber der Verwendung von herkömmlich imprägnierten Moskitonetzen verspricht (WHO, 2007). Die WHO sieht aber unter anderem im Hinblick auf breiteres Spektrum an Wirkstoffen, um Resistenzen entgegen zu können, und in Bezug auf die Wasch- und Abnutzungsresistenz weiteren Forschungsbedarf zur Optimierung der LLINs. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden Ergebnisse dargestellt, die einen Beitrag zur Optimierung der Wirksamkeit von LLINs leisten.

3. Materialien und Methoden

3.1. Extraktion und gaschromatographische Bestimmung

Die Bestimmung des Gehaltes an Insektiziden und Repellentien erfolgt nach Extraktion in einer Soxhletapparatur oder zur Ermittlung des Arbeitsbereiches nach Extraktion im Ultraschallbad durch Gaschromatographie mit massenselektiver Detektion. Die Auswertung erfolgt nach der Methode der externen Kalibration unter Verwendung von drei internen Standards.

Bei der Kapillargaschromatographie werden die zu bestimmenden Analyten auf der Trennsäule nach dem Prinzip der Verteilungschromatographie getrennt. Dazu werden die Analyten zunächst im Injektor verdampft und dann mit dem Trägergasstrom zur Trennsäule transportiert. Dort werden sie auf Grund unterschiedlicher Verteilungskoeffizienten und verschiedenen Aufenthaltszeiten in der stationären Phase unterschiedlich stark zurückgehalten und gelangen somit nacheinander zum Detektor (RÜCKER *et al.*, 2008). Bei der massenselektiven Detektion werden die Analyten im Detektor zunächst ionisiert, fragmentiert und anschließend nach ihrer Masse getrennt. Im Falle des verwendeten Quadrupol Analysators erfolgt die Ionisation durch Elektronenstoß (EI) mit einer Elektronenenergie von 70 eV und anschließendem Transport in ein Hochfrequenzfeld, dass durch vier parallel angeordnete Metallstäbe erzeugt wird. In diesem Feld gelangen nur Ionen mit einem ganz bestimmten Masse-Ladungs-Verhältnis zum Austrittsspalt und werden detektiert. Durch Veränderung der Spannung an den Metallstäben wird das Hochfrequenzfeld verändert und es gelangen andere Ionen zum Austrittsspalt. Die Kopplung von Gaschromatograph und Quadrupol Analysator wird auf Grund ihrer kurzen Registrierzeit und des geringen Raumbedarfs häufig eingesetzt und vereinigt ein Höchstmaß an Substanzspezifität und Empfindlichkeit miteinander (RÜCKER *et al.*, 2008).



Abbildung 29: Agilent Gaschromatograph im Labor BGU/CTU des ZInstSanBw KOB

3.1.1. Geräte und Hilfsmittel

- Gaschromatograph mit massenselektivem Detektor (Abbildung 29)
 - Agilent Gaschromatograph 6890N, Agilent Technologies, Waldbronn
 - Agilent Mass Selective Detektor 5973 Network
 - Gerstel MPS 2 Multi Purpose Sampler, Gerstel GmbH & Co. KG, Mühlheim / Ruhr
 - Trennsäule Phenomenex Zebron ZB-5MS, Länge 30m, Innendurchmesser 25mm, Filmdicke 25µm, T_{\max} 325/ 350°C isotherm/Temperaturprogramm
 - Trennsäule Phenomenex Zebron ZB-5HT Inferno, Länge 30m, Innendurchmesser 25mm, Filmdicke 25µm, T_{\max} 400/ 430°C isotherm/Temperaturprogramm
- Elektronische Analysenwaage Sartorius ME 235-P Genius, Sartorius AG, Göttingen
- Ultraschallbad Sonorex Digital 10 P, Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin
- Laborschüttler horizontal, Edmund Bühler GmbH, Hechingen
- Mehrstellenmagnetrührer IKAMAG RT 10 Power, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
- Reihenwasserbad Typ 1041, GFL mbH Burgwedel
- Soxhletapparatur bestehend aus
 - Rückflusskühler NS 45/40
 - Soxhlet-Aufsatz 30 ml, NS 29/32, Lenz
 - Reduzierstück NS 45/40 auf NS 29/32
 - Extraktionshülsen 18 x 55mm aus Cellulose, Whatman
- Messkolben mit Kegelschliffhülse und Glasstopfen; diverse Volumina
- Bechergläser; verschiedene Größen
- Erlenmeyerkolben; verschiedene Größen
- Reagenzgläser 30 ml mit Schliffstopfen
- Vollpipetten; diverse Volumina
- Rundkolben 100 ml
- Hamiltonspritzen; diverse Volumina
- Pasteurpipetten, Glas

- Glaswägeschiffchen
- Mikrospatel
- Schneidwerkzeuge (Skalpell und Schere)
- Schneidunterlage aus Glas
- Metallschablone 1dm² (Sonderanfertigung zur Bestimmung der flächenbezogenen Masse)
- Digitale Schieblehre, Messbereich 0 – 150 mm, Auflösung 0,01 mm, Genauigkeit ± 0,03 mm (> 100 – 200 mm), Fa. Th. Geyer
- Schutzhandschuhe, Baumwolle
- Pinzette
- Vials für Gaschromatographie
- Bördelzange
- Bördelkappen
- Siedeperlen

3.1.2. Referenzsubstanzen und Chemikalien

- Referenzsubstanzen:
 - N,N Diethyltoluamid (DEET), CAS-Nr. 134-62-3, ACROS (114571000)
 - Insektrepellent 3535 (IR 3535), CAS-Nr. 52304-36-6, Merck (1.11887.0100)
 - Etofenprox (EFPX), CAS-Nr. 80844-07-1, Dr. Ehrenstorfer (C 13363000)
 - Cis-Permethrin (CPM), CAS-Nr. 61949-76-6, Dr. Ehrenstorfer (C 15990100)
 - Trans-Permethrin (TPM), CAS-Nr. 61949-77-7, Dr. Ehrenstorfer (C 159902000)
 - Deltamethrin (DMT), CAS-Nr. 52918-63-5, Dr. Ehrenstorfer (C 121200000)
 - Cyfluthrin (CYFL), CAS-Nr. 68359-37-5, Dr. Ehrenstorfer (C 118500000)
 - Piperonylbutoxid (PBO), CAS-Nr. 51-03-6, Dr. Ehrenstorfer (C 16240000)
 - Diethylhexylphthalat (DEHP), CAS-Nr. 117-81-7, Dr. Ehrenstorfer (C 16173000)
 - Isobutylparaben (IBP), CAS-Nr. 4247-02-3, ABCR (180384)
 - Fenvalerat (FVL), CAS-Nr. 51630-58-1, Dr. Ehrenstorfer (C 13630000)

- Toluol SupraSolv® für Gaschromatographie, CAS-Nr. 108-88-3, Merck KGaA, Darmstadt
- N-Hexan SupraSolv® für Gaschromatographie, CAS-Nr. 110-54-3, Merck KGaA, Darmstadt

3.1.3. Durchführung

Nach Ankunft der Probe im Labor ist diese bis zur Bearbeitung dunkel, kühl und trocken zu lagern. Das Berühren der Proben mit ungeschützten Händen soll auf Grund des Produktschutzes vermieden werden, weshalb bei der Probenvorbereitung Baumwollhandschuhe zu tragen sind. Im Rahmen der Probenvorbereitung wird zunächst die flächenbezogene Masse der Probe bestimmt. Dazu werden aus dem Probenmaterial mit Hilfe der Metallschablone 1dm^2 mindestens zwei Prüfmuster ausgeschnitten und die Kantenlängen der Stücke mit der elektronischen Schieblehre kontrolliert. Das Ausschneiden der Netze erfolgt im glattgestrichenen ungespannten Zustand; die zulässige Abweichung der Kantenlängen beträgt $\pm 1\text{mm}$. Die Stücke werden anschließend auf der Analysenwaage gewogen und der Mittelwert als flächenbezogene Masse (DIN, 1997) für spätere Berechnungen verwendet. Je nach Menge des Probenmaterials wird die Mischprobe entweder aus dem gesamten Probenmaterial oder durch Entnahme von Einzelproben an verschiedenen Stellen eines großen textilen Flächengebildes hergestellt. Das Netzmaterial wird zunächst in Streifen geschnitten und anschließend durch Querschneiden in Quadrate geteilt. Diese Quadrate sollen eine Kantenlänge von maximal 4mm haben, damit eine gute Homogenisierung der Probe erreicht werden kann. Nach dem Durchmischen der Probe kann mit der Probenaufarbeitung (Abbildung 30 linke Seite) begonnen werden.

Für die Extraktion werden ca. 0,5 g (kann in Abhängigkeit von der Probe variiert werden) des homogenisierten Probenmaterials auf der Präzisionswaage in eine Extraktionshülse eingewogen. Für jede Probe wird dabei eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Extraktionshülse wird in den Soxhletaufsatz gegeben und mit dem Rückflusskühler und einem 100 ml Rundkolben, der mit 90 ml n-Hexan, den internen Standards und einigen Siedesteinen befüllt ist, auf dem Reihenwasserbad befestigt. Das Wasserbad wird auf ca. 95°C erhitzt und nach dem ersten Umlauf des Extraktionsmittels wird die Probe für 4 Stunden quantitativ extrahiert. Nach Ablauf der Zeit lässt man die Extraktionsapparatur auf Raumtemperatur abkühlen und überführt den Extrakt quantitativ unter Nachspülen in einen 100 ml Messkolben, welcher anschließend bis zur Marke mit n-Hexan aufgefüllt wird. Die so erhaltene Lösung kann direkt zur Messung am Gaschromatographen eingesetzt werden. In Abhängigkeit von der Analytenkonzentration in der Probe kann entweder die Messlösung verdünnt oder der Kalibrierbereich angepasst werden. Wenn bei einer Probe keine Informationen zur Konzentration der Analyten vorliegen, wird in einer verkürzten Extraktion der ungefähre Gehalt der Analyten in der Probe bestimmt. Dazu wird etwa 1 g der Probe auf der Präzisionswaage in einen Erlenmeyerkolben eingewogen und mit etwa 45 ml Toluol und internem Standard versehen. Der Erlenmeyerkolben wird mit einem Glasstopfen fest

verschlossen und die Probe für 20 Minuten auf dem Horizontalschüttler mit 150 Horizontalumdrehungen pro Minute extrahiert. Im Anschluss wird die Probe für weitere 20 Minuten im Ultraschallbad extrahiert. Der Extrakt wird anschließend in einen 50 ml Messkolben überführt und bis zur Marke mit Toluol aufgefüllt. Die so erhaltene Lösung ist ggf. nach Filtration zur Analyse am Gaschromatographen geeignet.

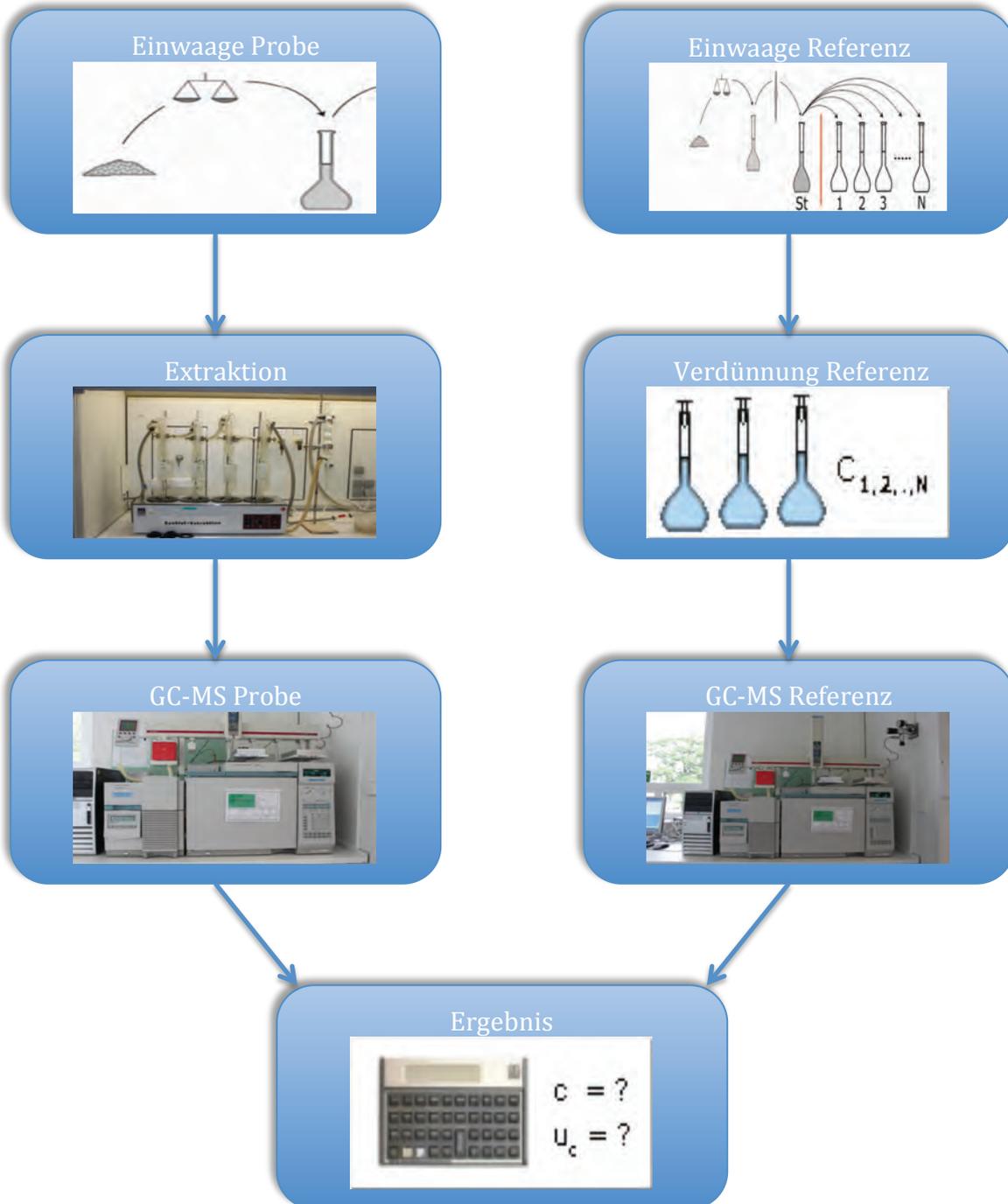


Abbildung 30: Flussdiagramm zur Darstellung des Ablaufes der quantitativen Bestimmung aktiver Inhaltsstoffe

Alternativ zu der oben beschriebenen Extraktion kann bei geringeren Analytkonzentrationen ein Extraktionsverfahren angewandt werden, dass etwa 95 % der aktiven Inhaltsstoffe erfasst und

einen kürzeren zeitlichen Aufwand erfordert. Für dieses Extraktionsverfahren werden ca. 1g des homogenisierten Probenmaterials mit Hilfe der Analysenwaage in ein 30 ml Reagenzglas mit Schliff eingewogen und mit 10 ml Toluol und internem Standard versetzt. Anschließend wird die Probe jeweils 10 Minuten auf dem Magnetrührer und 10 Minuten im Ultraschallbad extrahiert. Der Extrakt wird in einen 50 ml Messkolben überführt. Dieser Vorgang wird weitere viermal wiederholt und zum Abschluss der Messkolben bis zur Marke mit Toluol aufgefüllt. Die Lösung kann ggf. nach Filtration zur Bestimmung der Analyten auf den Gaschromatographen gegeben werden.

In der Entwicklung der Methode wurden die Verfahren gegenübergestellt und kritisch betrachtet. Das Verfahren der Soxhletextraktion dauert zwar am längsten und erfordert bei vielen Proben einen großen Einsatz an Glasgeräten, hat aber während der Extraktion den Vorteil, dass das Verfahren ohne weitergehende Betreuung erfolgen kann. Darüberhinaus gewährleistet nur dieses Verfahren die vollständige Extraktion aller aktiven Inhaltsstoffe aus der Probe.

Der nächste Schritt ist die Messung der Proben am Gaschromatographen, wobei zunächst der qualitative Nachweis der Analyten im Scan-Modus geführt wird. Anschließend erfolgt die quantitative Bestimmung der Analyten im Single Ion Monitoring (SIM). Die Parameter der Messung sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Geräteparameter für die Messung der Proben am Gaschromatographen im SIM.

Autosampler Sample Parameters Cleaning Parameters	Spritze	10 µl
	Injection Volume	1 µl
	Injection Speed	20 µl/s
	Fill Volume	3,0 µl
	Viscosity Delay	2,0 s
	Air Volume	2,0 µl
	Pre Injektion Delay	2,0 s
	Injektion Penetration	43 mm
	Vial Penetration	30 mm
	Preclean Sample	2
	Preclean Solvent	5
	Postclean Solvent	3
	Eject Speed	50 µl/s
	Injektor	Modus
Initial temperature		270°C
Pressure		8,64 psi
Purge flow		30,1 ml/min
Purge time		1,25 min
Total flow		34,0 ml/min
Gas saver		On
Saver flow		15,0 ml/min
Saver time		2,00 min
Gas type	Helium	

Ofen	Initial temperature Maximum temperature Initial time Equilibration time Post temperature Post time Run time Rampen	75°C 350°C 0,00 min 0,50 min 75°C 0,00 min 32,07 min <table border="1" data-bbox="922 495 1385 723"> <thead> <tr> <th>#</th> <th>Rate[°/min]</th> <th>Final temp.</th> <th>Final time</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>15,00</td> <td>180</td> <td>6,00</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>75,00</td> <td>260</td> <td>9,00</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>20,00</td> <td>350</td> <td>4,50</td> </tr> </tbody> </table>	#	Rate[°/min]	Final temp.	Final time	1	15,00	180	6,00	2	75,00	260	9,00	3	20,00	350	4,50
#	Rate[°/min]	Final temp.	Final time															
1	15,00	180	6,00															
2	75,00	260	9,00															
3	20,00	350	4,50															
Transfer Line	Initial temperature Initial time	280°C 0,00 min																
Detektor	MS Acquisition Parameters Tune file Acquisition Mode Solvent Delay EM absolute EM Offset Resulting EM Voltage Detektor off SIM Parameters Group 1 Group ID Resolution Ions (m/z), (Dwell time) Group 2 Group ID Resolution Group Start Time Ions (m/z), (Dwell time) Group 3 Group ID Resolution Group Start Time Ions (m/z), (Dwell time) Group 4 Group ID Resolution Group Start Time Ions (m/z), (Dwell time) MS Zones MS Quad MS Source	atune.u SIM 6,00 min false 24 1447,1 29,0 min DEET/IR 3535/IBP low 84, 119, 121, 130, 138, 172, 190, (75) DEHP/PBO low 14,70 min 149, 167, 176, (75) CPM/TPM/EFPX/CYFL low 19,50 min 135, 163, 167, 183, 197, 206, (75) FVL/DMT low 23,60 min 167, 181, 253, (75) 150°C maximum 200°C 230°C maximum 250°C																

Die Geräteparameter der SCAN-Methode für die Identifizierung der Analyten sind mit denen der SIM-Methode bis auf die Detektoreinstellungen identisch. Der Detektor zeichnet für die qualitative Bestimmung das Massenspektrum zwischen 35 und 450 amu bei einem Threshold von 150 auf.

3.1.4. Auswertung

Für die Auswertung werden die Flächen der Analyten durch die Flächen der zugehörigen internen Standards dividiert und die so erhaltene relative Fläche in die, aus der Kalibration des Analyten erhaltene, Regressionsfunktion eingesetzt und unter Berücksichtigung der Verdünnung und der flächenbezogenen Masse (DIN, 1997) der Gehalt des Analyten in Milligramm pro Quadratmeter Moskitonetz berechnet.

$$\text{Gehalt Analyt [mg/m}^2\text{]} = \frac{c [\mu\text{g/ml}] \cdot 100_v \cdot F \cdot \text{FBM [g/dm}^2\text{]} \cdot 100_n}{\text{Einwaage [g]} \cdot 1000_m}$$

- mit
- c Konzentration des Analyten in der Messlösung in $\mu\text{g/ml}$. Berechnet mittels externer Kalibration und linearer Regression der eingesetzten Standardsubstanz.
 - F Verdünnungsfaktor bei Verdünnung der Probe nach der Extraktion.
 - FBM Flächenbezogene Masse des Moskitonetzes in g/dm^2 .
 - 100_v Umrechnung von 1 ml Messlösung auf 100 ml Probelösung.
 - 100_n Umrechnung von Quadratdezimeter auf Quadratmeter Moskitonetz
 - 1000_m Umrechnung von μg auf mg Probe.

Die Erstellung der Regressionsfunktion erfolgt mit einem MS Excel – Datenblatt und / oder des von Dr. Hauke Petersen (Zentrales Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr Kiel) entwickelten auf Excel basierenden Rechentools SAAD (Statistische Auswertung von Analysendaten). Beide Rechenwege wurden gegenübergestellt und führen zu denselben Ergebnissen. Im Weiteren werden die Ergebnisse gegebenenfalls grafisch oder tabellarisch aufgearbeitet. Die qualitative Bestimmung der Analyten erfolgt über den Vergleich der Retentionszeiten der Peaks und den Vergleich des Massenspektrums des Analyten mit einem Referenzspektrum. Nur wenn beide Vergleiche übereinstimmen, wird die Identität der Substanz als bestätigt angesehen.

3.2. Bestimmung der insektiziden Aktivität

Zur Bestimmung der insektiziden Aktivität der untersuchten Substanzen und Substanzkombinationen wurde der durch die WHO beschriebene „Cone Test“ (WHO, 2005) in leicht modifizierter Form eingesetzt (FAULDE *et al.*, 2010). Die mit diesem Test erzielten Ergebnisse geben Aufschluss über Wirkstärke und Wirkgeschwindigkeit der insektiziden Agenzien und

werden angegeben als 100 % Knockdown - und 100 % Kill – Aktivität (FAULDE *et al.*, 2003; HOFFMANN, 1995).

3.2.1. Materialien und Hilfsmittel

- Versuchstiere: 5-8 Tage alte erwachsene weibliche Gelbfiebermücken der Gattung *Aedes aegypti*, die noch keine Blutmahlzeit zu sich genommen hatten. Die Gewinnung der Versuchstiere erfolgte aus Eiern des über 40 Jahre alten „Berlin –Stammes“ von *Aedes aegypti*, die vom Umweltbundesamt (Berlin, Deutschland) bezogen wurden. Für die Anzucht wurden die Eier in destilliertem Wasser suspendiert und nach der Entwicklung zum Larvenstadium mit homogenisiertem Fischfutter (Tetramin) bis zum Erreichen des adulten Stadiums gefüttert. Die adulten Stechmücken wurden mit 10 %iger Saccharoselösung bis zur Versuchsdurchführung gefüttert. Während der gesamten Entwicklungszeit wurde ein Klima von 27°C und 70 % relativer Luftfeuchtigkeit aufrechterhalten. Über die gesamte Studie wurde mit einem Tag-Nacht Rhythmus von 12 Stunden Helligkeit und 12 Stunden Dunkelheit gearbeitet.
- Glastrichter mit 13 cm Durchmesser
- Reagenzgläser
- Stoppuhren
- 0,1 molare Natriumhydroxidlösung
- Zellstoff
- Imprägnierte Netzmaterialien der Größe 25 x 25 cm
- Unimprägniertes Netzmaterial der Größe 25 x 25 cm
- Inerte Plastikunterlagen
- 10 % Saccharoselösung
- Fischfutter

3.2.2. Durchführung

Bei der Durchführung des „Trichtertests“ („Cone Test“) werden die zu untersuchenden textilen Flächengebilde einlagig auf eine inerte Plastikfolie gelegt und mit einem Glastrichter (13 cm Durchmesser) bedeckt. Um die Flucht der Testtiere zu verhindern, wird der obere Trichterrand mit gerolltem Zellstoff verschlossen. Dieser Verschluss garantiert einen ausreichenden Sauerstoffaustausch, verhindert aber das Entweichen der Testarthropoden. In gleicher Weise, wie die zu untersuchenden textilen Flächengebilde, wird ein unbehandeltes Moskitonetz bei jeder Versuchsreihe mitgeführt und das Verhalten der Testarthropoden in diesem „Blindversuch“ beobachtet. Nur wenn bei diesem „Blindversuch“ keine adversen Effekte auf die eingesetzten Testarthropoden zu beobachten sind, können die Ergebnisse verwendet werden. Die Glastrichter werden vor der Verwendung mit 0,1 N Natriumhydroxidlösung dekontaminiert und anschließend mit Wasser abgewaschen. In diesen Versuchsaufbau werden pro Ansatz 10 adulte weibliche

Stechmücken der Gattung „*Aedes aegypti*“ eingebunden. Dazu werden die Testtiere mit einem Reagenzglas eingefangen und zur Reduktion der Mobilität für 30 Minuten einer Temperatur von 10 °C ausgesetzt. Anschließend werden sie über die obere Trichteröffnung auf die Probe aufgebracht und die Trichteröffnung wieder mit Zellstoff verschlossen. Während des Versuches



Abbildung 31: Versuchsaufbau des „Trichtertests“ mit der Gelbfiebermücke *Aedes aegypti* im Labor des ZInstSanBw Koblenz LA I

werden die Testarthropoden möglichst permanent dem textilen Flächengebilde ausgesetzt. Dies geschieht dadurch, dass die Testtiere bei dem Versuch auf der Glaswandung oder dem Zellstoff zu landen, durch leichtes Klopfen wieder auf das Probenmaterial gezwungen werden. Während des gesamten Versuchszeitraumes wird das Verhalten der

Testarthropoden beobachtet und die Anzahl der immobilisierten und der toten Testarthropoden dokumentiert. Der Versuch wird beendet, wenn alle Testarthropoden

getötet sind oder wenn ein Zeitraum von 24 Stunden verstrichen ist. Nach Beendigung des Versuches werden die Versuchstiere gesammelt und fachgerecht entsorgt. Die Glastrichter werden autoklaviert und können danach wieder verwendet werden; die Plastikunterlagen werden zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen entsorgt. Jede Versuchsserie wurde mindestens als Doppelbestimmung durchgeführt.

3.2.3. Auswertung

Die Auswertung der „Trichtertests“ erfolgt über die gemessenen Zeiten bis zur Unfähigkeit aller Testarthropoden, sich zu bewegen oder zu fliegen (100% Knockdown time) (FAULDE *et al.*, 2003; HOFFMANN, 1995) und des Beginns einer permanenten Rückenlage ohne weitere Bewegung der Testarthropoden als 100 % Kill time (FAULDE *et al.*, 2010). Die Bewertung der erhaltenen Daten erfolgt nach Berechnung der Standardabweichung mit Hilfe von statistischen Testmethoden, welche die Signifikanz der Ergebnisse feststellen. Die Aufbereitung der Ergebnisse erfolgt darüber hinaus graphisch oder tabellarisch.



Abbildung 32: Aufnahme eines adulten Weibchens der Gattung *Aedes aegypti* nach Exposition mit einem imprägnierten Moskitonetz. Das Versuchstier liegt auf dem Rücken und zeigt keinerlei Bewegungsaktivität. Tiere in dieser permanenten Rückenlage zeigen einen irreversiblen „Kill-Effekt“ und werden als tot bewertet.

3.3. Bestimmung der Repellentaktivität

Um die Effizienz der textilen Flächengebilde, Stechmücken von der Haut fernzuhalten, zu testen, wurden diese in einem „Arm in Cage“-Test auf ihre Repellentaktivität untersucht. Diese häufig für dermal applizierbare Repellents angewendete Testanordnung (GRIFFIN and LAGAKOS, 2008; MASETTI and MAINI, 2007) wurde für diese Arbeit als Simulation eines worst-case Szenarios gewählt, um den Schutz der textilen Flächengebilde vor stechenden Mücken zu beurteilen. Mit Hilfe dieses Testansatzes können verschiedene Endpunkte analysiert werden. Neben dem Durchstichschutz ist das unter anderem das Auftreten eines „Deterrent-Effekts“ (Abschreckung der Insekten durch verschiedene parallele Wirkungs- und Verarbeitungsmechanismen (FAULDE, 2001; FAULDE, 2010)), eines „Space-Effekts“ (Vermeidung eines direkten Kontaktes mit den imprägnierten textilen Flächengebilden sichtbar durch einen Abstand zwischen den Versuchstieren und dem imprägnierten Material (FAULDE *et al.*, 2010)), eines „Hot-Feet-Effekts“ (Verringerung der Verweildauer der Insekten auf den textilen Flächengebilden mit dem Eindruck, dass der Kontakt mit dem Netz durch Anheben der Beine verringert wird (APPEL *et al.*, 2008; FAULDE *et al.*, 2010)) und einer 100%igen Landungsprotektion (Vollständiges Ausbleiben von Landungen der Versuchstiere auf dem textilen Flächengebilde über einen definierten Zeitraum (FAULDE *et al.*, 2010)). Wegen des hohen Einsatzes an Testtieren, kann diese Testanordnung nur begrenzt eingesetzt werden.

3.3.1. Materialien und Hilfsmittel

- Versuchstiere: Pro Versuch etwa vierhundert 5-20 Tage alte, weibliche Gelbfiebermücken der Art *Aedes aegypti*, die noch keine Blutmahlzeit zu sich genommen hatten. Die Gewinnung der Versuchstiere erfolgte aus Eiern des über 40 Jahre alten „Berlin – Stammes“ von *Aedes aegypti*, die vom Umweltbundesamt (Berlin, Deutschland) bezogen wurden. Für die Anzucht wurden die Eier in destilliertem Wasser suspendiert und nach der Entwicklung zum Larvenstadium mit homogenisiertem und zerkleinertem Fischfutter

(Tetramin) bis zum Erreichen des Stadiums der adulten Stechmücke gefüttert. Die adulten Stechmücken wurden mit 10 %iger Saccharoselösung bis zur Versuchsdurchführung gefüttert. Während der gesamten Entwicklungszeit wurde ein Klima von 27°C und 70 % relativer Luftfeuchtigkeit aufrechterhalten. Über die gesamte Studie wurde mit einem Tag-Nacht Rhythmus von 12 Stunden Helligkeit und 12 Stunden Dunkelheit gearbeitet.

- Testkäfige: 40 x 60 x 40 cm aus weißem Teflon mit einem Deckel aus Plexiglas. An der Vorderseite befindet sich eine Öffnung mit einem Einlass aus Baumwolle und an den Seiten sind jeweils 40 x 25cm große Öffnungen angebracht, die dem Luftaustausch dienen und mit stechmückensicheren sehr feinen Netzen verschlossen sind (Abbildung 33). Der Einlass dient gleichermaßen dem Schutz unbedeckter Hautareale und der Verhinderung des Entkommens der Testtiere aus dem Käfig.
- Laborhandschuhe
- Gummibänder zum Fixieren der textilen Flächengebilde
- Stoppuhr
- Testtextilien der Größe 35 x 25 cm
- Nicht imprägniertes Testmaterial als Negativkontrolle (25 x 35 cm)



Abbildung 33: Aufnahme eines Käfigs während der Durchführung eines Tests zur Bestimmung der Repellentaktivität

3.3.2. Durchführung

Zur Durchführung des Versuches wird zunächst das nicht imprägnierte Testmaterial mit einem Gummiband und einem Laborhandschuh am Oberarm befestigt und in den Testkäfig eingeführt (Abbildung 33). Wenn die Testarthropoden auf dem Material landen und Stichversuche unternehmen wird der Arm wieder aus dem Käfig entfernt und die Versuchsanordnung als „ready to use“ angenommen. Anschließend wird das zu untersuchende Testmaterial in gleicher Weise am Oberarm befestigt und zur Exposition in den Testkäfig eingeführt. Mit Exposition des Armes im Testkäfig wird die Stoppuhr gestartet und der Arm für fünf Minuten im Käfig belassen. Während der Exposition des Armes gegenüber den Testarthropoden wird darauf geachtet, dass der Arm möglichst permanent in der selben Position gehalten wird. Insbesondere hektische Bewegungen, welche die Testarthropoden vertreiben könnten, sind unbedingt zu vermeiden. Das Verhalten der Testarthropoden wird über den gesamten Zeitraum beobachtet und per Foto und Video dokumentiert. Nach fünf Minuten wird der Arm wieder aus dem Käfig genommen, wobei darauf zu achten ist, dass keine Testarthropoden den Käfig verlassen. Nach Entfernen des Testmaterials wird das Verhalten der Testarthropoden während des Versuches schriftlich dokumentiert und die Gesamtanzahl der Stiche auf dem Arm wird gezählt.

3.3.3. Auswertung

Für die Auswertung der Versuchsanordnung werden aus den dokumentierten Parametern verschiedene Endpunkte verglichen. Ein Landungsschutz von 100 % wird nur dadurch erreicht, dass innerhalb von fünf Minuten keine Testarthropode auf dem Testmaterial gelandet ist. Dieser Parameter wird als „Ja oder Nein“ - Entscheidung dokumentiert. Aus der Anzahl der gelandeten Testarthropoden kann aber dennoch eine Abstufung des Landungsschutzes vorgenommen werden. Weiterhin wird die Anzahl der Stiche auf dem Arm gezählt und der Durchstichschutz des textilen Flächengebildes beurteilt. Wenn auf dem Arm keine Stiche nachweisbar sind, wird für die Textilie ein 100 % Durchstichschutz (FAULDE *et al.*, 2010) postuliert. Dieser Durchstichschutz korreliert im allgemeinen mit dem Landungsschutz, was aber nicht bedeutet, dass ein 100 % Durchstichschutz auch einen 100 % Landungsschutz aufweisen muss. Aus dem Verhalten der Testarthropoden kann ebenfalls der Repellenteffekt (hier „space-repellency“) beurteilt werden. Dieser ist dadurch gekennzeichnet, dass die Versuchstiere schon deutlich vor der Oberfläche des Testmaterials zurückgehalten werden und wird als „Space-Effekt“ bezeichnet. Dieser Effekt ist je nach Beschaffenheit des Testmaterials mehr oder weniger deutlich und wird abgestuft bewertet. Als weiterer Endpunkt wird der „Hot-Feet-Effekt“ (APPEL *et al.*, 2008) beobachtet. Bei der Landung auf dem Testmaterial wird beobachtet, ob die Versuchstiere versuchen den Kontakt mit dem Testmaterial zu vermeiden oder auch wieder davonfliegen, ohne einen Stechversuch zu unternehmen. Dieser Effekt ist bei Pyrethroiden als Symptom ihrer neurotoxischen Eigenschaften bekannt und wird hinsichtlich seiner Stärke beurteilt. Die beobachteten Endpunkte werden

dokumentiert und mit den analytischen Ergebnissen sowie den Ergebnissen der insektiziden Aktivität korreliert.

3.4. Durchführung der Waschversuche

Vor der Durchführung der Waschversuche galt es zunächst zu definieren, wie das Waschverfahren durchzuführen ist. Waschversuche mit imprägnierten Moskitonetzen können mit dem Standardwaschverfahren der WHO (WHO, 2005) durchgeführt werden. Dabei handelt es sich um eine Versuchsanordnung, die im Labormaßstab durchgeführt wird und bei der die Netzmaterialien in einem Becherglas mit einer definierten Menge an demineralisiertem Wasser und Seife (Savon de Marseille) für einen definierten Zeitraum gerührt und anschließend ausgespült wird. Der Vorteil dieser Versuchsanordnung ist die Vergleichbarkeit von Waschversuchen unterschiedlicher Laboratorien. Der Nachteil dieses Verfahrens ist allerdings der fehlende Realitätsbezug. Egal ob Hand- oder Maschinenwäsche, bei beiden Waschverfahren ist die mechanische Belastung des Netzmaterials deutlich höher als bei dem Standardwaschverfahren der WHO, so dass realistische Vorhersagen zur tatsächlichen Waschresistenz des Imprägnierungsverfahrens nicht getroffen werden können. Da es aber Ziel der Versuche war, ein möglichst realistisches Bild zu generieren, wurden die Netzmaterialien in Anlehnung an die DIN EN ISO 6330 (DIN, 2011) – Nichtgewerbliche Wasch- und Trocknungsverfahren zur Prüfung von Textilien – gewaschen. Die Bedingungen unter denen die Waschversuche durchgeführt wurden, werden nachfolgend beschrieben.

3.4.1. Materialien und Hilfsmittel

- Handelsübliche Waschmaschine mit Kurzprogramm 30 min
- Wasser geringer bis mittlerer Härte, eingestellt mit Wasserenthärtungsanlage auf ca. 7° dH
- 2 kg Beiladung aus 100 % Baumwolle
- Phosphatfreies Waschmittel ohne optische Aufheller und ohne Enzyme (Taxat Color[®], das für das Waschen imprägnierter Uniformen der Bundeswehr vorgeschrieben ist)
- Trockengestell, das ein Trocknen der Probenmaterialien im Liegen ermöglicht
- Garn verschiedener Farben zum Kennzeichnen des Probenmaterials
- Probenmaterial, dass in Abhängigkeit von der Anzahl der durchzuführenden Waschgänge eine entsprechende Größe aufweisen muss
- Plastikbeutel, wiederverschließbar

3.4.2. Durchführung

Das zur Untersuchung anstehende Probenmaterial wird zur besseren Identifikation mit einem Haushaltsgarn farbig gekennzeichnet. Anschließend wird jede Probe einzeln mit 2 kg Beiladung unter Zusatz von 10 g Waschmittel in der Waschmaschine gewaschen. Die Wassertemperatur

betrug 30° C; das Waschprogramm hatte eine Laufzeit von 30 min inklusive Spülen und Schleudern bei 800 Umdrehungen/Minute. Unmittelbar nach dem Waschvorgang wird die Probe aus der Waschmaschine entnommen, glattgestrichen und liegend für 2,5 Stunden getrocknet. Nach dem so beendeten Waschgang, werden von der Probe in Abhängigkeit von den anstehenden Untersuchungen Aliquote von 20 x 20 cm für die chemische Analytik und 25 x 35 cm für die biologischen Verfahren entnommen. Die Art und Zahl der zu entnehmenden Proben ist einem vor der Prüfung zu erstellenden Prüfplan zu entnehmen (Abbildung 34). Die entnommenen Proben werden in beschriftete, wiederverschließbare Plastiktüten verpackt und bis zur Untersuchung lichtgeschützt aufbewahrt. Um Kreuzkontaminationen zu vermeiden und die Verschleppung von aktiven Inhaltsstoffen auszuschließen, wird ein nicht imprägniertes Netz ebenfalls gewaschen. Die Beurteilung dieses Netzes findet am Ende des ersten Waschganges statt. Wenn zu diesem Zeitpunkt keine Verschleppung zu beobachten ist, wird angenommen, dass auch zu einem späteren Zeitpunkt keine Kontamination durch das Waschverfahren stattfindet.

3.4.3. Auswertung

Zur Bewertung der Waschversuche werden die in diesem Teil unter 3.1 und 3.2 beschriebenen Methoden gemeinsam verwendet. Mit Hilfe des gaschromatographischen Analysenverfahrens wird die durch das Waschen verursachte Abnahme des Gehaltes an wirksamen Inhaltsstoffen gemessen und durch die Bestimmung der insektiziden Aktivität wird der Einfluss dieser Konzentrationsabnahme in den textilen Flächengebilden auf die Arthropoden bestimmt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden miteinander korreliert und graphisch aufgetragen, so dass die Aktivität unterschiedlicher textiler Flächengebilde in Abhängigkeit von der Anzahl der Waschgänge festgestellt werden kann. Wichtigster Endpunkt für diese Versuchsanordnung ist die Beurteilung der Waschresistenz des untersuchten Materials. Dabei ist allerdings nicht zu erwarten, dass die Materialien völlig inert gegenüber Wasser, Tensiden und mechanischer Belastung reagieren, sondern es ist wichtig herauszufinden, welches Material mit welchem Imprägnierungsverfahren die höchste Stabilität und Waschresistenz aufweist und bei welchem die höchste Residualaktivität festzustellen ist.

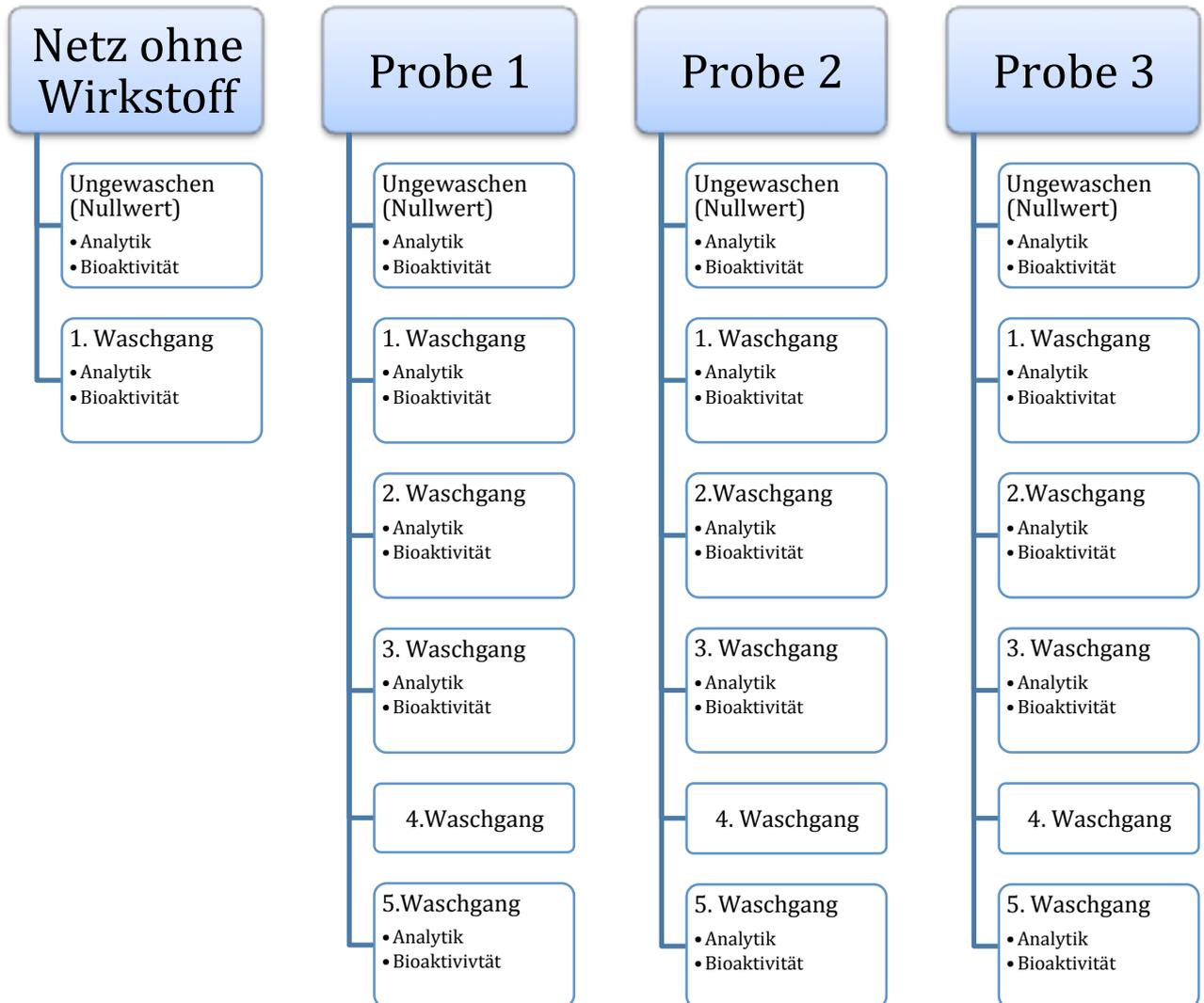


Abbildung 34: Beispiel eines Prüfplanes zur Durchführung eines Waschversuches

4. Ergebnisse

4.1. Entwicklung und Validierung einer Methode zur gaschromatographischen Bestimmung der aktiven Anteile von Repellentien und Insektiziden in textilen Bedarfsgegenständen

Die Schwierigkeit bei der Entwicklung der Methode bestand zum einen in der Erfordernis eine Multimethode für alle zu untersuchenden Substanzen zu entwickeln, und zum anderen das Extraktionsverfahren derart zu gestalten, dass die vollständige Extraktion der aktiven Inhaltsstoffe gewährleistet ist. Das Verfahren sollte darüberhinaus problemlos auf andere Laboratorien übertragbar sein, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse und eine breite Anwendbarkeit zu ermöglichen. Dazu sollte das verwendete Verfahren und die vorzuhaltende Ausstattung nicht zu speziell sein, sondern sich an üblicherweise vorhandener Laborausstattung orientieren.

Hinsichtlich des analytischen Verfahrens musste die Entscheidung zwischen einem flüssig- und einem gaschromatographischen Verfahren getroffen werden. Sowohl für Pyrethroide als auch für Diethyltoluamid sind beide Verfahren in der Literatur beschrieben (ABU-QARE and ABOU-DONIA, 2001; CHERSTNIAKOVA *et al.*, 2006), wobei es sich in diesen Fällen um Methoden der Rückstandsanalytik handelt und nicht alle der in der Methode zu erfassenden Substanzen abgedeckt werden. Die Entscheidung ein gaschromatographisches Verfahren zu verwenden, wurde auf Grund der einfacheren Probenaufarbeitung getroffen. Bei Verwendung eines unpolaren organischen Lösungsmittels, das für die Extraktion aller Analyten aus der textilen Matrix am besten geeignet ist, ist mit einem störenden Effekt von Matrixbestandteilen nicht in einem nennenswerten Umfang zu rechnen. Bei der Wahl des Extraktionsmittels musste ein Kompromiss zwischen Anwendbarkeit beim Extraktionsverfahren und Stabilität in der gaschromatographischen Bestimmung gefunden werden (MAŠTOVSKÁ and LEHOTAY, 2004).

4.1.1. Methodenentwicklung

Bei der Entwicklung der Methode stand zunächst die Bestimmung der ursprünglich für die Imprägnierung geplanten Substanzen im Vordergrund. Schnell stellte sich heraus, dass die Aufnahme weiterer Substanzen in die Methode sinnvoll sein würde, um mit dieser einen Methode auch vergleichende Untersuchungen anstellen zu können. So wurde im Verlauf der Arbeit die Methode um die Wirkstoffe IR 3535, Deltamethrin, Cyfluthrin und Piperonylbutoxid erweitert, wohingegen der Wirkstoff p-Menthandiol relativ schnell aus der Methode wieder herausgenommen wurde, weil sich herausstellte, dass insektizide Eigenschaften von Netzen mit

diesem Wirkstoff nur mit Konzentrationen erzielt werden können, die für den Verbraucher zu nicht akzeptablen sensorischen Belästigungen führen. Piperonylbutoxid wurde als letzte Substanz in das Spektrum mit aufgenommen, als in der aktuellen Literatur (N'GUESSAN *et al.*, 2010) Hinweise auf verstärkende Eigenschaften der Substanz in Kombination mit Pyrethroiden postuliert wurden. Zu Beginn der Methodenentwicklung wurde mit einem Teil der Analyten das Trennsystem entwickelt. Ausgewählt wurden hierfür die Analyten mit dem höchsten (Etofenprox) und tiefsten (Diethyltoluamid) Siedepunkt, sowie das Diastereomerenpaar Cis-Trans-Permethrin, dessen Trennung zur Bestimmung ihres Verhältnisses gewährleistet werden sollte. Als interner Standard wurde zunächst Aldrin verwendet und bei der analytischen Säule fiel die Wahl auf eine in analytischen Laboren weit verbreitete 5-Phenylmethylpolysiloxansäule. Abbildung 35 zeigt, dass die Trennung der Substanzen mit der Säule durchführbar ist und dass insbesondere das kritische Paar Cis-Trans-Permethrin getrennt ist.

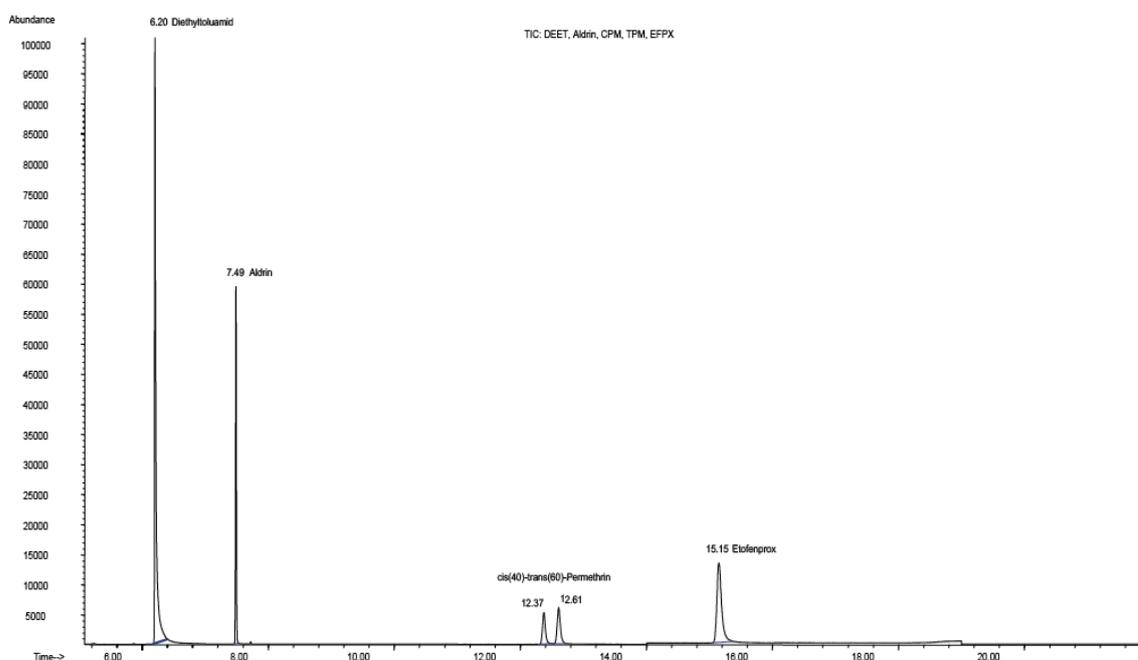


Abbildung 35: Chromatogramm von DEET, Aldrin, Cis-Trans-Permethrin und Etofenprox zu Beginn der Methodenentwicklung.

Mit der Kenntnis, dass die Methode grundsätzlich für die Bestimmung der Analyten anwendbar sein sollte, wurde mit der Optimierung der Methode begonnen. Hierbei galt es, dass in Abbildung 35 zu erkennende Tailing zu reduzieren und das Temperaturprogramm so zu entwickeln, dass weitere Substanzen in die Trennung eingebaut werden können. Um diese Anforderungen zu erfüllen wurde die Laufzeit der Methode erhöht, wobei die erste Temperaturrampe mit einem langsameren Anstieg gewählt wurde und die spätere Rampe schneller heizte. Erweitert wurde das Analytenspektrum um IR 3535 und Cyfluthrin, wodurch der langsamere Temperaturanstieg nötig wurde, da die Trennung von Diethyltoluamid und IR 3535 gewährleistet sein musste. Eine Trennung der Stereoisomere des Cyfluthrins wurde nicht angestrebt, da die Verwendung von

Cyfluthrin nur als Gemisch der Stereoisomere zu erwarten ist und andere Zusammensetzungen nicht verfügbar sind, so dass eine Bestimmung des Gehaltes über die Summe der Flächen angemessen ist. In Abbildung 36 ist die Weiterentwicklung der Methode dargestellt. Man erkennt,

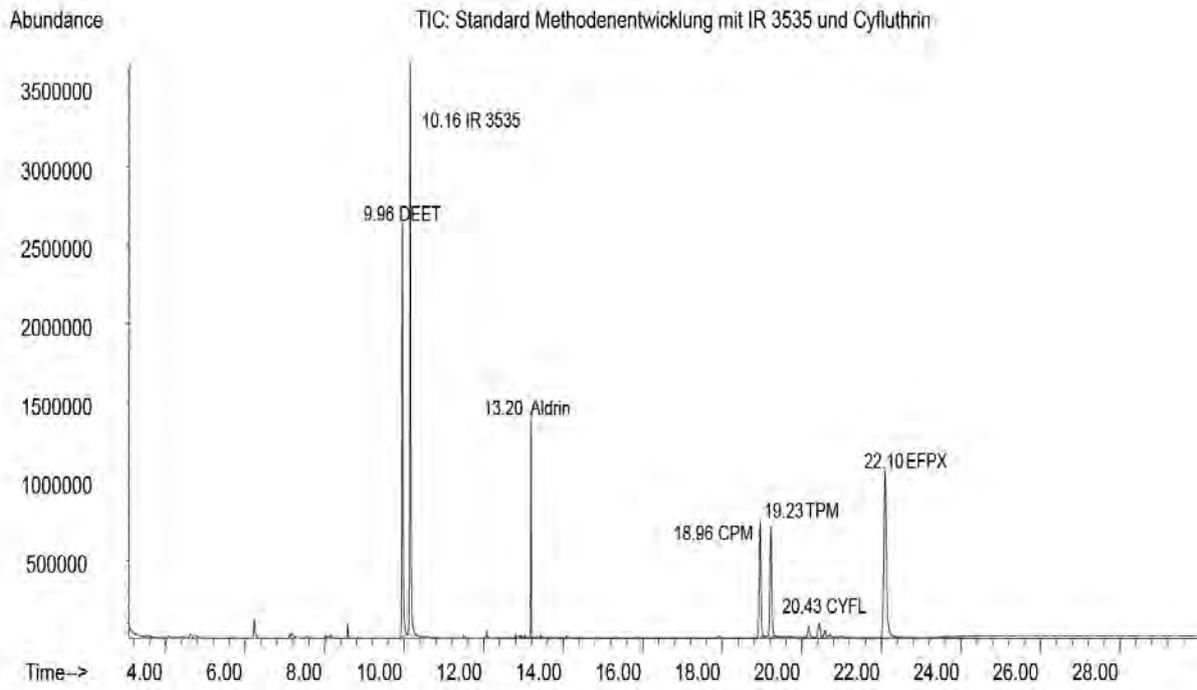


Abbildung 36: Chromatogramm der Erweiterung der Methode um die Analyten IR 3535 und Cyfluthrin mit ausreichender Auflösung aller kritischen Paare.

dass die neu hinzugefügten Analyten ausreichend aufgelöst im Chromatogramm erscheinen und dass im Vergleich zum Beginn der Methodenentwicklung die Schärfe der Peaks zugenommen und das Tailing abgenommen hat. Die Retentionszeiten der Analyten sind vergrößert, ohne dass eine Peakverbreiterung zu erkennen ist.

Die Methode war für die Bestimmung der genannten Analyten geeignet und wurde zur Verbesserung der Chromatographie zunächst nur leicht modifiziert, so dass die Auflösung und die Peakform der Analyten sich verbesserte (Abbildung 37). Dies erfolgte durch eine erneute Anpassung des Temperaturprogrammes und dem Wechsel von einer normalen 5-Phenylmethylpolysiloxansäule auf eine inzwischen zur Verfügung stehende Hochtemperatursäule desselben Materials.

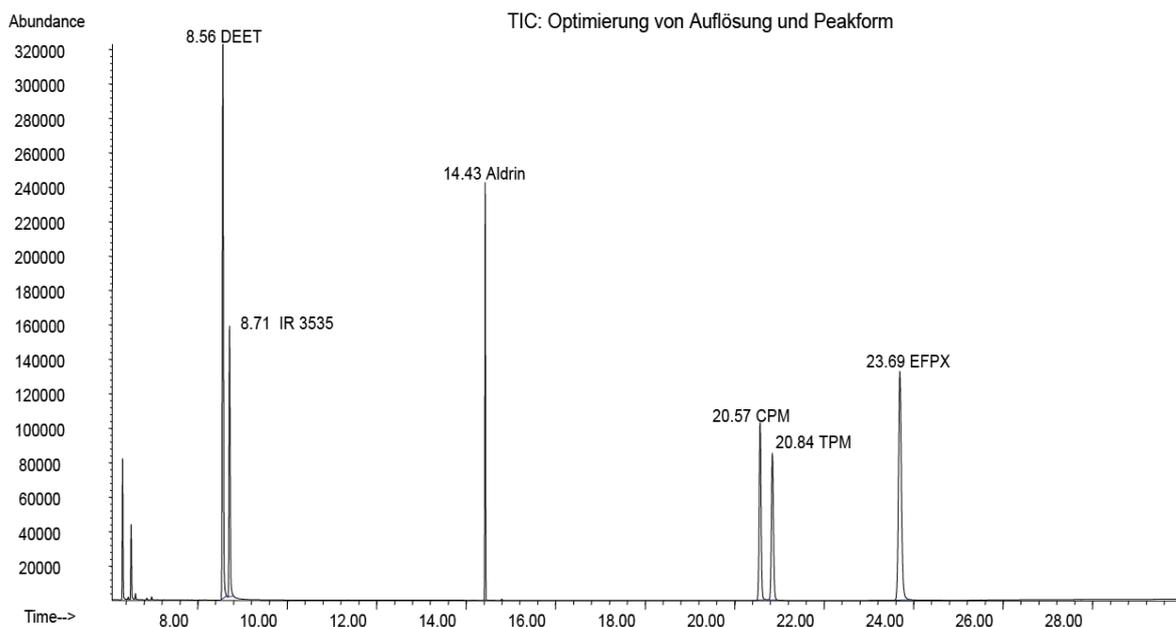


Abbildung 37: Weitere Optimierung der Methode durch Anpassung des Temperaturprogramms und Wechsel der analytischen Säule.

Zu erkennen ist eine verbesserte Auflösung der Permethrin-Peaks und eine verbesserte Symmetrie des Etofenprox-Peaks. Die letzte Veränderung der Methode wurde dann mit der Implementierung der Analyten Deltamethrin und Piperonylbutoxid vorgenommen.

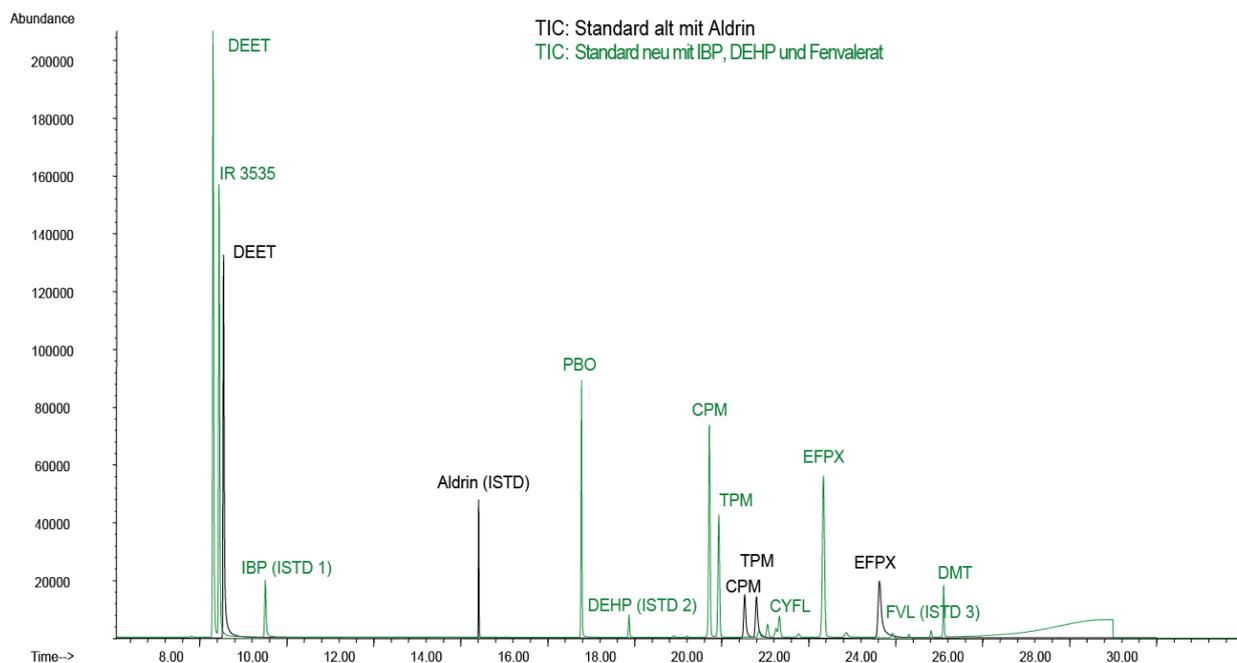


Abbildung 38: Overlay zweier Chromatogramme mit alten und neuen internen Standards.

Dabei wurde neben der Aufnahme der beiden Analyten auch ein Wechsel des internen Standards vorgenommen, da mit steigender Anzahl der Analyten auch eine größere Anzahl interner Standards für notwendig befunden wurde (Abbildung 38). Durch die Verwendung von drei internen Standards können die teilweise in sehr unterschiedlichen Konzentrationen in den Moskitonetzen vorliegenden Analyten nebeneinander bestimmt werden, ohne dass der interne Standard zu groß oder zu klein für einige Analyten wird. Besonders für Deltamethrin und die Repellentien ist das von großem Vorteil, da die Repellentien in vergleichsweise hoher Konzentration eingesetzt werden, während Deltamethrin in geringerer Konzentration eingesetzt wird und darüberhinaus ein vergleichsweise kleines Signal im Massenspektrum erzeugt. Für jeden Methodenschritt wurden grundsätzliche Validierungsparameter generiert, um den Gehalt der in der Entwicklung befindlichen Moskitonetze bestimmen zu können. Eine umfassende Validierung der Methode wurde mit den in Tabelle 9 aufgeführten Analyten durchgeführt und wird im folgenden Kapitel besprochen. Um die Richtigkeit der vor der vollständigen Validierung generierten Ergebnisse zu verifizieren, wurden die zuvor generierten Ergebnisse stichprobenartig überprüft. Diese Überprüfung lieferte keinen Hinweis darauf, dass die bisher generierten Ergebnisse anzuzweifeln wären.

4.1.2. Methodenvalidierung

Für die Validierung einer analytischen Methode sind diverse Richtlinien und Publikationen vorhanden, die das Vorgehen beschreiben. Im pharmazeutischen Bereich wird üblicherweise die ICH Guideline Q2 (R1) (ICH, 2005), im Bereich der Rückstandsanalytik das SANCO Dokument 10684 (COMMISSION, 2009) und im Bereich der Lebensmittelbedarfsgegenstände die Guideline des JRC (JRC, 2009) verwendet. Weitere Literatur zur Methodenvalidierung findet man beispielsweise im Schweizer Lebensmittelbuch (SLMB, 2004) oder den Publikationen von Hill (HILL and REYNOLDS, 1999) und Hoogerbugge (HOGERBUGGE and VAN ZONEN, 2000). Grundsätzlich unterscheidet sich das Vorgehen in den verschiedenen Dokumenten nicht wesentlich und die wichtigsten Parameter werden in allen Dokumenten gleichermaßen erwähnt. Das Vorgehen bei der nachfolgend beschriebenen Validierung entspricht in seiner Reihenfolge den Vorgaben der Guideline des JRC für ein „Full Single – Laboratory Method Validation Procedure“ (JRC, 2009). Die Messunsicherheit des Verfahrens wurde mit der Software „Uncertainty Manager“ der Firma VWR International bestimmt, die den Anforderungen des EURACHEM / CITAC Guide CG 4 und denen der DIN EN 17025 genügt.

Die wichtigsten Parameter, die für die Validierung einer neuen Methode, in welcher der Gehalt einzelner Analyten bestimmt werden soll, zwingend verifiziert werden müssen sind:

- Selektivität / Spezifität (Selectivity / Specificity)
- Linearität (Linearity)
- Arbeitsbereich (Range)
- Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze (LOD and LOQ)
- Richtigkeit (Accuracy)
- Präzision (Precision)
- Robustheit (Ruggedness)
- Messunsicherheit (Uncertainty)

4.1.2.1. Selektivität und Spezifität

Als Selektivität einer Methode wird die Fähigkeit bezeichnet, verschiedene Analyten ohne gegenseitige Störungen nebeneinander zu bestimmen und sie dadurch eindeutig zu identifizieren. Die Spezifität beschreibt die Fähigkeit einer Methode, eine Substanz ohne Verfälschung durch andere in der Probe vorhandene Komponenten zu erfassen und sie somit eindeutig zu identifizieren (KROMIDAS, 2000).

Selektivität und Spezifität der Methode werden in diesem Fall durch verschiedene Kennzahlen gewährleistet. Im Chromatogramm einer Standardlösung aller Analyten (Abbildung 39) ist zu erkennen, dass alle Substanzen voneinander getrennt sind. Die berechnete Auflösung der Peaks ist ausnahmslos größer als 2,0, so dass bei allen Peaks von einer Basislinientrennung (Auflösung > 1,5) auszugehen ist (Tabelle 9). Bei höheren Analytkonzentrationen wird die Auflösung beim

kritischen Paar DEET und IR 3535 zunehmend schlechter. Sie ist jedoch bis zum Verlassen des linearen Bereiches größer als 1,50 womit eine quantitative Bestimmung weiterhin möglich ist.

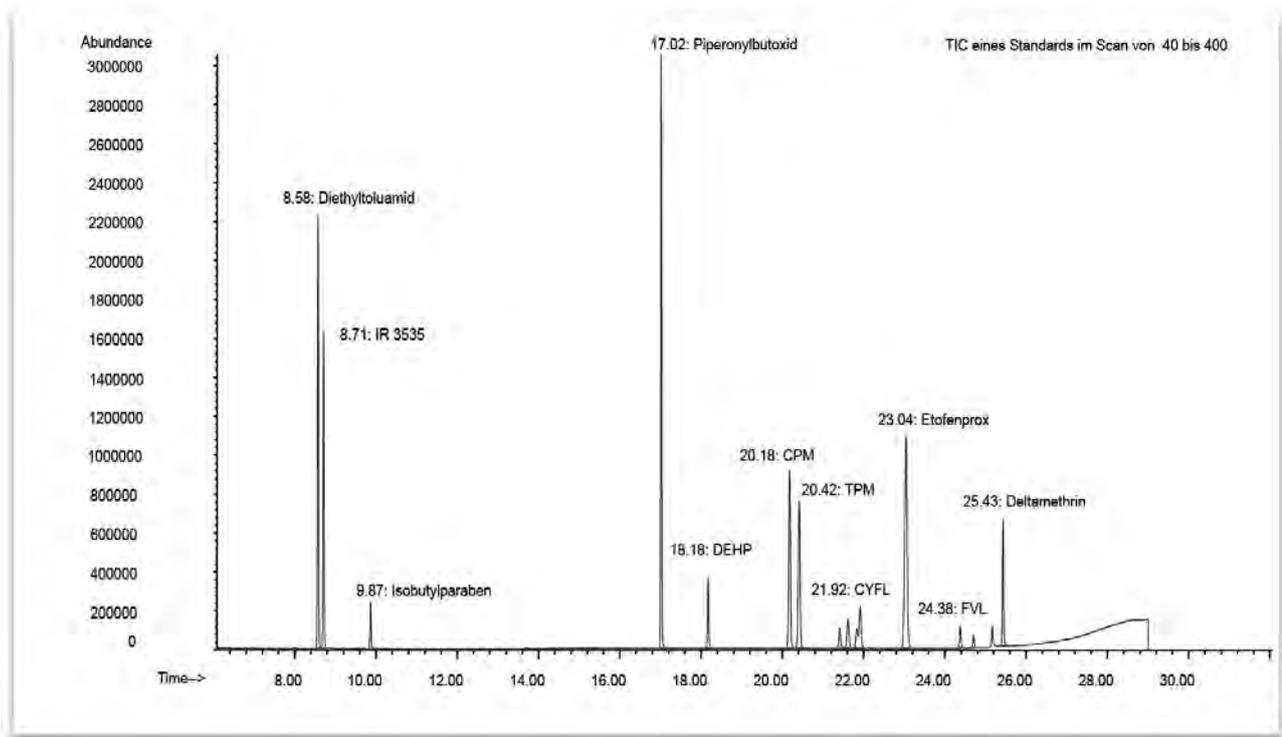


Abbildung 39: Chromatogramm aller Standardsubstanzen im SCAN – Modus. Die Aufnahme erfolgte von 40 bis 400 Masseneinheiten (m/z).

Die Berechnung der Auflösung und der Peaksymmetrie gemäß Ph.Eur. erfolgt nach folgenden Formeln:

Auflösung (Resolution):
$$R = \frac{\Delta t_R}{\bar{w}_b} = 1,18 \cdot \frac{[t_R(2) - t_R(1)]}{[w_h(1) + w_h(2)]}$$

- mit
- Δt_R = Differenz der Retentionszeiten
 - w_b = Mittelwert der Peakbasisbreiten
 - t_R = Retentionszeit
 - w_h = Peakbreite in halber Höhe

Peaksymmetrie (Tailing):
$$T = \frac{b_{0,1h}}{a_{0,1h}}$$

- mit
- $b_{0,1h}$ = Weg vom Lot des Peakmaximums zum Peakende in 10 % der Peakhöhe
 - $a_{0,1h}$ = Weg vom Peakbeginn zum Lot des Peakmaximums in 10 % der Peakhöhe

Peaksymmetrien zwischen 0,8 und 1,5 gelten als ausreichend symmetrisch für eine quantitative Auswertung (STAUFFER, 2008).

Tabelle 10: Auflistung der Analyten mit Retentionszeit, Peak-Peak Auflösung, Symmetrie, Fragmentionenverhältnis und relativer Retentionszeit bezogen auf den internen Standard Diethylhexylphthalat.

Analyt	R _t	rel. R _t	Resolution	Symmetrie	Target (T)	Qualifier (Q)	RatioT/Q
Diethyltoluamid	8.58	0.47	2.58	1.05	119	190	33.24
IR 3535	8.71	0.48	20.01	1.04	130	172	59.55
Piperonylbutoxid	17.02	0.93	20.91	0.99	176	149	20.23
Cis-Permethrin	20.18	1.11	2.89	1.03	183	163	19.06
Trans-Permethrin	20.42	1.12	2.89	1.00	183	163	25.78
Cyfluthrin	21.92	1.20	11.20	1.02	163	206	64.42
Etofenprox	23.04	1.27	12.22	1.06	163	135	15.93
Deltamethrin	25.43	1.39	8.35	0.99	181	253	68.87

Darüberhinaus werden die einzelnen Substanzen im SCAN-Modus über ihr Massenspektrum identifiziert und spezifisch nachgewiesen (Abbildungen 40 und 41).

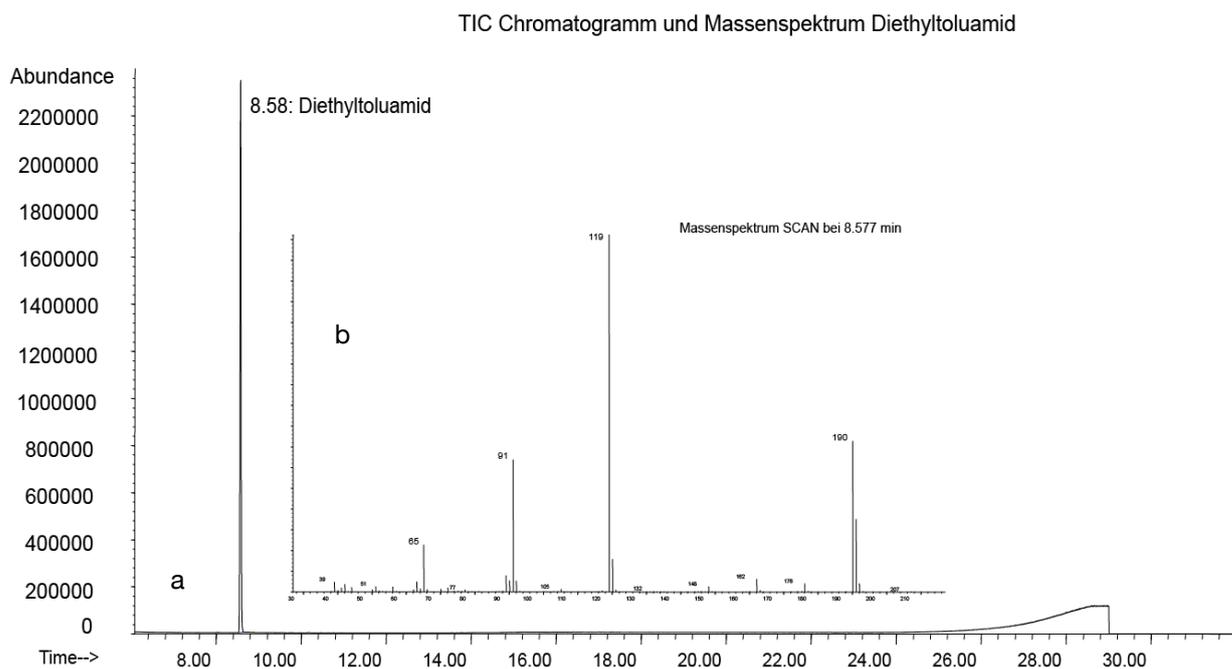


Abbildung 40: Chromatogramm (a) und Massenspektrum (b) von Diethyltoluamid im SCAN -Modus

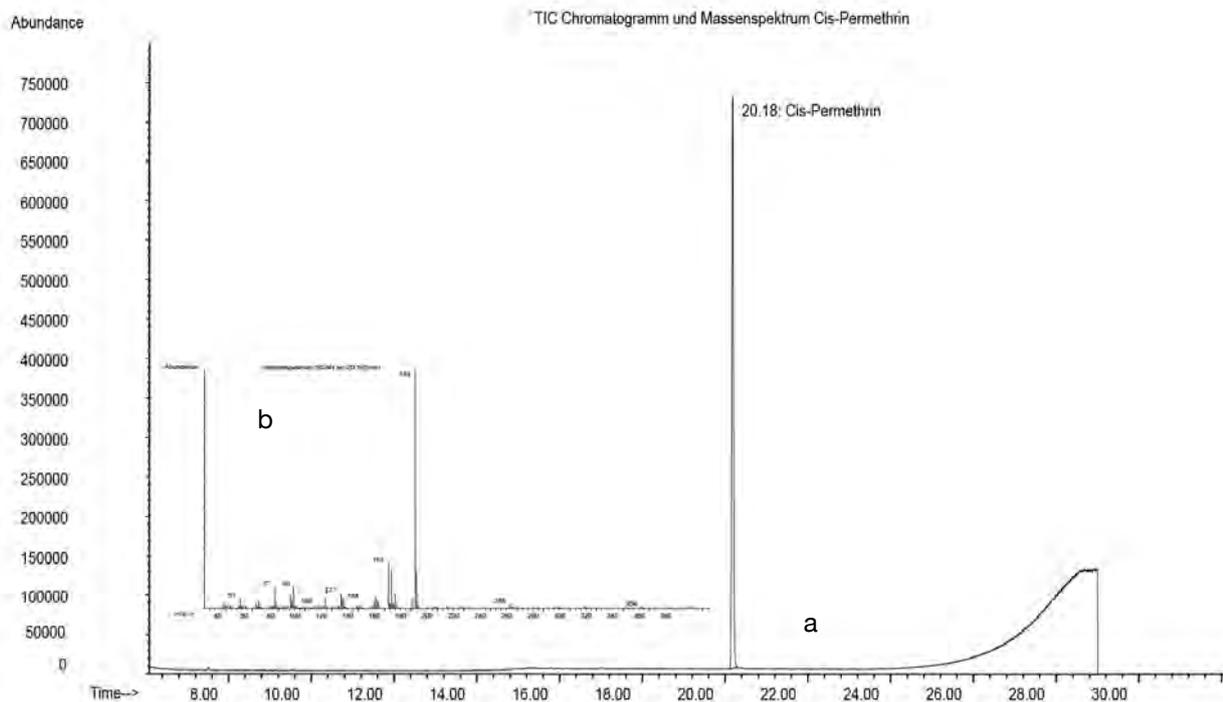


Abbildung 41: Chromatogramm (a) und Massenspektrum (b) Cis-Permethrin im SCAN-Modus

Die Chromatogramme und Massenspektren der anderen Analyten sind im Anhang 2 abgebildet. Aus den dargestellten Ergebnissen ist zu entnehmen, dass die Methode für die zu bestimmenden Substanzen sowohl selektiv als auch spezifisch ist.

4.1.2.2. Linearität und Arbeitsbereich

Die Linearität einer analytischen Methode ist definiert als der Bereich, in dem die erhaltenen Ergebnisse mit einer gewissen Streuung direkt proportional zur Konzentration des Analyten sind (ICH, 2005). Der Bereich, in dem für die Methode ein geeignetes Maß an Linearität, Präzision und Richtigkeit gezeigt werden kann, wird als Arbeitsbereich bezeichnet. Abbildung 42 zeigt exemplarisch die Linearität im nachgewiesenen Arbeitsbereich von 0,5 bis 60 mg/L für die Analyten Diethyltoluamid und Piperonylbutoxid. Die Arbeitsbereiche der übrigen Analyten gibt Tabelle 11 wieder; die zugehörigen Kalibriergeraden sind Anhang 3 zu entnehmen. Da der gezeigte Arbeitsbereich der Methode über mehrere Zehnerpotenzen verläuft, ist es in der Praxis nicht sinnvoll jedes Mal über diesen Bereich zu kalibrieren. In Abhängigkeit von dem erwarteten Gehalt an Wirkstoffen wird über einen kleineren Bereich kalibriert. In den meisten Fällen war dies der Bereich zwischen 5 und 50 mg /L; bei Waschversuchen und Moskitonetzen, die mit Deltamethrin imprägniert gewesen sind, war oftmals auch der Bereich zwischen 0,5 und 5 mg/L anzuwenden. Die Darstellung erfolgt an dieser Stelle nicht in der Angabe der Konzentration in Bezug auf die Fläche der Moskitonetze, da diese mit flächenbezogenen Massen zwischen 0,5 und 2 g/dm² nicht standardisierbar sind.

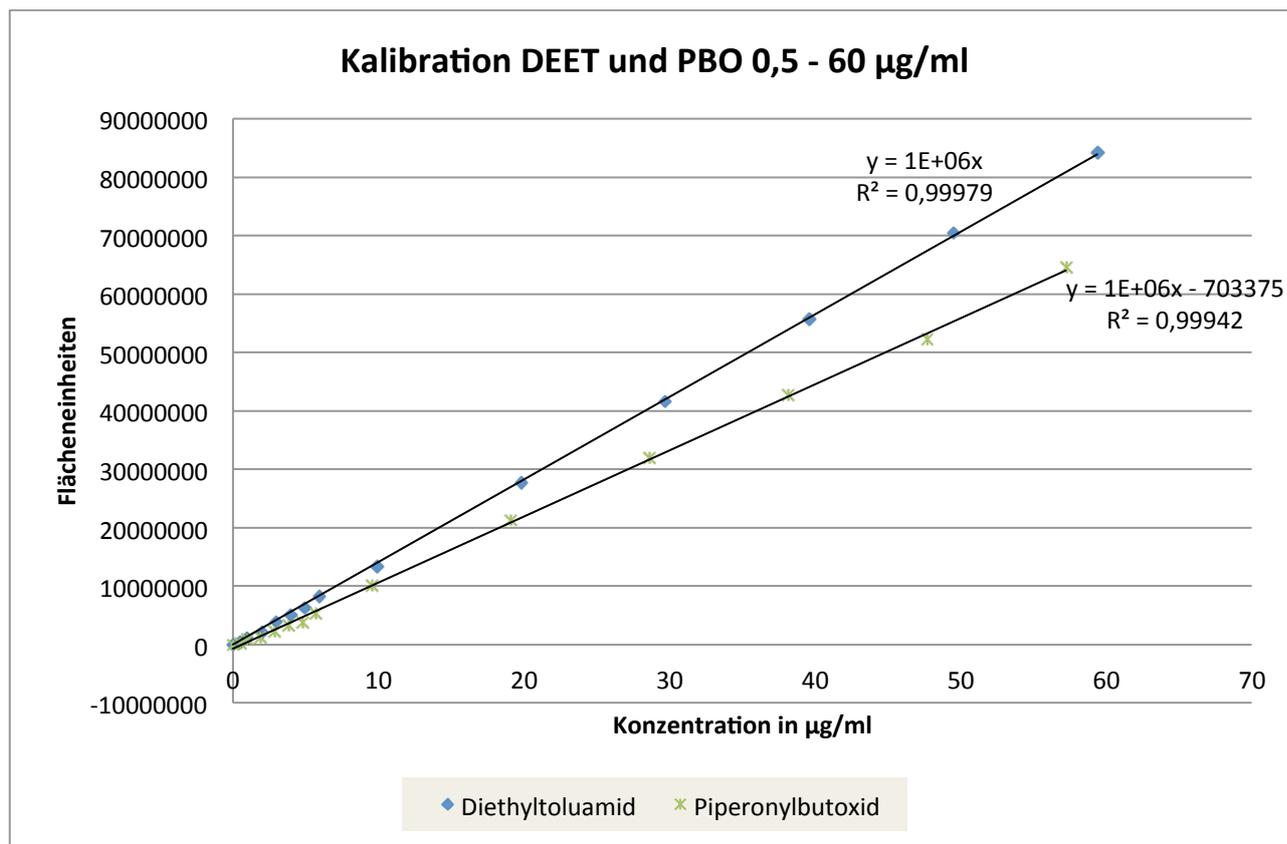


Abbildung 42: Darstellung einer Kalibration von Diethyltoluamid und Piperonylbutoxid über den Arbeitsbereich von etwa 0,5 bis 60 mg/L.

Tabelle 11: Darstellung der Arbeitsbereiche der unterschiedlichen Analyten mit Angabe der Korrelationskoeffizienten

Analyt	untere Grenze [mg/L]	obere Grenze [ml/L]	Korrelationskoeffizient
Diethyltoluamid	0,5	60	0,9998
IR 3535	0,5	60	0,9996
Piperonylbutoxid	0,5	60	0,9994
Cis-Permethrin	0,25	40	0,9991
Trans-Permethrin	0,25	40	0,9992
Cyfluthrin	0,5	60	0,9991
Etofenprox	0,5	60	0,9994
Deltamethrin	0,5	60	0,9988

Während der praktischen Tätigkeiten wurde, wie bereits erwähnt, über einen kleineren Bereich kalibriert. Für die Beurteilung dieser Kalibrationen wurde das auf Excel basierende SAAD – Programm verwendet, das zusätzlich zu den Korrelationskoeffizienten und der Geradengleichung (Abbildung 43) weitere statistische Kenndaten zur Charakterisierung der Kalibration berechnen kann. Dies sind, neben einem Residuenplot (Abbildung 44) und der relativen Unpräzision (Abbildung 45) der Kalibration, Aussagen zur Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze nach DIN 32645 und zur Verfahrensstandardabweichung sowie zum

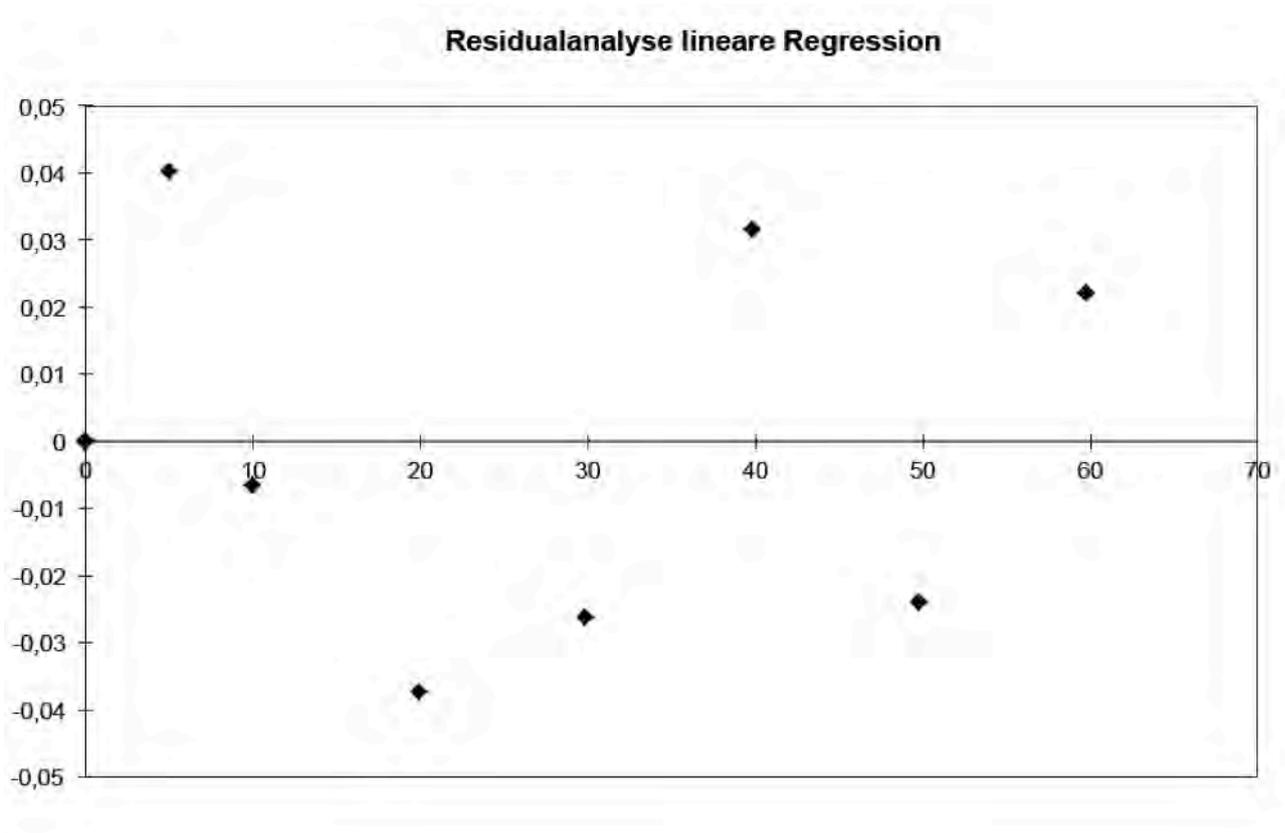


Abbildung 44: Residuenplot der Kalibration von Deltamethrin.

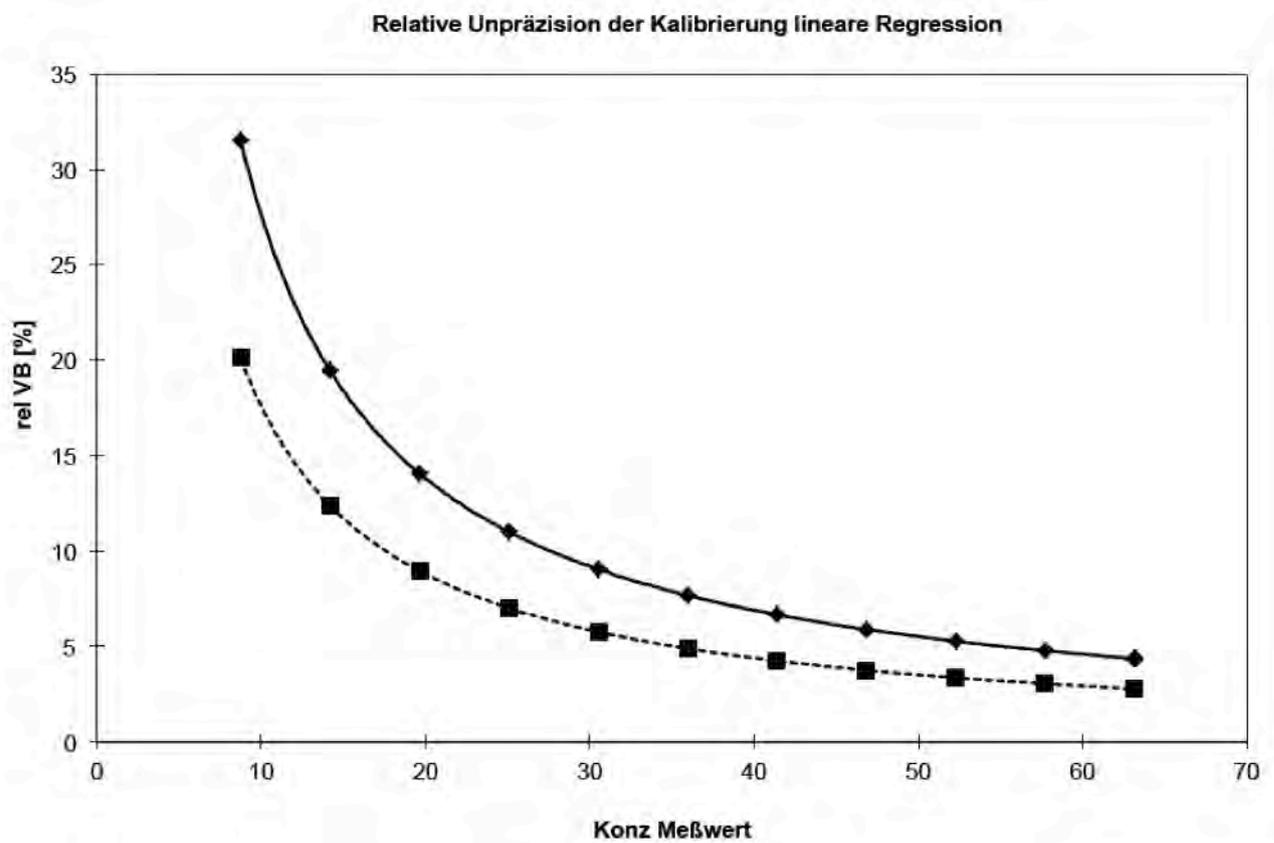


Abbildung 45: Relative Unpräzision der Kalibration von Deltamethrin.

Die Daten der übrigen Analyten werden der Übersichtlichkeit halber nicht detailliert dargestellt. Um den Nachweis zu führen, dass diese ebenfalls keine Trends im kalibrierten Bereich aufweisen, zeigt Abbildung 46 die Residuenplots aller Analyten bei einer Routinekalibration.

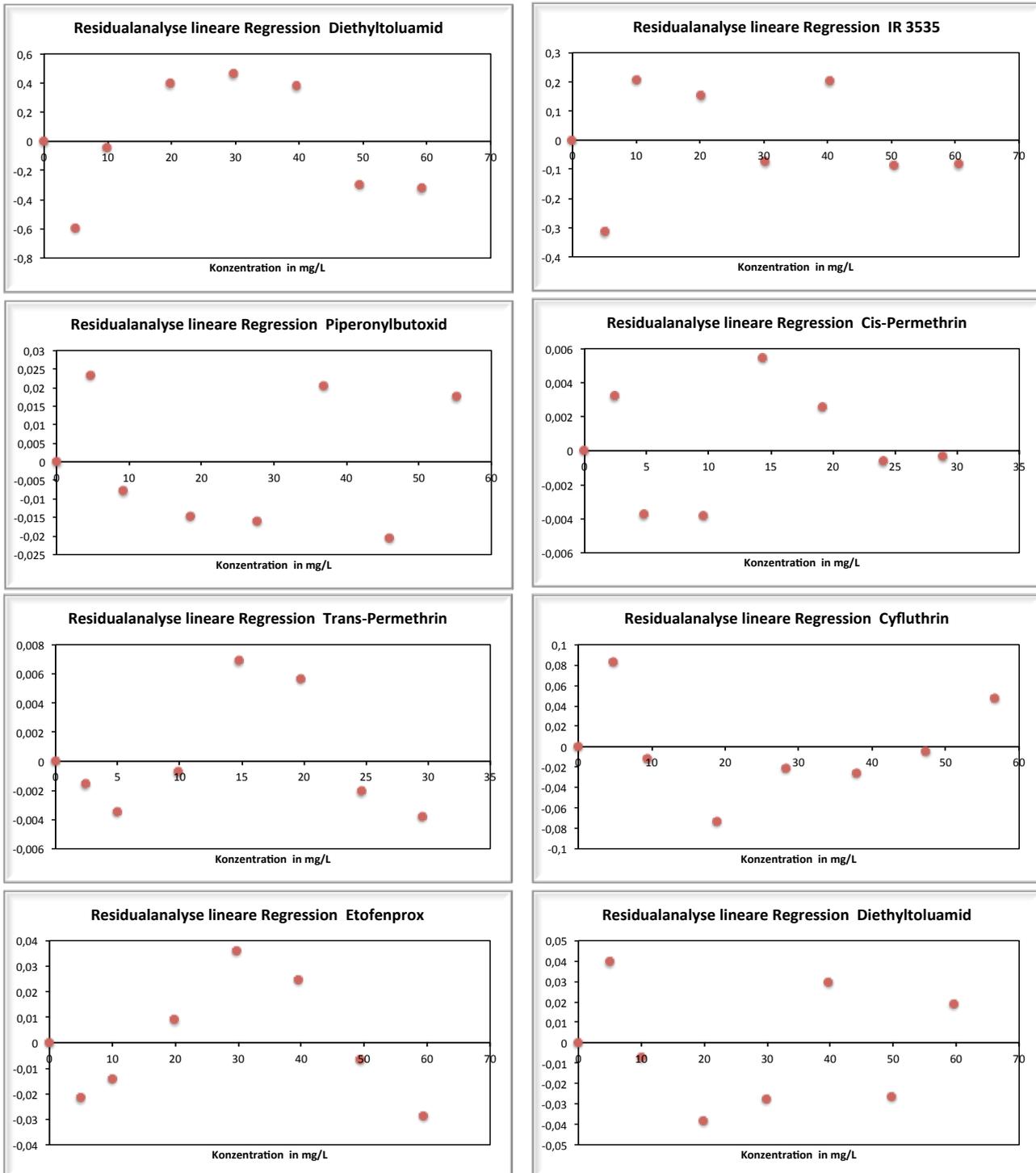


Abbildung 46: Residuenplots der einzelnen Analyten bei Kalibration in der Praxis

Zur Bestimmung der Proben wurde für jede Probenserie eine neue Kalibration mit sieben Kalibrierpunkten erstellt. Als Akzeptanzkriterien wurden ein Korrelationskoeffizient von mindestens 0,995, höchstens ein Ausreißer bei einem Grubbs-Test der Kalibration und keine erkennbaren

Trends im Residuenplot festgelegt. Die Gültigkeit der Kalibration über den Verlauf der Messungen wurde durch das Mitführen von Kontrollstandards gewährleistet. Die in den Abbildungen 43 bis 45 gezeigten statistischen Kennzahlen wurden für jeden Analyten und jede Kalibration neu bestimmt. Mit dem beschriebenen Arbeitsbereich können in der Praxis Proben bestimmt werden, deren Gehalt an aktivem Inhaltsstoff bei etwa 1 mg pro Quadratmeter textiles Flächengebilde liegt. Diese Bestimmungsgrenze ist bei ungewaschenen Proben in jedem Fall ausreichend, kann bei den Waschversuchen gegebenenfalls aber unterschritten werden. Durch eine Erhöhung der Einwaage ist in diesen Fällen jedoch ebenfalls eine Bestimmung möglich. Analytkonzentrationen unterhalb des beschriebenen Arbeitsbereiches zeigen in der Regel keine biologische Aktivität. Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Methode für alle untersuchten Analyten über den dargestellten Arbeitsbereich linear ist und das erhaltene Messsignal somit direkt proportional zur Konzentration der Analyten in der Probe ist.

4.1.2.3. Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Als Nachweisgrenze eines Verfahrens wird die kleinste Menge eines Analyten bezeichnet, die qualitativ noch erfasst werden kann (WELLMITZ and GLUSCHKE, 2005). Sie ist die Entscheidungsgrenze für das Vorhandensein einer Substanz und wird im englischen als Limit of Detection (LOD) bezeichnet (PETERS *et al.*, 2004). Die Bestimmungsgrenze eines Verfahrens ist analog zur Nachweisgrenze die kleinste Konzentration eines Analyten in einer Probe, die quantitativ bestimmt werden kann. Dabei ist an der Bestimmungsgrenze die relative Ergebnisunsicherheit 33% bei einem 99%igen Signifikanzniveau. Im englischen Sprachraum wird die Bestimmungsgrenze als Limit of Quantification (LOQ) bezeichnet (PETERS *et al.*, 2004). Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen des Verfahrens können mit verschiedenen Methoden bestimmt werden. Nach DIN 32645 (DIN, 2008) sind das die direkte Methode, die auch als Leerwertmethode bezeichnet wird, und die indirekte Kalibriergeradenmethode. In der chromatographischen Praxis und auch im europäischen Arzneibuch hat sich darüberhinaus die Bestimmung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze über das Signal-Rausch-Verhältnis bewährt. Die Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die einzelnen Substanzen wird dabei auf Basis des Signal-Rausch-Verhältnisses durchgeführt. Das Verfahren wird im Europäischen Arzneibuch unter 2.2.46 chromatographische Trennmethode beschrieben (COE, 2011) und nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Signal} - \text{to} - \text{Noise } [S/N] = \frac{2 \times H}{h}$$

mit H = Höhe des Peaks der betreffenden Komponente im Chromatogramm der Referenzlösung, gemessen vom Peakmaximum bis zur extrapolierten Basislinie des Signals die beidseitig gleichmäßig über eine Distanz, die dem 20fachen der Peakbreite in halber Höhe entspricht, betrachtet wird.

h = Bereich des Untergrundrauschens in einem Chromatogramm, das nach Einspritzen oder Auftragen einer Blindlösung erhalten wird, betrachtet über eine Distanz, die dem 20fachen der Peakbreite in halber Höhe des Peaks im Chromatogramm mit der vorgeschriebenen Referenzlösung entspricht und die möglichst gleichmäßig verteilt beiderseits der Stelle liegt, an der jener Peak auftreten würde.

Die Nachweisgrenze eines Verfahrens ist dabei definiert als der Punkt an dem das Signal-Rausch-Verhältnis 3 beträgt. Die Bestimmungsgrenze wird durch ein Signal-Rausch-Verhältnis von 10 beschrieben.

Bei der entwickelten Methode wurden Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für alle Analyten bei jeder Kalibration mit dem SAAD-Programm durch die Kalibriergeradenmethode nach DIN 32645 bestimmt. Da der Arbeitsbereich in den meisten Fällen deutlich über der tatsächlichen Nachweis- und Bestimmungsgrenze der Methode lag, wurden in einem Zusatzversuch die Kalibrierlösungen so lange verdünnt, bis die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen über die Signal-Rausch-Verhältnis Methode erreicht wurden. Auf Grund der unterschiedlich starken Ionisierung im Massenanalysator unterscheiden sich die so erhaltenen Ergebnisse z.T. deutlich voneinander (Tabelle 12). Den Empfehlungen der ICH für Gehaltsbestimmungen folgend (ICH, 2005), wäre die Bestimmung von Nachweis- und Bestimmungsgrenzen nicht zwingend erforderlich gewesen, dennoch wurden sie der Vollständigkeit halber berechnet.

Tabelle 12: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Methode zur Bestimmung von Repellentien und Insektiziden in mg/L nach DIN 32645 (Kalibriergeradenmethode) und über Signal-Rausch-Verhältnis.

Analyt	LOD DIN 32645 [mg/L]	LOD DIN 32645 [mg/L]	LOD S/N [mg/L]	LOQ S/N [mg/L]
Diethyltoluamid	0,6	1,9	0,001	0,002
IR 3535	0,4	1,2	0,002	0,004
Piperonylbutoxid	0,2	0,8	0,004	0,008
Cis-Permethrin	0,03	0,1	0,003	0,006
Trans-Permethrin	0,05	0,2	0,004	0,008
Cyfluthrin	0,3	0,8	0,032	0,096
Etofenprox	0,2	0,6	0,003	0,006
Deltamethrin	0,2	0,8	0,008	0,016

Aus den Ergebnissen ist zu erkennen, dass im Routinebetrieb die Leistungsfähigkeit der Methode nicht ausgeschöpft wird. Wenn erforderlich können mit der Methode auch deutlich geringere

Gehalte an Repellentien und Insektiziden bestimmt werden. Da aber mit den Moskitonetzen eine toxikologisch relevante Wirkung erzielt werden soll, sind auf den Netzen üblicherweise nicht nur Spuren der Analyten vorhanden. Grundsätzlich ist die Leistungsfähigkeit der Methode hinsichtlich der Nachweis- und Bestimmungsgrenze in jedem Fall ausreichend, um selbst geringe Mengen an Analyten in den imprägnierten Moskitonetzen nachzuweisen.

4.1.2.4. Richtigkeit

Richtigkeit wird definiert als die systematische Abweichung eines gemessenen Wertes vom „wahren“ Wert (SLMB, 2004). Im Englischen werden für die Richtigkeit die Werte *trueness* und *accuracy* synonym verwendet (ICH, 2005). Da für die Bestimmung der Richtigkeit eines Analysenverfahrens der „wahre“ Gehalt einer Probe an Analyten in einer definierten Matrix bekannt sein muss, ist die Richtigkeit insbesondere in neu entwickelten Methoden der am schwierigsten zu bestimmende Validierungsparameter. Normalerweise kann die Richtigkeit mit Hilfe von

- zertifiziertem Referenzmaterial,
- einem Vergleich mit einer unabhängigen validierten Methode,
- durch Teilnahme an Ringversuchen oder Laborvergleichsuntersuchungen,
- durch Aufstockverfahren („Dotieren“ oder „Spiken“ einer Probe)

nachgewiesen werden (WELLMITZ and GLUSCHKE, 2005).

Die Nachweisführung, dass die Methode in der Matrix zu richtigen Ergebnissen führt stellte bei der Validierung der Methode ein Problem dar, da es weder zertifiziertes Referenzmaterial noch eine alternative validierte Methode oder Ringversuche zur Bestimmung von Repellentien und Insektiziden in Moskitonetzen gibt. Ebenfalls war es dem Hersteller der Netze nicht möglich ein Netz mit einem definierten Gehalt an Analyten herzustellen, da ein exakter Gehalt mit dem Polymerisationsverfahren nicht eingestellt werden kann. Vielmehr ist die Gehaltsbestimmung nur mit der neu entwickelten Methode durchführbar. Andere bisher verwendete Gehaltsbestimmungen für vergleichbare Substanzen weisen keinen Nachweis einer quantitativen Extraktion auf und sind nicht publiziert.

Um den Nachweis der Richtigkeit so gut wie möglich zu führen, wurde ein Wiederfindungsversuch mit definiertem Gehalt an Analyten durchgeführt. Dabei konnten die Analyten jedoch nicht in die Polymermatrix des Moskitonetzes eingebunden werden, sondern die Aufstockung erfolgte in der Extraktionshülse vor Beginn der Extraktion, so dass die Wiederfindung zumindest das gesamte Verfahren abbildet.

Zudotiert wurde in einer Konzentration, die auch für einen Großteil der Proben repräsentativ war. Die Anzahl der Werte betrug $n=6$. Zur Auswertung wurden der Mittelwert und die Standardabweichung für jeden Analyten berechnet (Abbildung 47).

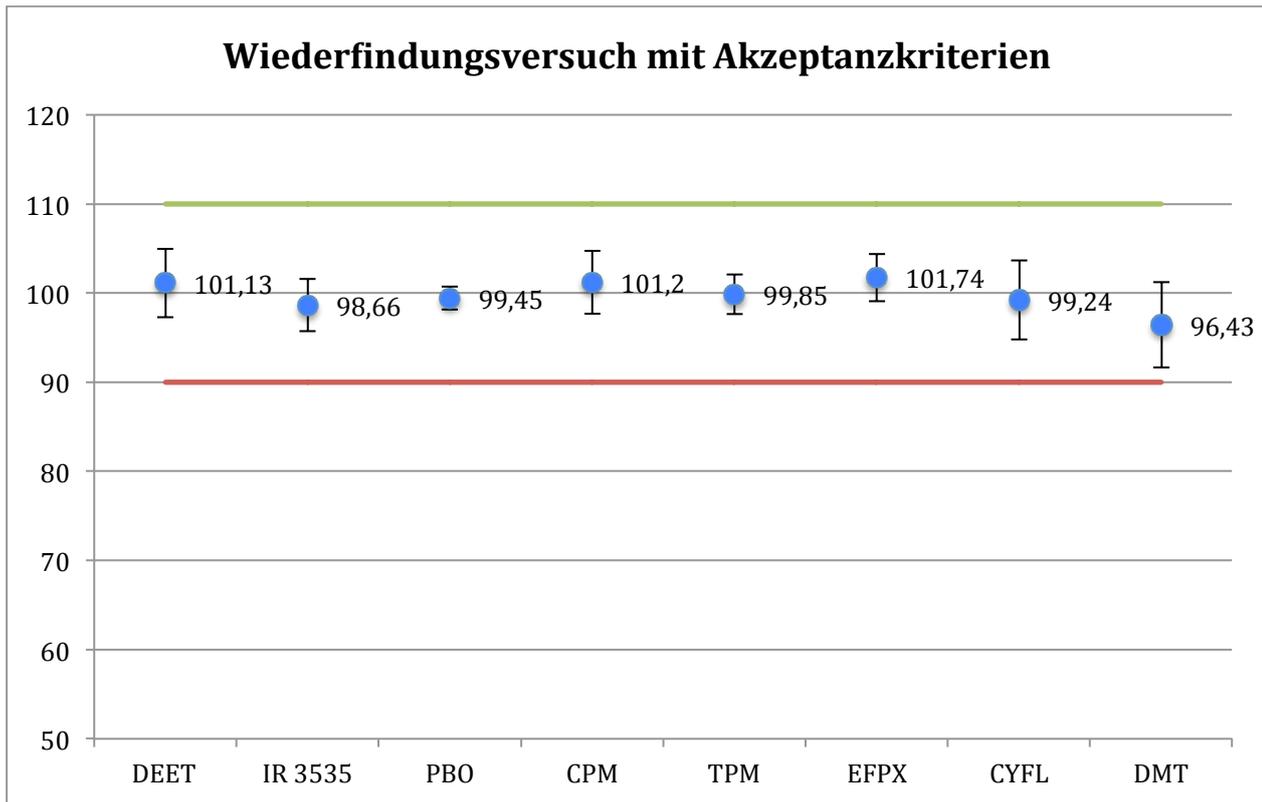


Abbildung 47: Dargestellt ist die prozentuale Wiederfindung der einzelnen Analyten mit der jeweils zugehörigen Standardabweichung. Die obere und untere Grenze kennzeichnen die selbst gesetzten Akzeptanzkriterien, für die Nichtberücksichtigung der Wiederfindungsrate.

Anschließend wurde für jeden Analyten ein zweiseitiger Grubbs Ausreißertest auf einem 95 % Signifikanzniveau durchgeführt, mit dem Ergebnis, dass keine Ausreißer vorlagen. Dem Test auf etwaige Ausreißer wurde ein zweiseitiger Student-Test mit dem Vorgabewert 100 % Wiederfindung angeschlossen (t-Test), um den Nachweis zu führen, dass sich die errechneten Mittelwerte der Wiederfindung nicht signifikant von 100 % unterscheiden. Das Signifikanzniveau wurde auch hier zu 95 % gewählt; entsprechend einem p-Wert von 0,05. Der Nachweis der Signifikanz gilt demnach als geführt, wenn der aus dem Student –Test berechnete p-Wert größer ist als 0,05. Alternativ kann der Prüfwert t mit dem Quantil der t-Verteilung verglichen werden und wenn dieser sich zwischen dem positiven und negativen Wert des Quantils befindet gilt die Hypothese, dass der Mittelwert sich signifikant von 100 % unterscheidet, als abgelehnt (Tabelle 13).

Tabelle 13: Statistische Auswertung des Wiederfindungsversuches (n=6) mit Darstellung von Mittelwert, Standardabweichung, Grubbs- und T-Test.

Analyt	Mittelwert [%]	SD (σ) [%]	Ausreißer Grubbs	Prüfwert Student [t]	p-Wert
Diethyltoluamid	101,13	3,86	Nein	0,717	0,505
IR 3535	98,66	2,93	Nein	-1,120	0,314

Analyt	Mittelwert [%]	SD (σ) [%]	Ausreißer Grubbs	Prüfwert Student [t]	p-Wert
Piperonylbutoxid	99,45	1,29	Nein	-1,044	0,341
Cis-Permethrin	101,2	3,52	Nein	0,835	0,443
Trans-Permethrin	99,85	2,23	Nein	-0,165	0,878
Cyfluthrin	101,74	2,65	Nein	1,608	0,168
Etofenprox	99,24	4,44	Nein	-0,419	0,693
Deltamethrin	96,43	4,77	Nein	-1,833	0,126

Im Falle der durchgeführten Untersuchungen ist der Wert des Quantils für das Signifikanzniveau $\alpha=0,05 \pm 2,5706$. Aus den Tabellenwerten von Tabelle 13 lässt sich erkennen, dass sowohl die Prüfwerte des Student-Tests kleiner als 2,5706 aber größer als $-2,5706$ als auch die p-Werte größer als das Signifikanzniveau 0,05 sind, so dass die Ergebnisse des Wiederfindungsversuches in ihrer Gesamtheit nicht statistisch signifikant verschieden von 100 % sind. Demnach wird der eingesetzte Gehalt an Analyt über das Extraktionsverfahren vollständig wiedergefunden. Für die Auswertung von Probenreihen wird als Spezifikation festgelegt, dass bei Wiederfindungen zwischen 90 und 110 % diese nicht in das Analyseergebnis einberechnet wird.

Grundsätzlich ist auf Grund der dargestellten Daten anzunehmen, dass die Methode bei vollständiger Extraktion einen richtigen Wert der in den Moskitonetzen enthaltenen Analyten liefert. Ein Vergleich zwischen mehreren Laboratorien (Ringversuch) wäre sinnvoll.

4.1.2.5. Präzision

Unter der Präzision einer Methode versteht man das Ausmaß der Streuung der Einzelwerte einer Bestimmung um den Mittelwert der Bestimmung (KROMIDAS, 2000). Man unterscheidet bei der Präzision zwischen drei verschiedenen Arten; der Wiederholpräzision (Repeatability), der Laborpräzision (Intermediate Precision) und der Vergleichspräzision (Reproducibility). Sie unterscheiden sich in der Art der Durchführung und der Aussage, die mit ihnen getroffen werden können. Die Wiederholpräzision beschreibt die Abweichung einzelner Messwerte, die mit derselben Methode und identischem Probenmaterial in einem Labor unter vergleichbaren Bedingungen innerhalb eines kurzen Zeitintervalls generiert worden sind. Zur Bestimmung der Wiederholpräzision wurde eine Probe mit möglichst vielen Analyten gewählt. Die ausgewählte Probe enthielt die Analyten Diethyltoluamid, Piperonylbutoxid, Cis- und Trans-Permethrin. Im Gegensatz zu den Werten der Richtigkeit wird in dieser Berechnung die Extraktion aus der Probe miterfasst. Da keine Probe vorhanden war, in der alle Analyten vorlagen, ist die Bestimmung dieser Parameter auf die oben genannten Analyten beschränkt. Auf Grund der Daten aus dem Wiederfindungsversuch wird jedoch angenommen, dass die generierten Daten auf die restlichen

Analyten übertragbar sind. Die Durchführung des Versuches erfolgte mit acht voneinander unabhängigen Aufarbeitungen einer Probe (n=8). Mit einer mitgeführten Kalibration wurde die Konzentration der einzelnen Analyten in der Messlösung berechnet und über Einwaage und flächenbezogene Masse der Gehalt in der Probe in mg pro Quadratmeter Moskitonetz (Anhang 4). Nach Überprüfung der Normalverteilung der Analysenserien mittels Shapiro-Wilk-Test (SHAPIRO and WILK, 1965) wurden für die Analyten Mittelwert, Standardabweichung und relative Standardabweichung berechnet und ein Ausreißertest nach Grubbs durchgeführt (Tabelle 14).

Tabelle 14: Statistische Auswertung der Wiederholpräzision (n=8) mit Darstellung von Mittelwert, Standardabweichung, relativer Standardabweichung, Grubbs- und Shapiro-Wilks-Test.

Analyt	Mittelwert [mg/m ²]	SD (σ) [mg/m ²]	RSD [%]	Ausreißer Grubbs	Verteilung Shapiro-Wilk
Diethyltoluamid	9497,5	226,7	2,39	Nein	Normal
Piperonylbutoxid	4022,6	78,8	1,96	Nein	Normal
Cis-Permethrin	1633,2	33,1	2,03	Nein	Normal
Trans-Permethrin	5323,2	105,1	1,97	Nein	Normal

Die Ergebnisse zeigen, dass die Wiederholpräzision bei einem selbst definierten Akzeptanzniveau von 5 % relativer Standardabweichung (WÄTZIG and ERMER, 2002) gewährleistet ist und dass die Werte nach Shapiro-Wilk normalverteilt und nach Grubbs ohne Ausreißer sind.

Zur Bestimmung der Laborpräzision (Intermediate Precision) werden Parameter der Bestimmung definiert und bewusst geändert. In den meisten Fällen wird der Zeitpunkt und /oder das Personal variiert. Für die Bestimmung der Laborpräzision dieser Methode wurde die dieselbe Probe eine Woche nach der ersten Analysenserie durch eine andere Person erneut achtmal aufgearbeitet und gemessen. Die Berechnung und Auswertung erfolgte analog zur ersten Analysenserie und es wurden die gleichen statistische Kenndaten erhoben (Tabelle 15).

Tabelle 15: Statistische Auswertung der Laborpräzision (n=8) mit Darstellung von Mittelwert, Standardabweichung, relativer Standardabweichung, Grubbs- und Shapiro-Wilk-Test.

Analyt	Mittelwert [mg/m ²]	SD (σ) [mg/m ²]	RSD [%]	Ausreißer Grubbs	Verteilung Shapiro-Wilk
Diethyltoluamid	9534,8	371,7	3,90	Nein	Normal
Piperonylbutoxid	4099,3	113,3	2,76	Nein	Normal
Cis-Permethrin	1689,6	56,9	3,36	Nein	Normal
Trans-Permethrin	5298,3	149,7	2,83	Nein	Normal

Wie in der vorhergegangenen Analysenserie sind die Werte der Analyten ohne Ausreißer und normalverteilt. Im Vergleich zur ersten Serie ist die relative Standardabweichung größer, die Mittelwerte der Analysenserien unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($p = 0,812$ (DEET); $0,139$ (PBO); $0,82$ (CPM); $0,740$ (TPM) in einem 2-seitigen ungepaarten t-Test). Um zu prüfen, ob die Analysenserien statistisch gesehen einer Grundgesamtheit zuzuordnen sind, wurden die Analysenserien mit dem von Dr. Hauke Petersen entwickelten Programm SAAD statistisch untersucht (Anhang 5). Mit Hilfe des Programmes wurden die normalverteilten Analysenserien auf Varianzhomogenität mittels Bartlett-Test, auf die Vergleichbarkeit der Varianzen mittels F-Test und auf Vergleichbarkeit der Varianzen mittels Kruskal-Wallis-Test begutachtet. Eine Übersicht über die Ergebnisse ist Tabelle 16 zu entnehmen.

Tabelle 16: Übersicht über die statistische Auswertung der Analysenserien (n=2) mit dem SAAD Programm von Dr. Hauke Petersen.

Analyt	Mittelwert [mg/m ²]	Wiederholbarkeit ($p=95\%$)	Vergleichbarkeit ($p=95\%$)	Varianzen Bartlett ($p=95\%$)	Varianzen F-Test ($p=99\%$)	Kruskal-Wallis ($p=99\%$)
Diethyltoluamid	9516,1	871,3	818,5	Homogen	Kein Unterschied	Kein Unterschied
Piperonylbutoxid	4060,9	276,3	300,6	Homogen	Kein Unterschied	Kein Unterschied
Cis-Permethrin	1661,4	131,6	167,1	Homogen	Kein Unterschied	Kein Unterschied
Trans-Permethrin	5310,7	366,0	346,0	Homogen	Kein Unterschied	Kein Unterschied

Da bei den Analysenserien kein Unterschied hinsichtlich der Varianzen und des Mittelwertes nachweisbar ist, kann aus den generierten Daten geschlossen werden, dass die an unterschiedlichen Tagen und durch unterschiedliche Personen erzeugten Ergebnisse einer Grundgesamtheit zuzuordnen sind. Somit ist im Hinblick auf die Laborpräzision nachgewiesen, dass die Methode zu vergleichbaren Messergebnissen führt. Der oben erwähnte Unterschied in den relativen Standardabweichungen ist statistisch gesehen nicht signifikant genug, um die Nullhypothese (Datensätze stammen aus der gleichen Grundgesamtheit) auszuschließen. Dennoch ist ein Unterschied erkennbar, der sich aber leicht mit dem unterschiedlichen Erfahrungsgrad der Analysten erklären lässt. Wie bei den Werten zu erwarten ist, wurden die Werte mit der höheren Standardabweichung von der mit der Methode weniger erfahrenen Person generiert. Die in der Tabelle angegebenen Werte für Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit (Tabelle 16) berechnen sich aus der Wiederholstandardabweichung und der Vergleichsstandardabweichung durch Multiplikation mit dem Faktor 2,83 für das Wahrscheinlichkeitsniveau 95% (BVL, 1983). Aus ihnen werden die Kriterien für die Akzeptanz der Werte einer Probendoppelbestimmung abgeleitet (s.a. Anhang 5).

4.1.2.6. Robustheit

Als Robustheit einer Methode bezeichnet man die Fähigkeit einer Methode unter veränderten Bedingungen gleichbleibende Messergebnisse zu erzielen (SLMB, 2004). Mit veränderten Bedingungen ist dabei gemeint, dass die Methode laborüblichen Veränderungen unterworfen ist. Größere Veränderungen der Methode als solches werden dabei nicht berücksichtigt, da derartige Veränderungen immer eine vollständige Revalidierung der Methode erfordern. Klassische Parameter (ICH, 2005) für die Robustheit jeder Methode sind die Stabilität der analytischen Lösungen und die Extraktionszeit der Probe. Speziell für gaschromatographische Bestimmungen ist der Änderung der Temperatur, der Flussrate und der Wechsel der analytischen Säule (Charge, Hersteller) von Bedeutung (ICH, 2005)

Bei der Entwicklung der Methode wurde der Einfluss der genannten Faktoren untersucht. Zur Bestimmung der Haltbarkeit der Lösungen wurde eine Standardlösung mit allen Analyten und internen Standards über mehrere Wochen arbeitstäglich injiziert. Die Lösung war bei Aufbewahrung im Kühlschrank über etwa 3 Wochen stabil. Danach war erkennbar, dass der interne Standard Fenvalerat, über die üblichen Varianzen hinaus, sukzessive geringere Flächeneinheiten im Chromatogramm zeigte. Die Stabilität der Standardlösungen wurde deshalb mit 2 Wochen festgelegt. Die höher konzentrierten Stammlösungen wurden für die Herstellung von Standardlösungen über mehrere Monate verwendet. Die in Toluol angesetzten und im Kühlschrank aufbewahrten Lösungen waren über 4 Monate stabil, bevor sich bei Fenvalerat und Deltamethrin verstärkt Abbauprodukte im Chromatogramm zeigten. Bei den anderen Standards waren nach 4 Monaten keine Veränderungen zu erkennen. Da dennoch alle Lösungen dasselbe Alter haben sollten, wurde für die Stammlösungen eine Haltbarkeit von 3 Monaten festgelegt.

Der Einfluss der Extraktionszeit wurde durch Variation der Dauer des Soxhletaufschlusses getestet. Dafür wurde eine Probe mehrfach eingewogen, mit einem Kalibrierstandard versetzt und für 1, 2, 3, 4 und 5 Stunden extrahiert. Die Auswertung dieser Versuchsanordnung (Abbildung 48) zeigt, dass nach etwa 3 Stunden der Gehalt im Extrakt konstant bleibt, so dass eine Mindestextraktionsdauer von 3 Stunden notwendig ist. Die Dauer der Extraktion wurde auf 4 Stunden festgelegt, um sicherzugehen, dass immer eine quantitative Extraktion stattfindet. Variationen in der Zeit sind demnach bis etwa 1 Stunde unkritisch. Bei darüberhinausgehenden Schwankungen nach unten muss mit einer nicht vollständigen Extraktion der aktiven Inhaltsstoffe gerechnet werden. Unter Punkt 4.1.3 wird gezeigt, dass nach der Extraktion noch Spuren der Analyten in den Netzen zurückbleiben. Diese haben jedoch keinen Einfluss auf die Wirksamkeit der Netze, so dass die Annahme einer 100 % Extraktion bezogen auf die aktiven Inhaltsstoffe gerechtfertigt ist. Bei den speziell für gaschromatographische Verfahren bedeutsamen Robustheitsparametern wurde der Einfluss unterschiedlicher Säulen auf das Verfahren getestet. Ein Wechsel der Säule ist bei gleichbleibenden relativen Retentionszeiten problemlos möglich, solange für die Methode Methylpolysiloxansäulen mit einem 5%igem Phenylanteil verwendet werden.

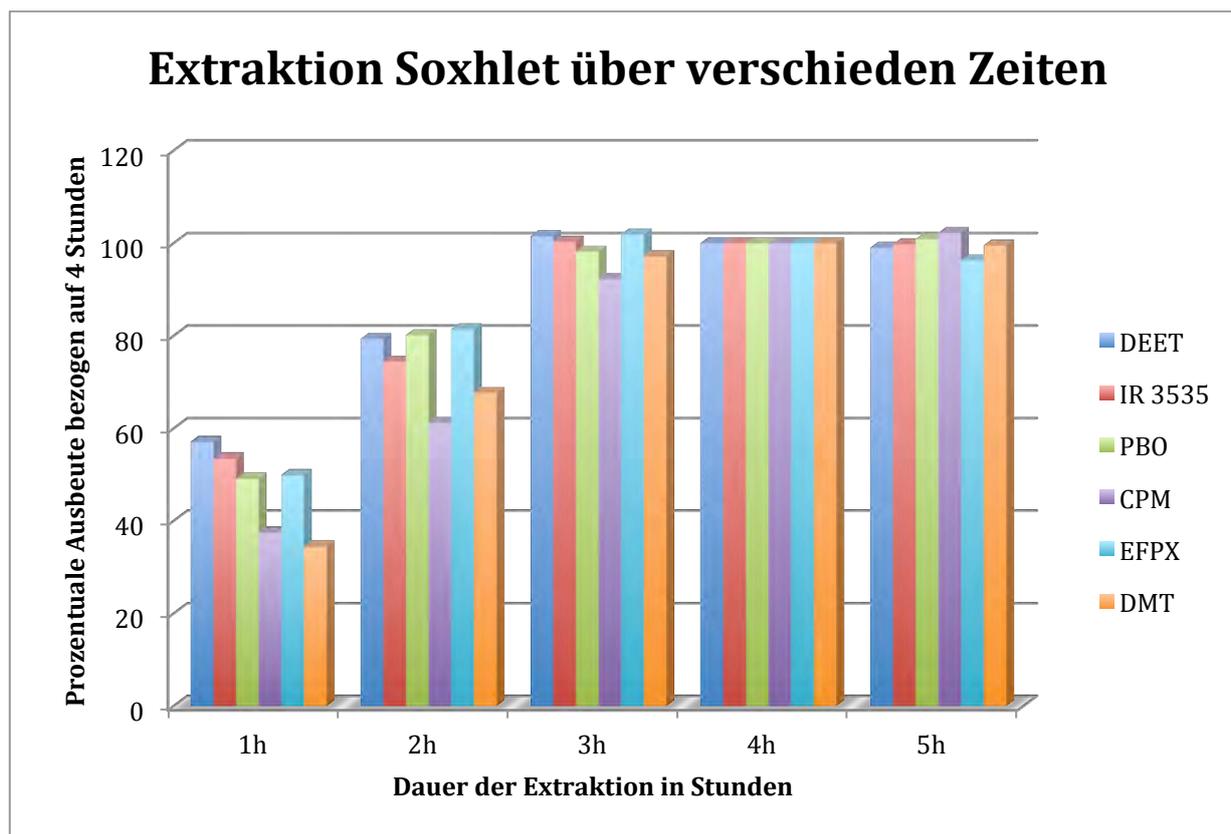


Abbildung 48: Ergebnisse der Extraktionsversuche zu den Zeitpunkten 1, 2, 3, 4 und 5 Stunden.

Während der Methodenentwicklung wurde darüberhinaus von einer Normaltemperatursäule auf eine Hochtemperatursäule gewechselt, was ebenfalls nicht zu einer nennenswerten Veränderung der chromatographischen Trennung führte, so dass diese auch ausgetauscht werden können. Verwendet wurden Säulen der Hersteller Agilent Technologies Waldbronn und Phenomenex Aschaffenburg; für andere Säulenhersteller kann demnach keine abschließende Aussage getroffen werden. Laborübliche minimale Flussschwankungen haben keinen nennenswerten Einfluss auf die chromatographische Trennung. Größere Schwankungen sind aber zu vermeiden, da bei zu hohem Fluss die Trennung des Paares Diethyltoluamid / IR 3535 nicht mehr gewährleistet ist und bei zu niedrigem Fluss ein Tailing der Peaks zu nicht akzeptablen Asymmetriewerten führt (siehe auch 4.1.2.1.). Ähnlich verhält es sich mit dem Einfluss der Temperatur. Auch hier sind kleinere Schwankungen ($\pm 5^\circ\text{C}$) akzeptabel. Weitergehende Veränderungen führen auch hier zu nicht akzeptablen Einflüssen. Im Zusammenhang mit Säulenwechsel und Säulen Kürzungen ist immer auf die Zeitfenster der gaschromatographischen Methode zu achten. Auch wenn die Methode so angelegt ist, dass Retentionszeitverschiebungen von bis zu einer halben Minute ohne Einfluss bleiben, so ist bei einem Säulenwechsel dennoch zu beobachten, ob die Zeitfenster der Methode gegebenenfalls angepasst werden müssen. Hinsichtlich der untersuchten Parameter ist die Methode ausreichend robust, um in der Routine und unter leicht variierenden Bedingungen verwendet zu werden.

4.1.2.7. Messunsicherheit

Da alle chemisch analytischen Verfahren mit einem Fehler behaftet sind, ist es für jedes Verfahren notwendig, die Unsicherheit des Verfahrens zu kennen oder zu schätzen. Dies wird durch die Schätzung der Messunsicherheit des Verfahrens vorgenommen. Die Messunsicherheit ist definiert als ein dem Messwert zugeordneter Parameter, der die Streuung der Messwerte beschreibt, die vernünftigerweise der Messgröße zugordnet werden können (DIN, 1999; ISO, 1993; JCGM, 2008). Sie muss das gesamte analytische Verfahren umfassen und kann aus der Validierung des Verfahrens, aus Qualitätsregelkarten oder Ringversuchen berechnet werden (SLMB, 2004). Die Berechnung aus den Validierungsdaten ist in diesem Fall die Methode der Wahl für die vorliegende Methode, da weder Ringversuchsdaten noch Daten aus Qualitätsregelkarten vorhanden sind. Um die Messunsicherheit berechnen zu können, müssen Informationen über folgende Punkte vorliegen (SLMB, 2004):

1. Spezifikation der Messgröße
2. Identifizierung der Unsicherheitsquellen
3. Quantifizierung des Beitrags durch die Präzision
4. Quantifizierung des Beitrages durch die Richtigkeit
5. Quantifizierung des Beitrages anderer Quellen

Aus diesen Informationen wird die kombinierte Messunsicherheit und daraus abgeleitet die erweiterte Messunsicherheit berechnet. Wenn Daten zu den oben genannten Punkten nicht verfügbar sind oder sich dieser Weg für das Verfahren nicht eignet, kann die Messunsicherheit auch aus Literaturwerten von anderen Prüfverfahren oder Ringversuchen, durch Expertenbeurteilung oder mit Hilfe des Verfahrens nach Horwitz (s.u.) abgeschätzt werden (SLMB, 2004).

Messunsicherheit nach Horwitz: $u_c = 0,02 * c^{0,8495}$

- c: Konzentration in kg/kg
u_c: Kombinierte Messunsicherheit

Bei diesen Vorgehensweisen ist immer schlüssig zu begründen, warum eine Abschätzung der Messunsicherheit auf Basis der Unsicherheit der einzelnen Analysenschritte nicht möglich gewesen ist. Das Verfahren nach Horwitz liefert in aller Regel eine Messunsicherheit, die größer ist, als die aus einer Validierung abgeleiteten Daten.

Bei der hier betrachteten Methode werden die oben genannten Punkte 1, 3 und 4 durch die bereits vorgestellten Validierungsdaten abgedeckt, Punkt 2 wird durch das in Abbildung 49 dargestellte Ishikawa-Diagramm abgebildet. Der Beitrag anderer Unsicherheitsquellen (Punkt 5) an der Gesamtmessunsicherheit ist so gering, dass er bei der Berechnung der Messunsicherheiten vernachlässigt werden kann. Den Nachweis dafür führt die Berechnung der Messunsicherheit für Diethyltoluamid mit dem Programm „Uncertainty Manager[®]“, das zeigt, dass

die Berechnung über die Präzisionsdaten unter Berücksichtigung der Richtigkeit die Messunsicherheit nicht unterschätzt und somit angewendet werden kann.

Da nicht für jeden Analyten Daten zur Präzision vorliegen, werden für diese die Daten aus der Richtigkeit verwendet, die sich in ihrer relativen Standardabweichung nicht signifikant von denen der Präzision unterscheiden (Tabellen 13 bis 15). Dargestellt werden kombinierte und erweiterte Messunsicherheit der Analyten in Tabelle 17, wobei die Berechnung der erweiterten Messunsicherheit über den Faktor $k=1,96$ für ein 95 % Konfidenzintervall erfolgt.

Tabelle 17: Darstellung der Messunsicherheiten der einzelnen Analyten in Prozent

Analyt	u_c [%]	k-Faktor 95%	U [%]
Diethyltoluamid	3,90	1,96	7,64
IR 3535	2,93	1,96	5,65
Piperonylbutoxid	2,76	1,96	5,33
Cis-Permethrin	3,36	1,96	6,59
Trans-Permethrin	2,83	1,96	5,55
Cyfluthrin	2,65	1,96	5,19
Etofenprox	4,44	1,96	8,70
Deltamethrin	4,77	1,96	9,35

Die zwischen 5 und 10 % liegenden Messunsicherheiten sind für die vorgesehene Anwendung der Methode zur Gehaltsbestimmung von Repellentien und Insektiziden in LLIN, LLRN und LLIRN vollkommen ausreichend, da sie in Kombination mit biologischen Aktivitäten angewandt wird und diese mit einer zumindest vergleichbaren Unsicherheit behaftet sind.

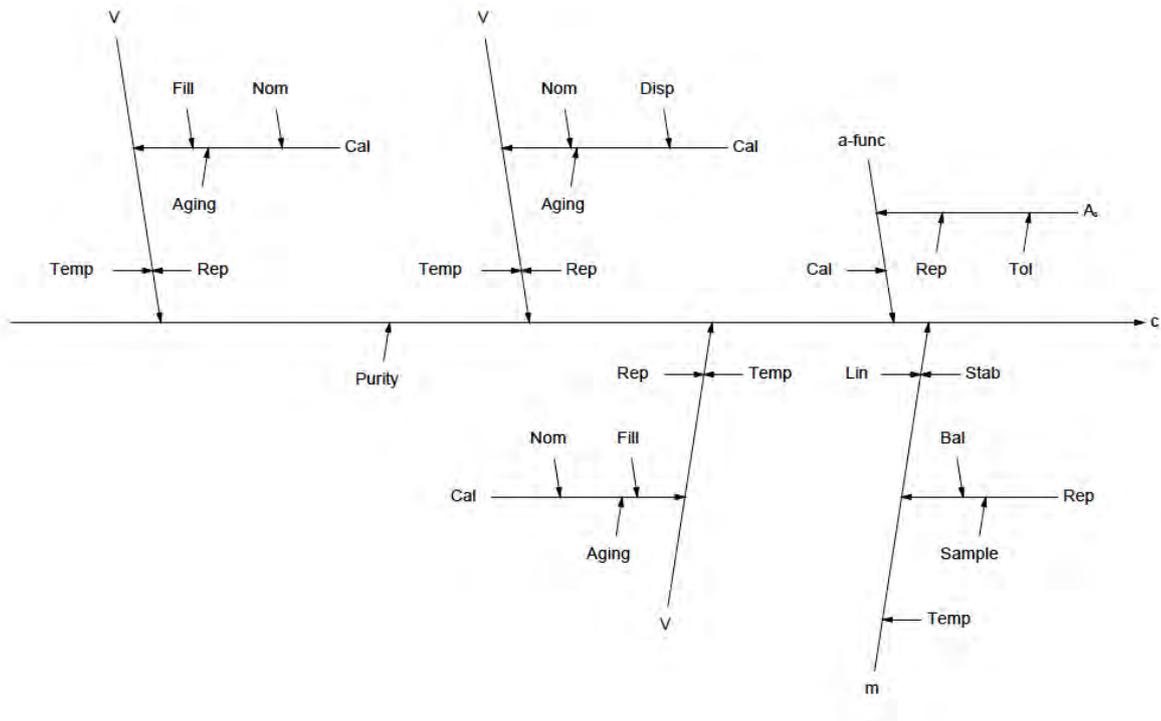


Abbildung 49: Ishikawa Diagramm zur Berechnung der Messunsicherheit erstellt durch die Software Uncertainty Manager®

4.1.3. Nachweis der quantitativen Extraktion aller aktiven Inhaltsstoffe

Um den gemessenen Gehalt an Insektiziden und Repellentien in Moskitonetzen mit den Bioaktivitätsversuchen korrelieren zu können, muss nachgewiesen werden, dass durch das Verfahren auch tatsächlich alle aktiven Inhaltsstoffe extrahiert worden sind. Diesen Nachweis bleiben bisherige Publikationen (KROEGER *et al.*, 2004; N'GUESSAN *et al.*, 2010; TUNGU *et al.*, 2010) schuldig und Abbildung 50 zeigt, dass eine einmalige, nicht erschöpfende Extraktion nicht für die Bestimmung des tatsächlichen Gehaltes an aktiven Inhaltsstoffen geeignet ist, da bei einmaliger

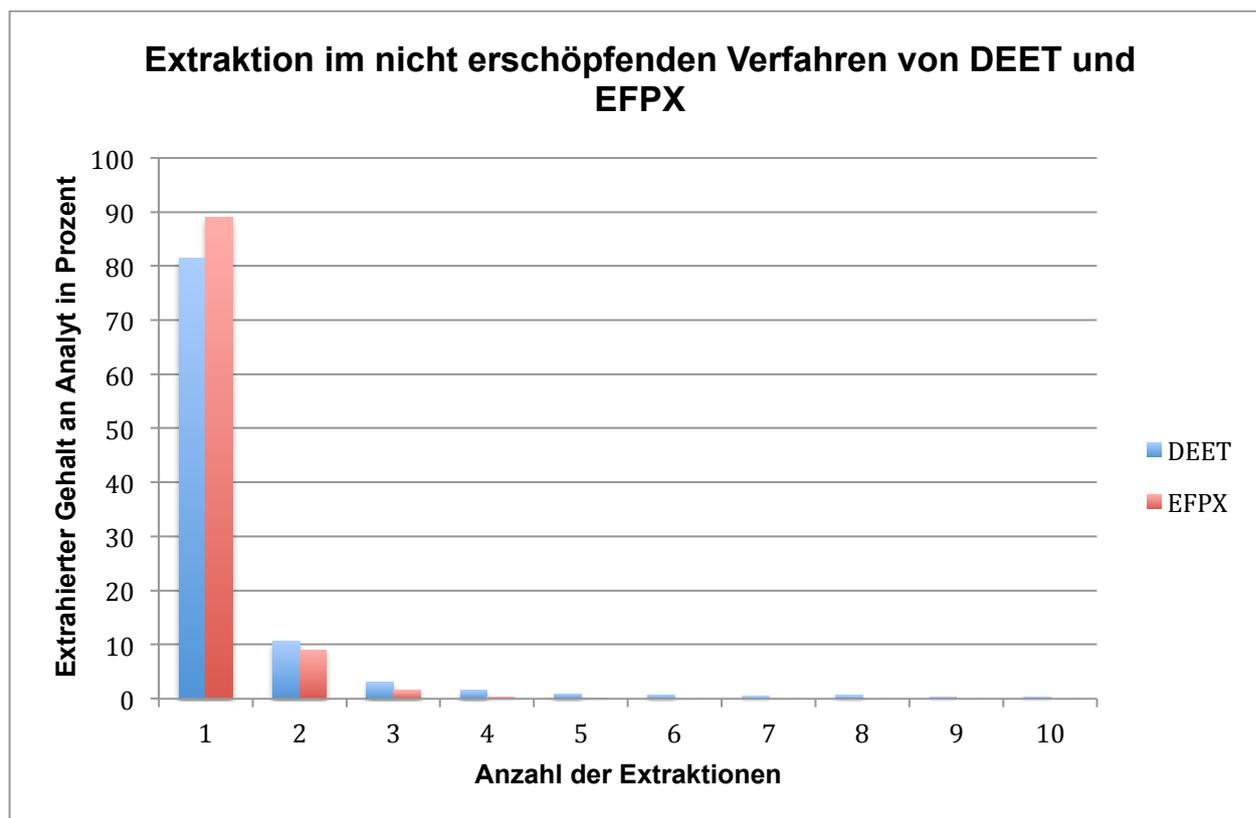


Abbildung 50: 10-fache Extraktion einer Probe mit Toluol mit einer Dauer von jeweils 30 min pro Extraktion.

Extraktion von einer halben Stunde noch mindestens 10 % der Wirkstoffe im Moskitonetz verbleiben. Der absolute Gehalt an Diethyltoluamid und Etofenprox in der Probe betrug sechs bzw. ein Gramm Wirkstoff pro Quadratmeter, so dass nach der ersten Extraktion in diesem Fall noch etwa 1200 (Diethyltoluamid) und 100 mg (Etofenprox) Wirkstoff pro Quadratmeter im Moskitonetz verblieben, die zweifellos noch über eine Aktivität gegenüber den Insekten verfügen. Im Vergleich dazu zeigt Abbildung 51, dass das für die Gehaltsbestimmung dieser Methode angewandte Extraktionsverfahren mehr als 99 % der aktiven Inhaltsstoffe aus dem Moskitonetz extrahiert, wobei der absolute Gehalt dieser Probe mit zehn Gramm Diethyltoluamid und sechs Gramm Gesamtpermethrin deutlich höher gewesen ist.

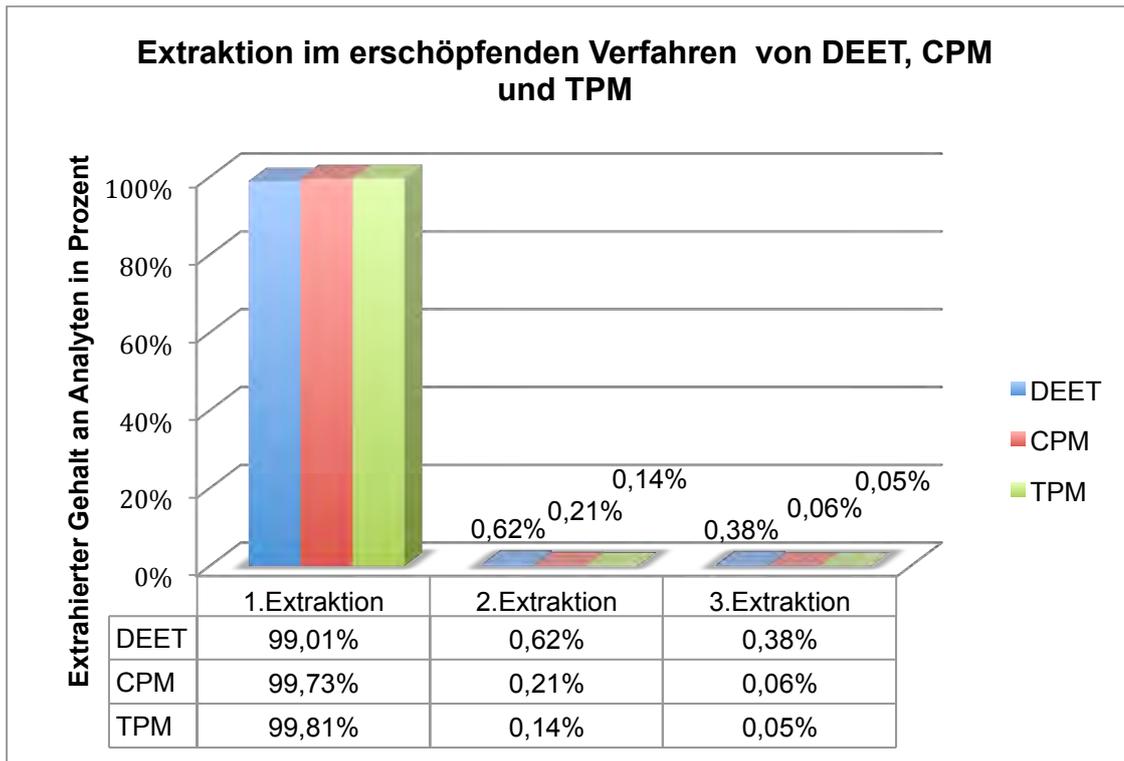


Abbildung 51: Dreimalige erschöpfende Extraktion einer Probe über jeweils 4 Stunden mit Soxhletapparatur.

Trotz dieser sehr guten Ausbeute, kann nicht ausgeschlossen werden, dass noch Rückstände der aktiven Inhaltsstoffe so in die Faser eingeschlossen sind, dass sie vom Extraktionsverfahren nicht erfasst werden. Die einzige Möglichkeit, eine vollständige Erfassung aller Inhaltsstoffe sicher zu gewährleisten, wäre ein zerstörender Aufschluss der Moskitonetze, der alle Substanzen in Lösung bringen würde. Dies wäre durchaus durch einen Mikrowellendruckaufschluss zu erreichen, hätte aber neben der Zerstörung der Faser auch eine Zerstörung der zu bestimmenden Analyten zur Folge. Da der chemische Nachweis einer vollständigen Extraktion aller Inhaltsstoffe nicht abschließend geführt werden kann, bleibt nur die Möglichkeit des Nachweises, dass die Moskitonetze nach der Extraktion keine biologische Aktivität aufweisen, so dass zumindest die Extraktion aller aktiven Inhaltsstoffe konstatiert werden kann. Zur Durchführung dieser Versuchsanordnung wurden drei Moskitonetze mit unterschiedlichen Gehalten an Repellentien und Insektiziden auf ihre Bioaktivität untersucht. Anschließend wurden die Netze extrahiert und erneut auf ihre Bioaktivität untersucht. Um einen eventuellen Einfluss der Extraktion auf die Bioaktivität der Netze auszuschließen wurde ein nicht imprägniertes Moskitonetz (als Nullnetz bezeichnet) zusätzlich zu den obligatorischen Negativkontrollen über den gesamten Versuch mitgeführt. Alle Netze wurden nach dem bereits beschriebenen Verfahren vier Stunden an der Soxhletapparatur mit n-Hexan extrahiert und anschließend über Nacht getrocknet. Die Bestimmung der Bioaktivität wurde über sechs Stunden durchgeführt. Bei fehlenden adversen Effekten auf die Versuchstiere nach dieser Zeit, wurden die Netze als nicht bioaktiv beurteilt. In allen Versuchen zeigt die Negativkontrolle über die Dauer von 360 Minuten keine Effekte auf die

Versuchstiere. Die nicht extrahierten Moskitonetze zeigten ihren wirksamen Bestandteilen entsprechend einen deutlichen Effekt auf die Versuchstiere, wobei die Menge an Permethrin der bestimmende Faktor in Bezug auf die „Kill Time“ ist (Tabelle 18).

Tabelle 18: Ergebnisse des Versuches zum Nachweis der Extraktion aller aktiven Inhaltsstoffe

Bezeichnung	DEET	IR 3535	CPM	TPM	KD (min)	Kill (min)
P4 bis	n.n.	1874,8	2,77	5,35	40	97,5
P6 bis	2409,8	n.n.	339,34	1038,54	10	37,5
P8 bis	n.n.	n.n.	588,42	1707,84	20	30
Nullnetz	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	360	360
P4 bis ex	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	360	360
P6 bis ex	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	360	360
P8 bis ex	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	360	360

Ebenfalls aus der Tabelle zu entnehmen ist das vollständige Verschwinden der Bioaktivität nach der Soxhletextraktion, die den ebenfalls fehlenden Bioaktivitäten von Nullnetz und Negativkontrolle entspricht. Abbildung 52 stellt dieses Ergebnis graphisch dar, wobei die logarithmisch dargestellte Primärachse zu beachten ist.

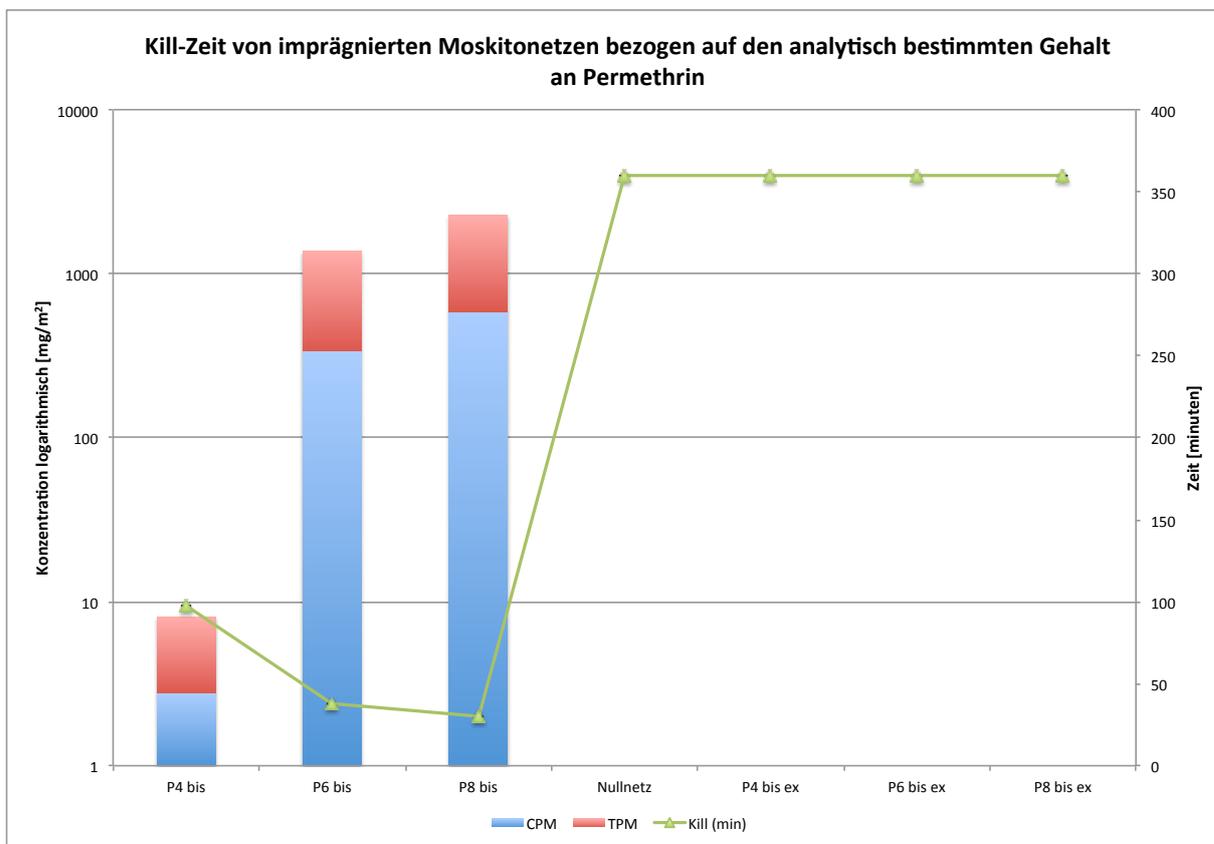


Abbildung 52: Darstellung der „Kill Time“ von extrahierten und nicht extrahierten Moskitonetzen mit Darstellung des Gesamtpermethringehaltes und logarithmischer Primärachse.

Die Wirksamkeit der Moskitonetze ist in diesem Fall nur in Abhängigkeit zu den am stärksten wirkenden Inhaltsstoffen Cis- und Trans-Permethrin dargestellt. Der Einfluss auf die Abtötungszeit wird auch durch den Gehalt an Repellentien beeinflusst, soll aber an einer anderen Stelle dieser Arbeit noch ausführlich diskutiert werden und wird der Übersichtlichkeit wegen nicht in die graphische Darstellung mit aufgenommen.

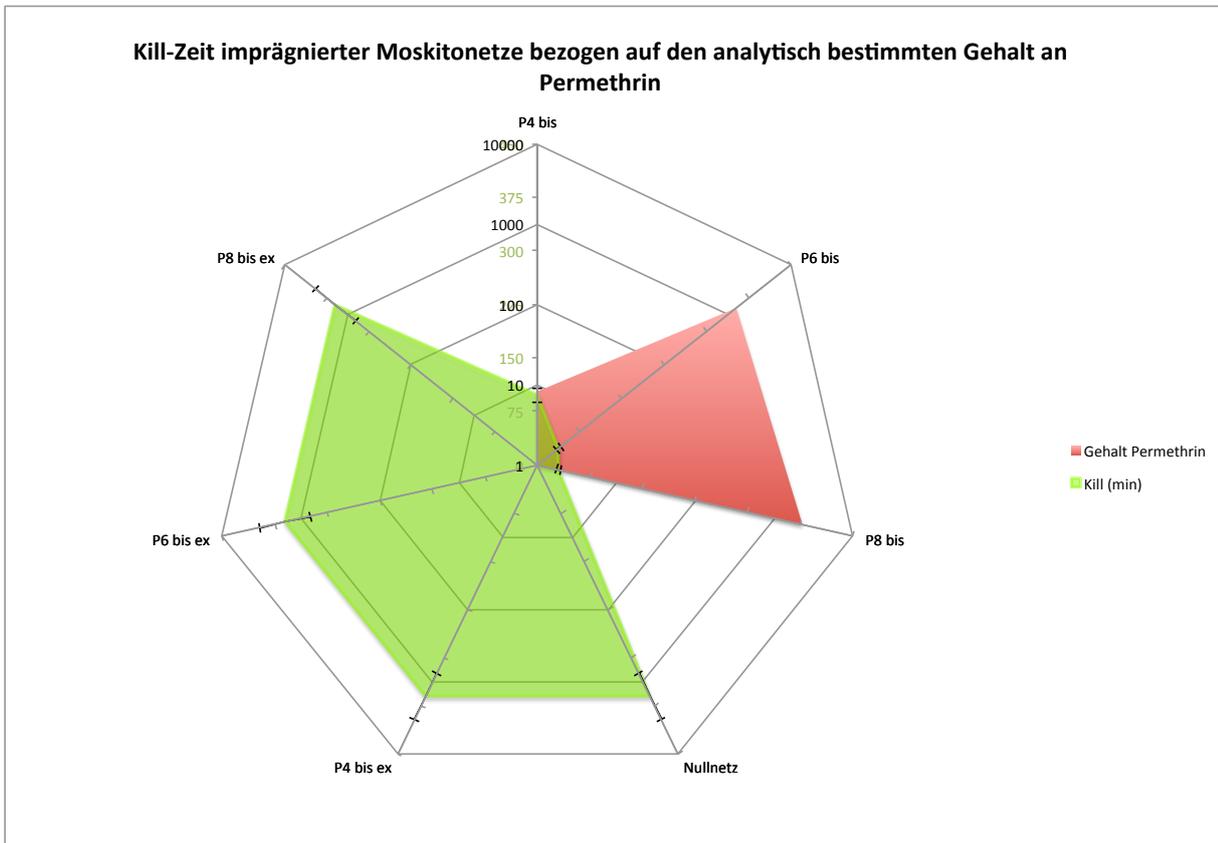


Abbildung 53: Netzdiagramm von Kill-Zeit und Gesamtpermethringehalt auf zwei Achsen zur Darstellung der vollständigen Extraktion der aktiven Inhaltsstoffe aus den imprägnierten Moskitonetzen.

Bei Betrachtung von Tabelle 18 und Abbildung 51 stellt sich möglicherweise die Frage, warum bei den extrahierten Moskitonetzen alle Wirkstoffe mit nicht nachweisbar gekennzeichnet sind, obwohl nach den Werten von Abbildung 51 mit einem Gehalt von etwa 5 mg Permethrin zu rechnen gewesen wäre. Die Ursache hierfür ist in der geringeren Konzentration der Analyten im Vergleich zum in Abbildung 51 beschriebenen Experiment zu suchen, wodurch eine noch geringere Menge auf der Faser verblieben ist, die sich unterhalb der für die Kalibration berechneten Nachweisgrenze befand. Das entscheidende Ergebnis dieses Versuches bleibt aber die Aussage, dass die vor der Extraktion für die Versuchstiere hochtoxischen Moskitonetze, nach der Extraktion keinen signifikanten Unterschied ($p = 1,0$) zu den nicht imprägnierten Moskitonetzen zeigten. Somit ist für das entwickelte Extraktionsverfahren nachgewiesen, dass alle aktiven Inhaltsstoffe bei der Aufarbeitung aus den Moskitonetzen entfernt werden.

4.2. Untersuchungen von imprägnierten Moskitonetzen

In diesem Teil werden die Ergebnisse der unterschiedlichen Versuche an imprägnierten Moskitonetzen vorgestellt. Die Versuche beinhalteten zum einen immer eine Bestimmung des Gehaltes an aktiven Inhaltsstoffen mit der unter 4.1. beschriebenen Methode und zum anderen die Tierversuche zur Bestimmung der biologischen Aktivität. Je nach Zielsetzung wurden die Methoden auf unterschiedliche Weise miteinander kombiniert, um ein der Fragestellung angemessenes Ergebnis erhalten zu können.

Die untersuchten Moskitonetze wurden von der Firma Utexbel, Renaix, Belgien produziert und mit einem neuen Polymercoatingverfahren imprägniert, dass von imprägnierten Uniformen auf Moskitonetze übertragen wurde (FAULDE and UEDELHOVEN, 2006; FAULDE *et al.*, 2010). Die Imprägnierung erfolgte im Rahmen der zur Verfügung stehenden Möglichkeiten nach unseren Vorgaben mit unterschiedlichen Substanzen und Substanzkombinationen, wobei die Konzentrationen der einzelnen Wirkstoffe in den zur Polymerisierung eingesetzten Ausgangslösungen zwischen 50 und 250 g/L lagen. Das neue Coatingverfahren ermöglicht das Aufbringen der Wirkstoffe in einer oder mehreren Schichten, so dass auch möglicherweise nicht miteinander kompatible Wirkstoffe auf ein Moskitonetz aufgebracht werden können. Die Imprägnierung der Moskitonetze erfolgt bei Verwendung eines Wirkstoffes durch zweimaliges Imprägnieren und anschließender Trocknung bei 110° C. Je nach Wirkstoff werden unterschiedliche Hilfsstoffe (Binder, Copolymere und Weichmacher auf Silikonbasis) bei der Imprägnierung zugesetzt. Zum Aufbringen weiterer Wirkstoffe wird das Netzmaterial unter Zusatz von Hilfsstoffen (s.o.) reimprägniert und bei 150° C getrocknet. Das Verfahren eignet sich für unterschiedliche Textilfasern und es wird zu untersuchen sein, welchen Einfluss die Fasern auf die Wirkung der Netze haben und welche Mengen Wirkstoff auf die unterschiedlichen Materialien aufgebracht werden können.

4.2.1. Bestimmung der Aktivität unterschiedlicher Wirkstoffe

Um eine Vergleichbarkeit der Wirkstärke unterschiedlicher Moskitonetze zu ermöglichen, wurden die Wirkstoffe Permethrin, Deltamethrin, Etofenprox, Cyfluthrin, IR 3535, und Diethyltoluamid in unterschiedlichen Konzentrationen auf Baumwollnetze aufgebracht und der Gehalt an aktiven Inhaltsstoffen sowie die Bioaktivität bestimmt und gegenübergestellt. Wenn man die von der WHO empfohlenen Konzentrationen für Pestizide zur konventionellen Imprägnierung (WHO, 2007) als Benchmark annimmt, wird zu prüfen sein, ob für das neue Imprägnierungsverfahren eine vergleichbare Dosis-Wirkungs-Beziehung und Residualaktivität für die einzelnen Pestizide gilt. Nicht charakterisiert sind bislang Repellentien; ihr konzentrationsabhängiges Verhalten gegenüber exponierten Testarthropoden wird von besonderem Interesse sein.

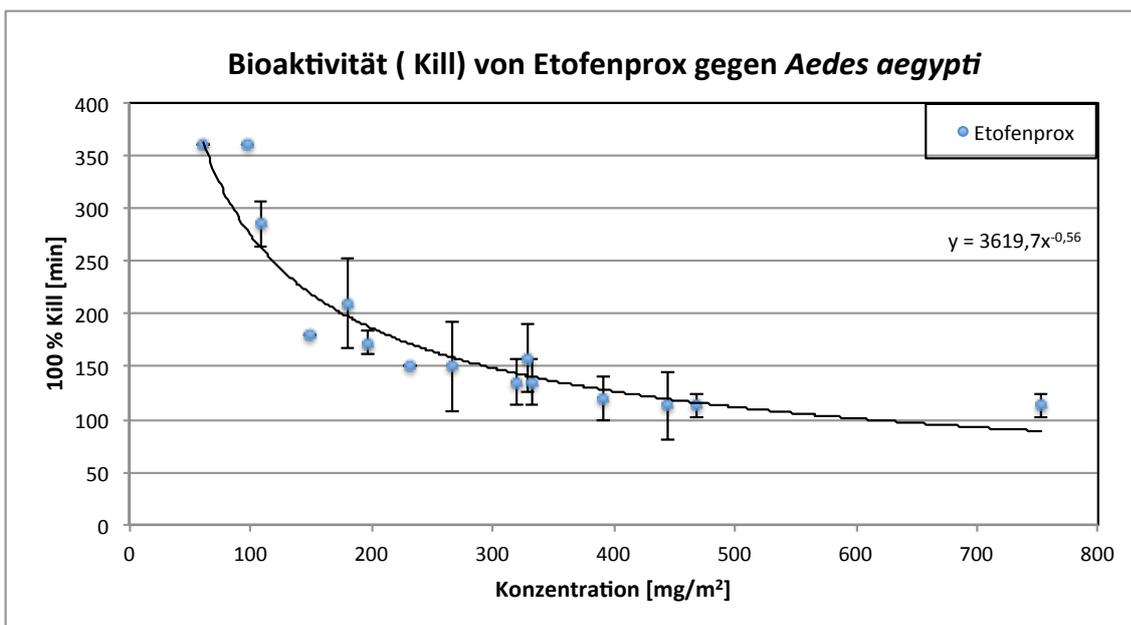
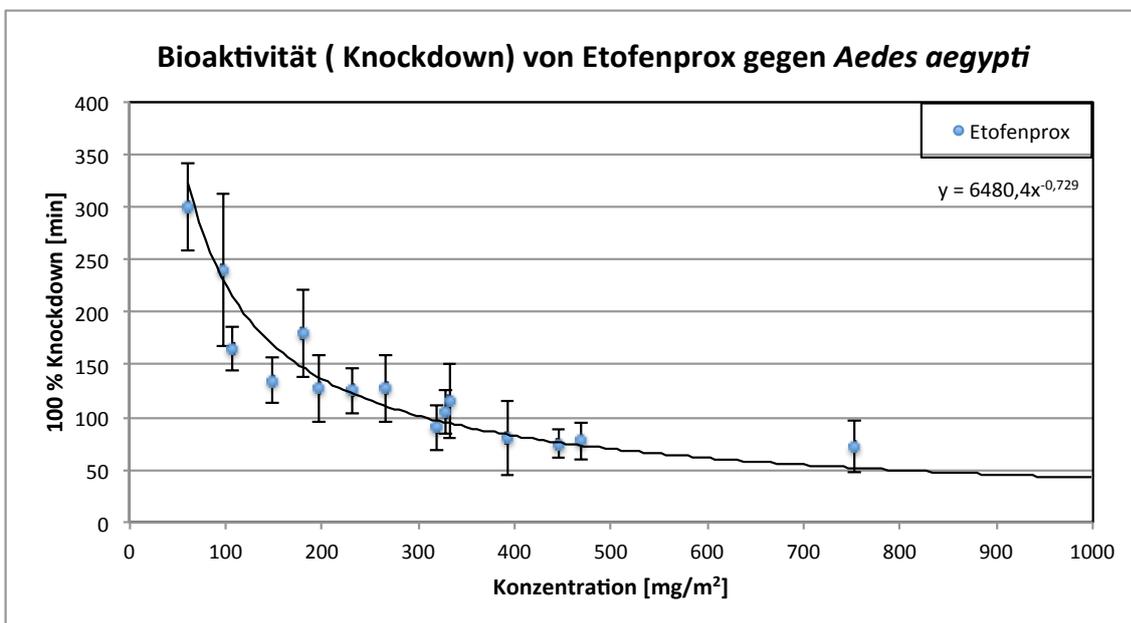


Abbildung 54: Konzentrationsabhängige Knockdown- und Kill- Aktivität von Etofenprox

Am Beispiel des Etofenprox werden die Resultate erläutert. Abbildung 54 zeigt die Kill- und Knockdown-Zeiten von Etofenprox beschichteten Netzen. Die Netze wurden mit Gehalten von 70 – 750 mg pro Quadratmeter Etofenprox produziert und untersucht. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichungen der Bioaktivitäten wieder. Mit den aufgetragenen Werten wurde eine exponentielle Regression durchgeführt und die Trendlinie, sowie die Gleichung der Regression, ist in den Diagrammen abgebildet.

Aus dem Diagramm (Abbildung 54) ist zu entnehmen, dass sowohl die Kill- als auch die Knockdown-Zeit mit steigender Konzentration an Etofenprox exponentiell abnimmt. Dasselbe Verhalten lässt sich auch für die anderen untersuchten Wirkstoffe erkennen (Abbildung 55). Die Diagramme der biologischen Aktivitäten mit Standardabweichungen sind in Anhang 6 vollständig dargestellt.

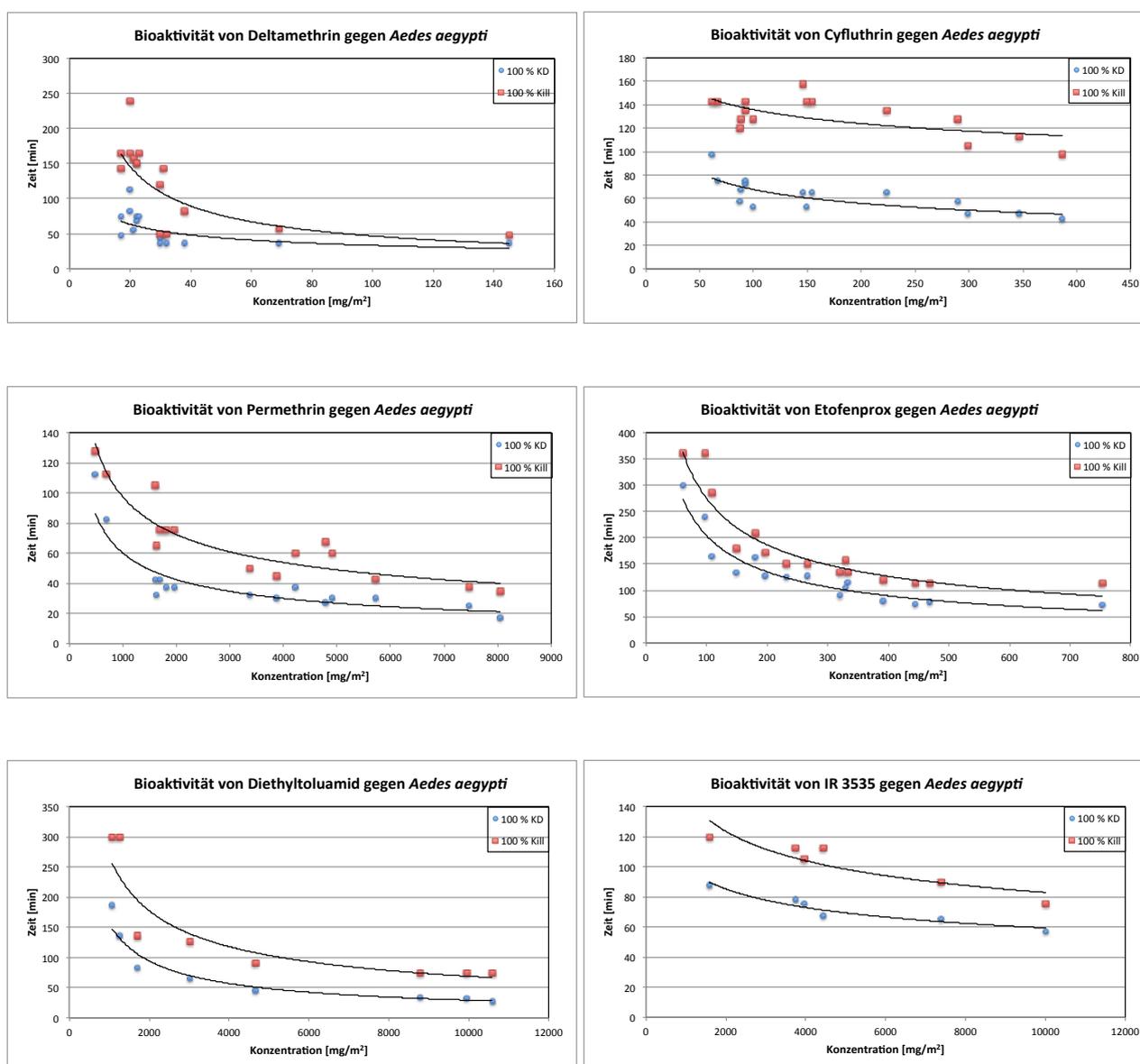


Abbildung 55: Darstellung der Kill- und Knockdown-Aktivitäten von Repellentien und Insektiziden. Als Maß für die Aktivität ist die Zeit in Minuten bis zum Erreichen des jeweiligen Endpunktes gegen die Konzentration des Wirkstoffes im Moskitonetz aufgetragen

Mit Hilfe der Exponentialgleichung werden die Konzentrationen berechnet, die für eine Kill-Time von 100 Minuten und eine Knockdown-Time von 60 Minuten benötigt werden. Durch Auflösen der Exponentialgleichung nach x ergibt sich für eine 60-Minuten-Knockdown-Time (KD_{60}) eine Konzentration von 615 mg/m^2 an Etofenprox und eine Konzentration von 607 mg/m^2 für eine 100-Minuten-Kill-Time ($Kill_{100}$). Die Wahl von 60 und 100 Minuten ist dabei willkürlich erfolgt. Durch Berechnung dieser Zeiten für die anderen untersuchten Wirkstoffe, kann die Insektizidie der Substanzen verglichen werden. Die Ergebnisse der Berechnung werden in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: Ergebnisse der Berechnung von KD_{60} und $Kill_{100}$ für verschiedene Wirkstoffe

Wirkstoff	$KD_{60} [\text{mg/m}^2]$	$Kill_{100} [\text{mg/m}^2]$
Cyfluthrin	156	387
Deltamethrin	23	34
Etofenprox	615	607
Permethrin	789	936
Diethyltoluamid	3730	5333
IR 3535	3950	4660

Den in Tabelle 19 dargestellten Werten folgend, können die Wirkstoffe in 3 Gruppen mit unterschiedlicher Wirkstärke eingeteilt werden. Am stärksten wirken, wie erwartet, die α -Cyano Pyrethroide Cyfluthrin und Deltamethrin, die auch Säugetieren gegenüber die höchste Toxizität aufweisen (KLAASSEN, 2008), wobei Deltamethrin das etwas stärker wirkende der beiden ist (FAULDE *et al.*, 2011). Permethrin und das „Non-ester“ Pyrethroid Etofenprox zeigen eine etwas geringere Wirksamkeit als die α -Cyano Pyrethroide. Beide Substanzen sind jedoch von ihrem toxikologischen Profil günstiger einzuschätzen; so zeigt Etofenprox nur eine geringe Toxizität gegenüber Säugetieren (DELORENZO and DE LEON, 2010; SREEHARI *et al.*, 2009) und ist ebenso in den genannten Konzentrationen als sicher einzuschätzen wie Permethrin, für das eine Sicherheit bei Bekleidungstextilien in diesem Konzentrationsbereich belegt ist (APPEL *et al.*, 2008).

Die dritte Gruppe bilden die Repellentien Diethyltoluamid und IR 3535. Sie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Wirkstärke nicht und weisen die schwächste Wirkung der drei Gruppen auf. Trotz der schwächsten Wirkung aller untersuchten Substanzen, ist erstaunlich, dass überhaupt ein signifikanter toxischer Effekt auf die Versuchstiere zu beobachten ist. Bislang war man davon ausgegangen, dass von den Repellentien zwar eine repellente (negativer Chemotropismus), aber keine insektizide Wirkung ausgehen würde. Die durchgeführten Untersuchungen beweisen aber, dass Diethyltoluamid und IR 3535 neben ihrer Repellent-Wirkung auch eine konzentrationsabhängige insektizide und akarizide Wirkung haben (FAULDE *et al.*, 2010). Um eine insektizide Wirkung zu erzielen, sind vergleichsweise hohe Repellentkonzentrationen auf den

Moskitonetzen notwendig, die bislang nur mit dem neuen Imprägnierungsverfahren problemlos aufgebracht werden können.

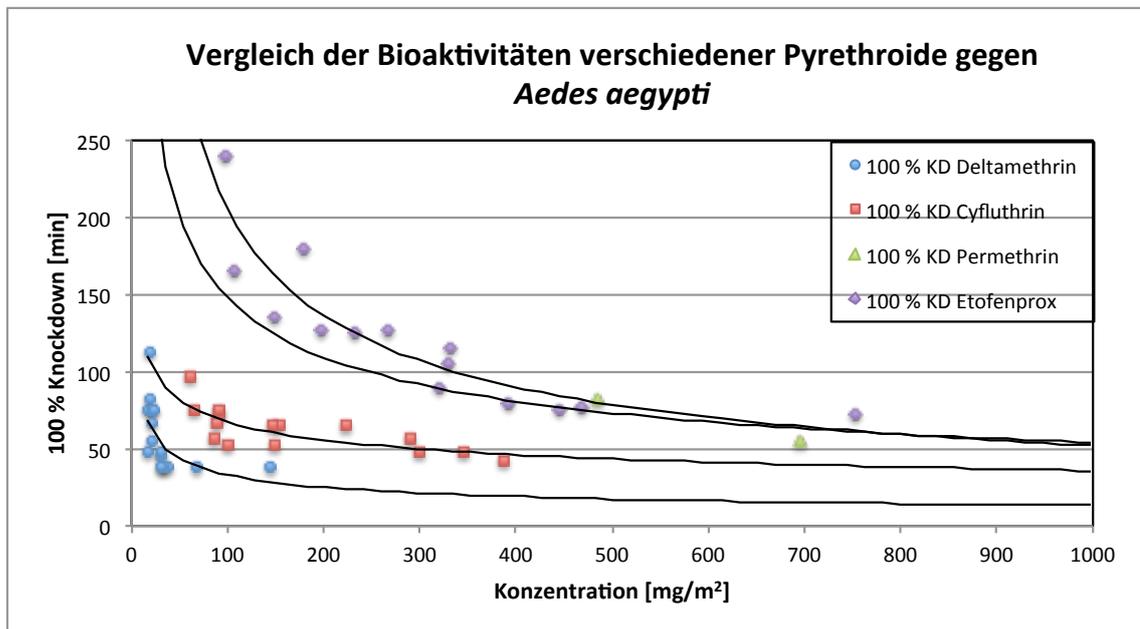


Abbildung 56: Darstellung der Knockdown-Aktivitäten von Deltamethrin, Cyfluthrin, Permethrin und Etofenprox

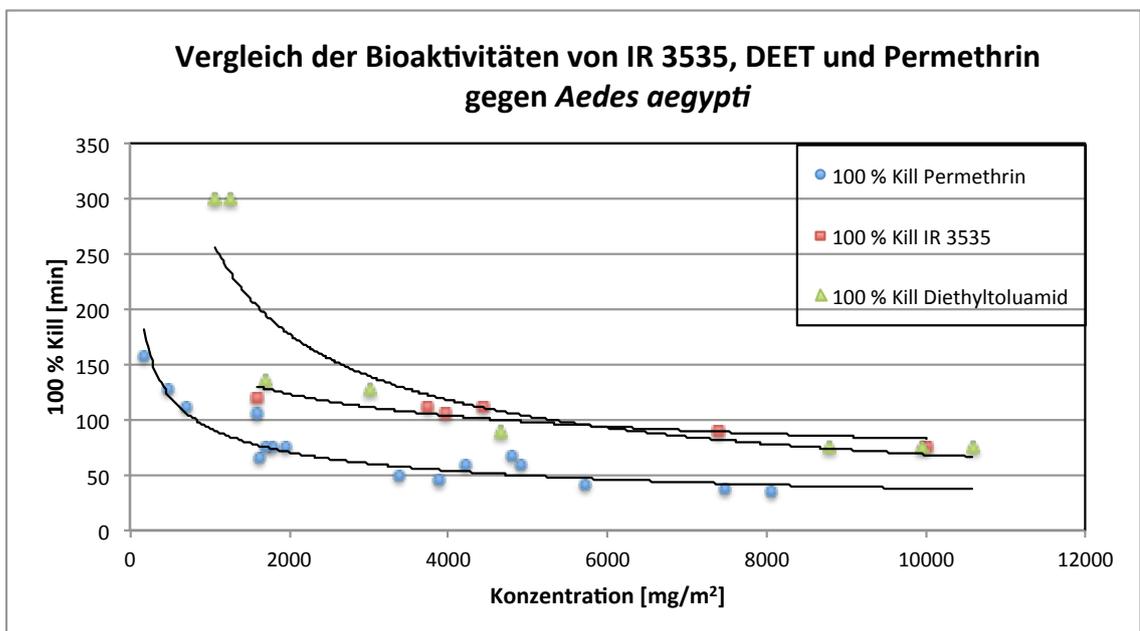


Abbildung 57: Vergleich der Kill-Aktivität von IR 3535 und Diethyltoluamid mit Permethrin

Die aus der Tabelle 19 abgeleiteten Schlüsse lassen sich auch aus den Abbildungen 56 und 57 entnehmen. Die α -Cyano Pyrethroide Deltamethrin ($p < 0,001$ gegen Etofenprox und $p = 0,012$ gegen Permethrin) und Cyfluthrin ($p < 0,027$ gegen Etofenprox und $p = 0,025$ gegen Permethrin)

zeigten eine statistisch signifikant höhere Knockdown-Aktivität als Etofenprox und Permethrin, unterscheiden sich jedoch untereinander nicht statistisch signifikant ($p = 0,384$) voneinander (95 % Konfidenzintervall). Die Wirkungskurven der Repellentien unterscheiden sich ebenfalls signifikant von der Wirkungskurve des Permethrins ($p < 0,01$; 95 % Konfidenzintervall).

Grundsätzlich ist zu konstatieren, dass mit allen untersuchten Wirkstoffen eine toxikologisch relevante Wirkung auf die Testarthropoden zu erzielen ist. Die Substanzen mit stärkerer Wirkung können zwar zur Erzielung eines vergleichbaren Effektes in geringerer Konzentration auf die Netze aufgebracht werden, im Umkehrschluss ist aber auch ihre Toxizität gegenüber dem Anwender höher (s. S. 28 f), so dass sich der Vorteil, eine geringere Menge zu applizieren, wieder aufhebt.

Aus technologischer Sicht ist die Applikation großer Mengen Wirkstoff auf die Fasern unproblematisch. Wie aus Abbildung 57 zu entnehmen ist, können bis zu 8000 mg/m^2 Permethrin und mehr als 10000 mg/m^2 Diethyltoluamid problemlos auf die Faser aufgebracht werden, wodurch Kill-Zeiten von weniger als 50 Minuten erreicht werden können.

Alle Wirkstoffe wurden darüberhinaus in „Arm-in-Cage“ Tests untersucht, mit dem Ergebnis, dass entgegen bisherigen Vermutungen (HOSSAIN and CURTIS, 1989), keines der Insektizide allein einen 100%igen Durchstichschutz gewährleistet. Abbildung 58 zeigt das Landeverhalten auf einem mit 1980 mg/m^2 Etofenprox imprägnierten Moskitonetz.



Abbildung 58: Mit Etofenprox imprägniertes Moskitonetz im „Arm-in-Cage“ Versuch

Auf dem Bild ist zu erkennen, dass die Versuchstiere auf dem Moskitonetz landen und durchstechen. Eine Wirkung auf das Verhalten der Versuchstiere in Form eines „Hot-Fee-

Effektes“ war erkennbar (erhöhte Bewegungen der Versuchstiere im Vergleich zur Nullprobe), aber der Effekt war nicht stark genug, um die Stiche der Versuchstiere zu unterbinden.

Zusätzlich zur Untersuchung der Wirkung von Insektiziden und Repellentien gegen *Aedes aegypti* wurden die Repellentien Diethyltoluamid und IR 3535 hinsichtlich ihrer akariziden Wirkung gegen Nymphen von *Ixodes ricinus* (Freilandfang) getestet (Abbildungen 59 und 60).

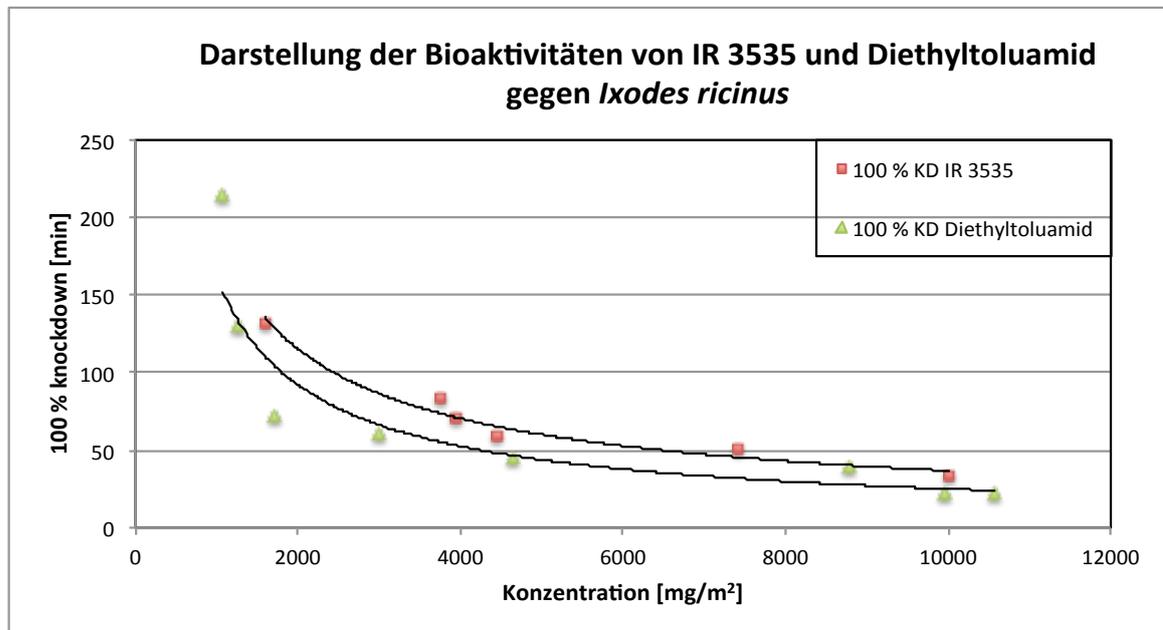


Abbildung 59: Darstellung der Knockdown-Aktivität von Diethyltoluamid und IR 3535 gegen Nymphen von *Ixodes ricinus* (Freilandfang)

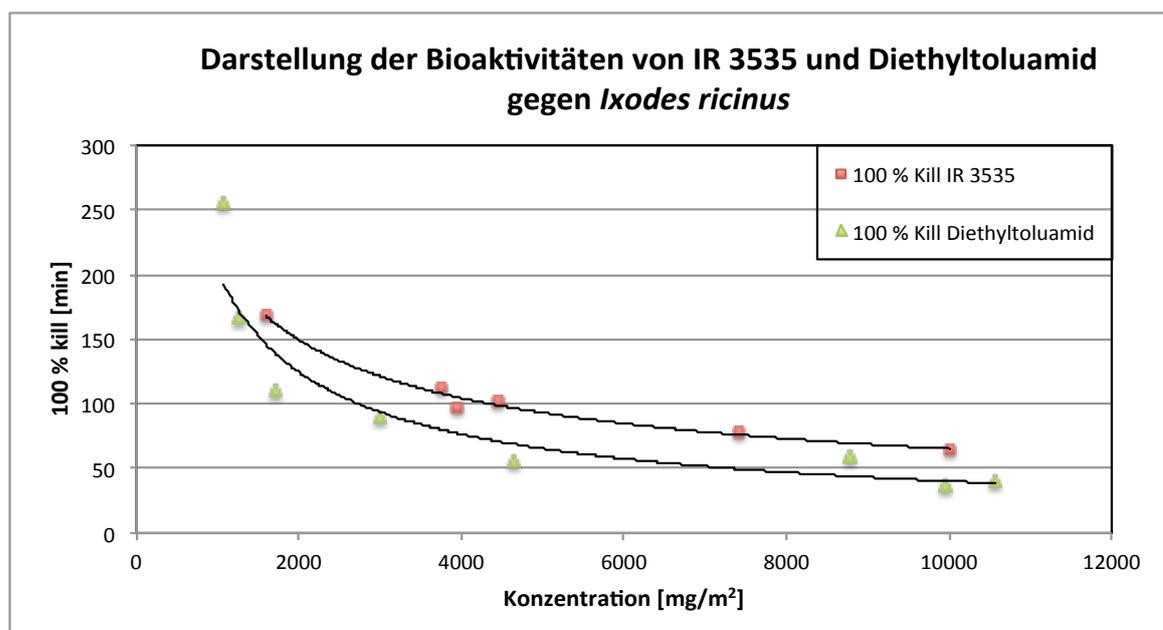


Abbildung 60: Darstellung der Kill-Aktivität von Diethyltoluamid und IR 3535 gegen Nymphen von *Ixodes ricinus* (Freilandfang)

Sowohl Diethyltoluamid als auch IR 3535 zeigen in dieser Versuchsanordnung eindeutig akarizide Effekte gegenüber den eingesetzten Versuchstieren. Das Dosis-Wirkungs-Verhalten von Diethyltoluamid gegenüber *Ixodes ricinus* unterscheidet sich dabei nicht signifikant von dem Verhalten gegenüber *Aedes aegypti* (FAULDE *et al.*, 2010). Vergleicht man die Akarizidie von Diethyltoluamid und IR 3535, so ist festzustellen, dass Diethyltoluamid hinsichtlich seiner Wirkstärke IR 3535 übertrifft (FAULDE *et al.*, 2010).

4.2.2. Bestimmung der Aktivität von Wirkstoffkombinationen

Nachdem erste Informationen zur Wirkstärke der eingesetzten Einzelsubstanzen vorlagen, wurden Moskitonetze mit mehr als einem Wirkstoff hergestellt. Ein erster Versuch enthielt dabei Baumwollnetze mit Etofenprox und Diethyltoluamid in Konzentrationen zwischen 100 und 2500 mg/m² (Abbildung 61). Bestimmt wurden bei den Netzen der Gehalt an aktiven Inhaltsstoffen sowie die biologische Aktivität in Form von Knockdown- und Kill-Effekt. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Abbildung 61 dargestellt und zeigen, dass mit steigenden Gehalten an Etofenprox und Diethyltoluamid die Toxizität der Moskitonetze gegenüber den Versuchstieren wie erwartet zunimmt. Auf Grund der schwankenden Werte der aktiven Inhaltsstoffe in den Netzen ist

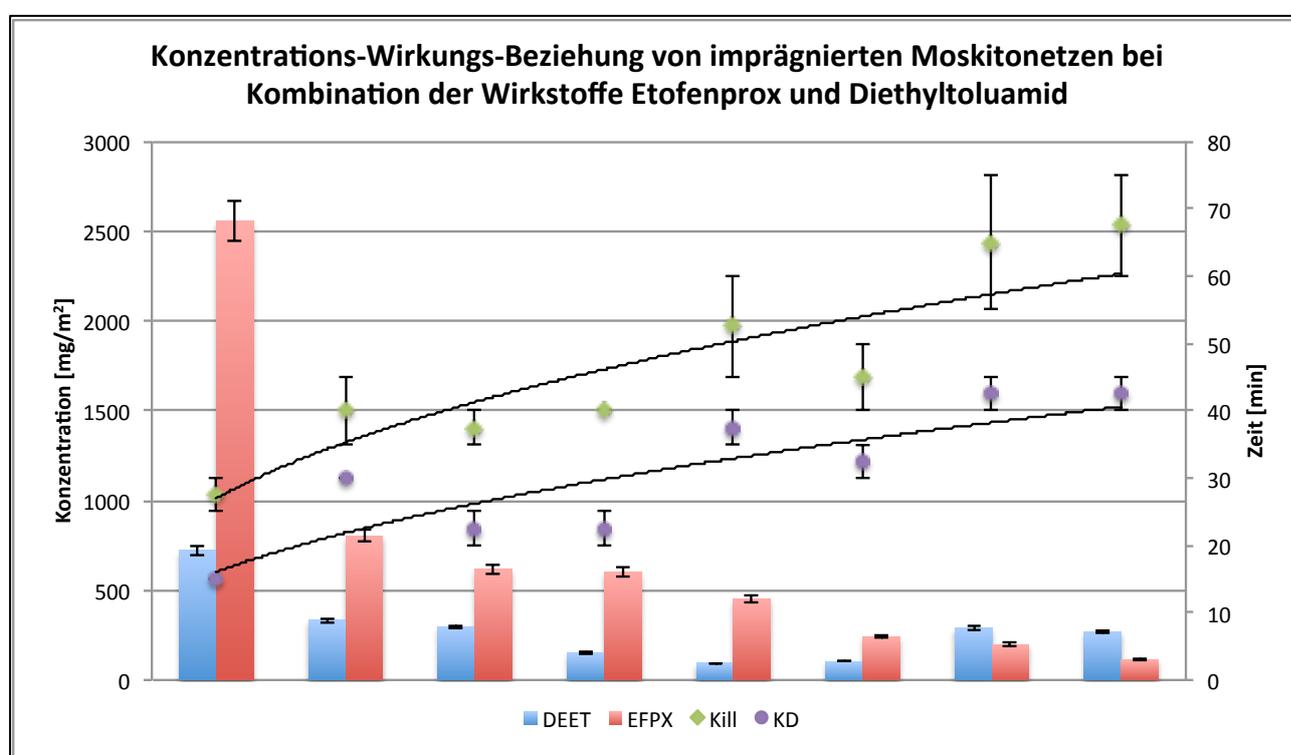


Abbildung 61: Darstellung der Konzentration und biologischer Wirksamkeit von mit Etofenprox und Diethyltoluamid imprägnierten Moskitonetzen

eine Berechnung von KD_{60} und oder $Kill_{100}$ nicht sinnvoll, da der Anteil des Einflusses der einzelnen Wirkstoffe auf die biologische Aktivität nicht bekannt ist. Wenn man allerdings die Werte aus Tabelle 19 mit dem Diagramm vergleicht, fällt auf, dass sowohl die Knockdown- als auch die Kill-Zeit für die Netze mit Etofenprox und Diethyltoluamid deutlich geringer sind, als bei den mit einem Wirkstoff imprägnierten Netzen. Gegen einen reinen additiven Effekt spricht dabei der große Unterschied der biologischen Aktivität schon bei geringen Konzentrationen der Wirkstoffe (FAULDE and NEHRING, 2012). Vielmehr ist zu vermuten, dass ein synergistischer Effekt vorliegt (BONNET *et al.*, 2009; PENNETIER *et al.*, 2007), der durch unterschiedliche insektizide Wirkmechanismen der Substanzen hervorgerufen sein könnte.

Trotz der guten Eigenschaften der Netze in den Untersuchungen zur biologischen Aktivität konnte in den „Arm-in-Cage“ Tests keines der Netze mit einem Durchstichschutz überzeugen. Auf allen Netzen landeten die Versuchstiere und stachen durch das Netz durch. Ein Unterschied zwischen den Netzen war bis auf das Netz mit 2557 mg/m² Etofenprox und 724 mg/m² Diethyltoluamid nicht zu erkennen. Bei diesem Netz war die Anzahl der Landeversuche geringer und auch ein „Hot-Feet-Effekt“ war zu beobachten. Aus den generierten Ergebnissen lässt sich vermuten, dass der Einfluss der Insektizide auf das Stechverhalten der Mücken wesentlich geringer ist, als bisher angenommen, wohingegen die Konzentration an Repellent möglicherweise einen entscheidenden Einfluss auf den Durchstichschutz hat.

In einer nächsten Serie wurden Baumwollnetze mit Diethyltoluamid und/oder Permethrin imprägniert. Bei der Imprägnierung wurde zunächst mit unterschiedlichen Konzentrationen an Diethyltoluamid imprägniert und anschließend mit Permethrin, wobei die Imprägnierung, die eigentlich nur mit Diethyltoluamid erfolgen sollte, eine nachweisbare Verunreinigung mit Permethrin enthielt. Wie bei den vorhergegangenen Netzen, wurde erneut die biologische Aktivität gegenüber *Aedes aegypti* und der Gehalt der Wirkstoffe bestimmt. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Abbildung 62 zusammengefasst.

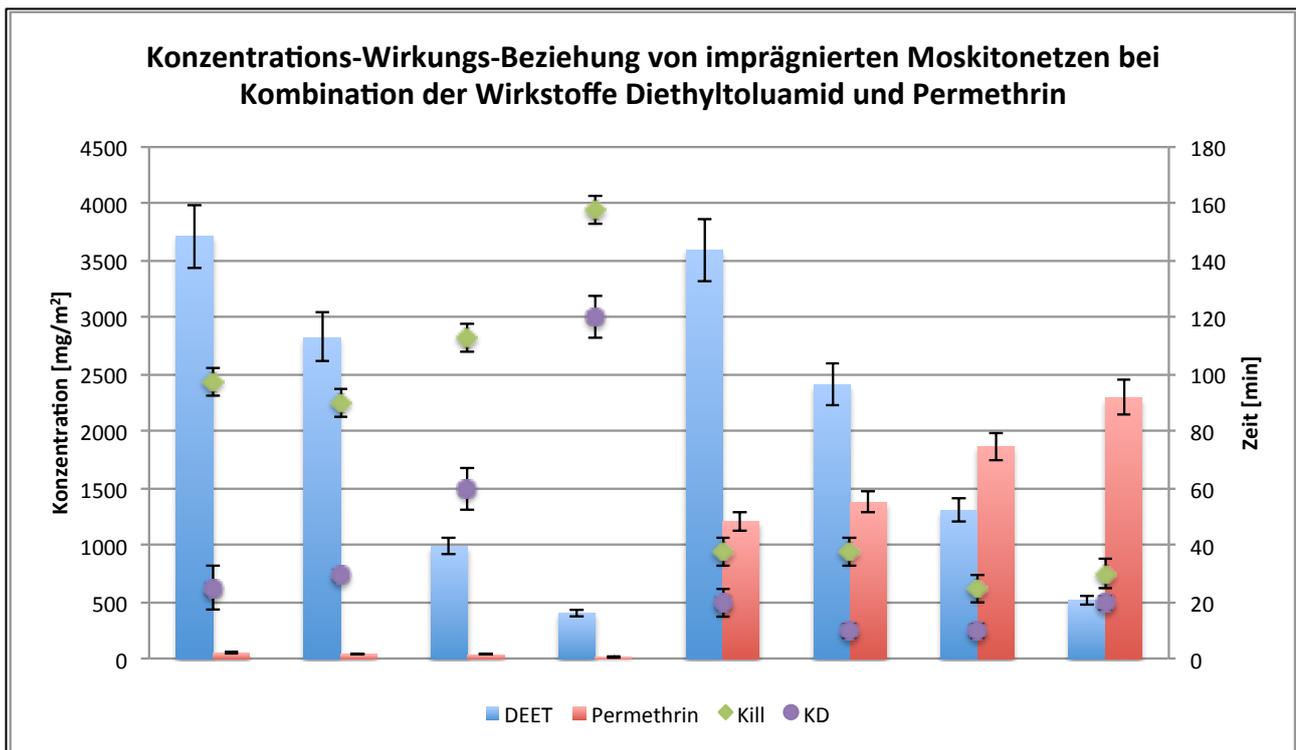


Abbildung 62: Darstellung der Konzentration und biologischer Wirksamkeit von mit Permethrin und Diethyltoluamid imprägnierten Moskitonetzen

Bei den mit Diethyltoluamid imprägnierten Netzen (mit einem Restgehalt von 15 bis 55 mg/m² Permethrin) wurden Gehalte zwischen 400 und 3700 mg/m² Diethyltoluamid auf die Fasern aufgebracht. Wie erwartet nimmt die Knockdown- und Kill-Zeit mit steigender

Wirkstoffkonzentration zu, wobei die Bioaktivität stärker ausgeprägt ist, als aus Abbildung 55 zu erwarten gewesen wäre. Diese Steigerung dürfte in dem Restgehalt an Permethrin begründet sein, das durch seinen vermuteten synergistischen Effekt zu einer erhöhten Bioaktivität führt. Bei der zusätzlichen Imprägnierung mit Permethrin ist zu erkennen, dass bei vergleichbaren Konzentrationen von Diethyltoluamid die auftragbare Konzentration an Permethrin steigt, da in allen Fällen die Konzentration der Lösung zur Imprägnierung mit Permethrin konstant blieb. Daraus lässt sich schließen, dass bei der Imprägnierung mit mehreren Wirkstoffen die Konzentrationen der Imprägnierungslösungen aufeinander abgestimmt werden müssen, um die gewünschten Zielkonzentrationen erreichen zu können.

Hinsichtlich der biologischen Aktivität zeigt die Wirkstoffkombination eine deutliche Verbesserung gegenüber den bisher untersuchten Netzen. Mit einer Knockdown-Zeit von maximal 20 Minuten und einer Kill-Zeit von maximal 40 Minuten werden Aktivitäten erreicht, die mit einer Einzelwirkstoffimprägnierung nicht zu erzielen sind (FAULDE and NEHRING, 2012). Die Unterschiede der Bioaktivitäten zwischen den Netzen in Abhängigkeit von dem Verhältnis zwischen Diethyltoluamid und Permethrin zeigen keine statistische Signifikanz ($p = 0,7$), wobei dies über einen Bereich mit stärker variierenden Permethringehalten zu überprüfen wäre. Die Wirksamkeit ist in jedem Fall bei allen mit Diethyltoluamid und Permethrin imprägnierten Netzen dieser Serie so hoch, dass ein sehr schneller Wirkungseintritt gewährleistet ist.

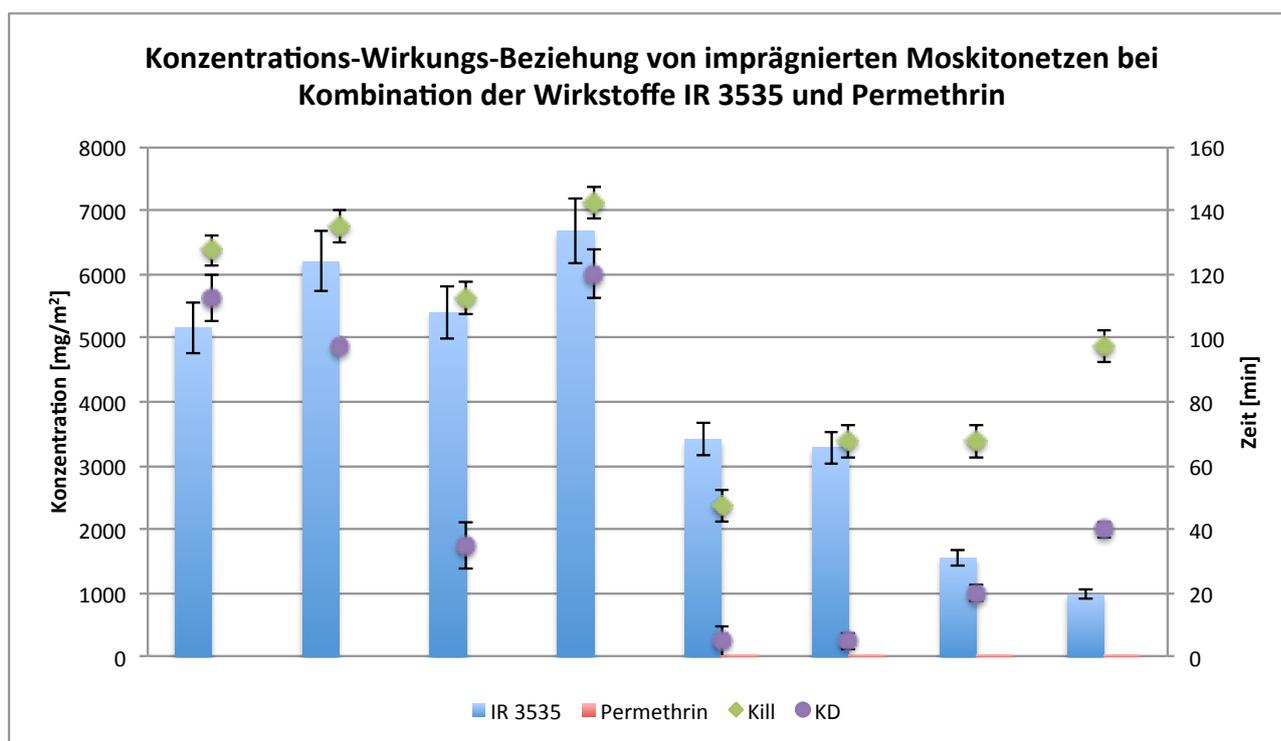


Abbildung 63: Darstellung der Konzentration und biologischer Wirksamkeit von mit Permethrin und IR 3535 imprägnierten Moskitonetzen

Parallel zur Imprägnierung mit Diethyltoluamid und Permethrin wurde eine Untersuchung mit IR 3535 und Permethrin durchgeführt (Abbildung 63). Auffällig dabei war insbesondere, dass bei

demselben Vorgehen bei der Imprägnierung keine nennenswerten Gehalte an Permethrin auf der Faser nachgewiesen werden konnten. Offensichtlich verhindert das IR 3535 die Bindung von Permethrin auf die Faser, so dass für eine hohe Bioaktivität notwendige Permethrinkonzentrationen nicht erreicht werden können. Gleichwohl ist auf Grund der höheren Affinität des IR 3535 zur verwendeten Baumwollfaser der absolute Gehalt mit maximal 6670 mg/m² deutlich höher. Die Bioaktivität bewegt sich dabei in dem Rahmen, der für den Einzelwirkstoff IR 3535 zuvor bestimmt worden war (Abbildung 55).

Vergleicht man die Bioaktivität in Abhängigkeit von der Konzentration an aktiven Inhaltsstoffen von den mit einem Insektizid imprägnierten Moskitonetzen und den mit Repellent und Insektizid imprägnierten Moskitonetzen, so fällt auf, dass eine signifikant ($p < 0,001$) höhere Bioaktivität (100% Knockdown Abbildung 64; 100% Kill Abbildung 65) schon bei vergleichsweise geringen Wirkstoffkonzentrationen erreicht wird. Dies gilt sowohl für die Netze, die erst mit Insektizid und danach mit Repellent imprägniert wurden (Permethrin in Permethrin + DEET) als auch für die Netze, die zuerst mit Repellent und anschließend mit Insektizid (DEET in Permethrin + DEET) imprägniert wurden (FAULDE and NEHRING, 2012). Ein Unterschied zwischen diesen beiden Imprägnierungsmethoden ist aus den Ergebnissen nicht abzuleiten.

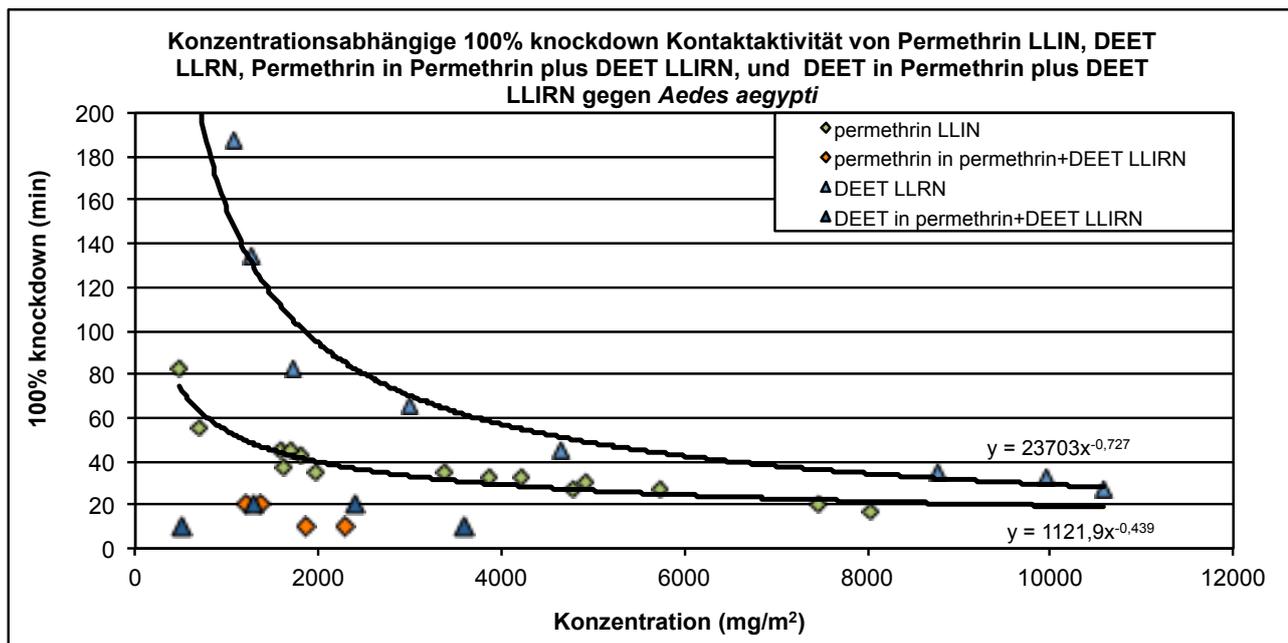


Abbildung 64: Gegenüberstellung der Knockdown-Aktivität von mit dem Polymercoatingverfahren imprägnierten LLIN und LLIRN in Abhängigkeit von ihrem Gehalt an aktiven Inhaltsstoffen

Die Betrachtung der Abbildungen 64 und 65 legt darüberhinaus nahe, dass der auf Seite 99 angesprochene synergistische Effekt zwischen Repellent und Insektizid in Bezug auf die Wirksamkeit gegen *Aedes aegypti* tatsächlich vorliegt.

Die Tatsache, dass aus den mit Repellent und Insektizid imprägnierten Netzen keine Dosis-Wirkungs-Kurve abgeleitet werden kann, ist eine Hinweis auf die starke bioaktive Wirksamkeit der Kombination aus Repellent und Insektizid. Um den sich der x-Achse langsam nähernden Teil der

Dosis-Wirkungs-Kurve zu verlassen, müssten wahrscheinlich deutlich geringere Konzentrationen an aktivem Inhaltsstoff auf die mit Repellent und Insektizid imprägnierten Netze aufgebracht werden.

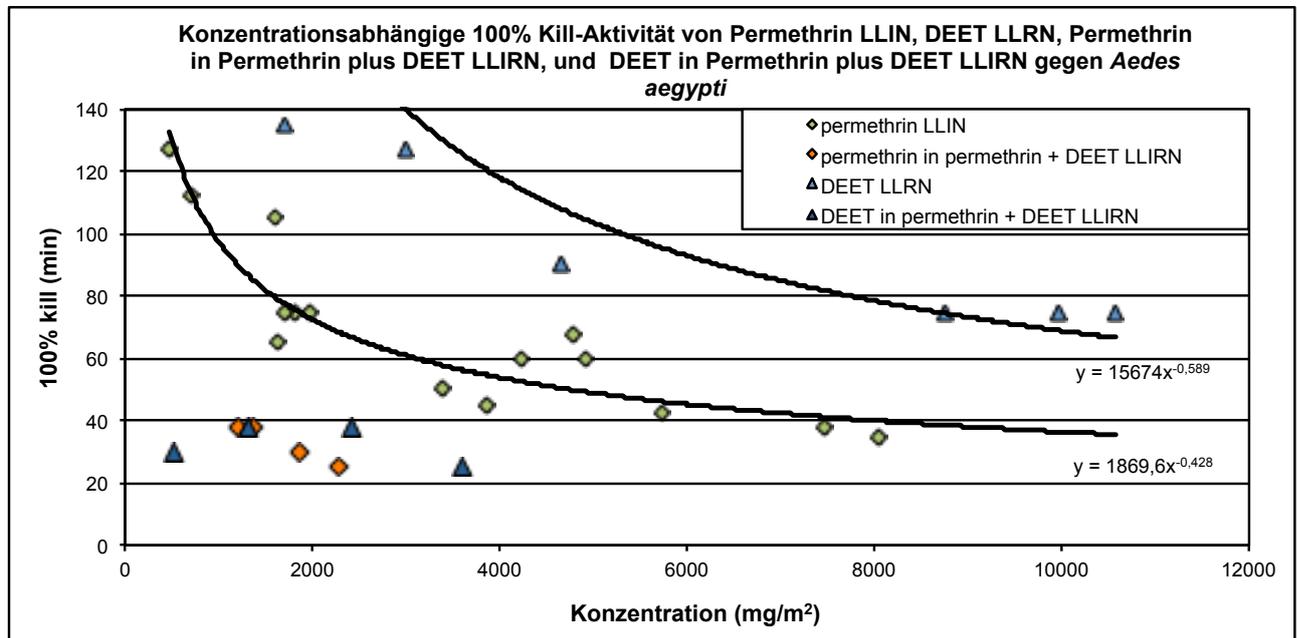


Abbildung 65: Gegenüberstellung der Kill-Aktivität von mit dem Polymercoatingverfahren imprägnierten LLIN und LLRN in Abhängigkeit von ihrem Gehalt an aktiven Inhaltsstoffen

Nach den oben beschriebenen Untersuchungen wurden mit den Netzen „Arm-in-Cage“ Tests durchgeführt, deren Ergebnisse teilweise in Abbildung 66 dargestellt sind.



Abbildung 66: „Arm-in-Cage“ Tests: 1: Unimprägniertes Netz, 2: Netz mit etwa 5000 mg/m² IR 3535, 3: Netz mit etwa 6700 mg/m² IR 3535, 4: Netz mit etwa 1500 mg/m² IR 3535 und 10 mg/m² Permethrin, 5: Netz mit etwa 3600 mg/m² Diethyltoluamid und 1200 mg/m² Permethrin,

Die Netze mit hohen Gehalten an Repellent zeigen einen deutlich sichtbaren Repellenteffekt, der bei etwa 3000 mg/m² Diethyltoluamid und 6000 mg/m² IR 3535 zu einem 100% Durchstichschutz

führt. Im Vergleich mit nicht imprägnierten Netzen und mit ausschließlich mit Insektiziden imprägnierten Netzen sind Landeversuche schon ab etwa 1500 mg/m² Repellent sichtbar reduziert. Netze mit einem hohen Gehalt an Repellent weisen darüber hinaus noch einen deutlich sichtbaren „Space-Effekt“ auf (Abbildung 66, 5.), der die Versuchstiere veranlasst, schon deutlich vor Erreichen der Netzoberfläche wieder davonzufiegen. Bei Netzen mit einem geringeren Gehalt an Diethyltoluamid und mehr Permethrin ist der Durchstichschutz nicht mehr gewährleistet, auch wenn eine geringere Landungstendenz als bei unimprägnierten Netzen zu beobachten ist. Diese Netze zeigen darüberhinaus einen deutlichen „Hot-Feet-Effekt“, so dass die meisten der gelandeten Versuchstiere das Netz umgehend wieder verlassen. Dennoch waren bei Repellentgehalten unter 3000 bzw. 6000 mg/m² Stech- und Saugakte zu verzeichnen, so dass kein 100% Durchstichschutz konstatiert werden konnte.

Da der Durchstichschutz unabhängig von der Insektizidkonzentration nur bei entsprechenden Repellentgehalten erreicht wurde, ist das Aufbringen eines Repellents in entsprechender Konzentration zum Erreichen eines Durchstichschutzes unabdingbar und scheint für die Wirksamkeit imprägnierter Moskitonetze von größerer Bedeutung zu sein, als bisher angenommen (FAULDE *et al.*, 2010).

Nachdem erfolgreich Insektizid und Repellent auf einem Moskitonetz kombiniert werden konnten, wurde eine Serie von Moskitonetzen hergestellt, die zusätzlich zu einem Insektizid und/oder Repellent noch Piperonylbutoxid enthielten. Piperonylbutoxid wird als Inhibitor des Cytochrom P 450 Systems (MOORES *et al.*, 2011) in Kombination mit Pyrethroiden eingesetzt (ELNAIEM *et al.*, 2008), um Pyrethroidresistenzen zu reduzieren (PEREGUDA and AGASHKOVA, 1991). Da Pyrethroidresistenzen neben den *kdr*-Mutationen, die zu einer verringerten Empfindlichkeit der Ionenkanäle führen und auf einer höheren Aktivität der Cytochrom P 450 Monooxygenase beruhen, können durch die Verwendung von Piperonylbutoxid gegebenenfalls auch resistente Vektoren bekämpft werden.

In der Versuchsserie wurden vier verschiedene Netzpaare hergestellt, von denen jeweils eines zusätzlich mit Piperonylbutoxid imprägniert war. Im Detail wurden folgende Wirkstoffkombinationen gewählt:

1. Permethrin ± Piperonylbutoxid
2. Permethrin und Diethyltoluamid ± Piperonylbutoxid
3. Diethyltoluamid ± Piperonylbutoxid
4. IR 3535 ± Piperonylbutoxid

Ziel der Versuche war es, herauszufinden, ob eine Imprägnierung mit den verschiedenen Wirkstoffen und Piperonylbutoxid möglich ist, und ob ein Einfluss der Kombination auf die Wirksamkeit gegenüber den Versuchstieren zu beobachten ist. Wie bereits an anderer Stelle erwähnt, ist der Umgang mit resistenten Stämmen aus Sicherheitsgründen nicht möglich, so dass sich die Beobachtungen ausschließlich auf die nicht resistenten Stämme von *Aedes aegypti* beziehen.

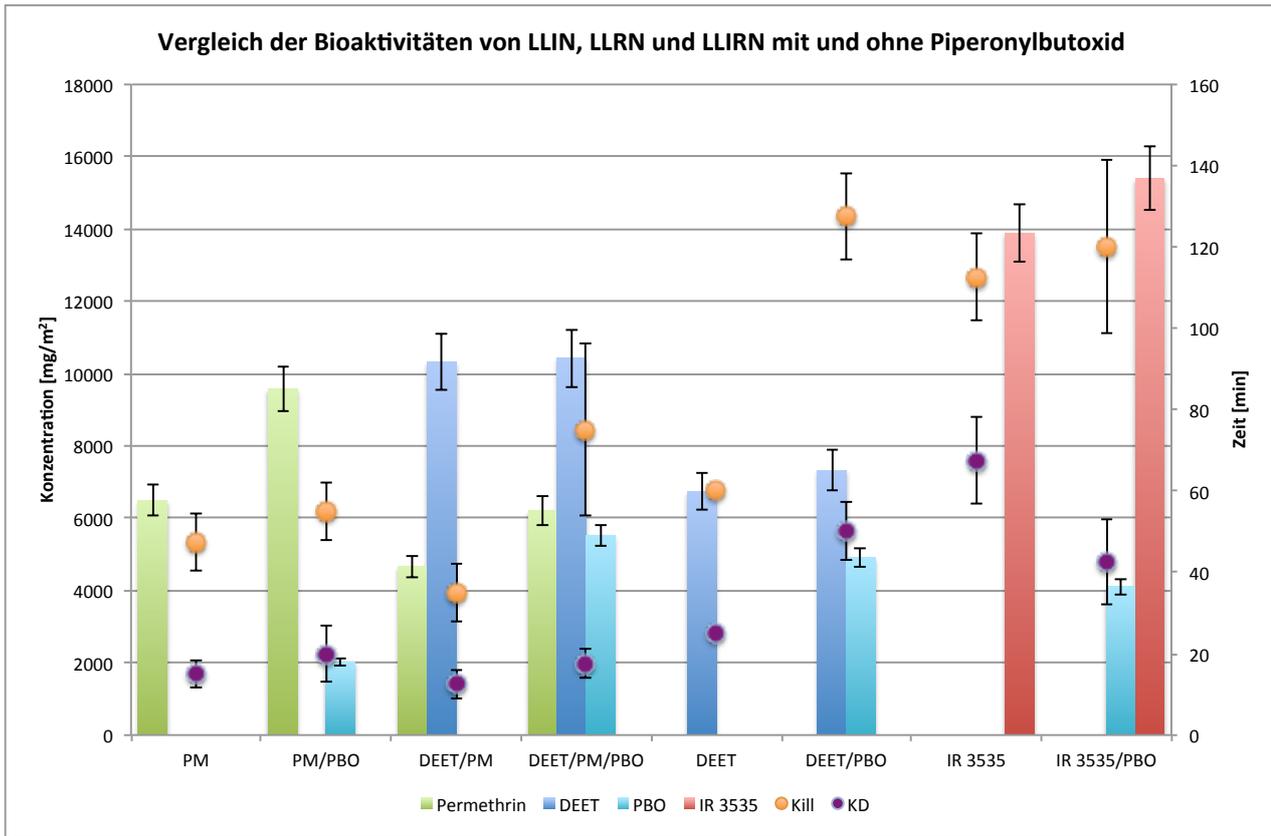


Abbildung 67: Konzentrationen und biologische Aktivitäten einer Serie imprägnierter Moskitonetze jeweils mit und ohne Piperonylbutoxid

Technologisch ist die Kombination von Piperonylbutoxid mit Repellentien und /oder Insektiziden problemlos möglich. Die Konzentrationen auf den Netzen erreichen sicher den stark wirksamen Bereich. Eine Verbesserung der biologischen Aktivität gegen nicht resistente Stämme von *Aedes aegypti* ist nicht festzustellen. In Kombination mit Diethyltoluamid scheint Piperonylbutoxid sogar einen negativen Einfluss auf die biologische Wirksamkeit zu haben. Da die nicht resistenten Stämme keine beschleunigte Entgiftung über das Cytochrom P 450 System aufweisen, ist auch die Hemmung dieses Systems demnach nicht von Relevanz für die biologische Aktivität. Der negative Einfluss auf die mit Diethyltoluamid imprägnierten Netze legt die Vermutung nahe, dass die Toxizität von Diethyltoluamid einen anderen Ursprung hat, als die der Pyrethroide. Um zu prüfen, ob die Kombination der Netze mit dem synergistisch wirkenden Piperonylbutoxid sinnvoll ist, müssten Versuche mit resistenten Stämmen von Vektoren durchgeführt werden. Bei nicht resistenten Stämmen entsteht durch die zusätzliche Imprägnierung mit Piperonylbutoxid kein Vorteil.

4.2.3. Vergleich der Eigenschaften unterschiedlicher Netzmaterialien bei der Imprägnierung mit dem neuen Polymerisationsverfahren

Nachdem die bisherigen Untersuchungen ausschließlich mit Baumwollnetzen durchgeführt worden sind, werden im folgenden Abschnitt die Eigenschaften anderer Netzmaterialien bei Imprägnierung mit dem neuen Polymerisationsverfahren vorgestellt.

Bei den weiteren Netzmaterialien handelte es sich zum einen um ein Polyesternetz und zum anderen um ein Baumwoll-Polyester-Mischgewebe, das als Lenonetz bezeichnet wird. Bei der Interpretation der Ergebnisse sind in jedem Fall auch die Eigenschaften der Netze, die in Tabelle 20 dargestellt werden, von Bedeutung.

Tabelle 20: Eigenschaften verschiedener zur Imprägnierung verwendeter Moskitonetze

Netztyp	Maschenweite	Flächenbezogene Masse [g/m ²]	Luftdurchlässigkeit
Baumwolle	eng (170 mesh/cm ²)	180	gering
Lenonetz (Mischgewebe)	mittel	70	mittel
Polyester	weit	45	hoch

Die Polyesternetze wurden gemeinsam mit den in Abbildung 62 und 63 dargestellten Baumwollnetzen hergestellt und mit dem gleichen Verfahren zum selben Zeitpunkt imprägniert, so dass diese Netze uneingeschränkt miteinander verglichen werden können. Anhand der vor den Untersuchungen bekannten Daten (Tabelle 20) wurde erwartet, dass die Polyesternetze bei gleichem Imprägnierungsverfahren eine geringere Kapazität haben sollten, als die Baumwollnetze, da die Oberfläche der Kunststofffaser deutlich geringer sein sollte. Zusätzlich zur Analytik der Polyesternetze wurde parallel zu den Baumwollnetzen die Bestimmung der Bioaktivität vorgenommen.

Bei Betrachtung der ausschließlich mit Repellentien imprägnierten Netze (Abbildung 68) ist zu erkennen, dass die Menge der Wirkstoffe, die auf die Polyesternetze aufgebracht werden kann, deutlich geringer ist als die Menge, die auf die Baumwollnetze polymerisiert werden kann. Für IR 3535 findet man auf den Baumwollnetzen zwischen 5200 und 6700 mg/m² Wirkstoff, bei den Polyesternetzen mit 86 bis 185 mg/m² nur etwa 2-3 % dieser Menge. Beim Diethyltoluamid ist die auf der Baumwollfaser nachzuweisende Menge zwischen 400 und 3700 mg/m² und bei der Polyesterfaser zwischen 69 und 400 mg/m², was etwa 10-17 % der auf die Baumwollfaser applizierbaren Menge an Diethyltoluamid entspricht. Wie zu erwarten war, haben die Polyesternetze eine deutlich geringere Kapazität in Bezug auf die auftragbare Menge an Repellentien. Dabei ist die Affinität von Diethyltoluamid zur Polyesterfaser größer als die von IR 3535, wohingegen dieselbe Konzentration einer Ausgangspolymerisationslösung bei den Baumwollfasern zu höheren Gehalten an IR 3535 als Diethyltoluamid führt. Bemerkenswert ist

darüberhinaus, dass die Konzentrationen der Ausgangslösungen sich bei IR 3535 nicht in dem Gehalt auf den Netzen widerspiegeln, wohingegen die Gehalte an Diethyltoluamid reproduzierbar

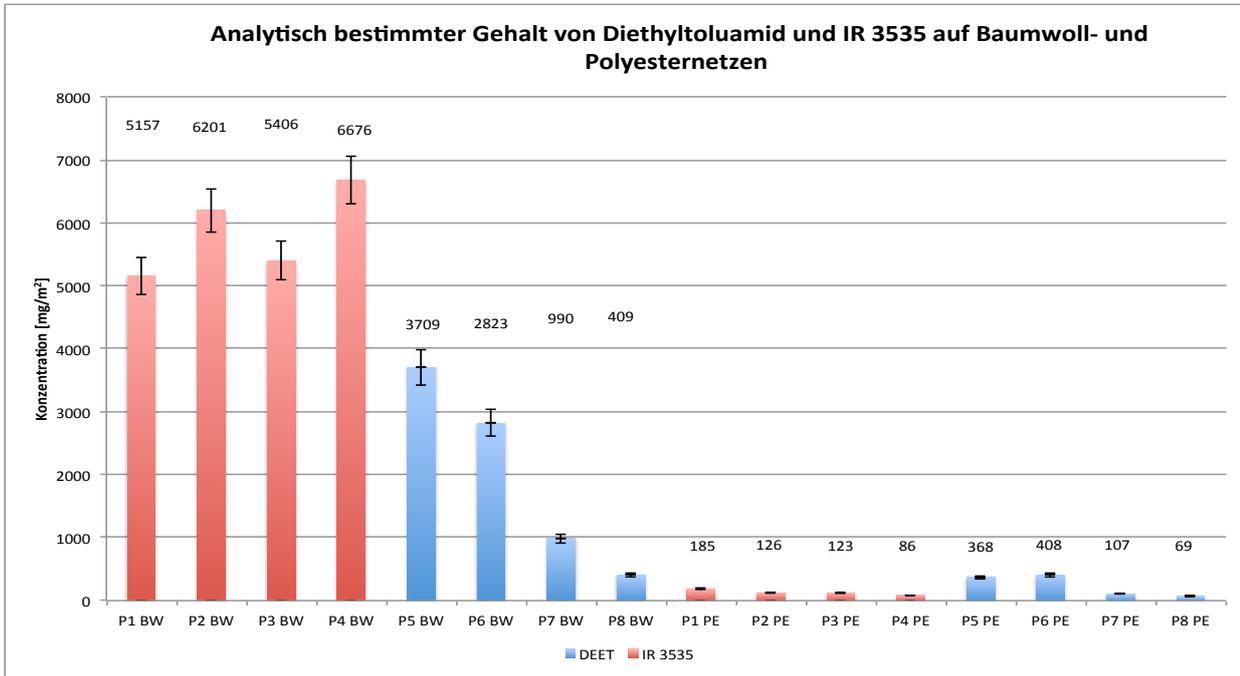


Abbildung 68: Vergleich der Konzentrationen an Diethyltoluamid und IR 3535 auf Baumwollnetzen (P1-P8 BW) und Polyesternetzen (P1-P8 PE) nach Imprägnierung mit demselben Verfahren

mit den Konzentrationen der Ausgangslösung korrelieren. Das Phänomen, dass die IR 3535 Konzentrationen nicht reproduzierbar sind, war bereits unter 4.2.2 zu erkennen, wo die Imprägnierung mit IR 3535 und Permethrin auf Baumwollnetzen zu keinen nennenswerten Gehalten an Permethrin führte. Dieses Ergebnis ist in Abbildung 69 unter P1 BW bis P4 BW nochmals dargestellt. In dieser Abbildung ist darüberhinaus erneut die Imprägnierung mit Diethyltoluamid und Permethrin auf Baumwollnetzen dargestellt; beides im Vergleich mit Polyesternetzen, die mit demselben Verfahren mit Repellent und Insektizid imprägniert wurden. Die bei den Baumwollnetzen gemachten Beobachtungen bestätigen sich auch für die Polyesternetze. Die Imprägnierung mit IR 3535 und Permethrin ist problematisch und führt zu äußerst geringen Permethringehalten, wohingegen die Imprägnierung mit Diethyltoluamid und Permethrin zu deutlich höheren Permethringehalten führt. Vergleicht man die Konzentration an Permethrin auf den Polyesternetzen mit der auf den Baumwollnetzen, so ergibt sich ein Wert von 4,6 bis 12,6 % der Menge, die auf die Baumwollnetze unter denselben Bedingungen aufgebracht wurde. Somit wird deutlich, dass sowohl bei Repellents als auch bei Insektiziden die Kapazität der Polyesternetze nur bei etwa 1/10 der Kapazität der Baumwollnetze liegt. Darüberhinaus wird deutlich, dass auch strukturell verwandte Substanzen bei ein und demselben Polymerisationsverfahren völlig anders reagieren, wie die eingeschränkte Kompatibilität von IR 3535 mit den verwendeten Materialien und der Polymerisationstechnik zeigt, und dass die Funktionsfähigkeit des Verfahrens für jeden einzelnen Wirkstoff individuell überprüft werden muss.

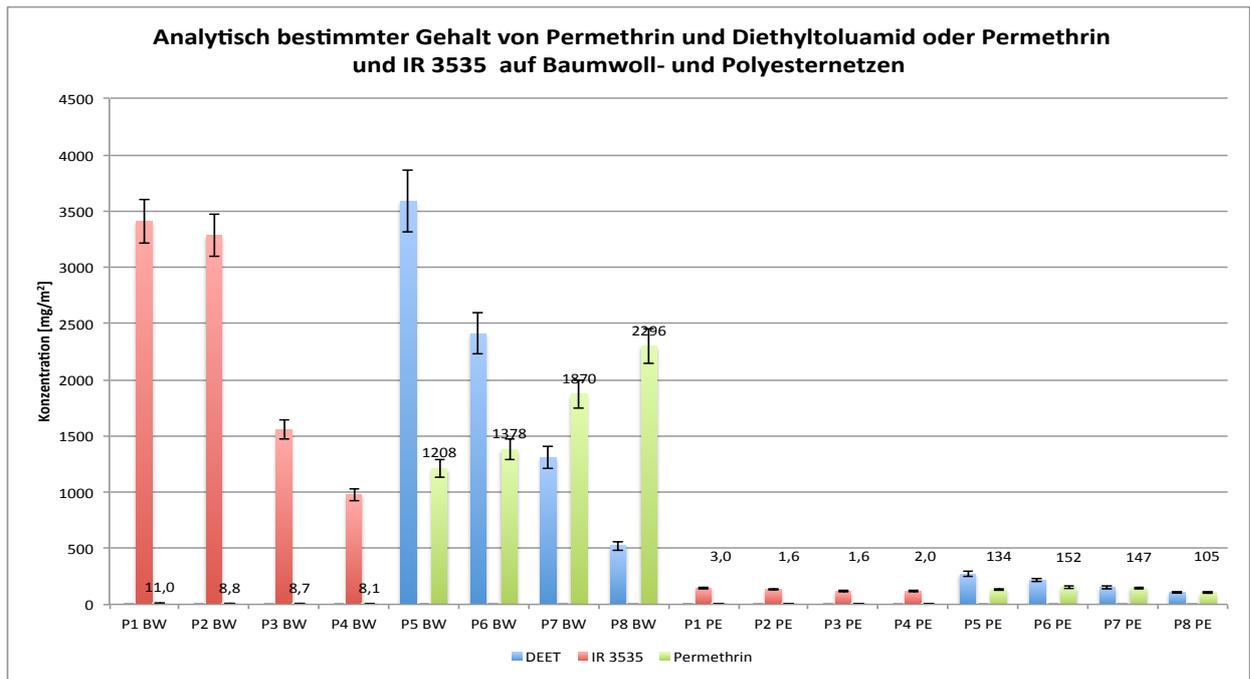


Abbildung 69: Vergleich der Konzentrationen an Diethyltoluamid, IR 3535 und Permethrin auf Baumwollnetzen (P1-P8 BW) und Polyesternetzen (P1-P8 PE) nach Imprägnierung mit demselben Verfahren

Neben dem Vergleich der absoluten Konzentrationen auf den Moskitonetzen wurden auch die Bioaktivitäten bestimmt und miteinander verglichen (Abbildung 70 und 71). Dabei fällt auf, dass

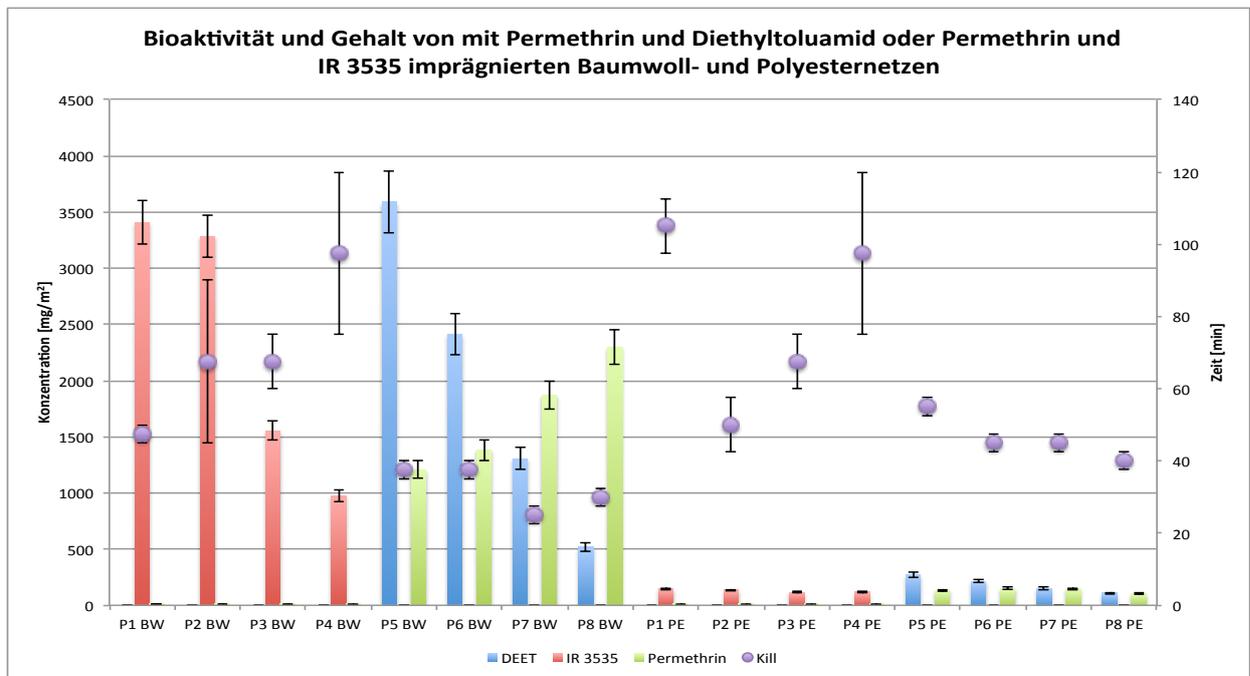


Abbildung 70: Darstellung der Kill-Aktivität von imprägnierten Baumwoll- und Polyesternetzen bei gleichzeitiger Abbildung der Konzentration an aktiven Inhaltsstoffen auf den Netzen

trotz der deutlich geringeren Konzentration an aktiven Inhaltsstoffen auf den Polyesternetzen, die Bioaktivität der Polyesternetze nur geringfügig schwächer ist, als die der Baumwollnetze mit deutlich mehr aktiven Inhaltsstoffen (Abbildung 70 und 71).

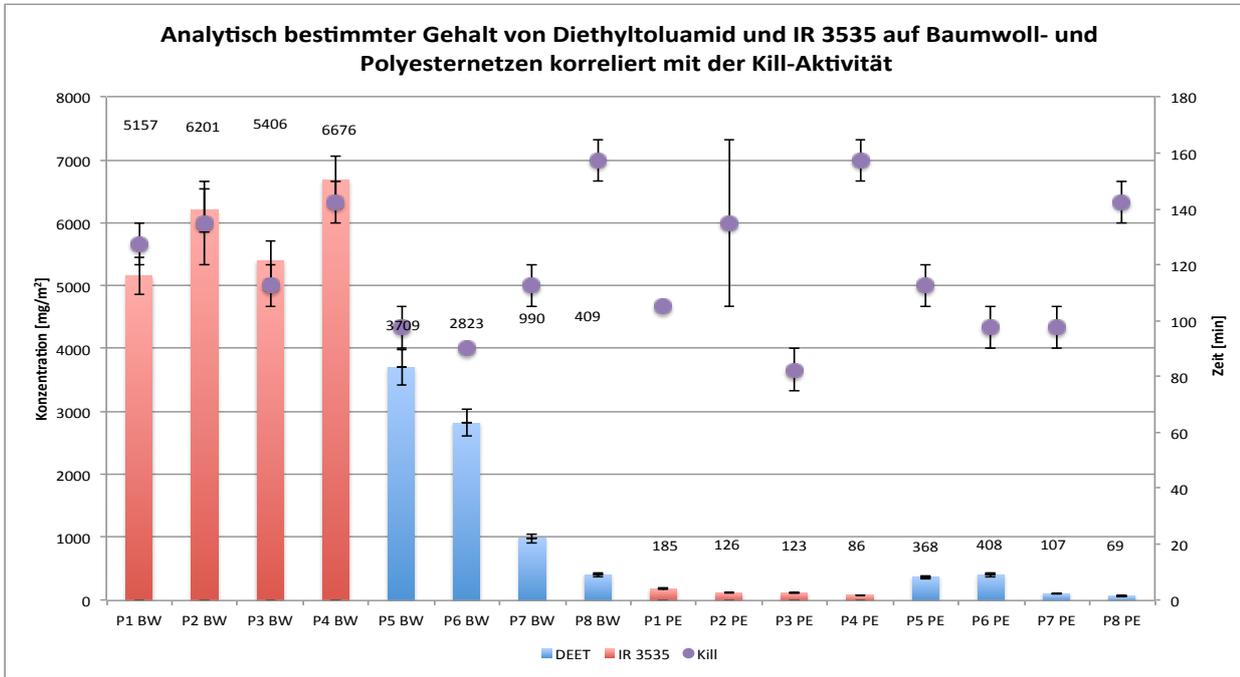


Abbildung 71: Kill-Aktivität von Baumwoll- und Polyesternetzen mit IR 3535 oder Diethyltoluamid imprägniert im Vergleich

Hier wäre auf Grund der großen Konzentrationsunterschiede in den Gehalten ein deutlicherer Unterschied in den Bioaktivitäten zu erwarten gewesen. Eine Ursache dafür könnte in dem Aufbau der Faser zugrunde liegen, der bei den Baumwollnetzen dazu führt, dass nicht der gesamte gebundene Wirkstoff zur Verfügung steht.

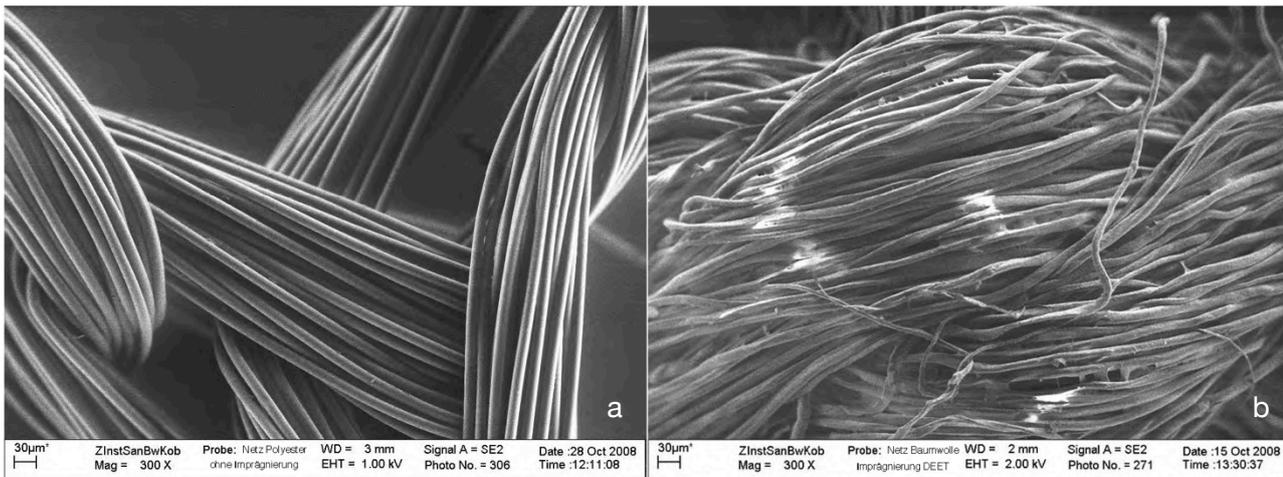


Abbildung 72: Elektronenmikroskopische Aufnahme (a) eines unimprägnierten Polyester- und (b) eines imprägnierten Baumwollnetzes (Polymercoatingverfahren) bei gleicher Vergrößerung

Wie in Abbildung 72 zu erkennen ist, sind die Fasern des Polyesternetzes dicker und glatter als die des Baumwollnetzes. Die Einzelfasern des Baumwollnetzes sind darüberhinaus mit einer raueren Oberfläche versehen und das gesamte Fasergebilde ist von einer größeren Unordnung geprägt. All dies führt zu einer größeren Oberfläche der Baumwollnetze und zu einer höheren Bindungskapazität für die aktiven Inhaltsstoffe. Denkbar ist darüberhinaus, dass die Baumwollfasern auf Grund ihrer physikalischen Eigenschaft quellen zu können, ein großer Teil der aktiven Inhaltsstoffe in Faser inkorporiert werden und diese Anteile nicht unmittelbar für die Bioaktivität zur Verfügung stehen. Eine Polyesterfaser kann nicht quellen und demnach auch keinen Wirkstoff in die Faser inkorporieren, so dass der Wirkstoff ausschließlich auf der Oberfläche der Faser gebunden ist. Dadurch ist der gesamte Wirkstoff oberflächenverfügbar und es reichen geringere Mengen, um einen der Baumwollfaser vergleichbaren Effekt zu erzielen.

Nach der Untersuchung von Baumwoll- und Polyesternetzen wurden von der Firma Utexbel weitere Netze hergestellt, welche die Eigenschaften der bisher untersuchten Moskitonetze verbinden sollte. Bei den als Lenonetzen bezeichneten Moskitonetzen handelt es sich um eine Mischfaser aus Baumwolle und Polyester, die leichter und luftdurchlässiger ist als reine Baumwollnetze. Gleichzeitig soll aber die Kapazität für die Aufnahme an aktiven Inhaltsstoffen größer sein, als bei den Polyesternetzen und die biologische Aktivität sollte möglichst an die der Baumwollnetze heranreichen. Hergestellt wurden zunächst Netze, die zum einen mit den Repellentien Diethyltoluamid (L1 bis L4) oder IR 3535 (L5 bis L8) in unterschiedlichen Konzentrationen imprägniert sein sollten und Netze die zusätzlich zu den Repellentien mit einer gleichbleibenden Menge Permethrin imprägniert sein sollten (L1,„bis“ bis L8,„bis“). Bei der analytischen Bestimmung des Gehaltes an aktiven Inhaltsstoffen wurde jedoch festgestellt, dass bei den Lenonetzen, die eigentlich nur mit Repellentien imprägniert sein sollten, auch geringe Mengen Permethrin (2 bis 12 mg/m²) nachgewiesen werden konnten (Abbildung 73 und 74). Das Permethrin ist vermutlich durch Verunreinigung auf die Netze gelangt. Die Netze, die zusätzlich zu den Repellentien mit Permethrin imprägniert sein sollten, enthielten ihrer Analyse zufolge IR 3535 und Permethrin in gleichbleibenden Konzentrationen (Abbildung 75).

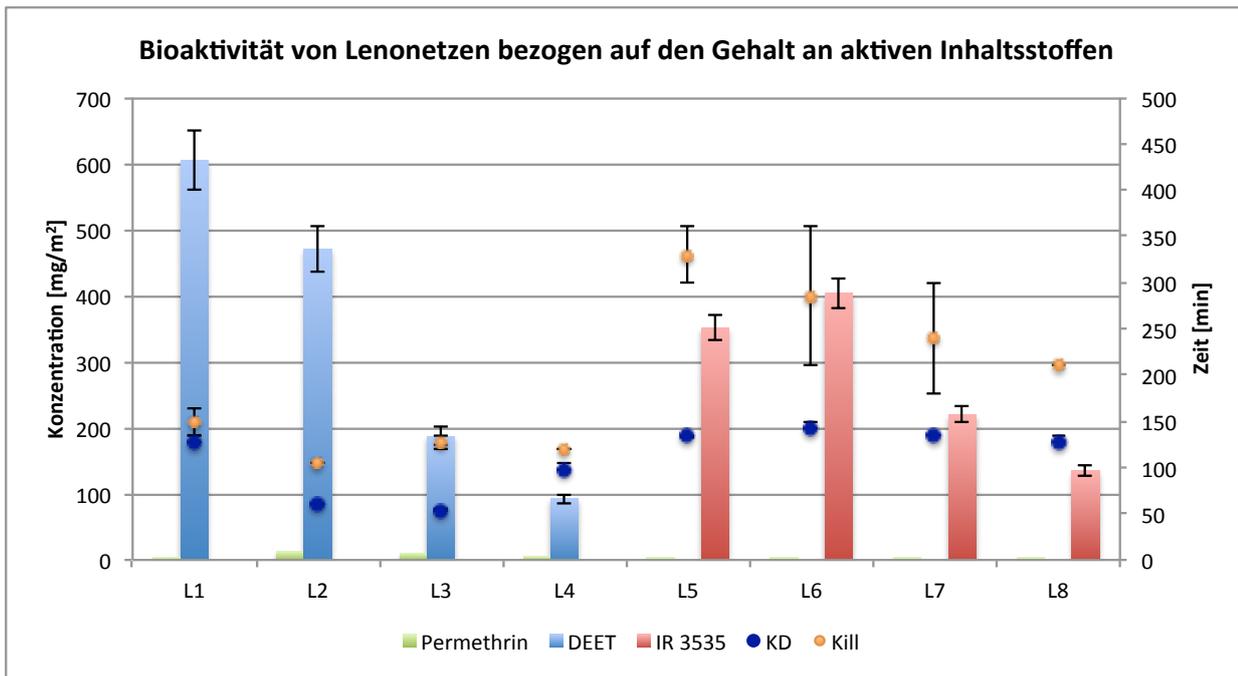


Abbildung 73: Konzentration und Bioaktivität von Lenonetzen mit Diethyltoluamid, IR 3535 und Rückständen von Permethrin

Grundsätzlich ist die erste Charge Lenonetze hinsichtlich ihrer Imprägnierbarkeit besser als die Polyesternetze jedoch schlechter als die der Baumwollnetze.

Bei der Beurteilung der Wirksamkeit der mit Repellentien imprägnierten Lenonetze muss der Restgehalt an Permethrin möglicherweise Berücksichtigung finden. Betrachtet man zunächst die Bioaktivität in Bezug auf den Gehalt an Repellentien, so sind die mit Diethyltoluamid

imprägnierten Lenonetze insbesondere hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität deutlich besser wirksam als die Netze mit IR 3535 (Abbildung 73). Das verwundert insofern, als dass derartige Unterschiede in der Wirksamkeit zwischen Diethyltoluamid und IR 3535 in den vorangegangenen Versuchen nicht aufgetreten waren. Geht man von einem synergistischen Effekt zwischen Repellent und Insektizid aus (siehe auch Seite 99), lassen sich die unterschiedlichen biologischen Aktivitäten mit den unterschiedlichen Konzentrationen an Permethrin erklären (Abbildung 74), die auf den Lenonetzen nachzuweisen waren. Die biologischen Aktivitäten der einzelnen Netze korrelieren interessanterweise sehr gut mit den gemessenen Permethringehalten auf den Netzen. Auch wenn es sich lediglich um geringe Mengen (maximal 1/20 des Gehaltes) im Vergleich zu den aufgetragenen Konzentrationen an Repellent handelt, scheinen diese einen deutlichen Einfluss auf die biologische Aktivität zu haben. Trotz des synergistischen Effektes bleibt die Wirksamkeit der Netze deutlich hinter den Netzen mit einem höheren Insektizidgehalt zurück, wie sich aus Abbildung 76 entnehmen lässt.

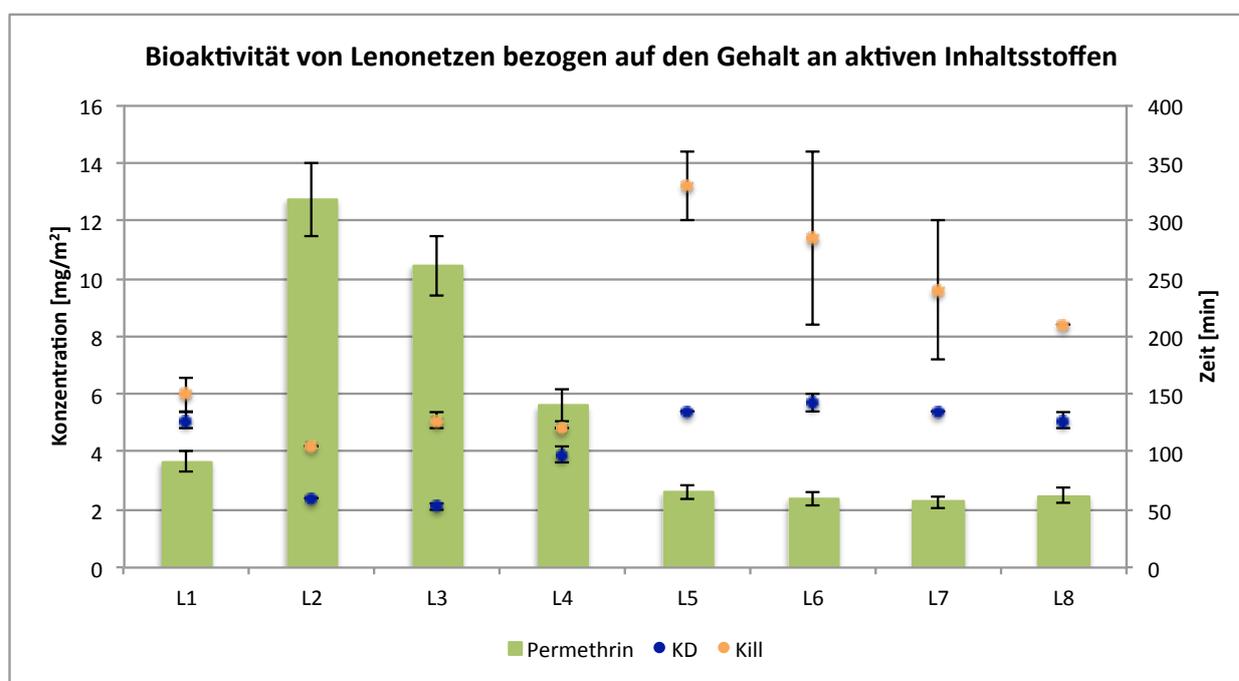


Abbildung 74: Konzentrationsabhängige Bioaktivität von Lenonetzen hinsichtlich Verunreinigungen mit Permethrin

Bei den Netzen, die ursprünglich mit unterschiedlichen Gehalten an Repellents und konstantem Gehalt an Permethrin imprägniert sein sollten, wurde ausschließlich IR 3535 und Permethrin nachgewiesen.

Festzustellen ist bei diesen Lenonetzen die Kompatibilität von IR 3535 und Permethrin bei der Imprägnierung. Waren bisher bei der Imprägnierung mit IR 3535 nur geringe Mengen Permethrin auf den fertigen Netzen nachweisbar, so sind bei den Lenonetzen jetzt Gehalte von bis zu 350 mg/m² festzustellen (Abbildung 75). Bei Addition der Gehalte an IR 3535 ergeben sich bis zu 600

mg/m² aktiver Inhaltsstoff, eine Menge, die etwa dem dreifachen der aktiven Inhaltsstoffe auf den Polyesternetzen entspricht.

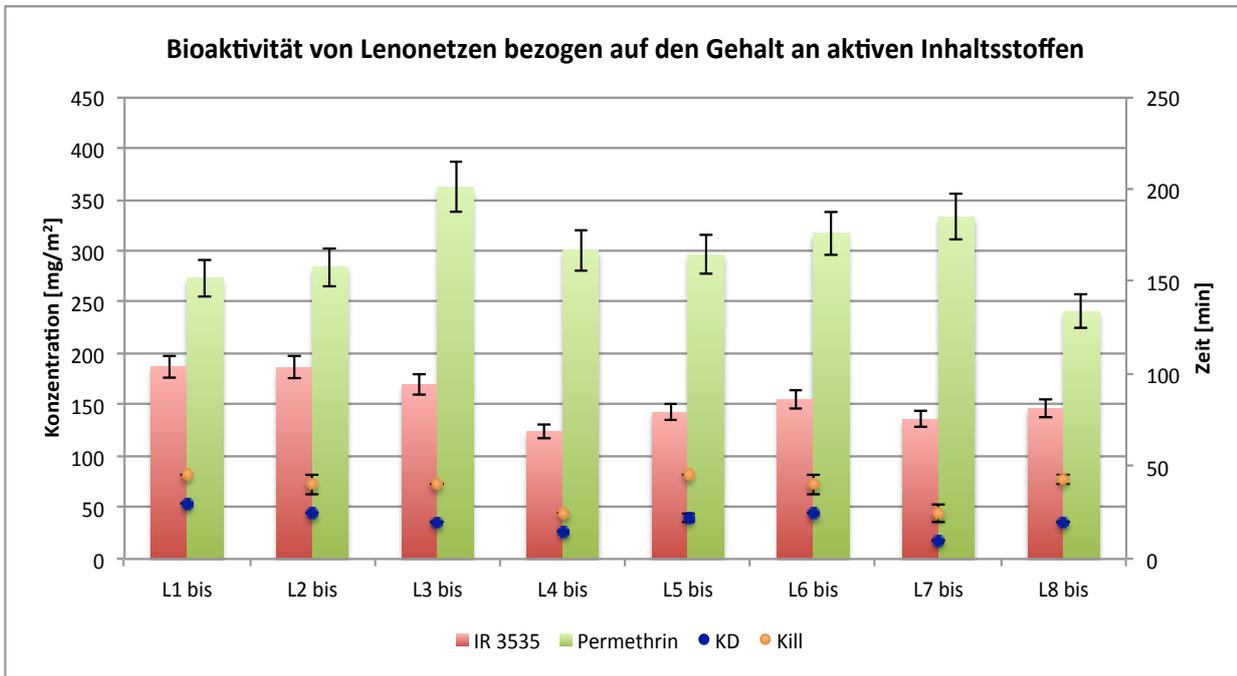


Abbildung 75: Bioaktivität und Gehalte von mit IR 3535 und Permethrin imprägnierten Lenonetzen

In Bezug auf die Bioaktivität lässt sich für die mit Repellent und Insektizid imprägnierten Lenonetze feststellen, dass die Wirksamkeit vergleichbar mit der von mit Diethyltoluamid und Permethrin imprägnierten Baumwollnetzen ist. Zwischen den einzelnen Lenonetzen lassen sich keine nennenswerten Unterschiede in der Bioaktivität erkennen, was mit der analytisch ermittelten Vergleichbarkeit des Gehaltes der Wirkstoffe auf den Netzen korreliert.

Da die Schwankungen an aktiven Inhaltsstoffen bei den unter gleichen Bedingungen imprägnierten Lenonetzen so gering sind, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den Bioaktivitäten festzustellen sind, kann davon ausgegangen werden, dass eine Produktion der Netze mit einem konstanten Gehalt an IR 3535 und Permethrin möglich ist.

Vergleicht man die unterschiedlich imprägnierten Lenonetze miteinander (Abbildung 76), so wird deutlich, dass Netze mit einem höheren Gehalt an Permethrin die größere Wirksamkeit aufweisen. Die Toxizität der Netze und der damit verbundenen Knockdown- und Kill-Zeiten für *Aedes aegypti*, die denen der wirksamsten Baumwollnetze entsprechen, werden auch bei weiteren Verbesserungen der Netze wahrscheinlich nicht mehr weiter sinken, da anzunehmen ist, dass eine nahezu maximale Wirkgeschwindigkeit erreicht ist. Wie bei allen toxischen Substanzen ist eine bestimmte Zeitspanne nötig, um den Wirkstoff an den Zielort zu bringen und dort seine Wirkung zu entfalten. Diese Zeitspanne kann durch Applikation höherer Dosen ab einem bestimmten Punkt nicht mehr verkürzt werden, so dass höhere Dosen keinen signifikant verbesserten Effekt mehr erzielen. Dieser Punkt scheint sowohl bei den Baumwollnetzen als auch bei den Lenonetzen

erreicht zu sein, so dass sich auch bei Steigerung der aufgetragenen Wirkstoffgehalte keine nennenswerten Verkürzungen der Knockdown- und Kill-Aktivitäten ergeben würden.

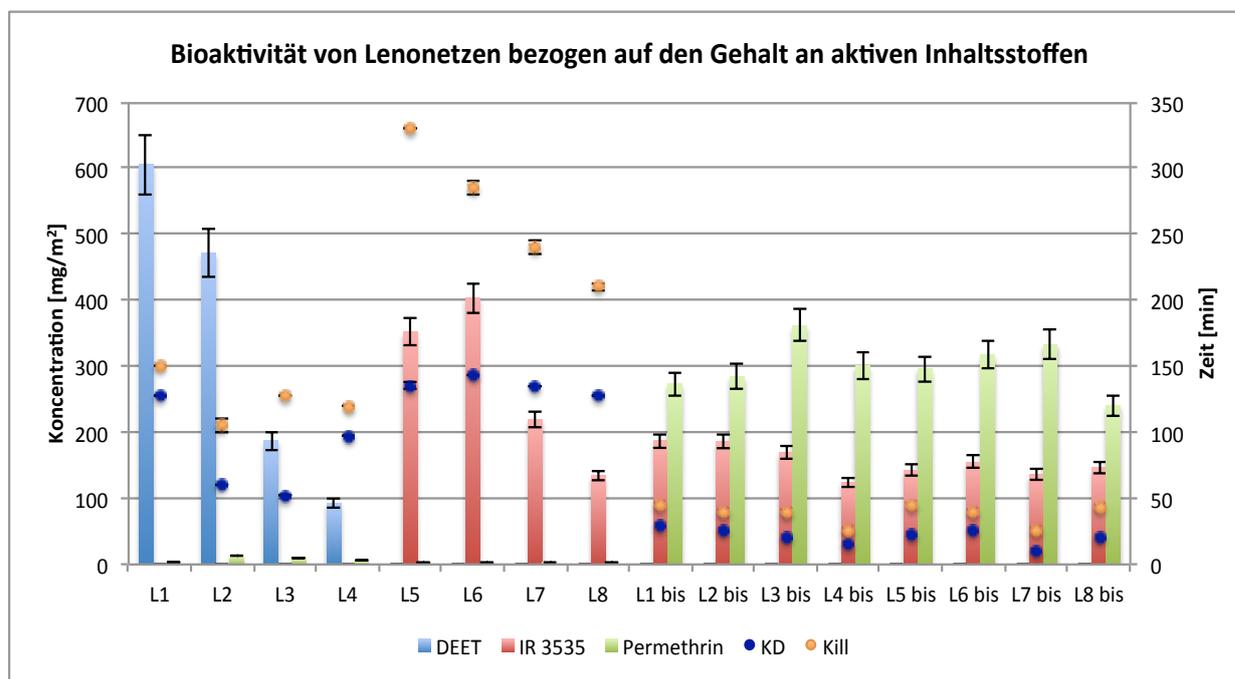


Abbildung 76: Vergleich von Knockdown- und Kill-Aktivitäten von Lenonetzen mit Bezug zu den enthaltenen Gehalten an Repellent und/oder Insektizid

Um weitere Informationen über die Wirksamkeit der Lenonetze zu erhalten, wurden einige der Netze mit „Arm-in-Cage“-Tests untersucht. Die Hoffnung, dass der höhere Gehalt an aktiven Inhaltsstoffen als bei den Polyesternetzen zu einer Verbesserung des Durchstichschutzes führen würde, konnte nicht bestätigt werden. Zwar war die Häufigkeit der Stech- und Landeversuche um etwa ein Drittel geringer als bei einem unbehandelten Netz, aber ein Abhalten der Stechmücken von ihrem Saugakt konnte nicht beobachtet werden. Auch wurde erneut kein Unterschied zwischen den Netzen mit viel und mit wenig Permethrin festgestellt, was zusätzlich belegt, dass die Anwesenheit eines Insektizids keinen Einfluss auf das Stechverhalten der Stechmücken hat und dass die entscheidende Bedeutung hier den Repellentien zukommt.

Um zu prüfen, ob eine weitere Verbesserung der Lenonetze möglich ist, wurden im Anschluss an die Untersuchung der ersten Lenonetze zwei weitere Lenonetze hergestellt, die mit einem anderen Verhältnis von Baumwolle und Polyester ausgestattet waren. Diese Netze wurden als Leno 1 und Leno 2 bezeichnet und jeweils auf vier unterschiedliche Arten imprägniert. Die verschiedenen Imprägnierungen wurden mit Permethrin (P1), Diethyltoluamid (P2), IR 3535 (P3) und Diethyltoluamid und Permethrin (P4) durchgeführt.

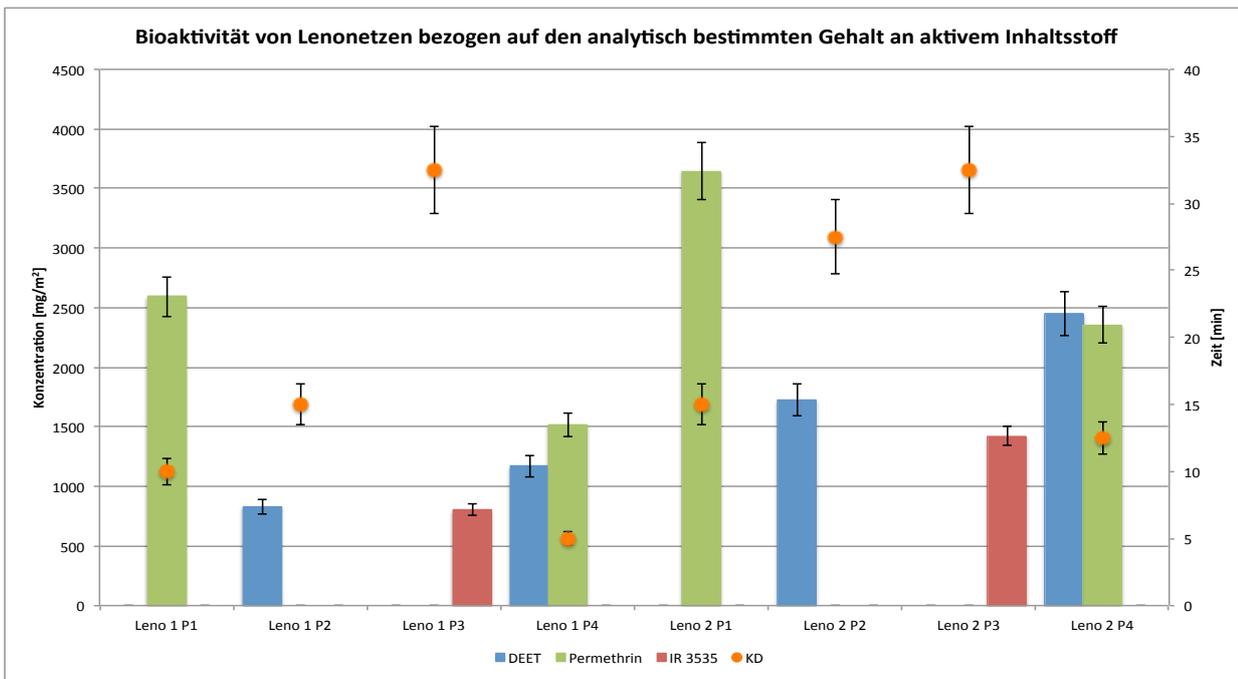


Abbildung 77: Gehalte und Knockdown-Aktivitäten unterschiedlicher Lenonetze mit verschiedenen Wirkstoffen

Zunächst werden die analytisch bestimmten Gehalte der beiden verschiedenen Lenonetze betrachtet. Dabei ist zu erkennen, dass das Lenonetz 2 bei allen Imprägnierungen deutlich höhere Wirkstoffkonzentrationen aufweist als das Netz Leno 1. Da beide Netze mit denselben Verfahren imprägniert wurden, ist zu schlussfolgern, dass Netz Leno 2 eine höhere physikalische Bindungskapazität für die aktiven Inhaltsstoffe besitzt als Netz Leno 1. Insgesamt weisen jedoch beide Netze eine deutlich höhere Bindungskapazität als das erste Lenonetz auf und bei Netz Leno 2 kann eine Menge an aktiven Inhaltsstoffen aufgebracht werden, die deutlich näher an die Kapazität der Baumwollnetze heranreicht.

Betrachtet man die Bioaktivitäten der einzelnen Netze (Abbildung 77 und 78), so ist ein Wirksamkeitsunterschied zwischen den Netzen Leno 1 und Leno 2 nicht festzustellen ($p > 0,8$). Der Unterschied zwischen den einzelnen Wirkstoffen ist aber wie schon in den vorangegangenen Versuchen deutlich. Diethyltoluamid wirkt etwas stärker und schneller als IR 3535 und Permethrin ist einzeln appliziert den Repellentien hinsichtlich der Wirkstärke deutlich überlegen ($p = 0,012$); die Kombination von Diethyltoluamid und Permethrin steht der Permethrinwirkung auch bei

geringeren absoluten Permethrinkonzentrationen nicht nach ($p > 0,7$) und bestätigt erneut die Theorie, dass ein synergistischer Effekt zwischen Repellent und Insektizid vorliegt.

Trotz der insgesamt höheren Konzentrationen an aktiven Inhaltsstoffen, sinkt die minimale Knockdown- und Kill-Zeit im Vergleich zu den ersten Lenonetzen nicht, da eine maximale dosisabhängige Wirkgeschwindigkeit erreicht ist (KADALA *et al.*, 2011).

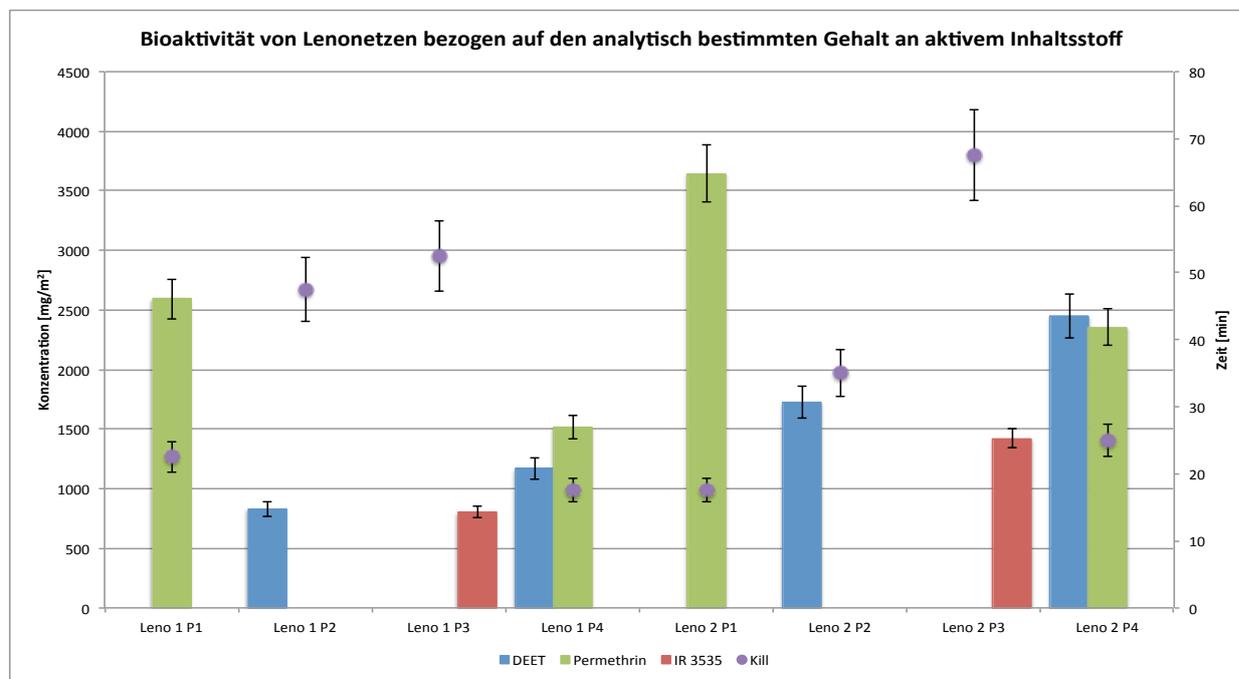


Abbildung 78: Gehalte und Kill-Aktivitäten unterschiedlicher Lenonetze mit verschiedenen Wirkstoffen

Allgemein zeigen beide Lenonetze sehr gute Eigenschaften und insbesondere bei den Netzen mit Diethyltoluamid und Permethrin wurden die Ergebnisse der „Arm-in-Cage“-Tests mit besonderem Interesse beobachtet. Bei den Netzen P1 bis P3 konnte keine Verbesserung des Durchstichschutzes im Vergleich zu den vorherigen Lenonetzen festgestellt werden. Keines der Netze, egal mit welcher Imprägnierung, hielt die Versuchstiere vom Durchstechen ab. Die besten Ergebnisse dieser Netze zeigt Leno 2 P2, dass mit einem Gehalt von 1725 mg/m² Diethyltoluamid für ein reduziertes Absatzbestreben der Versuchstiere sorgte. Die höchste Aktivität der Netze ging jedoch vom Lenonetz 2 P4 aus, dass mit 2447 mg/m² Diethyltoluamid den höchsten Gehalt an Repellent aufwies und folgerichtig eine doch deutlich abschreckende Wirkung auf die Versuchstiere hatte. Da der unter 4.2.2. postulierte Gehalt von ≥ 3000 mg/m² Diethyltoluamid zum Erreichen eines hundertprozentigen Durchstichschutzes nicht vorhanden ist, konnte dieser auch nicht erreicht werden, wohl aber eine deutlicher sichtbare Repellentwirkung im Vergleich zu den anderen Netzen. Das Netz mit einem Gehalt von 1424 mg/m² IR 3535 zeigte keine deutliche Repellentwirkung, da der erforderliche Gehalt für eine sichtbare Wirkung bei IR 3535 höher liegt als bei Diethyltoluamid und das Netz nur etwa 1/4 der notwendigen Wirkstoffmenge enthält.

Hinsichtlich eines Durchstichschutzes ist es bislang nur möglich, diesen auf Baumwollnetzen zu erzielen. Die dazu notwendigen Gehalte sind im Gegensatz zu den toxikologischen Endpunkten Knockdown und Kill nicht verschieden für die unterschiedlichen Netzmaterialien, so dass die Mindestmengen an Repellentien (siehe 4.2.2.) zwingend auf die Fasern aufgebracht werden müssen, um einen hundertprozentigen Durchstichschutz zu erzielen.

Die Ergebnisse unterschiedlicher LLRNs und LLIRNS in „Arm-in-Cage“-Tests sind in Tabelle 21 dargestellt und zeigen die dosisabhängigen Wirkungen der imprägnierten Moskitonetze hinsichtlich ihres Gehaltes an Repellentien.

Tabelle 21: Space-Effekt und schützende Eigenschaften von LLRNn and LLIRNn untersucht mit „Arm-in-Cage“-Tests für 5 Minuten und A. aegypti als Versuchstier

Netztyp:	Permethrin [mg/m ²]	Etofenprox [mg/m ²]	DEET [mg/m ²]	IR3535 [mg/m ²]	sichtbarer „Space-Effekt“	sichtbarer „Hot-Feet - Effekt“	Landungs -schutz	Stech- versuchs- schutz	Stech- schutz	Zeitdauer bis zum Verlust des Durchstichschutzes [Wochen]
LLRN	-	-	1080	-	+	+	Nein	Nein	Nein	-
LLRN	-	-	1270	-	+	+	Nein	Nein	Nein	-
LLRN	-	-	1720	-	+	++	Nein	Nein	Nein	-
LLRN	-	-	3010	-	+++	+++	Nein	Nein	Nein	-
LLRN	-	-	4660	-	+++	-	Ja	Ja	Ja	29
LLRN	-	-	8770	-	+++	-	Ja	Ja	Ja	54
LLRN	-	-	9960	-	+++	-	Ja	Ja	Ja	58
LLRN	-	-	10580	-	+++	-	Ja	Ja	Ja	61
LLRN	-	-	-	1590	+	+	Nein	Nein	Nein	-
LLRN	-	-	-	3750	+	++	Nein	Nein	Nein	-
LLRN	-	-	-	3960	+	++	Nein	Nein	Nein	-
LLRN	-	-	-	4450	++	++	Nein	Nein	Nein	-
LLRN	-	-	-	7400	++	++	Nein	Nein	Nein	-
LLRN	-	-	-	10020	+++	-	Ja	Ja	Ja	23
LLIRN	1208	-	3590	-	+++	+++	Nein	Ja	Ja	63
LLIRN	1378	-	2410	-	++	++	Nein	Nein	Nein	-
LLIRN	1870	-	1305	-	+	+	Nein	Nein	Nein	-
LLIRN	2296	-	520	-	+	+	Nein	Nein	Nein	-
LLIRN	11	-	-	1554	+	+	Nein	Nein	Nein	-
LLIRN	9	-	-	1875	+	+	Nein	Nein	Nein	-
LLIRN	8	-	-	3283	+	++	Nein	Nein	Nein	-
LLIRN	8	-	-	3408	+	++	Nein	Nein	Nein	-
LLIRN	-	702	4711	-	+++	-	Ja	Ja	Ja	61
LLIRN	-	2136	3254	-	++	+++	Nein	Nein	Nein	-
LLIRN	-	2139	5930	-	+++	-	Ja	Ja	Ja	83
LLIRN	-	2349	5002	-	+++	-	Ja	Ja	Ja	72

- nicht wahrnehmbar + wahrnehmbare Ausprägung ++ starke Ausprägung +++ sehr starke Ausprägung

4.2.4. Durchführung von Waschversuchen an LLIN, LLRN und LLIRN

Der letzte Teil der Ergebnisdarstellung widmet sich der Beschreibung von Waschversuchen, die an unterschiedlichen Netzen durchgeführt wurden und deren Ergebnisse bereits publiziert worden sind (FAULDE *et al.*, 2011).

LLINs reduzieren das Expositionsrisiko gegenüber Insektiziden für den Anwender (ANYANWU *et al.*, 2006; SHARMA *et al.*, 2009) und verbessern die Compliance durch die nicht mehr erforderliche Reimprägnierung. Die Entwicklung dieser Netze stellt einen der größten Fortschritte in der Malariabekämpfung der letzten Jahre dar (N'GUESSAN *et al.*, 2001) und die Netze zeigen eine deutlich länger anhaltende Wirkung als herkömmliche Moskitonetze (WHO, 2005). Dennoch gibt es hinsichtlich der Waschresistenz noch Verbesserungsmöglichkeiten, da bei den bisher verfügbaren LLINs deutliche Mengen an Insektizid durch den Waschvorgang verloren gehen (N'GUESSAN *et al.*, 2001; SHARMA *et al.*, 2010). Die Versuche dienen der Überprüfung, ob das neue Polymerisationsverfahren zu einer höheren Waschresistenz führt und somit die Residualaktivität von LLINs verbessert werden kann.

Das angewandte Waschverfahren nach DIN EN ISO 6330 (DIN, 2011) weicht von dem durch die WHO empfohlenen Prüfverfahren (WHO, 2005) deutlich ab. Angenommen wird, dass bei dem durch die WHO empfohlenen Prüfverfahren (WHO, 2005) größere Mengen an Inhaltsstoffen auf den Netzen verbleiben, als unter Realbedingungen zu erwarten wäre (ATIELI *et al.*, 2010). Bei dem Verfahren nach DIN EN ISO 6330 sollte die mechanische Belastung hingegen mit den in der Realität angewandten Verfahren eher vergleichbar sein.

Zunächst wurden Baumwollnetze imprägniert, die unterschiedliche Insektizide (Cyfluthrin, Deltamethrin, Etofenprox und Permethrin) in verschiedenen Konzentrationen enthielten. Diese wurden mit dem unter 3.4. beschriebenen Verfahren gewaschen und der Gehalt an Wirkstoff nach 1, 5, 10 und 20 Wäschen bestimmt (Tabelle 22). Jeder Wirkstoff wurde in drei verschiedenen Konzentrationen auf das Netzmaterial mit dem neuen Polymercoatingverfahren aufgebracht.

Aus Tabelle 22 sind die Veränderungen der Konzentrationen nach den einzelnen Waschgängen zu entnehmen und Tabelle 23 zeigt die Restgehalte an aktiven Inhaltsstoffen nach den Waschgängen in Prozent. Die absolute Abnahme der Wirkstoffgehalte ist in Abbildung 79 auf der linken Seite grafisch dargestellt. Auf der rechten Seite wird der Gehalt an Wirkstoff als Prozentsatz vom ungewaschenen Material dargestellt.

Wie zu erwarten ist, nimmt der Gehalt an aktiven Inhaltsstoffen bei allen untersuchten Wirkstoffen mit der Anzahl an durchgeführten Waschgängen ab (Tabelle 22, Abbildung 79). Diese zu erwartende Gehaltsabnahme verläuft allerdings bei den verschiedenen Wirkstoffen z.T. unterschiedlich (FAULDE *et al.*, 2011) und wird am besten aus den grafischen Darstellungen in Abbildung 79 ersichtlich.

Tabelle 22: Wirkstoffgehalt von imprägnierten Moskitonetzen vor dem Waschen und nach 1, 5, 10 und 20 Wäschen gemäß DIN EN ISO 6330

Netzbeschreibung	Wirkstoffgehalt in mg/m ² Netzmaterial				
	Ungewaschen	1 Waschgang	5 Waschgänge	10 Waschgänge	20 Waschgänge
PC-CY #1	87	88	92	66	61
PC-CY #2	154	149	146	92	100
PC-CY #3	387	346	299	290	223
PC-DM #1	38	17	17	20	20
PC-DM #2	69	21	22	22	23
PC-DM #3	145	32	30	30	31
PC-ET #1	197	149	108	97	61
PC-ET #2	445	392	329	232	180
PC-ET #3	753	469	320	332	267
PC-PM #1	1965	1805	1601	696	484
PC-PM #2	4798	4911	4225	1619	1696
PC-PM #3	8048	7470	5725	3868	3379

PC = Polymercoatingverfahren CY = Cyfluthrin DM = Deltamethrin PM = Permethrin ET = Etofenprox

Die mit Cyfluthrin imprägnierten Netze verfügten über Ausgangskonzentrationen an aktivem Inhaltsstoff von 87, 154 und 387 mg/m². Während der ersten fünf Waschgänge wurden nur bei dem mit 387 mg/m² Wirkstoff imprägnierten Netz eine signifikante Konzentrationsveränderung (Gehaltsdifferenz größer als die Messunsicherheit des Verfahrens) von 23% festgestellt. Bei den mit 87 und 154 mg/m² Cyfluthrin imprägnierten Netzen wurden erst nach zehn Waschgängen mit 75,9% (87) und 59,7% (154) diese signifikanten Unterschiede beobachtet. Nach zwanzig Waschgängen waren bei den drei Netzen noch 70,1 % (87), 64,9 % (154) und 57,6% (387) der ursprünglich eingesetzten Wirkstoffmenge vorhanden (Tabelle 23, Abbildung 79).

Bei den mit Deltamethrin imprägnierten Netzen betrug der initiale Gehalt 38, 69 und 145 mg/m². Bei diesen Netzen war schon nach dem ersten Waschgang ein Verlust an aktiven Inhaltsstoffen von 55,3 % (38), 69,6 % (69) und 77,9% (145) zu beobachten, der allerdings bei den folgenden Wäschen nicht mehr weiter fortschritt, so dass der Gehalt nach zwanzig Waschgängen mit dem nach einem Waschgang vergleichbar war (Abbildung 79).

Auf Grund der geringeren Wirkstärken des Nichtesterpyrethroids Etofenprox und des ohne α -Cyanogruppe auskommenden Permethrins gegenüber Cyfluthrin und Deltamethrin, wurden die

initialen Gehalte für die beiden Wirkstoffe höher gewählt. Die drei mit Etofenprox imprägnierten Netze wiesen vor den Waschversuchen 197, 445 und 753 mg/m² aktiven Inhaltsstoff auf; die Netze mit Permethrin 1965, 4798 und 8048 mg/m². Die Reduktion der aktiven Inhaltsstoffe durch die Waschvorgänge verläuft bei Etofenprox und Permethrin ansatzweise linear und nach zwanzig Waschgängen sind bei Etofenprox noch 31,0 % (197), 40,4 % (445) und 35,5% (753) und bei Permethrin noch 24,6 % (1965), 35,3 % (4798) und 42,0% (8048) der Wirkstoffe vorhanden.

Tabelle 23: Prozentuale Wirkstoffgehalte von imprägnierten Moskitonetzen vor dem Waschen und nach 1, 5, 10 und 20 Wäschen gemäß DIN EN ISO 6330

Netzbeschreibung	Wirkstoffgehalt in Prozent bezogen auf das ungewaschene Moskitonetz				
	Ungewaschen	1 Waschgang	5 Waschgänge	10 Waschgänge	20 Waschgänge
PC-CY #1	100	101,1	105,7	75,9	70,1
PC-CY #2	100	96,8	94,8	59,7	64,9
PC-CY #3	100	89,4	77,3	74,9	57,6
PC-DM #1	100	44,7	44,7	52,6	52,6
PC-DM #2	100	30,4	31,9	31,9	33,3
PC-DM #3	100	22,1	20,7	20,7	21,4
PC-ET #1	100	75,6	54,8	49,2	31,0
PC-ET #2	100	88,1	73,9	52,1	40,4
PC-ET #3	100	62,3	42,5	44,1	35,5
PC-PM #1	100	91,9	81,5	35,4	24,6
PC-PM #2	100	102,4	88,1	33,7	35,3
PC-PM #3	100	92,8	71,1	48,1	42,0

PC = Polymercoatingverfahren CY = Cyfluthrin DM = Deltamethrin PM = Permethrin ET = Etofenprox

In der Gesamtbetrachtung dieser Versuchsserie zeigt sich, dass Cyfluthrin über die höchste Waschresistenz nach zwanzig Waschgängen auf einem Baumwollnetz mit dem angewandten Polymercoatingverfahren verfügt (FAULDE *et al.*, 2011). Die anderen Insektizide unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Waschresistenz nach zwanzig Waschgängen nicht signifikant voneinander ($p > 0,7$), sind jedoch in der Art und Weise des Verlustes an aktiven Inhaltsstoffen unterschiedlich. Bei Deltamethrin wurde der größte Verlust an aktivem Inhaltsstoff bereits nach einem Waschgang festgestellt, wohingegen die Abnahme der aktiven Inhaltsstoffe bei Permethrin und Etofenprox eher kontinuierlich verlief (Abbildung 79).

Dieses von den anderen Insektiziden abweichende Verhalten des Deltamethrins wird auch bei Betrachtung von Abbildung 79 deutlich.

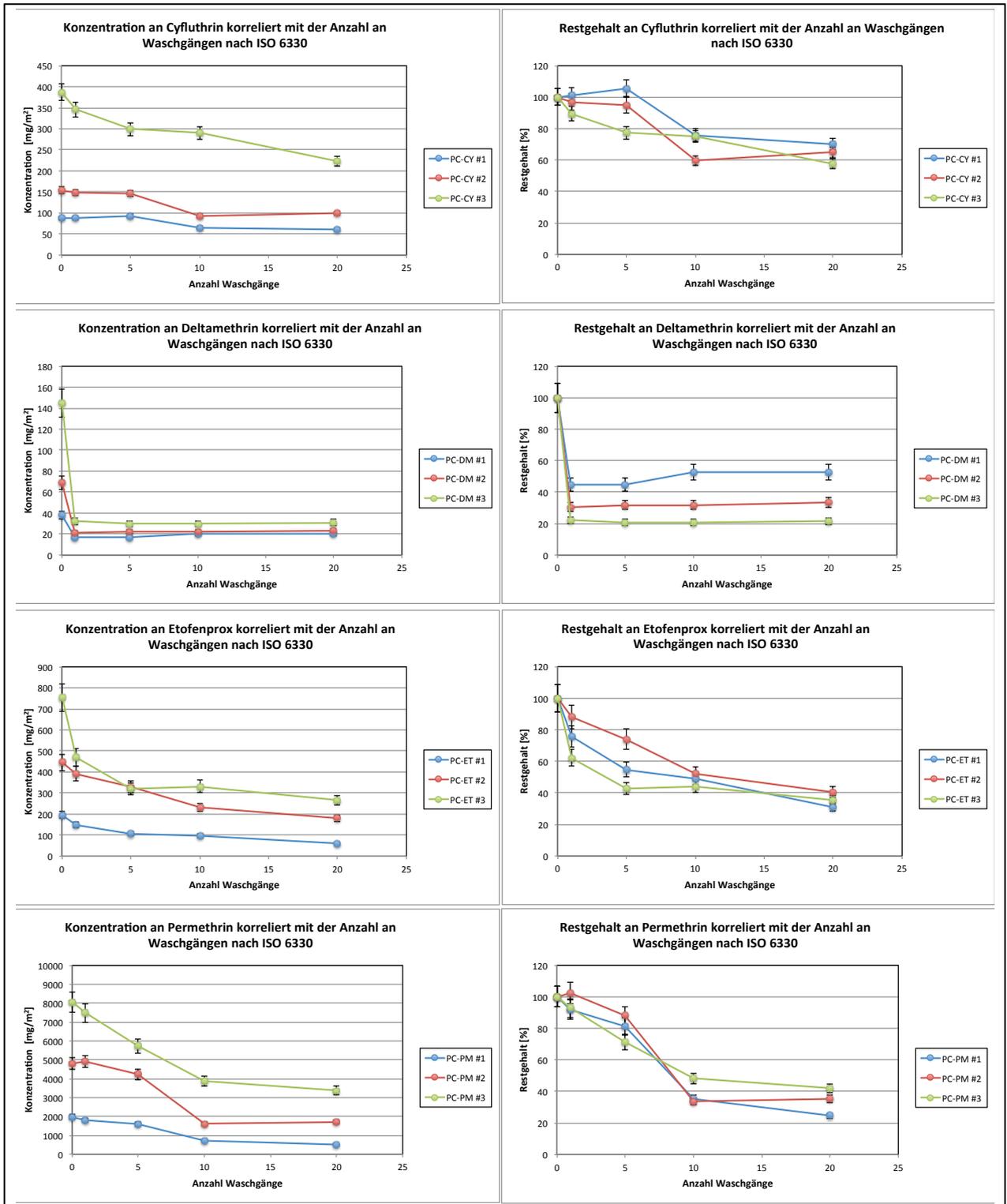


Abbildung 79: Darstellung der Konzentrationen und der prozentualen Gehalte an Insektiziden bezogen auf die Anzahl an Waschgängen von LLINs, die mit dem Polymercoatingverfahren imprägniert worden sind.

Deltamethrin imprägnierte Moskitonetze weisen unabhängig von dem ursprünglich auf das Netz aufgetragenen Wirkstoffgehalt nach zwanzig Waschgängen immer einen vergleichbaren absoluten Gehalt an Wirkstoff auf dem imprägnierten Netz auf, wohingegen die mit den anderen Insektiziden imprägnierten Netze einen absoluten Restgehalt an Insektizid aufweisen, der mit der ursprünglich eingesetzten Menge an Insektizid korreliert, d.h. dass die Netze, die eine höhere Ausgangskonzentration an Insektizid aufwiesen, auch nach zwanzig Waschgängen über eine höhere absolute Konzentration an Insektizid verfügen, als Netze, die mit einem geringeren Ausgangsgehalt an Insektizid imprägniert worden waren.

In einem weiteren Waschversuch wurde die Waschresistenz von Baumwollnetzen untersucht, die mit einem Insektizid und einem Repellent nach dem neuen Polymercoatingverfahren imprägniert waren. Verwendet für diesen Versuch wurden das Nichtesterpyrethroid Etofenprox und das Repellent Diethyltoluamid, die auch in dieser Reihenfolge auf das Moskitonetz aufgebracht wurden (Imprägnierung mit Etofenprox anschließend Imprägnierung mit Diethyltoluamid). Die drei mit unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen an Repellent und Insektizid versehenen Netze wurden nach DIN EN ISO 6330 zwanzigmal gewaschen und der Gehalt an aktiven Inhaltsstoffen nach 1, 5, 10 und 20 Waschgängen bestimmt. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 24 und Abbildung 80 dargestellt.

Tabelle 24: Wirkstoffgehalte von mit Diethyltoluamid und Etofenprox imprägnierten Moskitonetzen vor dem Waschen und nach 1, 5, 10 und 20 Wäschen gemäß DIN EN ISO 6330

Anzahl Wäschen	Wirkstoffgehalt in mg/m ² Netzmaterial					
	MN PC #1		MN PC # 2		MN PC #3	
	DEET	EFPX	DEET	EFPX	DEET	EFPX
0 x 30°C	5002	2349	4711	702	3254	2136
1 x 30°C	646	1830	666	673	497	1256
5 x 30°C	267	1069	461	578	91	956
10 x 30°C	147	910	192	534	29	758
20 x 30°C	123	732	169	461	17	638

MN = Moskitonetz PC = Polymercoatingverfahren DEET = Diethyltoluamid EFPX = Etofenprox

Die Ausgangskonzentrationen auf den zu untersuchenden Moskitonetzen betragen für Diethyltoluamid 5002, 4711 und 3254 mg/m² und für Etofenprox 2349, 702 und 2136 mg/m² aktiven Inhaltsstoff.

Die mit den Waschversuchen einhergehende Wirkstoffabnahme betrug bei Etofenprox 68,8 % (2349), 34,3 % (702) und 70,1% (2136); Werte, die mit den zuvor durchgeführten Untersuchungen mit den einzelnen Insektiziden ausgezeichnet korrelieren und zu dem Schluss führen, dass die

zusätzliche Imprägnierung mit dem Repellent Diethyltoluamid keinen Einfluss auf die Waschresistenz von Etofenprox bei den mit dem Polymercoatingverfahren imprägnierten Baumwollnetzen hat.

Tabelle 25: Prozentuale Wirkstoffgehalte von mit Diethyltoluamid und Etofenprox imprägnierten Moskitonetzen vor dem Waschen und nach 1, 5, 10 und 20 Wäschen gemäß DIN EN ISO 6330

Anzahl Wäschen	Wirkstoffgehalt in Prozent bezogen auf das ungewaschene Moskitonetz					
	MN PC #1		MN PC # 2		MN PC #3	
	DEET	EFPX	DEET	EFPX	DEET	EFPX
0 x 30°C	100	100	100	100	100	100
1 x 30°C	12,9	77,9	14,1	95,9	15,3	58,8
5 x 30°C	5,3	45,5	9,8	82,3	2,8	44,8
10 x 30°C	2,9	38,7	4,1	76,1	0,9	35,5
20 x 30°C	2,5	31,2	3,6	65,7	0,5	29,9

MN = Moskitonetz PC = Polymercoatingverfahren DEET = Diethyltoluamid EFPX = Etofenprox

Für die Waschresistenz des Repellents Diethyltoluamid sind die Ergebnisse deutlich schlechter. Mit Wirkstoffgehalten von 123 (5002), 169 (4711) und 17 (3254) mg/m² nach zwanzig Waschgängen entsprechend prozentualen Gehalten von 2,5 % (5002), 3,6 % (4711) und 0,5 % (3254) (Tabelle 25) verbleiben nur noch geringe Mengen des Wirkstoffs auf dem Moskitonetz. Betrachtet man den Verlauf der prozentualen Wirkstoffkonzentrationen an Diethyltoluamid in Abbildung 80, so lässt sich erkennen, dass der Gehalt an Diethyltoluamid auf den imprägnierten Moskitonetzen schon nach einem Waschgang auf unter 20% des ursprünglichen Gehalts sinkt, um dann näherungsweise linear abzunehmen.

Eine Ursache für dieses Verhalten der Wirkstoffe könnte die Reihenfolge der Imprägnierung sein, da die Moskitonetze zuerst mit Etofenprox imprägniert wurden und anschließend mit Diethyltoluamid. Um dies festzustellen, sind weitere Untersuchungen mit in unterschiedlicher Reihenfolge imprägnierten Netzen und darauf folgenden Waschversuchen notwendig. Die Untersuchungen der Waschresistenz der mit dem Polymercoatingverfahren imprägnierten Moskitonetze wurde in diesem Fall nicht mit Untersuchungen zur Bioaktivität kombiniert.

Nachdem Waschversuche mit den eigenen Moskitonetzen durchgeführt wurden und deren Waschresistenz bestimmt worden ist, wurde ein Vergleich der mit dem Polymercoatingverfahren imprägnierten Moskitonetze mit auf dem Markt verfügbaren Moskitonetzen durchgeführt. Für diesen Versuch wurden vier in Nutzung befindliche LLINs verwendet. Dabei handelte es sich um das mit 500 mg/m² Permethrin imprägnierte Care Plus[®] Polyesternetz der Firma Tropenzorg B.V. (Alemere, Niederlande), das mit 55 mg/m² Deltamethrin imprägnierte PermaNet[®] 2.0 Polyesternetz der Firma Vestergaard Frandsen Group S.A. (Lausanne, Schweiz), das mit 65 mg/m² Deltamethrin

imprägnierte NetProtect® Netz aus Polyethylen der Firma Bestnet Co. (Kolding, Dänemark) sowie das von der Firma Life Ideas Textiles Co. (Guandong, China) produzierte Polyethylenetz Conmanet®, das mit 500 mg/m² Permethrin imprägniert war.

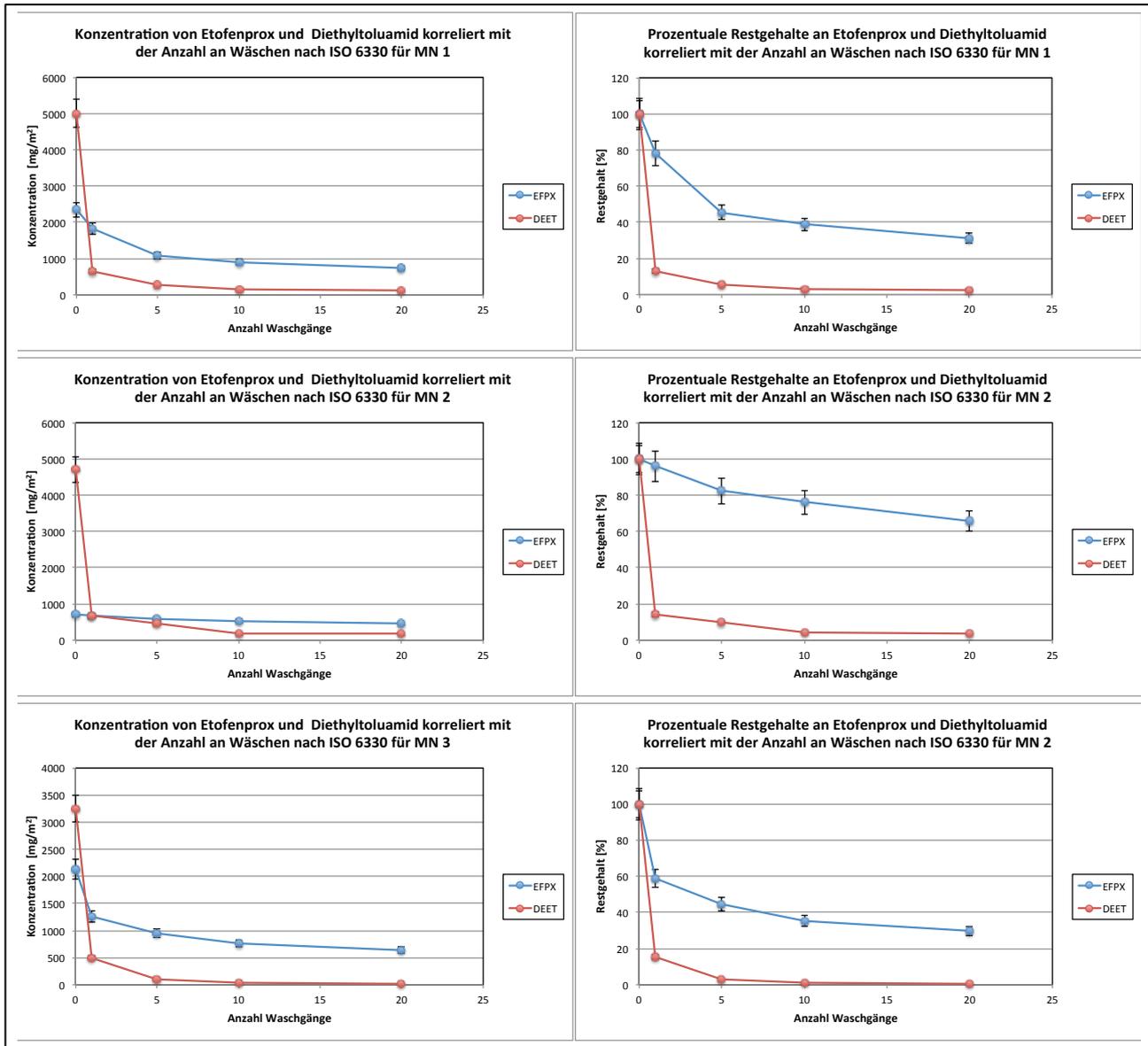


Abbildung 80: Darstellung der Konzentrationen und der prozentualen Gehalte an Etofenprox und Diethyltoluamid bezogen auf die Anzahl an Waschgängen von LLIRNs, die mit dem Polymercoatingverfahren imprägniert worden sind.

Bei allen Netzen handelte sich um LLIN, die nach WHO/WHOPES Standard imprägniert worden sind (WHO, 2005). Bei allen Untersuchungen wurde ein nicht imprägniertes Moskitonetz der Firma McKinley (Intersport Deutschland, Heilbronn Deutschland) als Negativkontrolle mitgeführt.

Alle Netze wurden in Anlehnung an die DIN EN ISO 6330 fünfmal gewaschen und auf ihren Gehalt an aktiven Inhaltsstoffen untersucht. Bei den Netzen Conmanet®, PermaNet® und NetProtect® stand jeweils ein Moskitonetz zur Verfügung, dessen Gehalt vor dem Waschen und nach einem, zwei, drei und fünf Waschgängen bestimmt wurde. Von dem Netz Care Plus® standen 5 Netze zur

Verfügung, deren Gehalte vor dem Waschen und nach einem und fünf Waschgängen bestimmt wurde (Abbildung 81).

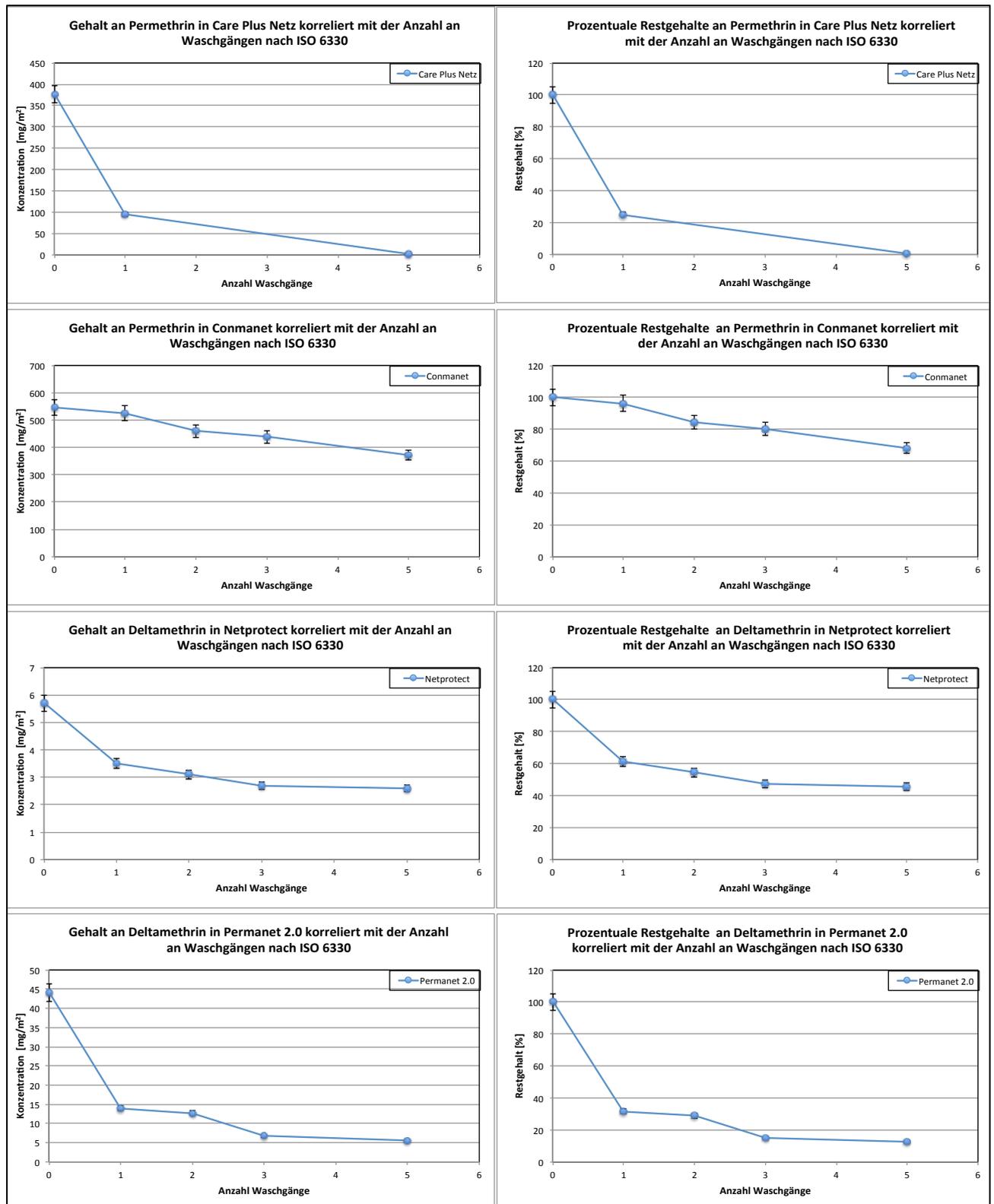


Abbildung 81: Darstellung der Konzentration und der prozentualen Gehalte an aktiven Inhaltsstoffen von kommerziell verfügbaren LLINs bezogen auf die Anzahl an Waschgängen.

Vor dem Waschen wurden bei den untersuchten Moskitonetzen Gehalte von $378 \pm 72,9 \text{ mg/m}^2$ (Mittelwert aus 5 Netzen) Permethrin für Care Plus[®], 44 mg/m^2 Deltamethrin für PermaNet[®] 2.0, $5,7 \text{ mg/m}^2$ Deltamethrin für NetProtect[®], und 545 mg/m^2 Permethrin für Conmanet[®] gemessen. Werden die gemessenen Gehalte auf den einzelnen Moskitonetzen mit den Angaben der Hersteller verglichen, so korrespondieren bis auf das NetProtect[®] Netz, auf dem nur etwa 10% des angegebenen Gehaltes nachgewiesen wurde, alle Netze gut mit den von den Herstellern gemachten Angaben.

Nach dem ersten Waschgang wird bei allen Netzen ein Wirkstoffverlust festgestellt. Dieser Wirkstoffverlust ist bei den Netzen PermaNet[®] (68,2%) und Care Plus[®] (73,7%) besonders stark ausgeprägt im Vergleich zu den Netzen NetProtect[®] (38,6%) und Conmanet[®] (19,6%). Nach fünf Waschgängen betragen dann die prozentualen Wirkstoffverluste für das Care Plus[®] Netz 99,1%, für das PermaNet[®] 31,1%, für das NetProtect[®] Netz 54,4% und für das Conmanet[®] 31,7%. Die prozentualen Restgehalte der untersuchten Moskitonetze sind in Abbildung 82 gemeinsam mit den prozentualen Restgehalten der nach dem neuen Polymercoatingverfahren imprägnierten Netze dargestellt.

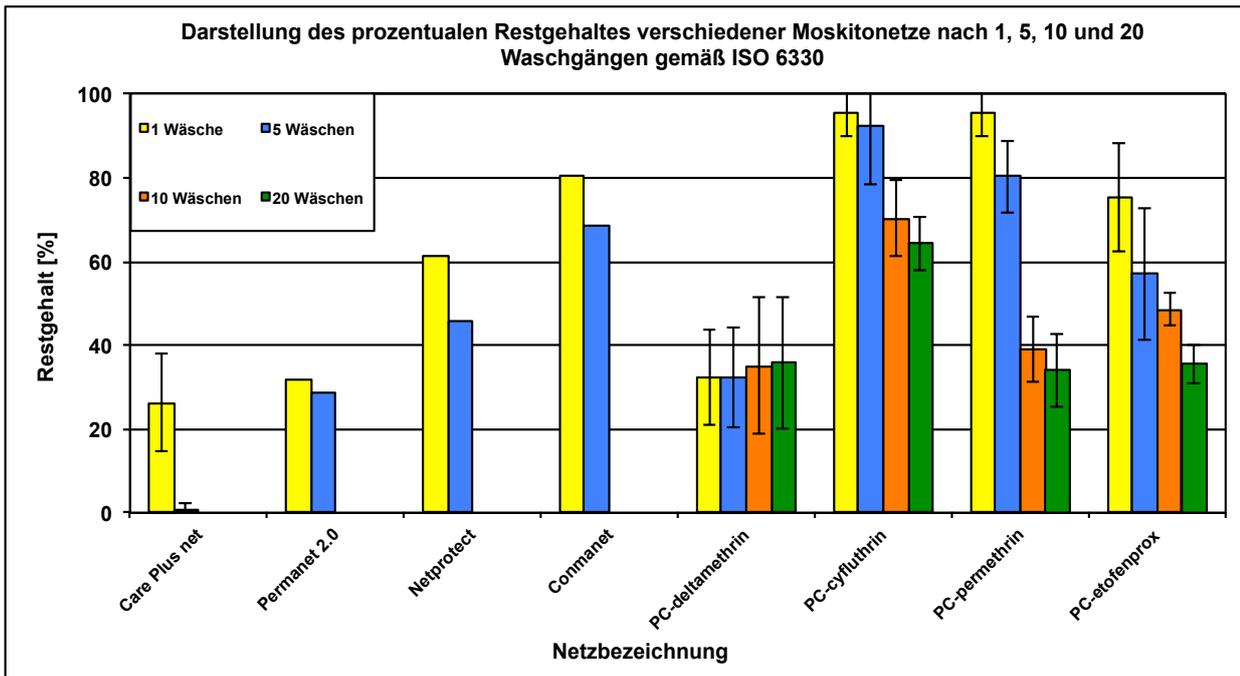


Abbildung 82: Vergleichende Darstellung der prozentualen Restgehalte von kommerziell verfügbaren LLIN und den nach dem neuen Polymercoatingverfahren imprägnierten LLINs.

Eine Betrachtung der Werte und der Abbildung zeigt, dass bei dem Care Plus[®] Netz die schwächste Waschresistenz vorhanden ist und dass bei diesem Netz nach fünf Waschgängen nur noch Spuren des ursprünglich aufgebrachtene Wirkstoffs vorhanden sind. Dies zeigt sich auch in Bezug auf die Bioaktivität des Care Plus[®] Netzes, das schon initial die geringste Wirkstärke in Bezug auf die Knockdown-Zeit aufwies und nach 5 Waschgängen fast gar keine biologische Aktivität mehr zeigte (Abbildung 84). Bei allen anderen imprägnierten Moskitonetzen ist die

Waschresistenz deutlich stärker ausgeprägt und die kommerziell erhältlichen Netze zeigen bis auf das Care Plus® Netz auch nach fünf Waschgängen noch eine deutliche Bioaktivität (Abbildung 83).

Wenn man die Restgehalte an aktiven Inhaltsstoffen der kommerziell verfügbaren Moskitonetze nach einem und fünf Waschgängen mit den Restgehalten an aktiven Inhaltsstoffen der nach dem Polymercoatingverfahren imprägnierten Moskitonetze miteinander vergleicht, so ist eine höhere Waschresistenz der mit dem Polymercoatingverfahren imprägnierten Moskitonetze erkennbar. Das bei den mit Deltamethrin nach dem Polymercoatingverfahren imprägnierten Netzen aufgetretene Phänomen, das besonders während der ersten Wäsche eine besonders hohe Abnahme des Wirkstoffgehaltes stattfindet, wurde auch bei dem mit Deltamethrin imprägnierten PermaNet® 2.0 beobachtet.

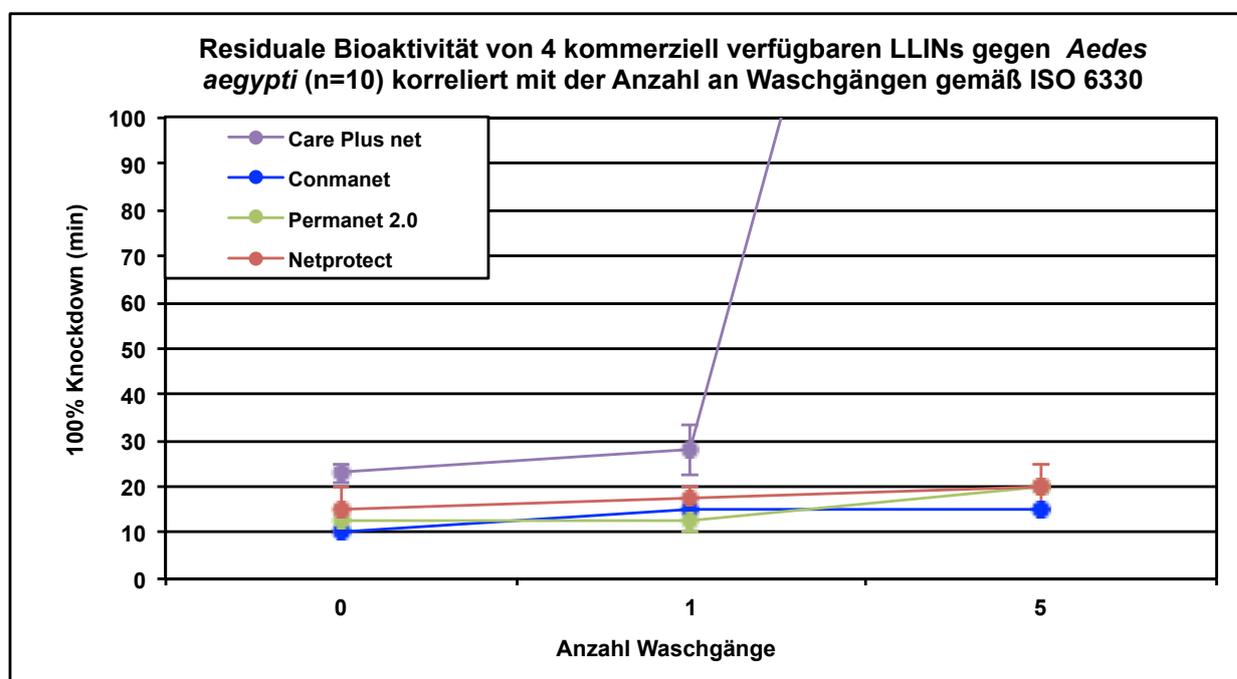


Abbildung 83: Darstellung der Bioaktivität (hier 100% Knockdown) von vier kommerziell verfügbaren LLINs in Abhängigkeit von der Anzahl an Waschgängen gemäß DIN EN ISO 6330.

Um die Bioaktivität der kommerziell verfügbaren Moskitonetze beurteilen zu können, wurde vor dem Waschen und nach dem ersten und dem fünften Waschgang die Bioaktivität der Netze mittels „Cone-Test“ bestimmt. Als Negativkontrolle wurde das McKinley-Netz bei allen Versuchen mitgeführt, um Auswirkungen des Waschmittels auf die Bioaktivität der Netze auszuschließen. Diese Negativkontrolle war über den gesamten Versuchszeitraum konstant und zeigte bei keinem der durchgeführten Versuche einen adversen Effekt auf die Versuchstiere.

Die Bioaktivitäten der ungewaschenen Netze PermaNet®, NetProtect®, und Conmanet®, in Abbildung 83 dargestellt als 100% Knockdown-Aktivität, waren vergleichbar und bewegten sich zwischen 10 und 17,5 Minuten. Das Care Plus® Netz wies im Vergleich zu den anderen Netzen mit einer mittleren Knockdown-Zeit von $23 \pm 2,1$ Minuten eine geringere Bioaktivität auf. Diese

Tatsache bestätigte die Untersuchung nach dem ersten Waschgang, bei dem Knockdown-Zeiten aller Netze außer dem Care Plus® Netz ($28,5 \pm 5,4$ Minuten) unterhalb von zwanzig Minuten gemessen wurden. Nach fünf Waschgängen konnte für die Netze PermaNet®, NetProtect®, und Conmanet® nach wie vor eine Knockdown Zeit von unter 30 Minuten bestimmt werden, wohingegen die mittlere Knockdown-Zeit des Care Plus® Netzes mit $305,5 \pm 76,4$ Minuten bestimmt wurde.

Die Bioaktivitäten, dargestellt als Knockdown-Zeit in Abhängigkeit von der Anzahl durchgeführten Wäschen, der fünf untersuchten Care Plus® Netze sind in Abbildung 84 aufgeführt und zeigen die großen Unterschiede der einzelnen Netzproben.

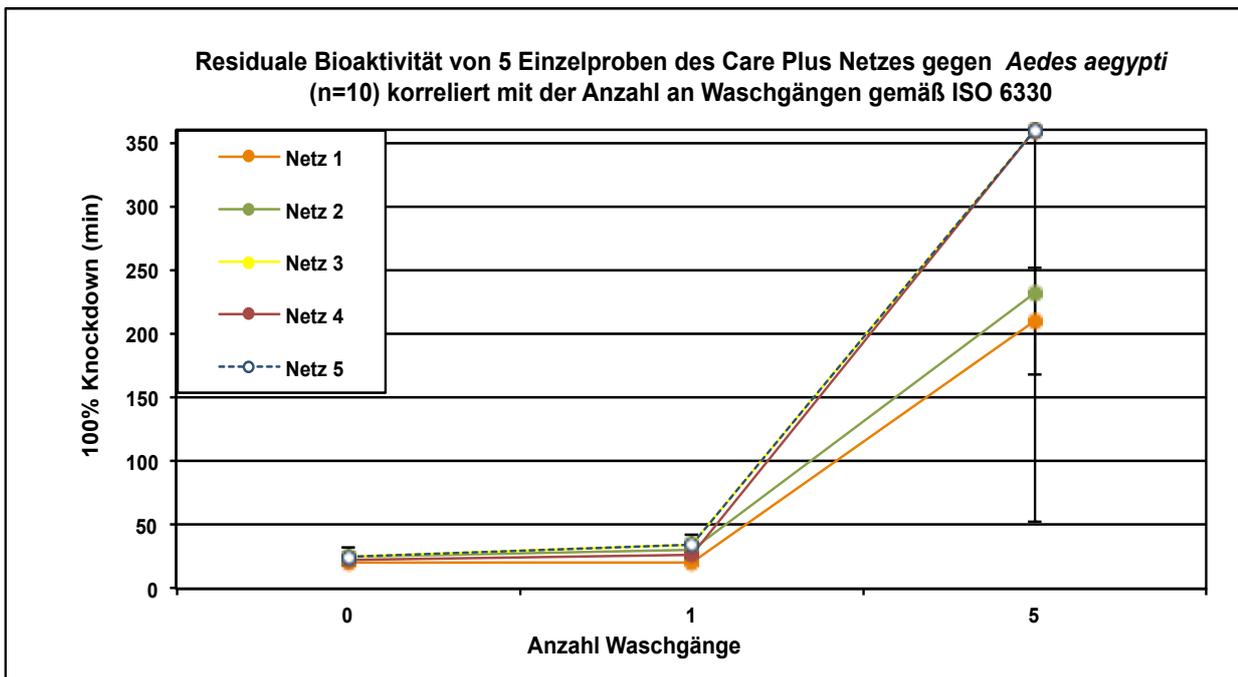


Abbildung 84: Darstellung der Bioaktivität (hier 100% Knockdown) von fünf simultan untersuchten Care Plus® Netzen

Zusätzlich zu den bereits erwähnten Untersuchungen wurden mit den ungewaschenen kommerziell verfügbaren Moskitonetzen „Arm-in-Cage“ Tests durchgeführt, um den Durchstichschutz der Moskitonetze zu beobachten. Die Ergebnisse dieser Versuche werden in Abbildung 85 bildlich dargestellt. Abbildung 85 Nr.6 zeigt dabei ein nicht imprägniertes Baumwollnetz, das als Positivkontrolle für die Bereitschaft der Stechmücken auf dem Netz zu landen und zu stechen dient. Abbildung 85 Nr.1 zeigt das Care Plus® Netz, Nr. 2 das PermaNet® 2.0, Nr. 3 das NetProtect® Netz und Nr. 4 das Conmanet®. Auf diesen Bildern ist eindeutig zu erkennen, dass die ungewaschenen kommerziell verfügbaren imprägnierten Moskitonetze keinen Durchstichschutz gewährleisten, der über den des nicht imprägnierten Moskitonetzes hinausgeht. Auch irritierende Effekte wie ein „Hot-Feet-Effekt“ waren nicht erkennbar. Abbildung Nr. 5 zeigt ein mit dem Polymercoatingverfahren imprägniertes LLIRN bei dem unter denselben Versuchsbedingungen weder Lande- noch Stichversuche zu erkennen sind. Da bei den

ungewaschenen kommerziell verfügbaren LLIN kein Durchstichschutz festgestellt wurde, ist auf weitere „Arm-in-Cage“ Versuche mit den gewaschenen Moskitonetzen verzichtet worden. Eine Besonderheit ist in Bezug auf das Conmanet® anzufügen. Die auffällig große Maschenweite des Netzes erlaubte es den Versuchstieren durch das Netz hindurchzugelangen und den Stichakt zu vollziehen, bevor eine Abtötung des Versuchstieres stattfand. Darüberhinaus war dieses Netz von einer so großen Festigkeit, dass eine Anwendung als Bettnetz äußerst fragwürdig erscheint. Zusammenfassend ist zu sagen, dass die hier untersuchten kommerziell verfügbaren LLINs bis auf das Care Plus® Netz über eine ausreichende Bioaktivität nach fünf Wäschen gemäß DIN EN ISO 6330 gegen *Aedes aegypti* verfügen, dass aber keines der hier untersuchten kommerziell verfügbaren LLINs einen Durchstichschutz gegen *Aedes aegypti* gewährleistet.



Abbildung 85: Darstellung von durchgeführten „Arm-in-Cage“ Tests: 1: Care Plus[®], 2: PermaNet[®] 2.0, 3: NetProtect[®], 4: Conmanet[®], 5: LLIRN mit IR 3535 und Permethrin und 6: Nichtimprägniertes Baumwollnetz

5. Diskussion

5.1. Analytische Methode

Für die Forschung an imprägnierten Moskitonetzen ist die Bestimmung des Gehaltes an aktiven Inhaltsstoffen notwendig, um die konzentrationsabhängige Wirkung einzelner, auf die Moskitonetze aufgebracht, Insektizide beurteilen zu können. Die „Guidelines for laboratory and field testing of LLIN“ sehen die analytische Bestimmung des Wirkstoffgehaltes lediglich als „supplementary test“ vor (WHO, 2005), obwohl die Beurteilung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen nur durch Kenntnis der quantitativen Anteile an Inhaltsstoffen möglich ist. Laut WHO obliegt das Testverfahren zur Bestimmung des Wirkstoffgehaltes dem Hersteller der imprägnierten Moskitonetze. Ein allgemein standardisiertes oder publiziertes Analysenverfahren wird seitens der WHO nicht beschrieben. Dies ist für die einzelnen Hersteller von imprägnierten Moskitonetzen, die ausschließlich ihren Wirkstoff in der von ihnen verwendeten Matrix bestimmen wollen, akzeptabel. Wird jedoch in der Forschung oder der Überwachung die Analyse unterschiedlicher Moskitonetze verschiedener Hersteller mit unterschiedlichen Wirkstoffen notwendig, so führt die Anwendung unterschiedlicher Methoden mit unterschiedlichen Extraktions- und Detektionsverfahren nicht zu vergleichbaren und standardisierbaren Ergebnissen.

In der Literatur beschriebene Multianalysenverfahren für Insektizide sind aus dem Bereich der Rückstandsanalytik in Lebensmitteln (Du et al., 2010; Maštovská and Lehotay, 2004; Shen et al., 2011) oder aus dem Bereich der biologischen Matrices (Hardt and Angerer, 2003; Leng and Gries, 2005) bekannt. Auch die publizierten Bestimmungen von Repellentien stammen aus der Spurensbeziehungsweise Umweltanalytik (Bisceglia et al., 2010) oder aus dem Forschungsfeld der biologischen Matrices (Abu-Qare and Abou-Donia, 2001; Cherstniakova et al., 2006). Eine Methode zur simultanen Bestimmung des Gehaltes von Repellentien und Insektiziden in imprägnierten Moskitonetzen ist bislang nicht veröffentlicht. Informationen zu Verfahren, mit denen der Gehalt an Wirkstoffen in imprägnierten Moskitonetzen bestimmt werden kann, findet man in den Methodenteilen von Veröffentlichungen bezüglich der Wirksamkeit imprägnierter Moskitonetze (Faulde and Uedelhoven, 2006; Kroeger et al., 2004; N'Guessan et al., 2010; N'Guessan et al., 2001; Norris and Norris, 2011) sowie auf der Website des Collaborative International Pesticides Analytical Council (CIPAC), der auf Grund der zunehmenden Wichtigkeit imprägnierter Moskitonetze in der Bekämpfung von vektorübertragenen Infektionskrankheiten Methoden der Netzhersteller zur Bestimmung der aktiven Inhaltsstoffe veröffentlicht (CIPAC, 2009). Betrachtet man die Methoden, so fällt auf, dass jede Methode nur zur Bestimmung eines Analyten konzipiert ist und dass sehr unterschiedliche Analyse- und Extraktionsverfahren angewandt werden. Insbesondere bei den Extraktionsverfahren ist die Durchführung sehr unterschiedlich. So werden unterschiedliche organische Lösemittel eingesetzt und die

Extraktionsdauer schwankt zwischen 5 Minuten und einer halben Stunde. Auch die Temperaturen während der Extraktion schwanken stark; eine Extraktion wird z.B. bei einer Temperatur von 70°C im Ultraschallbad durchgeführt, eine andere unter Rückfluss mit Xylol bei 90°C. Bei derart unterschiedlichen Bedingungen können keine vergleichbaren Ergebnisse erhalten werden, was die Notwendigkeit einer standardisierten Multimethode zur Bestimmung von Insektiziden und Repellentien deutlich macht. Auch wenn auf Grund der Matrix eine vollständige Extraktion aller Wirkstoffe nicht sicher nachgewiesen werden kann, ist ein standardisiertes Extraktionsverfahren dennoch nützlich, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

Die in dieser Arbeit vorgestellte Methode ist in der Lage, die am häufigsten angewandten Insektizide und Repellentien in imprägnierten Moskitonetzen valide zu bestimmen. Im gewählten Arbeitsbereich zwischen 0,25 und 60 mg/L Wirkstoff im Extrakt (entspricht je nach Netz zwischen 2 und 1000 mg/m² Netzmaterial) ist der Regressionskoeffizient der Kalibration bei allen Analyten größer als 0,998 und damit besser als die selbst definierte Spezifikation für den Regressionskoeffizienten von 0,995. Festgelegte Kriterien für die Güte des Korrelationskoeffizienten gibt es nicht und eine alleinige Betrachtung der Korrelationskoeffizienten sichert noch nicht den Nachweis der Linearität der Funktion. Gemeinsam mit dem Korrelationskoeffizienten gilt es die Residuen (Abbildung 46) zu betrachten und auf Ausreißer zu untersuchen (SANCO, 2009). Auch sollte eine Funktion zweiten Grades keine bessere Anpassung zeigen, als die ersten Grades (JRC, 2009). Zusätzlich zur Linearität der Messgröße in Abhängigkeit von der Konzentration des Analyten ist die Selektivität der Methode für die einzelnen Analyten durch die ausreichende Trennung (Auflösung der einzelnen Peaks größer als 1,5) beim chromatographischen Verfahren (STAUFFER, 2008) und das angewandte Detektionsverfahren der Massenspektrometrie (Nachweis der Einzelsubstanzen durch Vergleich der Massenspektren) gewährleistet. Auch im Hinblick auf Präzision und Richtigkeit werden die selbst definierten Akzeptanzkriterien eingehalten und die statistischen Berechnungen zeigen, dass Präzision und Richtigkeit gegeben sind. Hinsichtlich der Durchführung von Präzision und Richtigkeit ist möglicherweise zu diskutieren, ob die gewählten Bedingungen als realistisch und ausreichend anzusehen sind. Das Problem stellt in diesem Fall die Matrix Moskitonetz dar. Auf Grund des Herstellungsverfahrens wird nur ein geringer Teil der in der Polymerlösung befindlichen Wirkstoffe auf der Netzoberfläche gebunden, so dass es dem Hersteller nicht möglich ist, ein Referenzmaterial herzustellen, das einen definierten Gehalt an Wirkstoff enthält. Auch ist eine Bestimmung des Gehaltes nicht über eine Referenzmethode möglich, da eine solche nicht existent ist. Darüberhinaus können bei der Polymerisation nicht alle zu untersuchenden Analyten gemeinsam auf ein Netz aufgebracht werden, so dass nur eine begrenzte Auswahl an Analyten gleichzeitig aufgebracht werden kann. Bei der Bestimmung der Präzision wurde deshalb nur ein Teil der Analyten untersucht; die Analyten wurden aber so gewählt, dass alle Fenster der chromatographischen Bestimmung abgebildet wurden und somit ein Rückschluss auf die Präzision der nicht untersuchten Analyten möglich erschien. Die Richtigkeit sollte für alle Analyten individuell nachgewiesen werden. Da aus den genannten Gründen ein Referenzmaterial nicht zur

Verfügung stand, wurde entschieden, ein nicht imprägniertes Moskitonetz mit einem definierten Gehalt aller Analyten zu versetzen, ohne einen Polymerisationsprozess durchzuführen. Mit diesem Vorgehen konnte nachgewiesen werden, dass über den Extraktionsprozess die richtige Menge an zugesetzten Wirkstoffen wiedergefunden wird. Das für die Wiederfindung postulierte Akzeptanzkriterium wurde zu 90 bis 110 % des theoretischen Gehaltes gewählt; geringer als in der Literatur gefordert (SANCO, 2009). Zusätzlich wurde mittels t-Test überprüft, ob sich die Wiederfindung signifikant von 100 % unterscheidet (SLMB, 2004), was nicht der Fall war. Der Nachweis, dass auch nach einem Polymerisationsprozess alle Analyten richtig wiedergefunden werden, konnte so zwar nicht abschließend geführt werden, aber die Tatsache, dass nach diesem Verfahren extrahierte Netze keine insektizide Wirkung mehr haben, beweist, dass zumindest alle aktiven Inhaltsstoffe bis zur biologischen Sensibilitätsschwelle aus dem Netz entfernt worden sind. Zur Ermittlung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze ist festzustellen, dass diese mit unterschiedlichen Berechnungsverfahren durchgeführt worden sind, um die Problematik dieser Bestimmung zu verdeutlichen. Die im Verlauf dieser Arbeit validierte Methode zeigte selbst beim niedrigsten Kalibrierstandard bei allen untersuchten Analyten ein Signal-Rausch-Verhältnis von größer 50. Werden aus der zugehörigen Kalibriergerade Nachweis- und Bestimmungsgrenzen nach DIN 32645 (DIN, 2008) mit Hilfe der indirekten Kalibriergeradenmethode berechnet, so folgen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen, die vom Signal-Rausch-Verhältnis ebenfalls größer als 50 sind. Betrachtet man vergleichend dazu die Definitionen des Arzneibuches (COE, 2011) bezüglich Nachweis- und Bestimmungsgrenzen, so wird deutlich, dass die wirklichen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen des Verfahrens um mindestens den Faktor zehn tiefer liegen müssen. Der durchgeführte Verdünnungsversuch bestätigte diese Vermutung und stellte klar, dass das entwickelte Verfahren auch zur Bestimmung geringerer Wirkstoffgehalte geeignet ist. Grundsätzlich haben aus diesem Grund die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Analyten für die Validität der in dieser Arbeit untersuchten Wirkstoffgehalte keine bedeutsame Aussagekraft, weshalb z.B. die ICH-Guidelines bei reinen Gehaltsbestimmungen gänzlich den Verzicht der Bestimmung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze empfehlen (ICH, 2005). Da dem späteren Anwender aber durchaus die Möglichkeit gegeben sein sollte, die Analyten auch im Rückstandsbereich zu bestimmen und Nachweis- und Bestimmungsgrenze einen Maß für die Leistungsfähigkeit einer Methode darstellen, wurden diese zusätzlich bestimmt. Die Messunsicherheit des Verfahrens für die einzelnen Analyten beträgt zwischen 2,65 und 4,77 Prozent.; die mit dem Faktor 1,96 berechnete erweiterte Messunsicherheit beträgt demnach zwischen 5,19 und 9,35 Prozent. Durch die Verwendung der erweiterten Messunsicherheit kann für jeden einzelnen Messwert konstatiert werden, dass sich mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % der tatsächliche Wert in dem Bereich $\text{Messwert} \pm \text{erweiterte Messunsicherheit}$ befindet (SLMB, 2004). Welchen Wert eine Messunsicherheit annehmen darf, ist nirgendwo definiert. Wichtig ist, wie bei den anderen Validierungsparametern auch, dass die gewählten Akzeptanzkriterien eine in sich schlüssige Gesamtheit bilden, die am Ende zu dem Nachweis führt, dass die Methode für den vorgesehenen Zweck geeignet ist (MACNEIL *et al.*, 2000). Dieser Nachweis wird bei der in

dieser Arbeit vorgestellten Methode für die untersuchten Analyten Diethyltoluamid, IR 3535, Piperonylbutoxid, Permethrin, Cyfluthrin, Etofenprox und Deltamethrin erbracht. Eine Erweiterung der Methode um zusätzliche Wirkstoffe wäre vermutlich möglich, wurde aber in dieser Arbeit nicht mehr untersucht.

Das angewandte Extraktionsverfahren der Soxhlet-Extraktion über eine Dauer von vier Stunden, gewährleistet die Extraktion aller aktiven Inhaltsstoffe und extrahiert innerhalb dieser Zeit mehr als 99 Prozent aller extrahierbaren Inhaltsstoffe. Vergleichend dazu wurde eine Extraktion mit Toluol durchgeführt, die in ihren Bedingungen der von der CIPAC vorgestellten Methode zur Bestimmung von Deltamethrin entsprach (CIPAC, 2009). Bei dieser Versuchsanordnung wurden nur 80 – 90 % der extrahierbaren Inhaltsstoffe während der ersten Extraktion aus dem Netzmaterial herausgelöst und erst nach der 5. Extraktion waren mehr als 99 % der extrahierbaren Inhaltsstoffe aus dem Netzmaterial extrahiert. Dieses Ergebnis zeigt, dass bei einer nicht erschöpfenden Extraktion über eine Zeit von 30 Minuten bis zu 20 % geringere Gehalte bestimmt werden, als tatsächlich in dem Netz vorhanden sind. Dieser systematische Fehler kann insbesondere bei der Interpretation von Dosis – Wirkungs – Beziehungen zu Fehleinschätzungen hinsichtlich der konzentrationsabhängigen Wirksamkeit von aktiven Inhaltsstoffen auf imprägnierten Moskitonetzen führen.

Während der Entwicklung der Methode wurden verschiedene Lösemittel für die Extraktion getestet. Bei Vorversuchen im Ultraschallbad konnte dabei gezeigt werden, dass hinsichtlich der Extraktionskraft keine signifikanten Unterschiede zwischen Toluol, Xylol und Hexan bestehen, dass aber Ethanol über eine geringere Extraktionskraft, insbesondere bei den wenig polaren Substanzen Cyfluthrin, Etofenprox und Deltamethrin, verfügt. Für die Extraktion in der Soxhletapparatur waren Toluol und Xylol aber weniger geeignet, da auf Grund ihrer höheren Siedetemperatur die Verwendung eines Ölbad zum Erhitzen notwendig gewesen wäre, was einerseits von der Handhabung her schwieriger gewesen wäre und andererseits zu einer höheren thermischen Belastung der Analyten geführt hätte. Letztendlich wurde deshalb Hexan als das Lösungsmittel mit der besten Eignung für das in dieser Arbeit beschriebene Verfahren angesehen und für die Extraktion verwendet. Die niedrige Siedetemperatur des Hexans ist für die Extraktion von Vorteil, erfordert aber bei der sonstigen Arbeit besondere Aufmerksamkeit, da Lösungsmittelverluste durch Verdampfen vermieden werden müssen.

Der Zeitraum von vier Stunden für die Extraktion ist durchaus lang und durch die Verwendung einer Soxhlet – Apparatur relativ aufwändig. Die Messung größerer Serien ist deshalb mit einem großen Zeitaufwand verbunden, der von der apparativen Ausstattung abhängig ist. Als alternatives Extraktionsverfahren würde die Accelerated Solvent Extraction (ASE) in Frage kommen, die ebenfalls eine kontinuierliche Extraktion ermöglicht und bei Bedarf sogar mit verschiedenen Lösungsmitteln, unterschiedlichen Temperaturen und variablen Drücken während eines Extraktionsvorganges betrieben werden kann (GEY, 2008). Dieses neue Extraktionsverfahren hat verschiedene Vorteile; so ist der Verbrauch an Lösungsmitteln deutlich geringer, auf Grund der forcierten Temperatur- und Druckbedingungen können kürzere Analysenzeiten erreicht

werden und eine simultane Bestimmung von mehr als zwanzig Proben ist mit den entsprechenden Geräten möglich. Im Allgemeinen scheint die ASE insbesondere bei der Extraktion komplexer Matrices der Soxhletextraktion überlegen zu sein (MASALA *et al.*, 2011). Für die vorliegende Arbeit war eine ASE nicht verfügbar, so dass die Eignung dieser Extraktionstechnik nicht überprüft werden konnte. Die Anwendung dieser Extraktionstechnik könnte aber möglicherweise zu einer weiteren Verbesserung der Methode im Hinblick auf die Analysenzeiten und den Chemikalienverbrauch führen. Problematisch an der ASE ist eine zur Zeit noch geringe Verbreitung in den Laboratorien, wohingegen eine Soxhletapparatur zur Standardausstattung nahezu jeden Labors gehört, so dass die verbreitete Anwendung eines auf der ASE basierenden Aufschlussverfahrens zur Zeit eher fragwürdig erscheint.

Hinsichtlich des Detektionsverfahrens ist alternativ zur massenspektrometrischen Detektion auch die Verwendung eines Flammenionisationsdetektors (FID) zur quantitativen Bestimmung der Analyten denkbar. Bei diesem Detektionsverfahren wäre allerdings die qualitative Aussage zur Identität der Analyten nur über die Retentionszeit oder die relative Retentionszeit möglich und es müsste somit eine geringere Spezifität des Verfahrens in Kauf genommen werden. Auch in Bezug auf die Empfindlichkeit des Verfahrens, ist bei Detektion mittels FID mit einer geringeren Leistungsfähigkeit gegenüber der massenselektiven Detektion zu rechnen. Welche Auswirkungen dies im Einzelfall auf die generelle Anwendbarkeit der Methode hat, ist nicht abschließend zu klären, wobei insbesondere bei der Bestimmung geringerer Gehalte (z.B. im Rahmen von Waschversuchen) das Verfahren unter Verwendung eines FID an seine Grenzen gelangen könnte. Einen weiteren Diskussionsansatz bietet die Wahl des chromatographischen Analyseverfahrens. In der vorgestellten Methode wurde die Gaschromatographie als Analyseverfahren gewählt und nicht die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, die grundsätzlich auch als Analyseverfahren in Frage kommen würde. Zur Bestimmung der Einzelsubstanzen sind Methoden publiziert, die dokumentieren, dass sich alle Analyten der Methode sowohl mit gaschromatographischen als auch mit flüssigchromatographischen Verfahren bestimmen lassen. So ist beispielsweise die Bestimmung von Deltamethrin flüssigchromatographisch mittels Normalphasen HPLC und UV Detektion bei 236 nm (CIPAC, 2009), aber auch gaschromatographisch mit massenselektiver Detektion (LENG and GRIES, 2005) möglich. Auch die Bestimmung von Diethyltoluamid ist sowohl gaschromatographisch (CHERSTNIAKOVA *et al.*, 2006) als auch flüssigchromatographisch beschrieben. Bei der flüssigchromatographischen Bestimmung wird allerdings im Gegensatz zur Deltamethrinbestimmung eine Umkehrphasenchromatographie (RP) eingesetzt, die den Einsatz eines völlig anderen Säulenmaterials und Fließmittels erfordert. Durch die schlechtere Trennleistung der HPLC im Vergleich zur GC wäre eine Trennung aller Analyten sowohl auf einer Umkehrphase als auch auf einer Normalphase fraglich. Wahrscheinlich wäre eine Bestimmung aller Analyten mittels LC-MS/MS möglich gewesen, aber da diese aufwendige Analysetechnik deutlich weniger verbreitet ist als GC-MS, könnten nur einige wenige Labore die Analytik durchführen. Darüberhinaus müsste bei der LC-MS/MS mit einem wässrigen Puffersystem gearbeitet werden, was einen zusätzlichen Aufarbeitungsschritt nach der Extraktion führen würde.

Die Gefahr des Verlustes von Analyten wäre dabei besonders hoch, da das organische Lösemittel vollständig entfernt werden muss und Versuche am Rotationsverdampfer gezeigt haben, dass die tief siedenden Analyten wie Diethyltoluamid und IR 3535 schon bei geringem Unterdruck in das zu entfernende Lösemittel übergehen. Da bekannt war (AKHTAR, 1982; CHERSTNIAKOVA *et al.*, 2006), dass die am höchsten und am niedrigsten siedende Komponente der zu untersuchenden Analyten gaschromatographisch bestimmbar sind, und die Probe nach der Extraktion unmittelbar für die Analytik geeignet sein würde, wurde die Gaschromatographie als Methode der Wahl festgelegt und eine Bestimmung mittels HPLC nicht weiter verfolgt.

5.2. Untersuchungen an imprägnierten Moskitonetzen

Der Nutzen von imprägnierten Moskitonetzen im Rahmen eines integrierten Vektorenmanagements zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten ist allgemein anerkannt (BEIER *et al.*, 2008). Nach mehreren Jahrzehnten des erfolgreichen Einsatzes von imprägnierten Moskitonetzen und Verbesserungen der Anwenderfreundlichkeit und –sicherheit durch die Weiterentwicklung von ITN's zu LLINs (RAGHAVENDRA *et al.*, 2011) sind zunehmende metabolische und kdr-Resistenzen für die Wirksamkeit von imprägnierten Moskitonetzen ein Problem (ENAYATI and HEMINGWAY, 2006; HANCOCK, 2009; ZAIM and GUILLET, 2002), das nur durch eine weitere Verbesserung der imprägnierten Moskitonetze gelöst werden kann. Dieser Verbesserung dient die vorliegende Arbeit und die dargestellten Ergebnisse zeigen einen ersten, vielversprechenden Ansatz zur Bekämpfung von Resistenzen unter Verwendung einer Kombination von Repellents und Insektiziden auf imprägnierten Moskitonetzen (FAULDE and NEHRING, 2012).

Zu Beginn der Untersuchungen wurden verschiedene Einzelwirkstoffe mit dem neuen Polymercoatingverfahren (FAULDE and UEDELHOVEN, 2006) auf die zu untersuchenden Netze aufgebracht und dosisabhängige Wirksamkeitskurven erstellt. Mit diesen Kurven konnte die konzentrationsabhängige Wirksamkeit der einzelnen Analyten bestimmt werden.

Parallel zu den Untersuchungen mit Pyrethroiden wurden erstmals Repellents (Diethyltoluamid und IR 3535) in hoher Konzentration (mehr als 10g/m^2) auf Moskitonetze aufgebracht und deren Bioaktivität untersucht. Interessanterweise konnten für beide Repellentien insektizide (gegen *Aedes aegypti*) und akarizide (gegen *Ixodes ricinus*) Wirkungen nachgewiesen werden (FAULDE *et al.*, 2010). Die Wirkstärke beider Repellentien ist schwächer als die der Pyrethroide (Abbildung 57; $p < 0,01$), wohingegen sich die Wirkstärke von Diethyltoluamid und IR 3535 bei Konzentrationen von über 2 g/m^2 nicht signifikant ($p = 0,29$) voneinander unterscheidet. Bei Betrachtung des Knockdown-Effektes und Konzentrationen von unter 2 g/m^2 zeigt Diethyltoluamid eine größere Wirksamkeit als IR 3535. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Untersuchungen von Liccardi (LICCIARDI *et al.*, 2006), wo festgestellt wurde, dass bei auf Papierfiltern aufgebrachten Repellentien Diethyltoluamid die stärkste Wirksamkeit zeigte, gefolgt von IR 3535 und Icaridin, für das bei den untersuchten Konzentrationen keine toxische Wirkung auf die Versuchstiere (*Aedes aegypti*) festgestellt wurde. Die bei dieser Untersuchung angewandten Konzentrationen an Repellents waren geringer, als die bei der vorliegenden Arbeit eingesetzten Maximalkonzentrationen, so dass die vorhandene insektizide und akarizide Wirkung von IR 3535 bei Liccardi (LICCIARDI *et al.*, 2006) nicht festgestellt wurde. Die Untersuchung des Repellents Icaridin wurde auf Grund fehlender Verfügbarkeit nicht durchgeführt. Nimmt man den hier bestätigten Nachweis hinsichtlich der Wirkstärke der Repellents als Grundlage (LICCIARDI *et al.*, 2006), so ist davon auszugehen, dass Diethyltoluamid und IR 3535 besser geeignet sind als Icaridin, um eine insektizide Wirkung auf imprägnierten Moskitonetzen zu erzielen und dass die nicht durchgeführten Untersuchungen mit diesem Repellent keine relevanten Auswirkungen auf

das Grundsatzergebnis haben. Mit dem geführten Nachweis der Toxizität von Diethyltoluamid und IR 3535 gegen *Aedes aegypti* bei Kontaktexposition stellt sich die Frage, ob die Überlebenszeit von Stechmücken auch über die Gasphase beeinflusst wird oder ob der direkte Kontakt mit den Wirkstoffen erforderlich ist. Dieser Fragestellung sollte in Expositionsversuchen von Stechmücken mit unterschiedlichen Konzentrationen im Gasraum nachgegangen werden und ist ein Ansatzpunkt für weitere Forschungsaktivitäten.

Eine weitere Beobachtung, die während der Versuche gemacht werden konnte, betrifft die Wirkdauer der imprägnierten Moskitonetze. Obwohl zu Beginn der Untersuchungen nicht explizit geplant, wurden die Veränderungen der Bioaktivität der mit Diethyltoluamid und IR 3535 imprägnierten Moskitonetze beobachtet und festgestellt, dass die Wirksamkeit der mit dem Polymercoatingverfahren imprägnierten Moskitonetze auch nach einem Jahr noch vorhanden war. Dieses Erkenntnis bestätigt die Anwendbarkeit des ursprünglich für Herstellung von Uniformen entwickelten Imprägnierungsverfahrens (FAULDE and UEDELHOVEN, 2006) auch für die Herstellung von LLRN.

Zusätzlich zur insektiziden Wirkung wurde eine akarizide Wirkung gegen *Ixodes ricinus* beobachtet. Diese Tatsache bietet eine zusätzliche Option in der Vermeidung von zeckenübertragenen Krankheiten in Europa. Auch wenn die Notwendigkeit der Verwendung von imprägnierten Bedarfsgegenständen in Europa zur Vermeidung vektorübertragener Infektionskrankheiten noch nicht im Mittelpunkt des öffentlichen Interesses steht, ist die Option den zur Zeit in Europa bedeutendsten Überträger von vektorübertragenen Infektionskrankheiten (WIRTZ, 2001) wirksam zu bekämpfen, nicht nur für beruflich exponierte Personen (Waldarbeiter, Soldaten) und „Outdoorfans“ von Bedeutung, sondern im Zuge eines möglicherweise bevorstehenden Klimawandels auch für große Teile der europäischen Bevölkerung.

Die festgestellte insektizide Aktivität der Repellentien bietet unterschiedliche Möglichkeiten die Wirksamkeit imprägnierter Moskitonetze zu verbessern. Zum einen ist die alleinige Anwendung als Wirkstoff auf imprägnierten Moskitonetzen denkbar, zum anderen die Kombination mit einem Pyrethroid. Da aus technologischer Sicht dem Aufbringen mehrerer Inhaltsstoffe mit dem Polymercoatingverfahren nichts entgegenstand, wurde im weiteren Verlauf der Untersuchungen die Wirksamkeit von Kombinationen eines Repellents mit einem Insektizid geprüft. Gegenstand der Untersuchungen waren die beiden verfügbaren Repellents Diethyltoluamid und IR 3535 in Kombination mit Permethrin oder Etofenprox. Bei der Wahl der Insektizide wurde neben der reinen Verfügbarkeit auch das toxikologische Profil der Wirkstoffe berücksichtigt. Permethrin und Etofenprox sind hinsichtlich ihrer ADI-Werte günstiger zu beurteilen als die α -Cyano Pyrethroide Deltamethrin und Cyfluthrin (AGRAR, 2000) und darüberhinaus standen toxikologische Daten (APPEL *et al.*, 2008; ROßBACH *et al.*, 2005) zur Verfügung, die eine Anwendung von Permethrin in den vorgesehenen Konzentrationen als sicher für den Verbraucher annehmen lassen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten, dass Diethyltoluamid problemlos mit den Insektiziden auf das Netz appliziert werden kann. Im Gegensatz dazu war die Polymerisation mit IR 3535 problematisch, da der erwartete Gehalt an Insektizid nicht auf dem Netzmaterial

nachweisbar war. Die Ursache dafür kann nur vermutet werden. Möglicherweise ist die Bindungsaffinität von IR 3535 zum Netzmaterial besonders hoch oder es findet eine Verdrängung des Insektizids beim Polymerisationsprozess statt. Diese Frage kann abschließend nicht geklärt werden, jedoch wurde deutlich, dass sich Diethyltoluamid besser für die Herstellung eines LLIRNs mit dem Polymercoatingverfahren eignet.

Grundsätzlich lässt sich aus den mit unterschiedlichen Netzmaterialien durchgeführten Versuchen schlussfolgern, dass die Erzielung einer vergleichbaren Toxizität gegenüber *Aedes aegypti* mit allen Netzmaterialien möglich ist, wobei die Anwesenheit eines Insektizids zwingend erforderlich scheint, um eine maximale Toxizität zu gewährleisten. Je nach Netzmaterial ist die Kompatibilität der einzelnen Wirkstoffe bei der Imprägnierung zu beobachten, wobei insbesondere Kombinationen mit IR 3535 problematisch zu sein scheinen. Auf Grund unterschiedlicher Eigenschaften der verwendeten Fasern kann allein auf Grund des Gehaltes an aktiven Inhaltsstoffen keine Aussage zur Bioaktivität gemacht werden. So reicht bei den Polyesternetzen und den Lenonetzen ein geringerer absoluter Gehalt an Wirkstoffen aus, um eine vergleichbare Wirkstärke wie auf den Baumwollnetzen mit höherem absoluten Gehalt zu erzielen. Die Lenonetze konnten soweit modifiziert werden, dass die Aufnahmekapazität bezüglich der aktiven Inhaltsstoffe nah an die der Baumwollnetze heranreicht. Bei der erreichbaren maximalen Knockdown- und Kill-Geschwindigkeit ist bei bestimmten minimalen Zeitpunkten ein „Cut-off“ festzustellen, der auch durch die Verwendung von größeren Gehalten an aktiven Inhaltsstoffen nicht unterschritten werden kann. Durch experimentelle Bestimmung dieser Grenzen für die einzelnen Netzmaterialien kann eine ideale Wirkstoffkonzentration festgelegt werden, die zu maximaler Toxizität bei gleichzeitig minimaler Exposition für den Anwender führt.

Die Wirksamkeit der mit Diethyltoluamid und Permethrin imprägnierten Netze war sowohl in Bezug auf die Kill-Aktivität als auch auf die Knockdown-Aktivität signifikant höher, als die der mit Permethrin (KD: $p < 0,001$; Kill: $p < 0,001$) oder Diethyltoluamid (KD: $p < 0,001$; Kill: $p < 0,001$) imprägnierten Netze, die als Referenz betrachtet wurden. Das gleiche Ergebnis war auch für die Kombination aus Diethyltoluamid und Etofenprox zu beobachten, wo die biologischen Aktivitäten sich ebenfalls signifikant von den ausschließlich mit Diethyltoluamid (KD: $p < 0,004$; Kill: $p < 0,001$) oder Etofenprox (KD: $p < 0,001$; Kill: $p < 0,001$) imprägnierten Netzen unterschieden. Wenn man die extrapolierten Knockdown- und Kill-Zeiten für Permethrin und Etofenprox mit den Zeiten der kombinierten Netze vergleicht, so sind für die Kombination Diethyltoluamid/Permethrin um 55-75% reduzierte Knockdown-Zeiten und um 55-64% reduzierte Kill-Zeiten, für die Kombination Diethyltoluamid/Etofenprox um 42-50% reduzierte Knockdown-Zeiten und um 25-38% reduzierte Kill-Zeiten zu beobachten gewesen. Selbst bei den mit IR 3535 und Permethrin imprägnierten Netzen, die, wie bereits erwähnt, nicht den erwarteten Gehalt an Permethrin aufwiesen, war eine verstärkte Wirksamkeit im Vergleich zur Referenz (IR 3535) signifikant feststellbar (KD: $p < 0,001$; Kill: $p < 0,001$). Diese Beobachtung lässt einen deutlichen synergistischen Effekt zwischen den Wirkstoffen vermuten, wobei die Kombination aus Diethyltoluamid und Permethrin offenbar eine höhere Wirksamkeit besitzt als die aus Diethyltoluamid und Etofenprox. Die Theorie bezüglich

eines synergistischen Effektes wird gestützt durch beschriebene synergistische Effekte für Diethyltoluamid und Propoxur gegen *Aedes aegypti* (PENNETIER et al., 2005) und zeigt, dass durch den kombinierten Einsatz von Repellent und Insektizid eine verstärkte Toxizität gegenüber den Versuchstieren erreicht werden kann. Obwohl der Mechanismus der synergistischen toxikologischen Wirkung der auf den Netzen kombinierten Wirkstoffe bislang völlig unbekannt ist, wird vermutet, dass der toxikologischen Gesamtwirkung unterschiedliche Einzelmechanismen zu Grunde liegen (FAULDE et al., 2010; LICCIARDI et al., 2006; PRIDGEON et al., 2009). Wenn sich bestätigt, dass die Wirkung der Kombination von Repellent und Insektizid nicht auf der Verstärkung oder Unterstützung eines Wirkmechanismus beruht, sondern auf einer komplexen Wirkung an unterschiedlichen Angriffspunkten, dann ist denkbar, dass eine metabolische oder genetische Anpassung an einen Wirkstoff nicht zu einem Überleben des Vektors führt, so dass mit diesen Wirkstoffkombinationen Resistenzbildungen unterbunden oder zumindest reduziert werden könnten.

Die alleinige Betrachtung der toxikologischen Wirkung von imprägnierten Moskitonetzen auf die entsprechenden Zielorganismen ist nicht ausreichend. Zum Schutz des Menschen muss auch ein Durchflug- bzw. Durchstichschutz gewährleistet sein, um den Transmissionsweg sicher zu unterbinden. In den durchgeführten Arm-in Cage Tests zur Bestimmung des Durchstichschutzes erwiesen sich die ausschließlich mit Insektiziden imprägnierten Netze als nicht ausreichend wirksam (FAULDE and NEHRING, 2012). Zwar konnte bei den Netzen mitunter ein Deterrent-Effekt beobachtet werden, aber keines der Netze war in der Lage, alle ca. 400 Stechmücken während der 5 minütigen Expositionszeit von der Blutmahlzeit abzuhalten. Im Gegensatz dazu kann mit hohen Konzentrationen Repellent (Diethyltoluamid ab etwa 3000 mg/m²; IR 3535 ab etwa 6000 mg/m²) eben dieser erforderliche 100 %ige Durchstichschutz erreicht werden (FAULDE et al., 2010). Im Gegensatz zu den Insektiziden ist bei den Repellents neben dem Deterrent-Effekt auch ein Space-Effekt zu beobachten, der den größten Teil der Stechmücken davon abhält, näher als 10 - 40 mm an das Netz heranzufiegen. Dieser negative Chemotropismus auf Distanz führt zu einer geringeren Exposition der Stechmücken mit den Wirkstoffen und reduziert so den Selektionsvorteil durch eine Resistenz. Dies wiederum kann insgesamt zu einer Verminderung der Resistenzen führen. Andererseits könnte die Hypothese aufgestellt werden, dass durch den fehlenden Kontakt mit dem Netz die blutsuchende Stechmücke ein anderes Opfer sucht und dieses potentiell infizieren kann. Dem ist entgegenzuhalten, dass auch eine Stechmücke, die Kontakt mit einem Insektizid hatte, durchaus noch in der Lage ist, für einen gewissen Zeitraum zu stechen und Krankheiten zu übertragen. Darüberhinaus ist zu bedenken, dass die LLINs zwar ein wichtiges Element in der Malariaprotektion sind, aber nur in einem ganzheitlichen Ansatz, in dem andere Maßnahmen vorrangig für die Reduktion von Stechmückenpopulationen verantwortlich sind, eine wirklich nachhaltige Wirkung erzielt werden kann.

Ein weiterer zu bedenkender Punkt bei der Anwendung von Diethyltoluamid in LLIRNs ist die Ausbildung einer Resistenz gegenüber dem Wirkstoff durch Verwendung in LLIRNs. Bei Anwendung von Diethyltoluamid als Repellent, sind Stechmücken beobachtet worden, die nicht

durch den negativen Chemotropismus von einer Blutmahlzeit abgehalten werden (RUTLEDGE *et al.*, 1994). Diese fehlende Sensitivität gegenüber Diethyltoluamid beruht wahrscheinlich auf einer morphologischen, genetisch determinierten Veränderung der Antennen der Stechmücken (STANCZYK *et al.*, 2010), so dass die nicht sensitiven Stechmücken den Geruch von Diethyltoluamid nicht mehr wahrnehmen können. Auf dem LLIRNs hätte dies zur Folge, dass die Stechmücken die erste Verteidigungslinie des LLIRN, die auf dem Space-Effekt beruht, durchbrechen könnten. Der Hot-Feet oder Deterrent-Effekt sollte anschließend die Stechmücken, die eine Insensitivität aufweisen, von der dauerhaften Landung abhalten. Sollte dies nicht geschehen, ist die starke synergistische Toxizität von Insektizid und Repellent in der Lage die Stechmücke durch den rasch einsetzenden Knockdown-Effekt auszuschalten, bevor sie ein Opfer findet und sticht. Die toxikologische relevante Wirkung von Diethyltoluamid sollte durch die Veränderung der Antennen nicht beeinträchtigt werden, da es sich bei der morphologischen Veränderung nicht um eine Änderung der Stoffwechseleigenschaften der Stechmücke handelt. Allerdings ist zur Zeit noch unklar, ob eine derartige Veränderung der sensorischen Fähigkeiten der Stechmücke tatsächlich einen Selektionsvorteil bietet, der zu einer weiten Verbreitung dieser Eigenschaft führt. Wahrscheinlich ist dass nicht der Fall, da in dem über 50 Jahre andauernden erfolgreichen Einsatz von Diethyltoluamid als Repellent keine Fälle bekannt geworden sind, bei denen große Stechmückenpopulationen die Anwesenheit von Diethyltoluamid ignoriert hätten.

Bei der Untersuchung des Space-Effektes war noch eine weitere Beobachtung äußerst interessant. Die mit mehreren Wirkstoffen imprägnierten Netze waren teilweise zuerst mit Insektizid und anschließend in der oberen Schicht mit Repellent imprägniert. Bei anderen Netzen befand sich das Repellent in der inneren Schicht und das Insektizid auf der äußeren Schicht. Die Netze, bei denen sich das Repellent in der inneren Schicht befand, zeigten einen prolongierten 100%igen Durchstichschutz von insgesamt bis zu 83 Wochen gegenüber den Netzen die auf der äußeren Schicht mit Repellent imprägniert waren und auch gegenüber den ausschließlich mit Repellent imprägnierten Netzen (FAULDE and NEHRING, 2012). Neben der Reihenfolge der Applikation der Wirkstoffe, ist die Dauer des 100%igen Durchstichschutzes auch abhängig von der Initialkonzentration an Wirkstoff. Dies zeigt erneut, dass für die Gewährleistung eines Durchstichschutzes eine Mindestmenge an Repellent auf dem Netz vorhanden sein muss, die konsequenterweise bei einer höheren Ausgangskonzentration erst zu einem späteren Zeitpunkt unterschritten wird. Der Verlust an Wirkstoff lässt sich mit der Flüchtigkeit der Repellents erklären, die auch Bestandteil ihrer räumlichen Wirkung ist. Bei einer zusätzlichen Polymerschicht mit Insektizid ist dieser Verlust geringer, da die Angriffsfläche wahrscheinlich durch die reduzierte Oberfläche vermindert ist. Dennoch hat die zusätzliche Polymerschicht keinen Einfluss auf die Wirksamkeit hinsichtlich des Durchstichschutzes, so dass bei einer Imprägnierung mit Repellent und Insektizid das Repellent grundsätzlich auf die innere Polymerschicht aufgebracht werden sollte. Prinzipiell ist aber das Vorhandensein eines Insektizids nicht erforderlich, um einen 100%igen Durchstichschutz zu gewährleisten. Dafür ist die Anwesenheit eines Repellents in hohen Konzentrationen ausreichend. Die unmittelbar toxischen Effekte auf die Versuchstiere

werden aber durch die Verwendung der Kombination aus Repellent und Insektizid deutlich gesteigert, so dass diese, insbesondere wenn die erforderliche Repellentkonzentration für einen 100%igen Durchstichschutz unterschritten wird, letztendlich die geeignetste Variante für eine effektive Imprägnierung der Moskitonetze darstellt.

Der abschließende Teil dieser Diskussion befasst sich mit den Waschversuchen, die an den eigenen und den kommerziell erhältlichen Moskitonetzen durchgeführt wurden. Es wurde gezeigt, dass das neue Imprägnierungsverfahren, neben der Möglichkeit deutlich größere Mengen an Wirkstoffen auf die Fasern aufzubringen, über eine Waschresistenz verfügt, die eine Wirksamkeit über die gesamte Lebensdauer des Moskitonetzes gewährleistet. Um einen Vergleich zu führen, wurden bereits auf dem Markt verfügbare Moskitonetze dem gleichen Waschverfahren unterzogen, so dass eine Aussage getroffen werden konnte, wie die Waschresistenz des Polymercoatingverfahrens einzuordnen ist. Die erste Aussage, die getroffen werden kann, ist, dass die Waschresistenz nicht allein von dem Verfahren abhängt mit dem die Netze imprägniert werden, sondern dass zwischen dem Imprägnierungsverfahren, dem aufzubringenden Wirkstoff und der Wirkstoffmenge ein sensibles Verhältnis besteht, dass in jedem Einzelfall gesondert betrachtet werden muss. Diese Erkenntnis ist der Tatsache geschuldet, dass bei der Imprägnierung eines Netzmaterials mit verschiedenen Wirkstoffen nach derselben Methode und unter Verwendung derselben Weichmacher und Binder, der Wirkstoffgehalt nach 1, 5, 10, und 20 Wäschen deutlich unterschiedlich abgenommen hatte. Bei Cyfluthrin, dem nach unseren Untersuchungen resistenstesten Wirkstoff in der Polymerschicht, waren nach 20 Waschgängen noch bis zu 70 Prozent des eingesetzten Wirkstoffes vorhanden. Deltamethrin, das in einer vergleichbaren Konzentration aufgebracht worden war, wies nach 20 Waschgängen noch maximal 52 Prozent des initial eingesetzten Wirkstoffes auf, wobei interessanterweise der Wirkstoff schon nach einem Waschgang in ähnlicher Konzentration vorlag, wie nach 20 Wäschen (Abbildung 77). Permethrin und Etofenprox verfügten nach 20 Wäschen noch über etwa 40 Prozent des ursprünglichen Wirkstoffgehaltes, wobei allerdings berücksichtigt werden muss, dass die Initialkonzentration dieser beiden Wirkstoffe mitunter deutlich höher war, als bei den anderen Wirkstoffen (Etofenprox bis zu 750 mg/m² und Permethrin bis zu 8000 mg/m²), so dass die geringere Waschresistenz auch darin ihre Ursache haben kann, da grundsätzlich die Tendenz zu erkennen war, dass höhere Ausgangskonzentrationen zu einem prozentual geringeren Endgehalt führten, wobei aber der absolute Gehalt nach 20 Wäschen höher war.

Grundsätzlich ist für die Beurteilung einer ausreichenden Waschresistenz von Bedeutung, ob nach einer entsprechenden Anzahl an Waschgängen noch die notwendige Konzentration an Wirkstoff enthalten ist. Dabei ist unter anderem auch zu berücksichtigen, dass hierfür je nach Wirkstoff unterschiedliche Gehalte erforderlich sind und somit weniger die prozentuale Ausbeute, sondern vielmehr der absolute Restgehalt von Bedeutung ist. Betrachtet man diesen Restgehalt an Wirkstoffen auf allen mit dem Polymercoatingverfahren imprägnierten Netzen nach 20 Waschgängen gemäß DIN EN ISO 6330, so ist unter Berücksichtigung der unter 4.2.1. durchgeführten Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Beziehungen davon auszugehen, dass die auf

den Netzen nachzuweisenden Wirkstoffgehalte ausreichend sind, um eine adäquate Wirksamkeit zu gewährleisten. Dennoch ist auch die Kenntnis über die prozentuale Ausbeute von Bedeutung, da nur darüber ein dimensionsloser Vergleich der Waschresistenzen möglich ist.

Eine Aussage bezüglich der Waschresistenz im Vergleich zu anderen kommerziell erhältlichen Netzen sollte durch einen unter gleichen Waschbedingungen durchgeführten Versuch erhalten werden. Hierbei gilt es grundsätzlich zu bedenken, dass die Ergebnisse dieser Versuche nur eine Momentaufnahme darstellen und bei den kommerziell erworbenen Netzen keine Informationen zum Alter der Netze oder zum Verfahren der Imprägnierung vorlagen. Vor dem Waschen wurde deshalb bei allen Netzen die Ausgangskonzentration an Wirkstoff bestimmt, die anschließend für die Berechnung des Verlustes nach dem Waschen zu Grunde gelegt wurde. Auffällig bei der Bestimmung der Ausgangskonzentration war, dass bei dem Netprotect®-Netz mit 6 mg/m² nur etwa 10 Prozent der vom Hersteller angegebenen Wirkstoffkonzentration nachgewiesen wurde, wohingegen sich die Gehalte bei den Netzen Conmanet® und PermaNet® 2.0 innerhalb der von den Herstellern angegebenen Spezifikationen befanden. Für das Care Plus® Netz war keine Spezifikation verfügbar. Wie bereits erwähnt, ist die Waschresistenz von verschiedenen Faktoren abhängig. Der Vergleich zwischen den Netzen kann also nur als Anhaltspunkt dienen und eine Beurteilung welches Imprägnierungsverfahren am besten geeignet ist, ist insbesondere auf Grund der großen Unterschiedlichkeit der Fasermaterialien (Abbildung 84) schwierig, da bislang nicht bekannt ist, ob sich das Imprägnierungsverfahren für alle Fasermaterialien gleichermaßen eignet. Da bei dem von uns angewandten Imprägnierungsverfahren Waschversuche bislang nur mit Baumwollnetzen durchgeführt wurden, kann eine Aussage zur Waschresistenz bei synthetischen Fasern noch nicht getroffen werden. Die grundsätzliche Anwendbarkeit des Imprägnierungsverfahrens für synthetische Polyesterfasern wurde jedoch bereits erfolgreich nachgewiesen (siehe 4.2.3.).

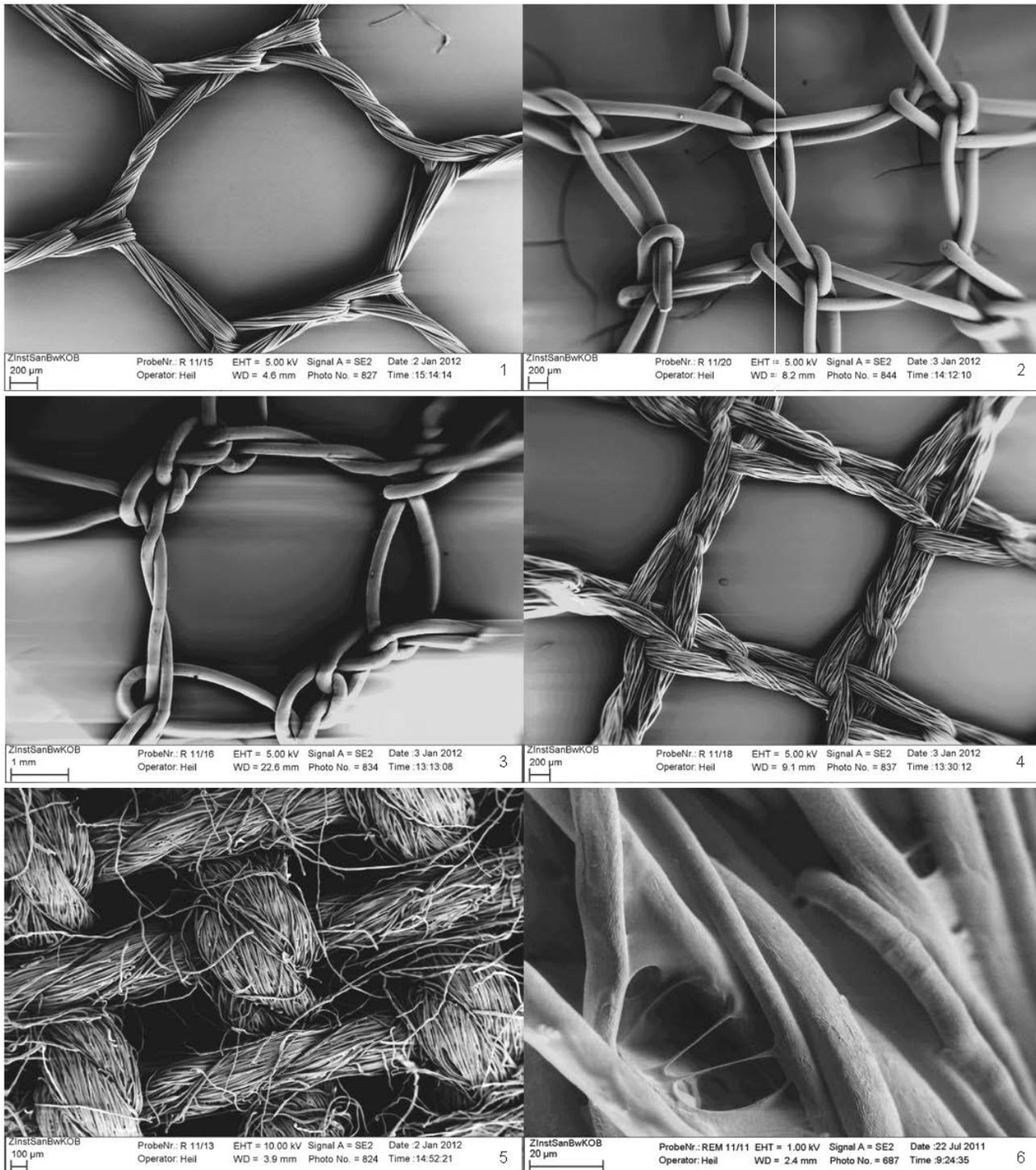


Abbildung 86: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Moskitonetzen unterschiedlicher Hersteller, aufgenommen in der Laborgruppe Elektronenmikroskopie des Zentralen Institutes der Bundeswehr Koblenz: 1.McKinley® Netz, 2. Netprotect® Netz, 3. Conmanet®, 4. PermaNet® 2.0, 5. PC-Netz Utexbel, 6. PC-Netz Utexbel stärkere Vergrößerung. Die Abbildung zeigt die großen Unterschiede hinsichtlich der verwendeten Materialien und Fasereigenschaften.

Vergleicht man, trotz der erwähnten Unwägbarkeiten, die Waschresistenzen der einzelnen Netze miteinander, so zeigt sich, dass das nach dem Polymercoatingverfahren mit Deltamethrin imprägnierte Netz in etwa denselben Restgehalt nach 5 Waschgängen aufwies (32 %), wie das PermaNet® 2.0 (29 %). Besonders interessant war hier die Beobachtung, dass auch beim

PermaNet® 2.0 der größte Wirkstoffverlust bereits nach der ersten Wäsche auftrat; ein Effekt, der auch bei den nach dem Polymercoatingverfahren imprägnierten Netze beobachtet werden konnte. Bei Vergleich des Conmanet® – Netzes gegenüber dem mit dem Polymercoatingverfahren und Permethrin imprägnierten Netz ist der Restgehalt von 82 Prozent bei dem mit dem Polymercoatingverfahren imprägnierten Netz gegenüber 68 Prozent beim Conmanet® höher und es kann eine bessere Waschbeständigkeit des Polymercoatingnetzes angenommen werden. Das Netprotect® Netz, das mit Deltamethrin imprägniert ist, wies nach 5 Waschgängen einen Restgehalt an aktivem Inhaltsstoff von 46% auf und ist möglicherweise mit dem PermaNet 2.0 hinsichtlich seiner Waschresistenz vergleichbar, wobei allerdings wegen des äußerst geringen Ausgangsgehalt des Netzes diese Bewertung nur als Vermutung angesehen werden kann. Wenn man die Restgehalte an Permethrin des Care Plus® Netzes betrachtet, so ist festzustellen, dass nach 5 Wäschen mit dem gewählten Waschprotokoll nur noch Spuren (maximal 2 %) des ursprünglich eingesetzten Wirkstoffes vorhanden waren, so dass bei diesem Netz nicht von einer, gemäß WHO Guidelines für LLINs geforderten (WHO, 2005), erhöhten Waschresistenz ausgegangen werden kann.

Grundsätzlich ist also zu konstatieren, dass die Waschbeständigkeit der nach dem neuen Verfahren imprägnierten Netze mindestens die gleiche Güte aufweist, wie die zur Zeit auf dem Markt erhältlichen Netze. Inwiefern dies auch für andere Materialien, als das bislang untersuchte Baumwollmaterial gilt, bedarf weiterer Studien.

Bei den kommerziell zu erwerbenden Netzen Conmanet®, Netprotect® und PermaNet® 2.0 wurde eine gute biologische Wirksamkeit nach 5 Wäschen festgestellt, das Care Plus® Netz wies nach 5 Wäschen keine nennenswerten toxikologischen Eigenschaften gegen *Aedes aegypti* auf, so dass bei Verwendung des Care Plus® Netzes nach 5 Wäschen kein Schutz der Individuen mehr besteht.

Ein letzter hier zu diskutierender Waschversuch wurde mit einem nach dem Polymercoatingverfahren imprägnierten Netz gemacht, das mit dem Wirkstoffen Etofenprox und Diethyltoluamid belegt war. Die innere Schicht wurde dabei durch das Etofenprox gebildet und die äußere durch Diethyltoluamid. Für den Wirkstoff Etofenprox ist festzustellen, dass kein nennenswerter Unterschied zu den ausschließlich mit Etofenprox imprägnierten Netzen erkennbar ist und dass mit dem daraus resultierenden Restgehalt nach 20 Waschgängen eine gute Bioaktivität gewährleistet sein sollte. Schlechter ist die Bilanz für das Diethyltoluamid; hier ist bereits nach dem ersten Waschgang ein Wirkstoffverlust von 80 Prozent zu verzeichnen und nach 20 Wäschen befinden sich maximal 3 Prozent des ursprünglichen Gehaltes auf den Moskitonetzen. Es ist davon auszugehen, dass die Repellentwirkung des Diethyltoluamids und damit der 100 %ige Durchstichschutz bereits nach einem Waschgang nicht mehr gegeben sein dürfte. Hier gilt es das Verfahren zu optimieren, und zu prüfen, ob die Waschresistenz durch Maßnahmen, wie z.B. die Polymerisation auf eine innere Schicht, verbessert werden kann. Eine Erhöhung der Waschbeständigkeit für das Diethyltoluamid wäre günstig, da in der vorliegenden

Arbeit gezeigt wurde, welche außergewöhnliche Verbesserung imprägnierter Moskitonetze durch die Kombination mit einem Repellent erreicht werden kann.

Zum Abschluss ist festzuhalten, dass es im Rahmen dieser Arbeit gelungen ist, eine analytische Methode zu entwickeln, die zur Bestimmung eines Großteils der zur Imprägnierung von Moskitonetzen angewendeten Wirkstoffe geeignet ist. Darüberhinaus wurde ein erster Versuch unternommen, Repellentien mit Insektiziden auf mit dem Polymercoatingverfahren imprägnierten Moskitonetzen zu kombinieren. Der dabei festgestellte synergistische Effekt zwischen Diethyltoluamid und Permethrin / Etofenprox und die Erzielung eines 100 %igen Durchstichschutzes bei Moskitonetzen, die mit einer entsprechend hohen Menge an Repellent imprägniert wurden, sind ein Ansatz, der zu einer deutlichen Verbesserung der Wirksamkeit bei gleichzeitiger Reduktion der Gefahr von Resistenzbildungen führen könnte.

Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei diesen Ergebnissen um einen vielversprechenden Ansatz zu einer deutlichen Verbesserung imprägnierter Moskitonetze. Ob diese neuen Netze auch in der Praxis die zu erwartende herausragende Verbesserung darstellen, kann erst abschließend beurteilt werden, wenn die Netze in weiteren Felduntersuchungen, insbesondere hinsichtlich ihrer Wirksamkeit gegenüber anderen auch pyrethroidresistenten Stechmückenarten, getestet worden sind. Diese Versuche in Gebieten, in denen Malaria oder Gelbfieber endemisch sind, müssen zeigen, ob die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Moskitonetze tatsächlich eine neue, bessere Alternative in der Prävention vektorübertragener Infektionskrankheiten darstellen können.

6. Anhang

6.1. Anhang 1: Übersicht über die Malariagebiete 2011 (DTG)

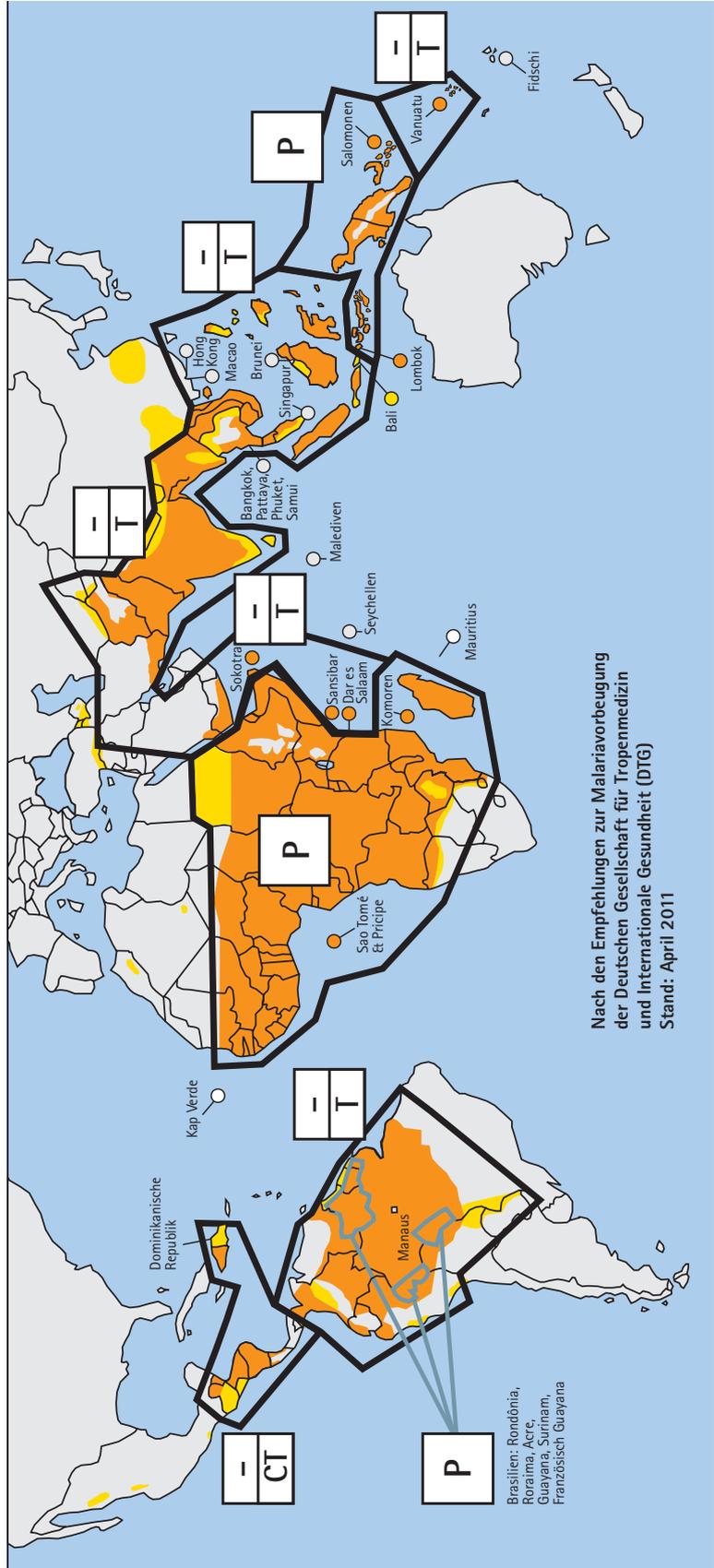
Malaria prophylaxe 2011

Einteilung in Zonen mit unterschiedlicher medikamentöser Chemoprophylaxe gemäß Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit (DTG) Stand: April 2011

-  Gebiete, in denen die Malaria nicht oder nicht mehr vorkommt
-  Gebiete mit sehr beschränktem Malariarisiko; Malariaübertragung selten
-  Gebiete mit Malariaübertragung
- Alle Malaria-gebiete**
-  Mückenschutz empfohlen (minimales Risiko, siehe Länderliste)

-  Mefloquin (Lariam®) oder Atovaquon/Proguanil (Malarone®) oder Doxycyclin* zur Chemoprophylaxe
-  Keine Chemoprophylaxe empfohlen. Zur Notfalltherapie Atovaquon/Proguanil (Malarone®) oder Artemether/Lumefantrin (Riamet®)
-  Keine Chemoprophylaxe empfohlen. Chloroquin zur Notfalltherapie

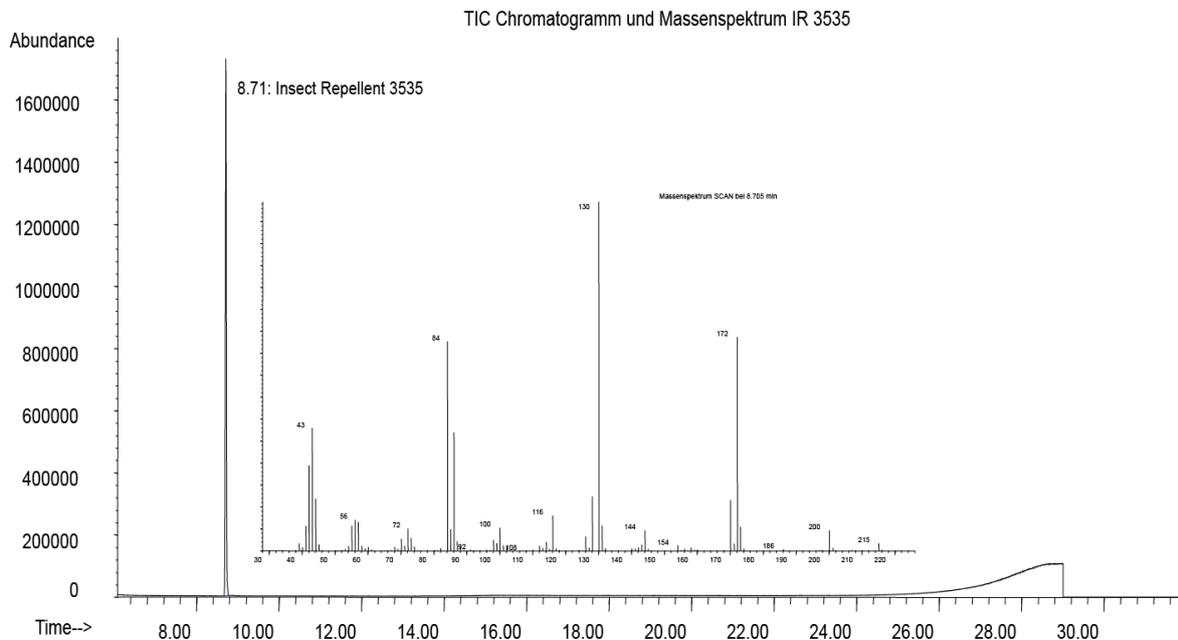
*für diese Indikation in Deutschland nicht zugelassen



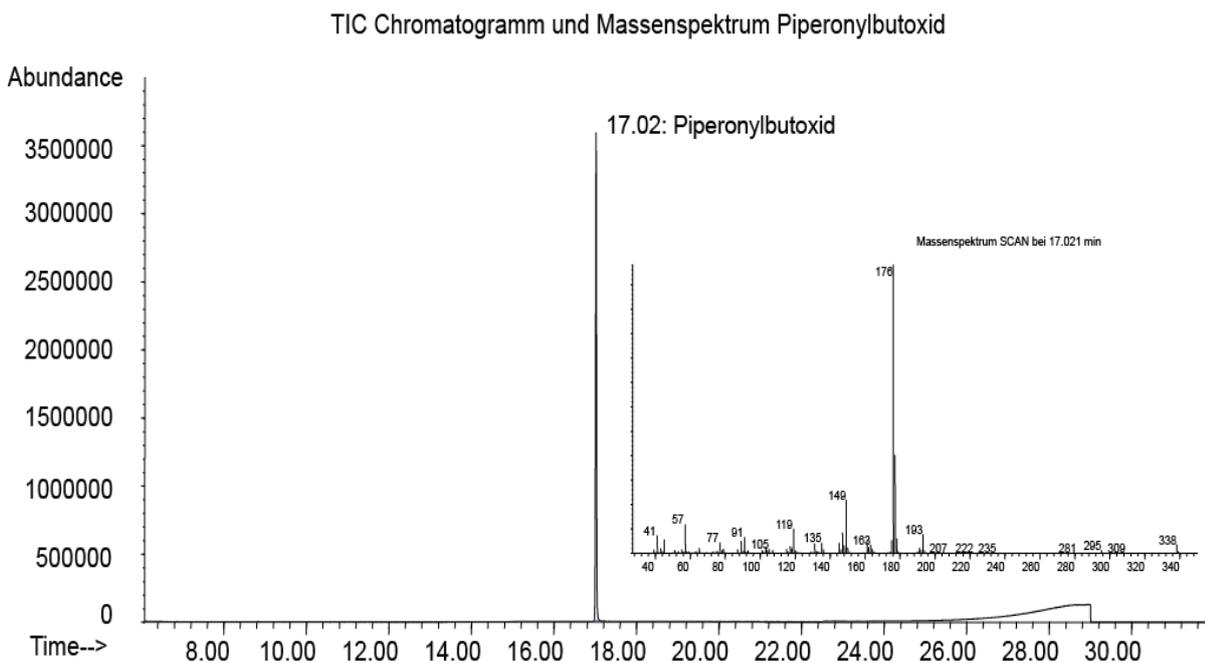
Nach den Empfehlungen zur Malariavorbereitung der Deutschen Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit (DTG) Stand: April 2011

6.2. Anhang 2: Chromatogramme und Massenspektren der Analyten

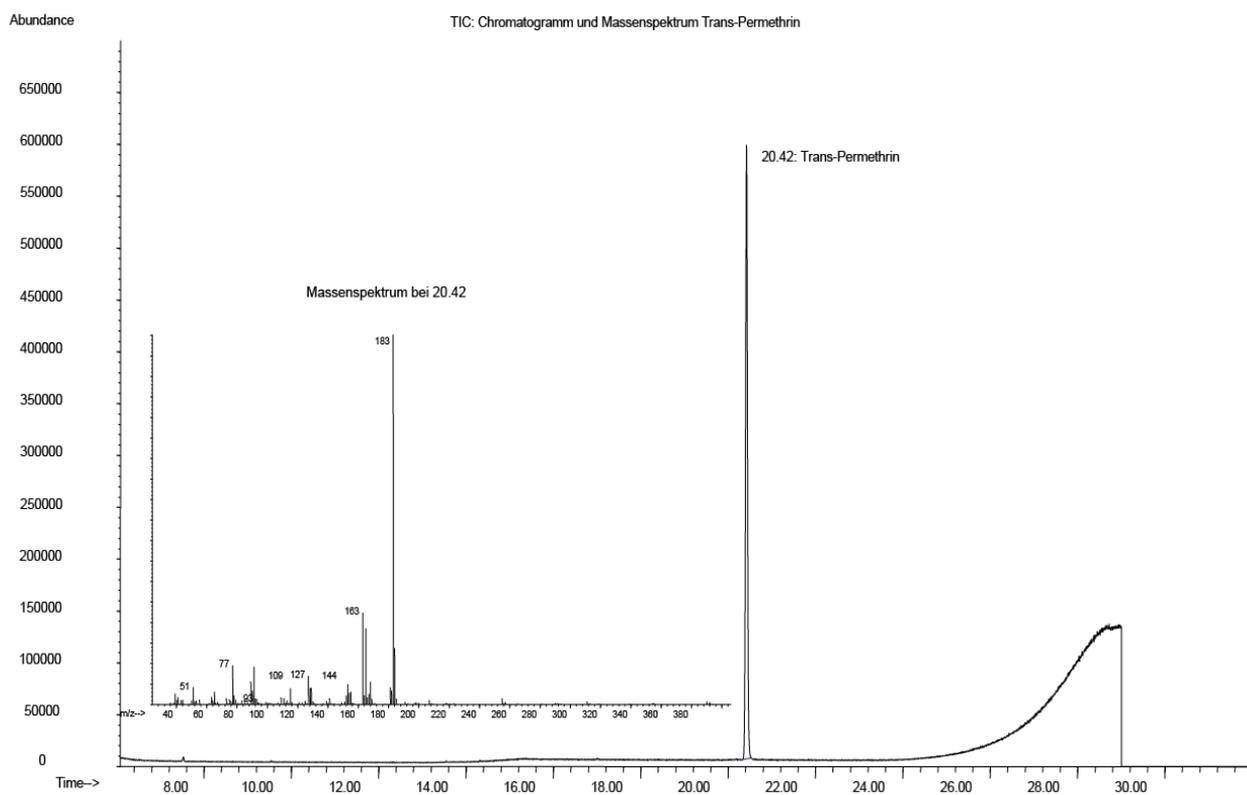
Insect Repellent 3535



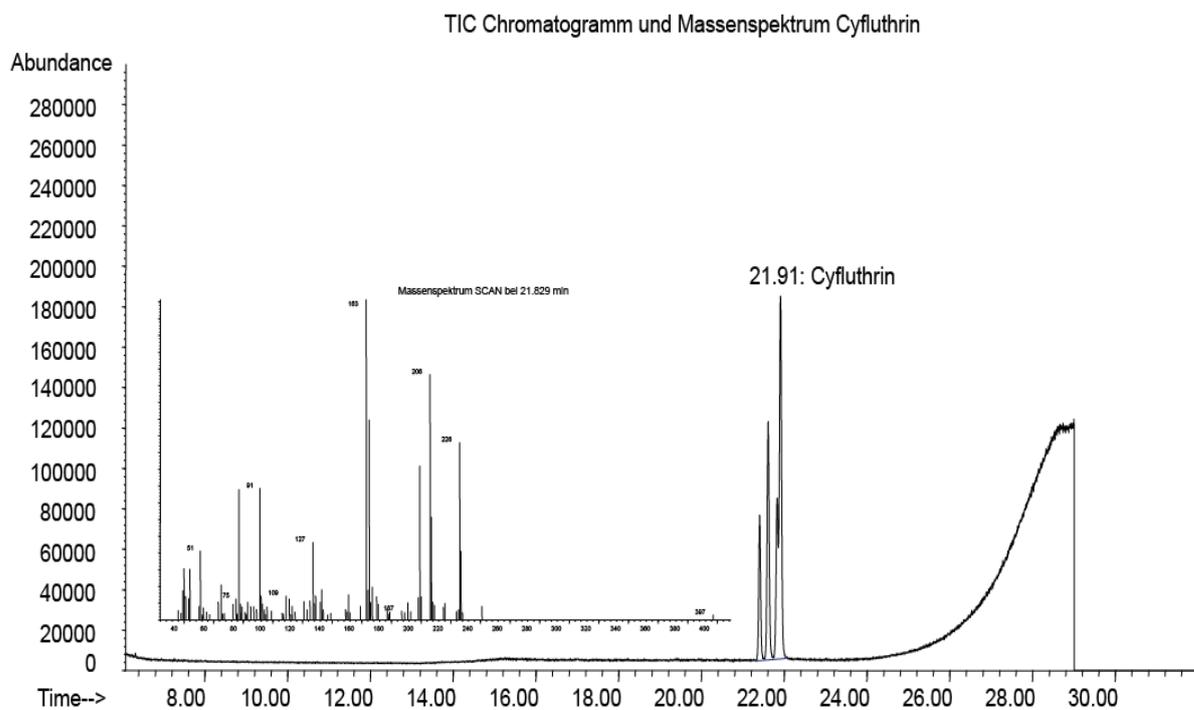
Piperonylbutoxid



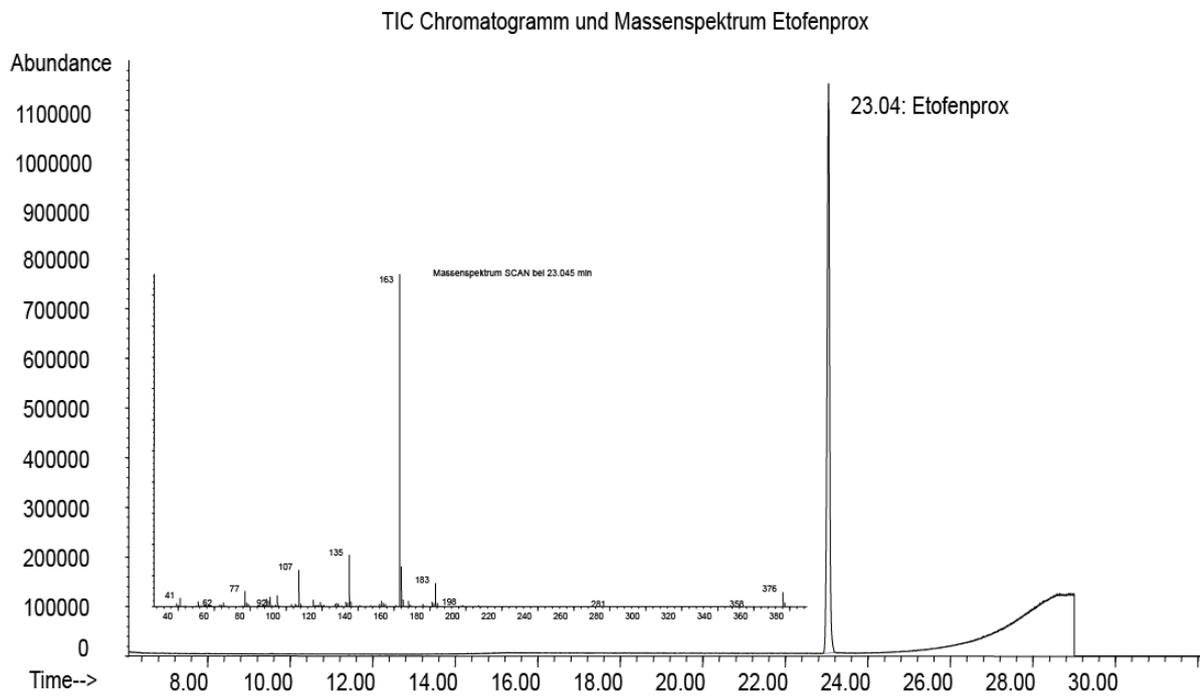
Trans -Permethrin



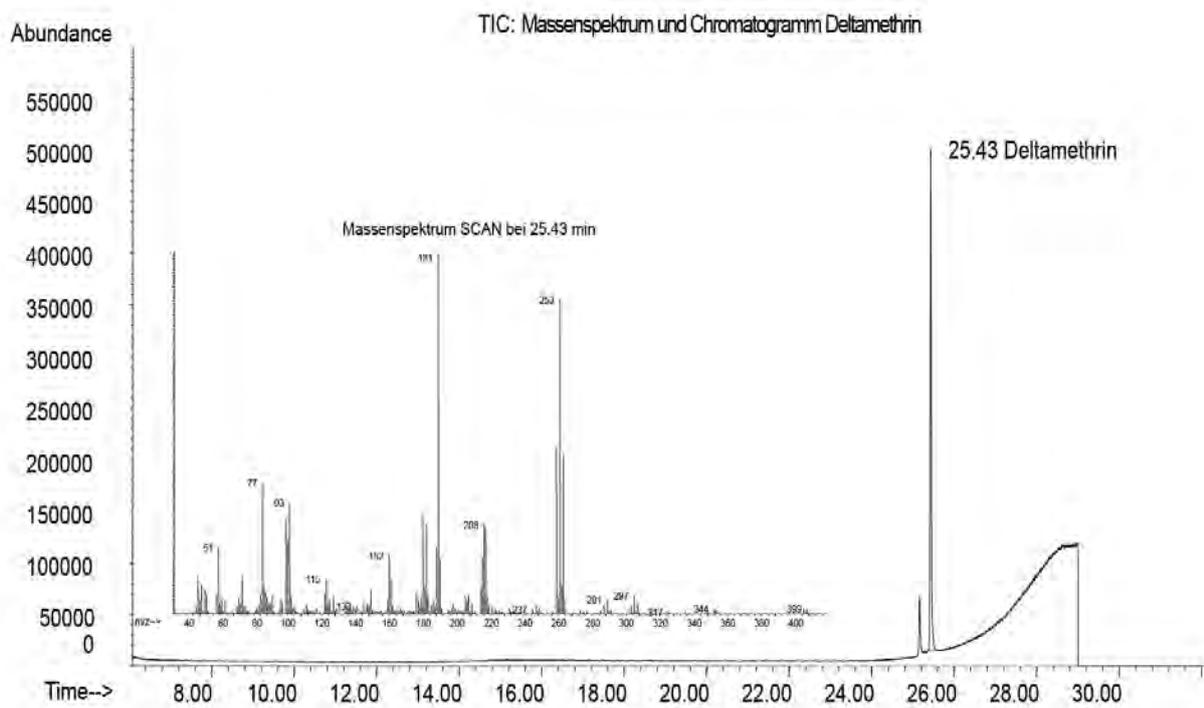
Cyfluthrin



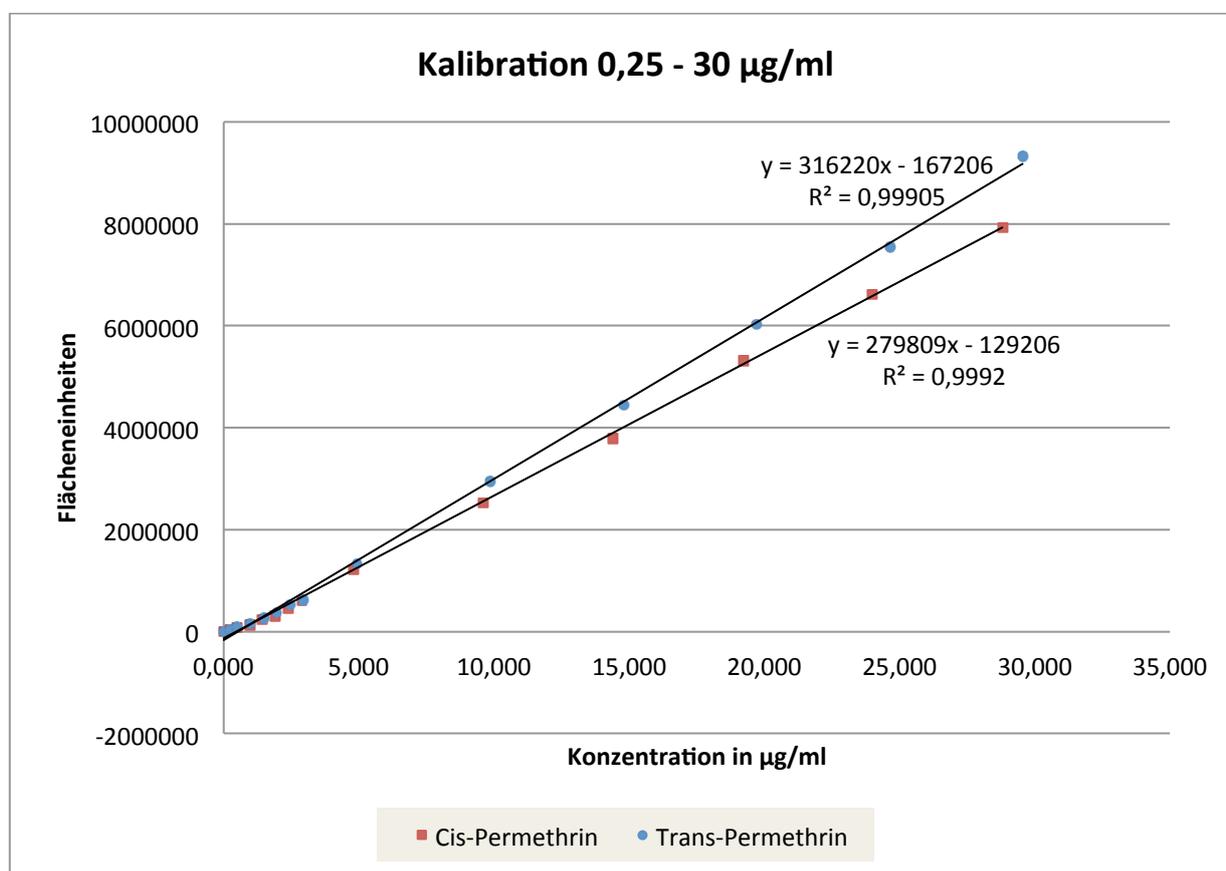
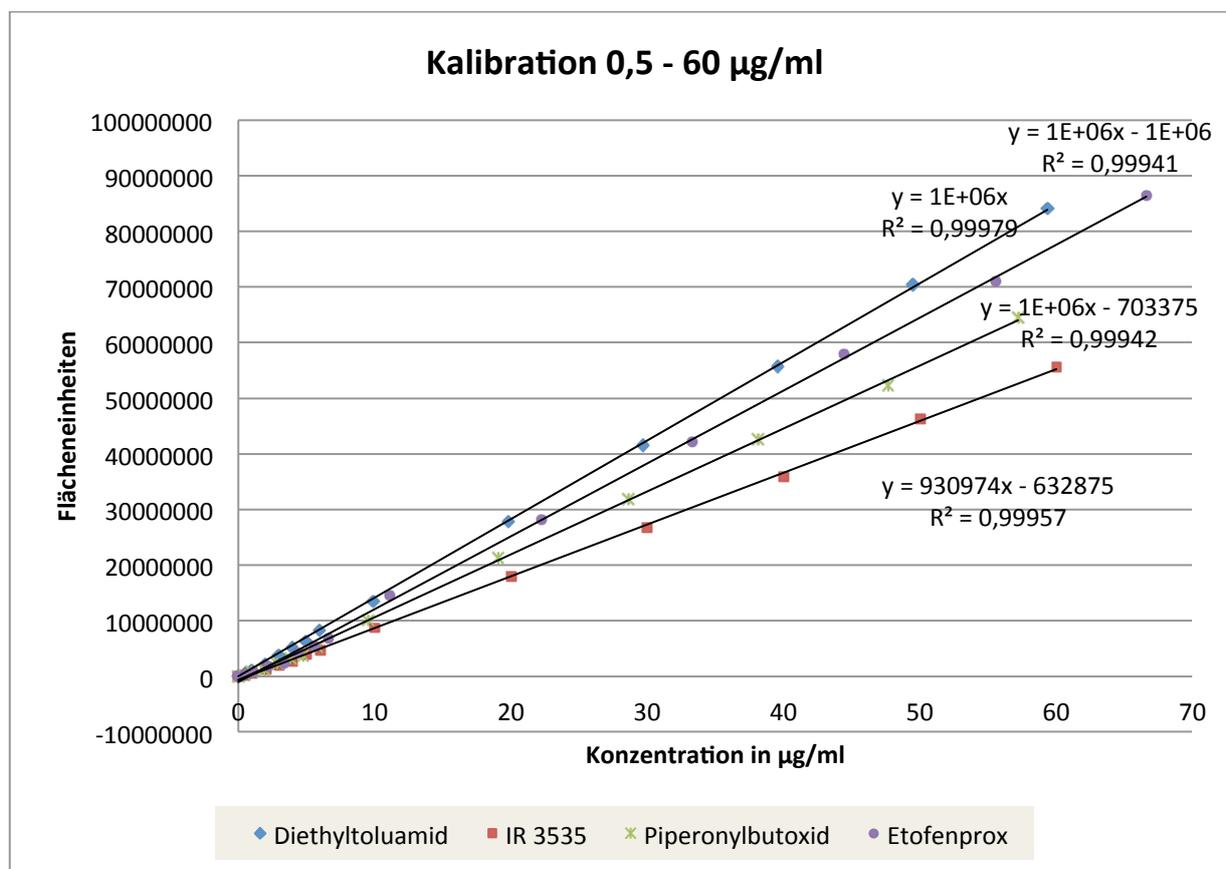
Etofenprox

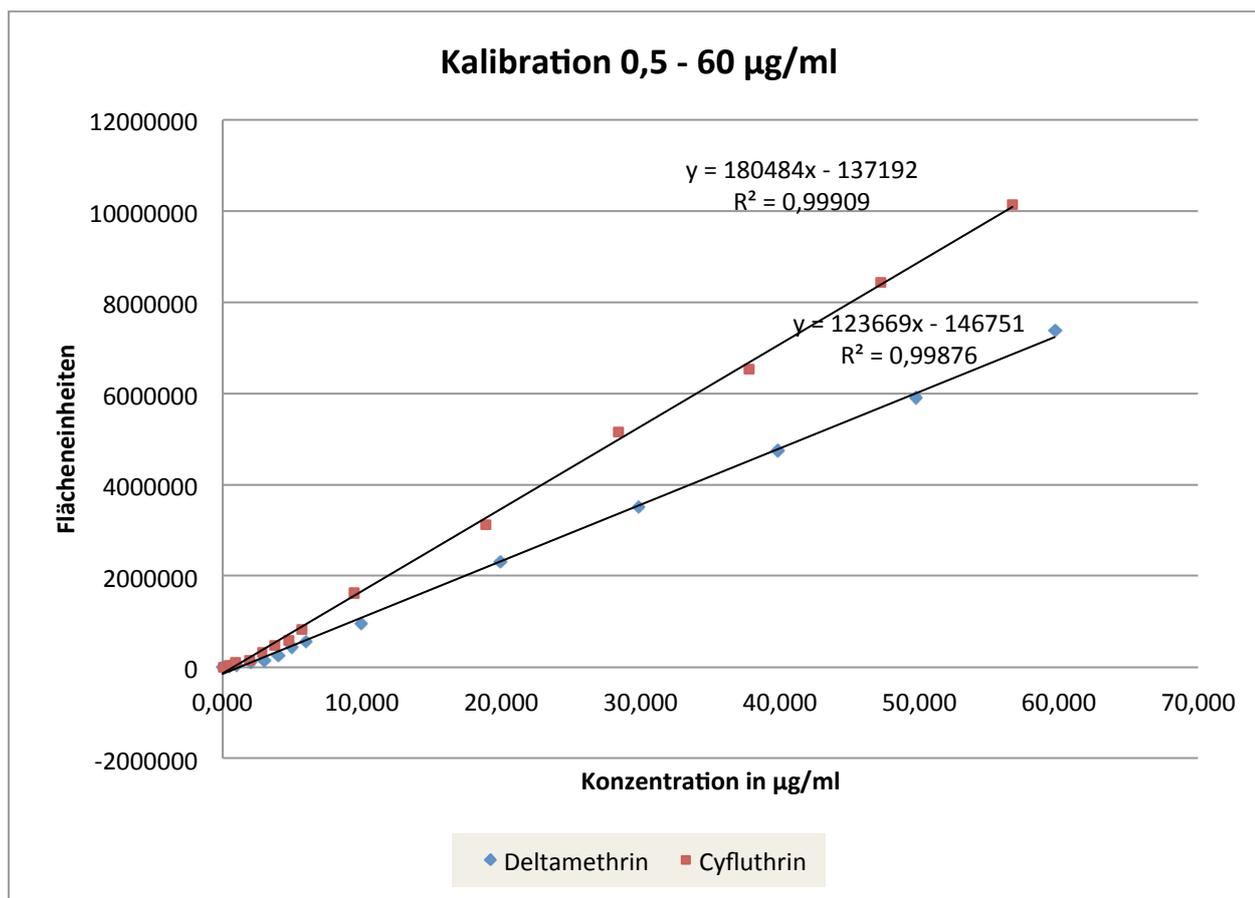


Deltamethrin



6.3. Anhang 3: Kalibriergeraden der Analyten über den Arbeitsbereich





6.4. Anhang 4: Gehalte der Analyten in den einzelnen Proben der Präzisionsversuche in mg pro Quadratmeter Moskitonetz

Analysenserie Tag 1

Analyt/ Tag.Probe	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	1.7	1.8
Diethyltoluamid	9689,4	9367,2	9378,0	9376,8	9895,3	9301,3	9686,2	9285,7
Piperonylbutoxid	3987,7	4041,6	4028,6	4037,6	4068,6	4140,2	4014,0	3862,4
Cis-Permethrin	1633,0	1630,0	1573,1	1614,2	1657,3	1687,1	1644,7	1625,8
Trans- Permethrin	5521,8	5388,3	5295,4	5223,3	5287,1	5390,8	5277,7	5201,0

Analysenserie Tag 2

Analyt/ Tag.Probe	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	1.7	1.8
Diethyltoluamid	9689,4	9367,2	9378,0	9376,8	9895,3	9301,3	9686,2	9285,7
Piperonylbutoxid	3987,7	4041,6	4028,6	4037,6	4068,6	4140,2	4014,0	3862,4
Cis-Permethrin	1633,0	1630,0	1573,1	1614,2	1657,3	1687,1	1644,7	1625,8
Trans- Permethrin	5521,8	5388,3	5295,4	5223,3	5287,1	5390,8	5277,7	5201,0

6.5. Anhang 5: Datenblätter der Berechnung von Wiederhol- und Laborpräzision mit dem Programm SAAD

Validierung von Methoden
Wiederholbarkeit, Vergleichbarkeit

29.11.11

SAAD - Statistische Auswertung von Analysendaten

Analysenparameter:

Diethyltoluamid

Prüfanweisung:

Detrmination of Repellents and Insecticides i

Maßeinheit der Meßwerte:

mg/sqm

Name	Anzahl Meßwerte	Mittelwert	Standard-abweichung	Varianz
Analyst 1	8	9497,488	226,734	51408,378
Analyst 2	8	9534,788	371,736	138187,661

Homogenität der Varianzen (Bartlett-Test; p = 95%):

Die Varianzen sind homogen !

Varianzanalyse (F-Test; p = 99%)

Die Vergleichsvarianz und die mittlere Wiederhol-Varianz unterscheiden sich nicht voneinander !

Mittelwertanalyse (Kruskal-Wallis-Test; p = 99%)

Die Mittelwerte unterscheiden sich nicht voneinander und können zusammengefaßt werden !

Gesamt-Mittelwert 9516,138 mg/sqm

Wiederholbarkeit (p = 95%) 871,337 mg/sqm

Vergleichbarkeit (p = 95%) 818,472 mg/sqm

Die Einzelwerte einer Doppelbestimmung dürfen sich um höchstens 871,34 mg/sqm unterscheiden.

Die Mittelwerte zweier Doppelbestimmungen eines Mitarbeiters dürfen sich um höchstens 616,13 mg/sqm unterscheiden.

Zwei Einzelwerte zweier Mitarbeiter dürfen sich um höchstens 818,47 mg/sqm unterscheiden.

Die Mittelwerte zweier Doppelbestimmungen verschiedener Mitarbeiter dürfen sich um höchstens 538,78 mg/sqm unterscheiden.

Die Mittelwerte unterscheiden sich nicht voneinander und können zusammengefaßt werden !

Validierung von Methoden
Wiederholbarkeit, Vergleichbarkeit

29.11.11

SAAD - Statistische Auswertung von Analysendaten

Analysenparameter:

Piperonylbutoxid

Prüfanweisung:

Determination of Repellents and Insecticides

Maßeinheit der Meßwerte:

mg/sqm

Name	Anzahl Meßwerte	Mittelwert	Standard-abweichung	Varianz
Analyst 1	8	4022,588	78,852	6217,681
Analyst 2	8	4099,300	113,312	12839,629

Homogenität der Varianzen (Bartlett-Test; p = 95%):

Die Varianzen sind homogen !

Varianzanalyse (F-Test; p = 99%)

Die Vergleichsvarianz und die mittlere Wiederhol-Varianz unterscheiden sich nicht voneinander !

Mittelwertanalyse (Kruskal-Wallis-Test; p = 99%)

Die Mittelwerte unterscheiden sich nicht voneinander und können zusammengefaßt werden !

Gesamt-Mittelwert

4060,944 mg/sqm

Wiederholbarkeit (p = 95%)

276,250 mg/sqm

Vergleichbarkeit (p = 95%)

300,566 mg/sqm

Die Einzelwerte einer Doppelbestimmung dürfen sich um höchstens 276,25 mg/sqm unterscheiden.

Die Mittelwerte zweier Doppelbestimmungen eines Mitarbeiters dürfen sich um höchstens 195,34 mg/sqm unterscheiden.

Zwei Einzelwerte zweier Mitarbeiter dürfen sich um höchstens 300,57 mg/sqm unterscheiden.

Die Mittelwerte zweier Doppelbestimmungen verschiedener Mitarbeiter dürfen sich um höchstens 228,44 mg/sqm unterscheiden.

Die Mittelwerte unterscheiden sich nicht voneinander und können zusammengefaßt werden !

SAAD - Statistische Auswertung von Analysendaten

Analysenparameter:

Cis-Permethrin

Prüfanweisung:

Determination of Repellents and Insecticides

Maßeinheit der Meßwerte:

mg/sqm

Name	Anzahl Meßwerte	Mittelwert	Standard-abweichung	Varianz	
Analyst 1	8	1633,150	33,072	1093,757	
Analyst 2	8	1689,638	56,857	3232,726	

Homogenität der Varianzen (Bartlett-Test; p = 95%):

Die Varianzen sind homogen !

Varianzanalyse (F-Test; p = 99%)

Die Vergleichsvarianz und die mittlere Wiederhol-Varianz unterscheiden sich nicht voneinander !

Mittelwertanalyse (Kruskal-Wallis-Test; p = 99%)

Die Mittelwerte unterscheiden sich nicht voneinander und können zusammengefaßt werden !

Gesamt-Mittelwert	1661,394 mg/sqm
--------------------------	------------------------

Wiederholbarkeit (p = 95%)	131,625 mg/sqm
-----------------------------------	-----------------------

Vergleichbarkeit (p = 95%)	167,144 mg/sqm
-----------------------------------	-----------------------

Die Einzelwerte einer Doppelbestimmung dürfen sich um höchstens 131,63 mg/sqm unterscheiden.

Die Mittelwerte zweier Doppelbestimmungen eines Mitarbeiters dürfen sich um höchstens 93,07 mg/sqm unterscheiden.

Zwei Einzelwerte zweier Mitarbeiter dürfen sich um höchstens 167,14 mg/sqm unterscheiden.

Die Mittelwerte zweier Doppelbestimmungen verschiedener Mitarbeiter dürfen sich um höchstens 138,83 mg/sqm unterscheiden.

Die Mittelwerte unterscheiden sich nicht voneinander und können zusammengefaßt werden !

Validierung von Methoden
Wiederholbarkeit, Vergleichbarkeit

29.11.11

SAAD - Statistische Auswertung von Analysendaten

Analysenparameter:

Trans-Permethrin

Prüfanweisung:

Determination of Repellents and Insecticides

Maßeinheit der Meßwerte:

mg/sqm

Name	Anzahl Meßwerte	Mittelwert	Standardabweichung	Varianz
Analyst1	8	5323,175	105,091	11044,125
Analyst 2	8	5298,275	149,719	22415,885

Homogenität der Varianzen (Bartlett-Test; p = 95%):

Die Varianzen sind homogen !

Varianzanalyse (F-Test; p = 99%)

Die Vergleichsvarianz und die mittlere Wiederhol-Varianz unterscheiden sich nicht voneinander !

Mittelwertanalyse (Kruskal-Wallis-Test; p = 99%)

Die Mittelwerte unterscheiden sich nicht voneinander und können zusammengefaßt werden !

Gesamt-Mittelwert

5310,725 mg/sqm

Wiederholbarkeit (p = 95%)

366,045 mg/sqm

Vergleichbarkeit (p = 95%)

346,010 mg/sqm

Die Einzelwerte einer Doppelbestimmung dürfen sich um höchstens 366,04 mg/sqm unterscheiden.

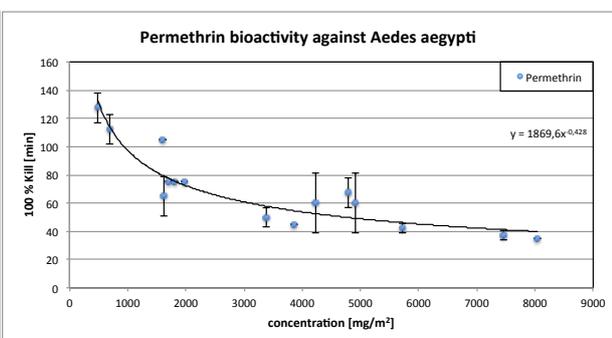
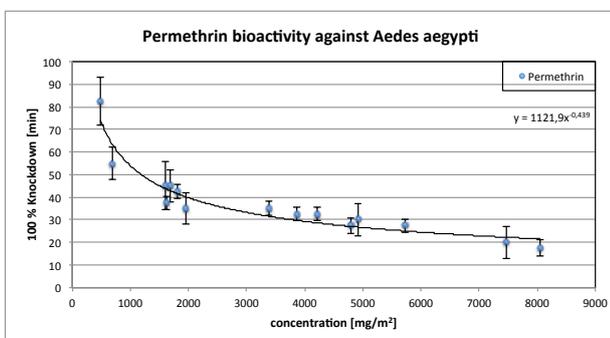
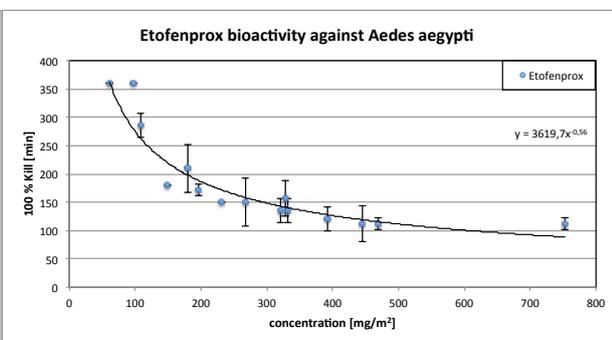
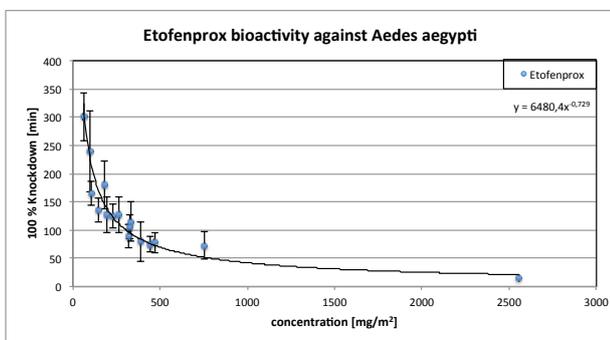
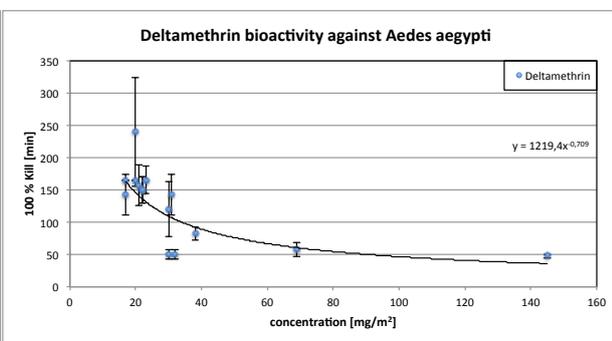
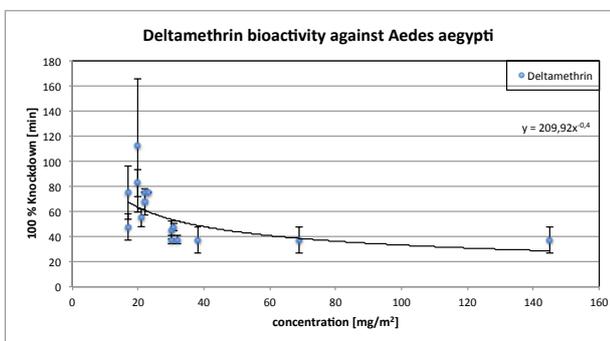
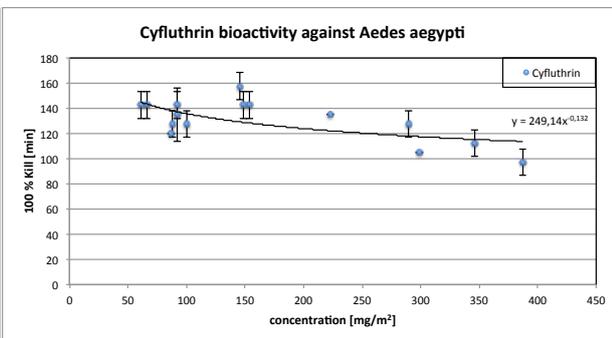
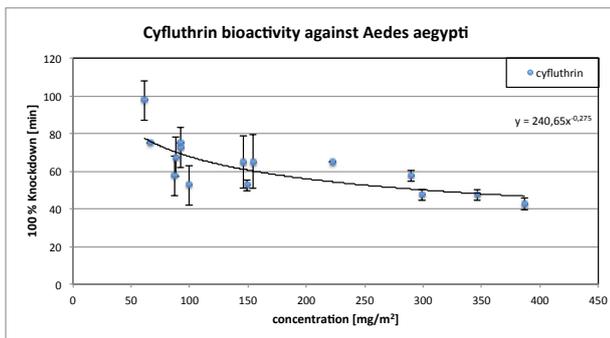
Die Mittelwerte zweier Doppelbestimmungen eines Mitarbeiters dürfen sich um höchstens 258,83 mg/sqm unterscheiden.

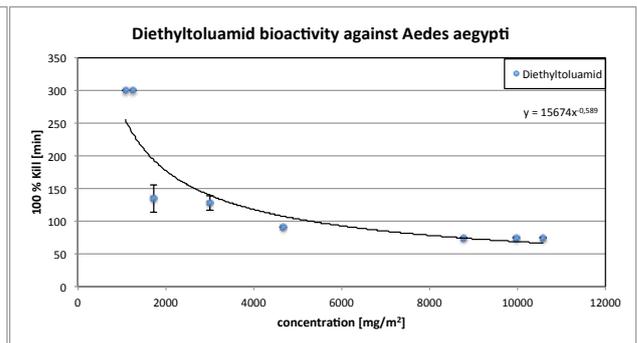
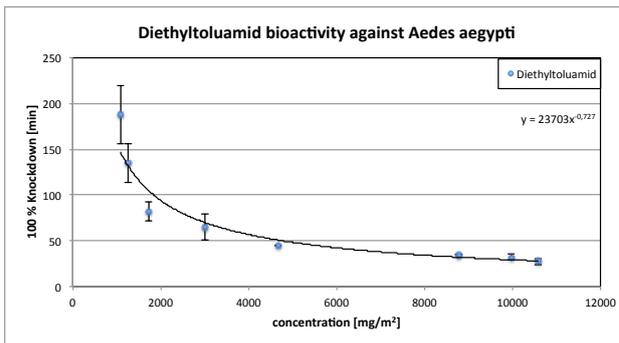
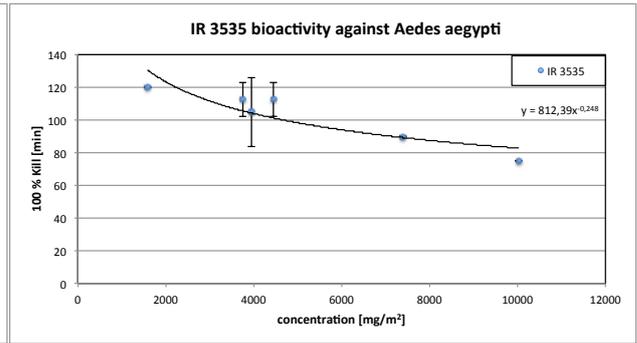
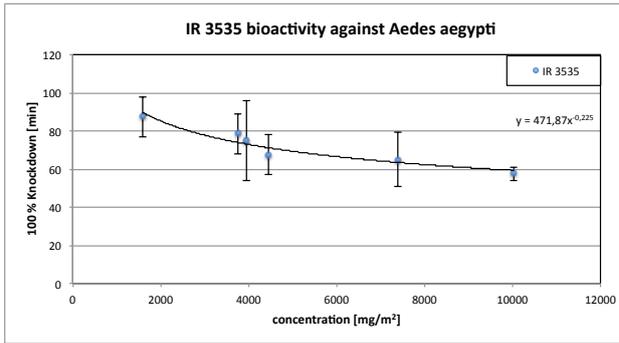
Zwei Einzelwerte zweier Mitarbeiter dürfen sich um höchstens 346,01 mg/sqm unterscheiden.

Die Mittelwerte zweier Doppelbestimmungen verschiedener Mitarbeiter dürfen sich um höchstens 229,63 mg/sqm unterscheiden.

Die Mittelwerte unterscheiden sich nicht voneinander und können zusammengefaßt werden !

6.6. Anhang 6: Knockdown- und Kill-Aktivitäten einzelner Insektizide und Repellentien





7. Literaturverzeichnis

ABU-QARE, A. W. and ABOU-DONIA, M. B. (2001). "Simultaneous determination of malathion, permethrin, DEET (N,N-diethyl-m-toluamide), and their metabolites in rat plasma and urine using high performance liquid chromatography." *J Pharm Biomed Anal* **26**(2): 291-299.

AGRAR, I. (2000). *Wirkstoffe in Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmitteln*. München Wien Zürich, BLV Verlagsgesellschaft mbH.

AKHTAR, M. H. (1982). "Gas chromatographic determination of deltamethrin in biological samples." *J Chromatogr* **246**(1): 81-87.

ALONSO, P. L., LINDSAY, S. W., ARMSTRONG, J. R., CONTEH, M., HILL, A. G., DAVID, P. H., FEGAN, G., DE FRANCISCO, A., HALL, A. J., SHENTON, F. C. and ET AL. (1991). "The effect of insecticide-treated bed nets on mortality of Gambian children." *Lancet* **337**(8756): 1499-1502.

ALTENKÄMPER, M., SCHLITZER, MARTIN (2008). "Erfolgreich gegen den Insektenangriff." *Pharmazeutische Zeitung* **11/2008**(153): 18-25.

ANTWI, F. B., SHAMA, L. M. and PETERSON, R. K. (2008). "Risk assessments for the insect repellents DEET and picaridin." *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP* **51**(1): 31-36.

ANYANWU, E. C., EHIRI, J. E., KANU, I. and MERRICK, J. (2006). "Health effects of long-term exposure to insecticide-treated mosquito nets in the control of malaria in endemic regions, revised." *ScientificWorldJournal* **6**: 1631-1641.

APPEL, K. E., GUNDERT-REMY, U., FISCHER, H., FAULDE, M., MROSS, K. G., LETZEL, S. and ROSSBACH, B. (2008). "Risk assessment of Bundeswehr (German Federal Armed Forces) permethrin-impregnated battle dress uniforms (BDU)." *Int J Hyg Environ Health* **211**(1-2): 88-104.

ATIEMI, F. K., MUNGA, S. O., OFULLA, A. V. and VULULE, J. M. (2010). "Wash durability and optimal drying regimen of four brands of long-lasting insecticide-treated nets after repeated washing under tropical conditions." *Malar J* **9**: 248.

BADOLO, A., ILBOUDO-SANOGO, E., OUEDRAOGO, A. P. and COSTANTINI, C. (2004). "Evaluation of the sensitivity of *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* complex mosquitoes to two insect repellents: DEET and KBR 3023." *Tropical medicine & international health : TM & IH* **9**(3): 330-334.

BARNARD, D. R., BERNIER, U. R., POSEY, K. H. and XUE, R. D. (2002). "Repellency of IR3535, KBR3023, para-menthane-3,8-diol, and deet to black salt marsh mosquitoes (Diptera : Culicidae) in the Everglades National Park." *Journal of Medical Entomology* **39**(6): 895-899.

BEIER, J. C., KEATING, J., GITHURE, J. I., MACDONALD, M. B., IMPOINVIL, D. E. and NOVAK, R. J. (2008). "Integrated vector management for malaria control." *Malar J* **7 Suppl 1**: S4.

BERNHARD-NOCHT-INSTITUT (2009). *Zecken - kleine Blutsauger als große Gefahr*. B.-N.-I. f. Tropenmedizin. Hamburg.

- BISCEGLIA, K. J., YU, J. T., COELHAN, M., BOUWER, E. J. and ROBERTS, A. L. (2010). "Trace determination of pharmaceuticals and other wastewater-derived micropollutants by solid phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry." Journal of Chromatography A **1217**(4): 558-564.
- BOECKEN, G., WEITZEL, T., SUNDERKÖTTER, C., FISCHER, M., VON STEBUT-BORSCHITZ, E., BOGDAN, C., PIETRAS, M., ANDERS, G., HARMS-ZWINGENBERGER, G., BURCHARD, G., BIALEK, R., LIPPERT, U., GROBUSCH, M., ERKENS, K., FLEISCHER, B., LÖBERMANN, M., SCHUNK, M. and STERZIK, B. (2009). "S1-Leitlinie Diagnostik und Therapie der kutanen und mukokutanen Leishmaniasis in Deutschland." JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft **7**: s1-s38.
- BONNET, J., PENNETIER, C., DUCHON, S., LAPIED, B. and CORBEL, V. (2009). "Multi-function oxidases are responsible for the synergistic interactions occurring between repellents and insecticides in mosquitoes." Parasites & Vectors **2**.
- BRIASSOULIS, G., NARLIOGLOU, M. and HATZIS, T. (2001). "Toxic encephalopathy associated with use of DEET insect repellents: a case analysis of its toxicity in children." Human & Experimental Toxicology **20**(1): 8-14.
- BROWN, M. and HEBERT, A. A. (1997). "Insect repellents: an overview." Journal of the American Academy of Dermatology **36**(2 Pt 1): 243-249.
- BVL (1983). "Planung und statistische Auswertung von Ringversuchen." Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB: 1-17.
- CARROLL, S. P. and LOYE, J. (2006). "PMD, a registered botanical mosquito repellent with deet-like efficacy." Journal of the American Mosquito Control Association **22**(3): 507-514.
- CDC. (2010). "Centers for Disease Control and Prevention." Parasites-Leishmaniasis, from Centers for Disease Control and Prevention.
- CDC. (2011). "Centers for Disease Control and Prevention." Yellow Fever Symptoms, from http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/yellowfever/YF_Symptoms.html.
- CDC. (2011). "Centers for Disease Control and Prevention." from dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary.
- CHERSTNIAKOVA, S. A., GARCIA, G. E., STRONG, J., BI, D., WEITZ, J., ROY, M. J. and CANTILENA, L. R. (2006). "Rapid determination of N,N-diethyl-m-toluamide and permethrin in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry and pyridostigmine bromide by high-performance liquid chromatography." Journal of analytical toxicology **30**(1): 21-26.
- CIPAC (2009). LN-Methods, Collaborative International Pesticides Analytical Council
- CoE (2011). Europäisches Arzneibuch, 7. Ausgabe, amtliche deutsche Ausgabe. Chromatographische Trennmethode, Deutscher Apotheker Verlag.
- COMMISSION, E. (2009). Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. SANCO. Brussels, European Commission.

CORBEL, V., STANKIEWICZ, M., PENNETIER, C., FOURNIER, D., STOJAN, J., GIRARD, E., DIMITROV, M., MOLGO, J., HOUGARD, J. M. and LAPIED, B. (2009). "Evidence for inhibition of cholinesterases in insect and mammalian nervous systems by the insect repellent deet." BMC biology **7**: 47.

COURTENAY, O., GILLINGWATER, K., GOMES, P. A., GARCEZ, L. M. and DAVIES, C. R. (2007). "Deltamethrin-impregnated bednets reduce human landing rates of sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* in Amazon households." Med Vet Entomol **21**(2): 168-176.

COX-SINGH, J., DAVIS, T. M., LEE, K. S., SHAMSUL, S. S., MATUSOP, A., RATNAM, S., RAHMAN, H. A., CONWAY, D. J. and SINGH, B. (2008). "Plasmodium knowlesi malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening." Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America **46**(2): 165-171.

CURTIS, C., LINES, J., CARNEVALE, P., ROBERT, V., BOUDIN, C. and HALNA, J.-M. (1991). Impregnated bed nets and curtains against malaria mosquitoes. Control of disease vectors in the community. C. CF. London, Wolfe.

D'ALESSANDRO, U., OLALEYE, B. O., MCGUIRE, W., THOMSON, M. C., LANGEROCK, P., BENNETT, S. and GREENWOOD, B. M. (1995). "A comparison of the efficacy of insecticide-treated and untreated bed nets in preventing malaria in Gambian children." Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene **89**(6): 596-598.

DAVIS, E. E. (1984). "Regulation of Sensitivity in the Peripheral Chemoreceptor Systems for Host-Seeking Behavior by a Hemolymph-Borne Factor in *Aedes-Aegypti*." Journal of Insect Physiology **30**(2): 179-183.

DAVIS, E. E. (1985). "Insect repellents: concepts of their mode of action relative to potential sensory mechanisms in mosquitoes (Diptera: Culicidae)." Journal of medical entomology **22**(3): 237-243.

DAVIS, E. E. and SOKOLOVE, P. G. (1976). "Lactic acid-sensitive receptors on the antennae of the mosquito, *Aedes aegypti*." Journal of Comparative Physiology **105**: 43-54.

DELORENZO, M. E. and DE LEON, R. G. (2010). "Toxicity of the insecticide etofenprox to three life stages of the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*." Arch Environ Contam Toxicol **58**(4): 985-990.

DESJEUX, P. (2001). "The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide." Trans R Soc Trop Med Hyg **95**(3): 239-243.

DIN (1997). Textile Flächengebilde - Bestimmung der flächenbezogenen Masse unter Verwendung kleiner Proben. DIN EN 12127. D. I. f. N. e.V. Berlin, Deutsches Institut für Normung e.V.: 1-5.

DIN (1999). DIN V ENV 13005 Leiffaden zur Angabe der Unsicherheit beim Messen. 13005:1999-06. D. I. f. Normung. Berlin, Deutsches Institut für Normung e.V.: 1-106.

DIN (2008). DIN 32645
Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung. Berlin, Deutsches Institut für Normung: 1-28.

- DIN (2011). Textilien - Nichtgewerbliche Wasch- und Trocknungsverfahren zur Prüfung von Textilien. DIN EN ISO 6330. D. I. f. Normung. Berlin, Deutsches Institut für Normung e.V.: 2-31.
- DRAPEAU, J., ROSSANO, M., TOURAUD, D., OBERMAYR, U., GEIER, M., ROSE, A. and KUNZ, W. (2011). "Green synthesis of para-Menthane-3,8-diol from Eucalyptus citriodora: Application for repellent products." Comptes Rendus Chimie **14**(7-8): 629-635.
- DU, J., YAN, H., SHE, D., LIU, B. and YANG, G. (2010). "Simultaneous determination of cypermethrin and permethrin in pear juice by ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography." Talanta **82**(2): 698-703.
- ELNAIEM, D. E., KELLEY, K., WRIGHT, S., LAFFEY, R., YOSHIMURA, G., REED, M., GOODMAN, G., THIEMANN, T., REIMER, L., REISEN, W. K. and BROWN, D. (2008). "Impact of aerial spraying of pyrethrin insecticide on Culex pipiens and Culex tarsalis (Diptera: Culicidae) abundance and West Nile virus infection rates in an urban/suburban area of Sacramento County, California." J Med Entomol **45**(4): 751-757.
- ENAYATI, A. A. and HEMINGWAY, J. (2006). "Pyrethroid insecticide resistance and treated bednets efficacy in malaria control." Pesticide Biochemistry and Physiology **84**(2): 116-126.
- EPA (2005). "<http://www.epa.gov/opprd001/factsheets/picaridin>."
- EPA. (2011). "http://www.epa.gov/pesticides/health/mosquitoes/ai_insectrp.htm."
- EPA (2011). "http://www.epa.gov/oppbopd1/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet_011550.htm."
- FAUCI, A. S. (2001). "Infectious diseases: considerations for the 21st century." Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America **32**(5): 675-685.
- FAULDE, M. (2001). Repellentien. Therapeutische Verfahren in der Dermatologie, Dermatika und Kosmetika. H. C. Korting and W. Sterry. Berlin, Blackwell Wissenschafts-Verlag: 727-741.
- FAULDE, M. (2010). Insektizide, Akarizide und Repellentien. Krank durch Arthropoden. - Denisia 30. A. C. H. Linz, Land Oberösterreich, Biologiezentrum/Oberösterreichische Landesmuseen: 110-122.
- FAULDE, M., ALBIEZ, G. and NEHRING, O. (2011). "Novel long-lasting impregnation technique transferred from clothing to bednets: extended efficacy and residual activity of different pyrethroids against Aedes aegypti as shown by EN ISO 6330-standardized machine laundering." Parasitology Research: 1-10.
- FAULDE, M. and HOFFMANN, G. (2001). "Vorkommen und Verhütung vektorassoziierter Erkrankungen des Menschen in Deutschland unter Berücksichtigung zoonotischer Aspekte." Bundesgesundheitsbl.-Gesundheitsforsch.-Gesundheitsschutz **44**(2001): 116-136.
- FAULDE, M., MROSS, K.G. (2008). "Bekleidungsimpregnierung mit Akariziden: Effektive und anwendersichere Methode zur Prävention vor Zeckenbefall und zeckenübertragenen Infektionserkrankungen." Hyg Med **4**(33): 135-141.

FAULDE, M., SCHRADER, J., HEYL, G., AMIRIH, M. and HOERAUF, A. (2008). "Zoonotic cutaneous leishmaniasis outbreak in Mazar-e Sharif, northern Afghanistan: an epidemiological evaluation." Int J Med Microbiol **298**(5-6): 543-550.

FAULDE, M., SCHRADER, J., HEYL, G. and HOERAUF, A. (2009). "High efficacy of integrated preventive measures against zoonotic cutaneous leishmaniasis in northern Afghanistan, as revealed by Quantified Infection Rates." Acta Trop **110**(1): 28-34.

FAULDE, M. and UEDELHOVEN, W. (2006). "A new clothing impregnation method for personal protection against ticks and biting insects." Int J Med Microbiol **296 Suppl 40**: 225-229.

FAULDE, M. K., ALBIEZ, G. and NEHRING, O. (2010). "Insecticidal, acaricidal and repellent effects of DEET- and IR3535-impregnated bed nets using a novel long-lasting polymer-coating technique." Parasitol Res **106**(4): 957-965.

FAULDE, M. K., HEYL, G. and AMIRIH, M. L. (2006). "Zoonotic cutaneous leishmaniasis, Afghanistan." Emerg Infect Dis **12**(10): 1623-1624.

FAULDE, M. K. and NEHRING, O. (2012). "Synergistic insecticidal and repellent effects of combined pyrethroid and repellent-impregnated bed nets using a novel long-lasting polymer-coating multi-layer technique." Parasitology Research **accepted**.

FAULDE, M. K., UEDELHOVEN, W. M. and ROBBINS, R. G. (2003). "Contact toxicity and residual activity of different permethrin-based fabric impregnation methods for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae), and *Lepisma saccharina* (Thysanura: Lepismatidae)." J Med Entomol **40**(6): 935-941.

FRADIN, M. S. (1998). "Mosquitoes and mosquito repellents: a clinician's guide." Annals of internal medicine **128**(11): 931-940.

FRADIN, M. S. and DAY, J. F. (2002). "Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites." The New England journal of medicine **347**(1): 13-18.

FRIMMEL, S., HEMMER, C. J., LÖBERMANN, M. and REISINGER, E. C. (2009). "Klimawandel und Globale Erwärmung. Wegbereiter für die globale Ausbreitung tropischer Infektionskrankheiten?" Pharmazie in unserer Zeit **38**(6): 492-499.

FULOP, B. and POGGENSEE, G. (2008). "Epidemiological situation of Lyme borreliosis in Germany: surveillance data from six Eastern German States, 2002 to 2006." Parasitology Research **103 Suppl 1**: S117-120.

GELL, P. G. H. (1983). "The Restless Tide - the Persistent Challenge of the Microbial World - Krause, Rm." Immunology Today **4**(7): 200-200.

GEY, M. H. (2008). *Präanalytische Methoden Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*, Springer Berlin Heidelberg: 57-90.

GIBBONS, R. V. (2010). "Dengue conundrums." International Journal of Antimicrobial Agents **36**(Supplement 1): S36-S39.

- GRIFFIN, B. A. and LAGAKOS, S. W. (2008). "Design and Analysis of Arm-in-Cage Experiments: Inference for Three-State Progressive Disease Models with Common Periodic Observation Times." Biometrics **64**(2): 337-344.
- GU, W. and NOVAK, R. J. (2009). "Predicting the impact of insecticide-treated bed nets on malaria transmission: the devil is in the detail." Malar J **8**: 256.
- GUZMAN, M. G., HALSTEAD, S. B., ARTSOB, H., BUCHY, P., FARRAR, J., GUBLER, D. J., HUNSPERGER, E., KROEGER, A., MARGOLIS, H. S., MARTINEZ, E., NATHAN, M. B., PELEGRINO, J. L., SIMMONS, C., YOKSAN, S. and PEELING, R. W. (2010). "Dengue: a continuing global threat." Nature reviews. Microbiology **8**(12 Suppl): S7-16.
- HANCOCK, P. A. (2009). "Combining Fungal Biopesticides and Insecticide-Treated Bednets to Enhance Malaria Control." PLoS Comput Biol **5**(10): e1000525.
- HARDT, J. and ANGERER, J. (2003). "Biological monitoring of workers after the application of insecticidal pyrethroids." International Archives of Occupational and Environmental Health **76**(7): 492-498.
- HEICK, H., SHIPMAN, R., NORMAN, M. and JAMES, W. (1980). "Reyeliike syndrome associated with use of an insect repellent in a presumed heterozygote for ornithine carbamyl transferase deficiency." J Pediatr(97): 471-473.
- HELLENBRAND, W., Gesundheitsberichterstattung des Bundes "Neue und vermehrt auftretende Infektionskrankheiten" 2003
- HEMMER, C., FRIMMEL, S., KINZELBACH, R., GÜRTLER, L. and REISINGER, E. (2007). "Globale Erwärmung: Wegbereiter für tropische Infektionskrankheiten in Deutschland?" DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift **132**(48): 2583-2589.
- HEMPELMANN, E., TESAROWICZ, I. and OLEKSYN, B. J. (2009). "Kurzgefasste Geschichte der Malaria-Chemotherapie. Von Zwiebeln bis zum Artemisinin." Pharmazie in unserer Zeit **38**(6): 500-507.
- HEUDORF, U., ANGERER, J., DREXLER, H. (2003). " Abschätzung der Exposition gegenüber Organophosphaten und Pyrethroiden in einer Großstadtbevölkerung in Deutschland." Umweltmedizin Forschung und Praxis(8): 79-85.
- HILL, A. R. and REYNOLDS, S. L. (1999). "Guidelines for in-house validation of analytical methods for pesticide residues in food and animal feeds." Analyst **124**(6): 953-958.
- HOFFMANN, G. (1995). "Wirkung, Einsatzgebiete und Erfordernis der Anwendung von Pyrethroiden im nicht-agrarischen Bereich." Bundesgesundheitsbl.-Gesundheitsforsch.-Gesundheitsschutz(38): 294-303.
- HOLZGRABE, U. (2009). "Neue Hoffnung auf eine Malaria-Impfung." Pharmazie in unserer Zeit **38**(6): 486-487.

HOOGERBUGGE, R. and VAN ZONEN, P. (2000). Validation of analytical data in a research and development environment. Principles and Practices of Method Validation. A. Fajgelj and A. Ambrus, The Royal Society of Chemistry: 19-28.

HOSSAIN, M. I. and CURTIS, C. F. (1989). "Permethrin-impregnated bednets: behavioural and killing effects on mosquitoes." Med Vet Entomol **3**(4): 367-376.

HUY, R., BUCHY, P., CONAN, A., NGAN, C., ONG, S., ALI, R., DUONG, V., YIT, S., UNG, S., TE, V., CHROEUNG, N., PHEAKTRA, N. C., UOK, V. and VONG, S. (2010). "National dengue surveillance in Cambodia 1980–2008: epidemiological and virological trends and the impact of vector control." Bulletin of the World Health Organization **88**(9): 650-657.

ICH (2005). "ICH Harmonised Tripartite Guideline - Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)." International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of Pharmaceuticals for human use(4): 1-13.

ISO (1993). International vocabulary of basic and general terms in metrology. I. O. f. Standardisation. Geneva, International Organisation for Standardisation: 1-116.

JCGM (2008). Evaluation of measurement data - Guide to the expression of uncertainty in measurement, BIPM. **1**: 1-116.

JRC (2009). Guidelines for performance criteria and validation procedures of analytical methods used in controls of food contact materials. I. f. h. a. c. protection. Ispra, European Commission - Joint Research Centre: 1-64.

KADALA, A., CHARRETON, M., JAKOB, I., LE CONTE, Y. and COLLET, C. (2011). "A use-dependent sodium current modification induced by type I pyrethroid insecticides in honeybee antennal olfactory receptor neurons." NeuroToxicology **32**(3): 320-330.

KATZ, T. M., MILLER, J. H. and HEBERT, A. A. (2008). "Insect repellents: historical perspectives and new developments." Journal of the American Academy of Dermatology **58**(5): 865-871.

KAUFMANN, S., (2009) "Infektionskrankheiten." <http://www.berlin-institut.org>

KEISER, J., SINGER, B. H. and UTZINGER, J. R. (2005). "Reducing the burden of malaria in different eco-epidemiological settings with environmental management: a systematic review." The Lancet infectious diseases **5**(11): 695-708.

KISZEWSKI, A., MELLINGER, A., SPIELMAN, A., MALANEY, P., SACHS, S. E. and SACHS, J. (2004). "A global index representing the stability of malaria transmission." American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **70**(5): 486-498.

KLAASSEN, C. D. (2008). Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 7th Edition. New York, McGrawHill.

KROEGER, A., SKOVMAND, O., PHAN, Q. C. and BOEWONO, D. T. (2004). "Combined field and laboratory evaluation of a long-term impregnated bednet, PermaNet." Trans R Soc Trop Med Hyg **98**(3): 152-155.

- KROMIDAS, S. (2000). Handbuch Validierung in der Analytik. Weinheim, Verlag Wiley VCH.
- KUNZ, C. (1994). Frühsommer-Meningoencephalitis (FSME) in Europa. Durch Zecken übertragbare Erkrankungen: FSME und Lyme-Borreliose. 2. Potsdamer Symposium 1993. J. H. Süss. Schriesheim, Weller Verlag: 23-30.
- LENG, G. and GRIES, W. (2005). Determination of Pyrethroids in Blood Plasma and Pyrethroid/Pyrethrin Metabolites in Urine by Gas Chromatography-Mass Spectrometry and High-Resolution GC-MS. **19**: 17-33.
- LENGELER, C. (2004). "Insecticide-treated bed nets and curtains for preventing malaria." Cochrane database of systematic reviews(2): CD000363.
- LICCIARDI, S., HERVE, J. P., DARRIET, F., HOUGARD, J. M. and CORBEL, V. (2006). "Lethal and behavioural effects of three synthetic repellents (DEET, IR3535 and KBR 3023) on *Aedes aegypti* mosquitoes in laboratory assays." Med Vet Entomol **20**(3): 288-293.
- LICCIARDI, S., HERVE, J. P., DARRIET, F., HOUGARD, J. M. and CORBEL, V. (2006). "Lethal and behavioural effects of three synthetic repellents (DEET, IR3535 and KBR 3023) on *Aedes aegypti* mosquitoes in laboratory assays." Medical and Veterinary Entomology **20**(3): 288-293.
- LIEBISCH, A. and LIEBISCH, G. (1997). Biologie und Ökologie der Zecken. Einheimische Zeckenborreliose (Lyme-Krankheit) bei Mensch und Tier. H. H. Horst. Balingen, Spitta Verlag. **3. Aufl.**: 31-47.
- LINDSAY, S. W. and GIBSON, M. E. (1988). "Bednets revisited-- old idea, new angle." Parasitology Today **4**(10): 270-272.
- LOPEZ, A. D., MATHERS, C. D., EZZATI, M., JAMISON, D. T. and MURRAY, C. J. L. (2006). Measuring the Global Burden of Disease and Risk Factors, 1990–2001. New York, Oxford University Press.
- LUTZ, D., (2010) "Emerging tick-borne diseases: a domestic ecological mystery."
- MACNEIL, J. D., PATTERSON, J. and MARTZ, V. (2000). Validation of analytical methods-proving your methods is 'fit for purpose'. Principles and Practices of Method Validation. A. Fajgelj and A. Ambrus, The Royal Society of Chemistry: 100-107.
- MASALA, S., AHMED, T., BERGVALL, C. and WESTERHOLM, R. (2011). "Improved efficiency of extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from the National Institute of Standards and Technology (NIST) Standard Reference Material Diesel Particulate Matter (SRM 2975) using accelerated solvent extraction." Analytical and Bioanalytical Chemistry **401**(10): 3305-3315.
- MASETTI, A. and MAINI, S. (2007). "Arm in cage tests to compare skin repellents against bites of *Aedes albopictus*." Bulletin of Insectology(59): 157-160.
- MAŠTOVSKÁ, K. and LEHOTAY, S. J. (2004). "Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues." Journal of Chromatography A **1040**(2): 259-272.

MERCK_KGAA (2011). "<http://www.merck-chemicals.de/cosmetic-ingredients/ir3535>."

MOORE, S. J., DARLING, S. T., SIHUINCHA, M., PADILLA, N. and DEVINE, G. J. (2007). "A low-cost repellent for malaria vectors in the Americas: results of two field trials in Guatemala and Peru." Malaria Journal **6**.

MOORE, S. J. and MAIA, M. F. (2011). "Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing." Malaria Journal **10**.

MOORES, G., ALPTEKIN, S., FIELD, L. and PHILIPPOU, D. (2011). "Interactions of piperonyl butoxide and its analogue with CYP3A4." Current Opinion in Biotechnology **22, Supplement 1(0)**: S72.

MORENS, D. M., FOLKERS, G. K. and FAUCI, A. S. (2004). "The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases." Nature **430(6996)**: 242-249.

MUTSCHLER, E., GEISLINGER, G., KROEMER, K., RUTH, P., SCHÄFER-KORTING, M. (2008). Arzneimittelwirkungen. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: 892-899.

MUTSCHLER, E., GEISLINGER, G., KROEMER, K., RUTH, P., SCHÄFER-KORTING, M. (2008). Arzneimittelwirkungen. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.

N'GUESSAN, R., ASIDI, A., BOKO, P., ODJO, A., AKOGBETO, M., PIGEON, O. and ROWLAND, M. (2010). "An experimental hut evaluation of PermaNet((R)) 3.0, a deltamethrin-piperonyl butoxide combination net, against pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes in southern Benin." Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene **104(12)**: 758-765.

N'GUESSAN, R., DARRIET, F., DOANNIO, J. M. C., CHANDRE, F. and CARNEVALE, P. (2001). "Olyset Net® efficacy against pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* after 3 years' field use in Côte d'Ivoire." Medical and Veterinary Entomology **15(1)**: 97-104.

NELSON, M. J. (1986). Aedes aegypti: Biology and Ecology. Washington, D.C.

NORRIS, L. and NORRIS, D. (2011). "Efficacy of long-lasting insecticidal nets in use in Macha, Zambia, against the local *Anopheles arabiensis* population." Malaria Journal **10(1)**: 254.

O'CONNELL, S., GRANSTROM, M., GRAY, J. S. and STANEK, G. (1998). "Epidemiology of European Lyme borreliosis." Zentralblatt für Bakteriologie : international journal of medical microbiology **287(3)**: 229-240.

PAGANOTTI, G. M., PALLADINO, C. and COLUZZI, M. (2004). "Der Ursprung der Malaria." Spektrum der Wissenschaft: 82-89.

PENNETIER, C., CORBEL, V., BOKO, P., ODJO, A., N'GUESSAN, R., LAPIED, B. and HOUGARD, J. M. (2007). "Synergy between repellents and non-pyrethroid insecticides strongly extends the efficacy of treated nets against *Anopheles gambiae*." Malaria Journal **6**.

PENNETIER, C., CORBEL, V. and HOUGARD, J. M. (2005). "Combination of a non-pyrethroid insecticide and a repellent: a new approach for controlling knockdown-resistant mosquitoes." Am J Trop Med Hyg **72**(6): 739-744.

PEREGUDA, T. A. and AGASHKOVA, T. M. (1991). "[The characteristics of the development in houseflies of resistance to synergized and nonsynergized permethrin]." Meditainskaia parazitologija i parazitarnye bolezni(1): 26-28.

PETERS, F. T., HARTUNG, M., HERBOLD, U., SCHMITT, G., DALDRUP, T. and MÜBHOFF, F. (2004). "Anlage zu den Richtlinien der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen." Toxichem + Krimtech **71**(3): 146-155.

PETERSON, C. and COATS, J. (2001). "Insect repellents - past, present and future." Pesticide Outlook **12**(4): 154-158.

PREISER, W. (2010). "Klinik, Epidemiologie und Diagnostik tropischer Virusinfektionen. Tropische Viren nicht nur in den Tropen." Pharmazie in unserer Zeit **39**(1): 34-40.

PRIDGEON, J. W., BERNIER, U. R. and BECNEL, J. J. (2009). "Toxicity comparison of eight repellents against four species of female mosquitoes." Journal of the American Mosquito Control Association **25**(2): 168-173.

RAGHAVENDRA, K., BARIK, T. K., REDDY, B. P., SHARMA, P. and DASH, A. P. (2011). "Malaria vector control: from past to future." Parasitology Research **108**(4): 757-779.

RANDOLPH, S. E. (2004). "Evidence that climate change has caused 'emergence' of tick-borne diseases in Europe?" International Journal of Medical Microbiology Supplements **293**, **Supplement 37**(0): 5-15.

REICHL, F.-X. (2002). Taschenatlas der Toxikologie. Hamburg, Nikol Verlag.

REINERT, J. F., HARBACH, R. E. and KITCHING, I. J. (2004). "Phylogeny and classification of Aedini (Diptera: Culicidae), based on morphological characters of all life stages." Zoological Journal of the Linnean Society **142**(3): 289-368.

REMANE, A., STORCH, V. and WELSCH, U. (1976). Systematische Zoologie: Stämme d. Tierreichs, Fischer.

RKI, R. K. I. (1999, akt. 2010). "Lyme Borreliose." Epidemiologisches Bulletin **15**(22): 163-167.

RKI, R. K. I. (1999, akt. 2011). "Frühsommer-Meningoenzephalitis." Epidemiologisches Bulletin **15**(16).

RKI, R. K. I. (2001). "Gelbfieber." Epidemiologisches Bulletin **15**(27): 195-197.

RKI, R. K. I. (2009). Reiseassoziierte Infektionskrankheiten 2008. A. f. Infektionsepidemiologie. Berlin, Plusprint. **1**: 385-396.

RKI, R. K. I. (2011). "FSME: Risikogebiete in Deutschland (Stand: April 2011)." Epidemiologisches Bulletin(17): 133-148.

ROßBACH, B., SCHARNBACHER, J., EGERER, E., HOMMEL, G. and LETZEL, S., " Biomonitoring und Beurteilung der möglichen Gefährdungen von militärischem Personal der Bundeswehr durch Permethrin in Uniformen" 2005

RTI (2007). Integrated Vector Management Programs for Malaria Control, Research Triangle Institute.

RÜCKER, G., NEUGEBAUER, M. and WILLEMS, G. G. (2008). Gaschromatographie. Instrumentelle Pharmazeutische Analytik. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft. **4**: 416-443.

RÜCKER, G., NEUGEBAUER, M. and WILLEMS, G. G. (2008). Massenspektrometrie. Instrumentelle Pharmazeutische Analytik. Stuttgart. **4**: 309-369.

RUTLEDGE, L. C., GUPTA, R. K., PIPER, G. N. and LOWE, C. A. (1994). "Studies on the inheritance of repellent tolerances in *Aedes aegypti*." Journal of the American Mosquito Control Association **10**(1): 93-100.

RUTLEDGE, L. C., WIRTZ, R. A., BUESCHER, M. D. and MEHR, Z. A. (1985). "Mathematical models of the effectiveness and persistence of mosquito repellents." Journal of the American Mosquito Control Association **1**(1): 56-62.

SACHS, J. and MALANEY, P. (2002). "The economic and social burden of malaria." Nature **415**(6872): 680-685.

SANCO (2009). Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. SANCO/10684/2009. D. G. f. H. a. C. D. SANCO), European Commission.

SCHURIGT, U. and MOLL, H. (2009). "Wirkstoffsuche und Entwicklung von Vakzinierungsstrategien zur Behandlung und Prophylaxe der kutanen Leishmaniose." Pharmazie in unserer Zeit **38**(6): 532-537.

SHAFER, T. J., MEYER, D. A. and CROFTON, K. M. (2005). "Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs." Environ Health Perspect **113**(2): 123-136.

SHAPIRO, S. S. and WILK, M. B. (1965). "An Analysis of Variance Test for Normality." Biometrika **52**(3/4): 591-611.

SHARMA, S. K., TYAGI, P. K., UPADHYAY, A. K., HAQUE, M. A., MOHANTY, S. S., RAGHAVENDRA, K. and DASH, A. P. (2009). "Efficacy of permethrin treated long-lasting insecticidal nets on malaria transmission and observations on the perceived side effects, collateral benefits and human safety in a hyperendemic tribal area of Orissa, India." Acta Trop **112**(2): 181-187.

SHARMA, S. K., UPADHYAY, A. K., HAQUE, M. A., TYAGI, P. K., RAGHAVENDRA, K. and DASH, A. P. (2010). "Wash-resistance and field evaluation of alphacypermethrin treated long-lasting

insecticidal net (Interceptor) against malaria vectors *Anopheles culicifacies* and *Anopheles fluviatilis* in a tribal area of Orissa, India." Acta Trop **116**(1): 24-30.

SHEN, C.-Y., CAO, X.-W., SHEN, W.-J., JIANG, Y., ZHAO, Z.-Y., WU, B., YU, K.-Y., LIU, H. and LIAN, H.-Z. (2011). "Determination of 17 pyrethroid residues in troublesome matrices by gas chromatography/mass spectrometry with negative chemical ionization." Talanta **84**(1): 141-147.

SLMB (2004). Leitfaden zur Validierung chemisch-physikalischer Prüfverfahren und zur Abschätzung der Messunsicherheit. S. Eidgenossenschaft. Bern, Bundesamt für Gesundheit, Abteilung Lebensmittelsicherheit: 1-29.

SODERLUND, D. M., CLARK, J. M., SHEETS, L. P., MULLIN, L. S., PICCIRILLO, V. J., SARGENT, D., STEVENS, J. T. and WEINER, M. L. (2002). "Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment." Toxicology **171**(1): 3-59.

SREEHARI, U., MITTAL, P. K., RAZDAN, R. K., DASH, A. P. and ANSARI, M. A. (2009). "Impact of etofenprox (Vectron 20 WP) indoor residual spray on malaria transmission." Indian Journal of Medical Research **129**(5): 593-598.

STANCZYK, N. M., BROOKFIELD, J. F. Y., IGNELL, R., LOGAN, J. G. and FIELD, L. M. (2010). "Behavioral insensitivity to DEET in *Aedes aegypti* is a genetically determined trait residing in changes in sensillum function." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **107**(19): 8575-8580.

STAUFFER, D. (2008). Das Chromatogramm. Chromatogramme richtig integrieren und bewerten. S. Kromidas and H.-J. Kuss. Weinheim, Wiley VCH.

STICH, A. (2009). "Malaria. Die wichtigste tropische Infektionskrankheit." Pharmazie in unserer Zeit **38**(6): 508-511.

STORCH, V., KÜKENTHAL, W. G. and WELSCH, U. (2002). Kükenthals Leitfaden für das Zoologische Praktikum, Spektrum-Akademischer Vlg.

SYED, Z. and LEAL, W. S. (2008). "Mosquitoes smell and avoid the insect repellent DEET." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105**(36): 13598-13603.

TAKKEN, W. (2002). "Do insecticide-treated bednets have an effect on malaria vectors?" Tropical Medicine & International Health **7**(12): 1022-1030.

TENENBEIN, M. (1987). "Severe toxic reactions and death following the ingestion of diethyltoluamide-containing insect repellents." JAMA : the journal of the American Medical Association **258**(11): 1509-1511.

TOWNSON, H., NATHAN, M., ZAIM, M., GUILLET, P., MANGA, L., BOS, R. and KINDHAUSER, M. (2005). "Exploiting the potential of vector control for disease prevention." Bulletin of the World Health Organization **83**: 942-947.

TRIGG, J. K. (1996). "Evaluation of a eucalyptus-based repellent against Anopheles spp in Tanzania." Journal of the American Mosquito Control Association **12**(2): 243-246.

TUNGU, P., MAGESA, S., MAXWELL, C., MALIMA, R., MASUE, D., SUDI, W., MYAMBA, J., PIGEON, O. and ROWLAND, M. (2010). "Evaluation of PermaNet 3.0 a deltamethrin-PBO combination net against Anopheles gambiae and pyrethroid resistant Culex quinquefasciatus mosquitoes: an experimental hut trial in Tanzania." Malar J **9**: 21.

UCMP.BERKELEY. (2011). "Arthropoda." University of California, from <http://www.ucmp.berkeley.edu/arthropoda/arthropoda.html>.

UMWELTBUNDESAMT (2005). Kommission "Human Biomonitoring" Innere Belastung der Allgemeinbevölkerung in Deutschland mit Pyrethroiden und Referenzwerte für Pyrethroidmetabolite im Urin, Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz Springer Medizin Verlag: 1187-1193.

UoF. (2011). "Aedes aegypti." University of Florida, from http://entnemdept.ufl.edu/creatures/aquatic/aedes_aegypti.htm.

VAN DEN BERG, H. and TAKKEN, W. (2009). "Evaluation of integrated vector management." Trends in parasitology **25**(2): 71-76.

WÄTZIG, H. and ERMER, J. (2002). Analytische Unsicherheit und Rationale Spezifikationsfindung - Schwerpunkt Gehaltsbestimmungen. Workshop Arzneimittelkontrolle/ Pharmazeutische Analytik DPhG, Frankfurt/Main.

WELLMITZ, J. and GLUSCHKE, M. (2005). Leitlinie zur Methodvalidierung. Q. i. B. L.-M. N.-u. O. (BLMP). Berlin, Umweltbundesamt: 1-22.

WHO, Technical Report Series, No. 793 "Anonymous, Control of leishmaniasis. Report of a WHO Expert Committee" 1990

WHO, "Instructions for treatment and use of insecticide-treated mosquito nets" 2002

WHO (2004). Global Strategic Framework for Integrated Vector Management. **10**: 1-12.

WHO, "The world health report 2004 — Changing history" 2004

WHO (2005). Guidelines for laboratory and field testing of long-lasting insecticidal mosquito nets, World Health Organisation: 1-8.

WHO (2007). "Insecticide-Treated Mosquito Nets: a WHO Position Statement." World Health Organisation - Global Malaria Programme: 1-10.

WHO. (2007). "WHO recommended insecticide products treatment of mosquito nets for malaria vector control." from <http://www.who.int/whopes/quality/en/>.

WHO. (2011). "WHO recommended long-lasting insecticidal mosquito nets." from <http://www.who.int/whopes/quality/newspecif/en/>.

WHO, Malaria Control Unit, UNICEF "The Africa Malaria Report 2003" 2003

WILDER-SMITH, A., OOI, E. E., VASUDEVAN, S. G. and GUBLER, D. J. (2010). "Update on dengue: epidemiology, virus evolution, antiviral drugs, and vaccine development." Current infectious disease reports **12**(3): 157-164.

WIRTZ, H.-P. (2001). "Zecken als Krankheitsüberträger: Was tun bei einem Stich?" Biologie in unserer Zeit **31**(4): 229-238.

ZAIM, M. and GUILLET, P. (2002). "Alternative insecticides: an urgent need." Trends in parasitology **18**(4): 161-163.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anzahl der Todesfälle durch vektorübertragene Infektionskrankheiten (WHO, 2004) .1	
Abbildung 2: Anteil der durch Infektionskrankheiten hervorgerufenen Todesfälle an der gesamten Anzahl an Todesfällen (WHO, 2004).5	
Abbildung 3: Dargestellt sind neu auftretende (rot) und wieder auftretende (blau) Infektionskrankheiten. Abbildung aus (MORENS <i>et al.</i> , 2004) in Nature.6	
Abbildung 4: Vorkommen verschiedener Stechmücken der Gattung Anopheles (KISZEWSKI <i>et al.</i> , 2004).....7	
Abbildung 5: Temperaturverlauf bei Infektionen mit unterschiedlichen Malariaerregern (Quelle: www.infektionsbiologie.ch).....8	
Abbildung 6: Lebenszyklus des Malariaerregers <i>P. falciparum</i> (HOLZGRABE, 2009)9	
Abbildung 8 Länder und Gebiete die von Dengue-Fieber bedroht sind. Die Linien markieren das mögliche Ausbreitungsgebiet von <i>Aedes aegypti</i> (FRIMMEL <i>et al.</i> , 2009).13	
Abbildung 10: Taxonomie der Gliederfüßer nach (REMANE <i>et al.</i> , 1976; STORCH <i>et al.</i> , 2002)17	
Abbildung 11: Unterscheidungsmöglichkeiten parasitärer Arthropoden18	
Abbildung 12: Wichtige Eigenschaften hämophager Vektoren nach (FAULDE and HOFFMANN, 2001)19	
Abbildung 13: Stammbaum von <i>Stegomyia aegypti</i> (REINERT <i>et al.</i> , 2004; REMANE <i>et al.</i> , 1976; STORCH <i>et al.</i> , 2002). Der Übersichtlichkeit halber vereinfacht dargestellt.....21	
Abbildung 14: Weiße Markierung auf dem Thorax von <i>Aedes aegypti</i> (CDC, 2011)22	
Abbildung 15: Entwicklungsstadien von <i>Aedes aegypti</i> (oben links: Eier in Glasbehälter, oben rechts: Eier in Vergrößerung, unten links: Larve, unten rechts: Puppe); Bilder: CDC und University of Florida.....23	
Abbildung 16: Lebenszyklus von <i>Ixodes ricinus</i> (WIRTZ, 2001)24	
Abbildung 17: Pyrethrin.....26	
Abbildung 18: Permethrin (Typ I Pyrethroid)26	
Abbildung 19: Cyfluthrin (Typ II Pyrethroid).....27	
Abbildung 20: Deltamethrin (Typ II Pyrethroid)27	
Abbildung 21: A: Proteinstruktur eines spannungsgesteuerten Ionenkanals. B: Mögliche Zustände eines spannungsabhängigen Natriumkanals (MUTSCHLER, 2008).27	
Abbildung 22: Wirkmechanismus von Pyrethroiden (SHAFER <i>et al.</i> , 2005). Durch die verlängerte Öffnungszeit des spannungsabhängigen Natriumkanals wird die Repolarisation der Membran gestört und das normale Ruhepotential nicht erreicht. Die Folge sind schnell aufeinander folgende Aktionspotentiale, die entweder zu einer starken wiederholten Exzitation der betroffenen Neurone führen (Typ I) oder nach einigen schnell aufeinanderfolgenden Aktionspotentialen eine Blockade der Neurone hervorrufen (Typ II).28	
Abbildung 23: Phase 1 Metabolismus von Permethrin30	

Abbildung 24: Strukturen der vor dem zweiten Weltkrieg allein oder in Kombination verwendeten Repellentien. Citronellol ist stellvertretend als Leitsubstanz des Zitronenöls abgebildet.	32
Abbildung 25: Strukturen verschiedener synthetischer Repellentien	33
Abbildung 26: Wirksamkeit von IR 3535 als Lotion und Spray gegen Stechmücken (MERCK_KGAA, 2011).....	35
Abbildung 27: Synthese von cis/trans(±)-p-Menthan-3,8-diol aus (+)-Citronellal (nach (DRAPEAU <i>et al.</i> , 2011)).....	37
Abbildung 28: Kernelemente des IVM nach (BEIER <i>et al.</i> , 2008)	39
Abbildung 29: Agilent Gaschromatograph im Labor BGU/CTU des ZInstSanBw KOB	46
Abbildung 30: Flussdiagramm zur Darstellung des Ablaufes der quantitativen Bestimmung aktiver Inhaltsstoffe.....	50
Abbildung 32: Aufnahme eines adulten Weibchens der Gattung <i>Aedes aegypti</i> nach Exposition mit einem imprägnierten Moskitonetz. Das Versuchstier liegt auf dem Rücken und zeigt keinerlei Bewegungsaktivität. Tiere in dieser permanenten Rückenlage zeigen einen irreversiblen „Kill-Effekt“ und werden als tot bewertet.	56
Abbildung 33: Aufnahme eines Käfigs während der Durchführung eines Test zur Bestimmung der Repellentaktivität.....	57
Abbildung 34: Beispiel eines Prüfplanes zur Durchführung eines Waschversuches.....	61
Abbildung 35: Chromatogramm von DEET, Aldrin, Cis-Trans-Permethrin und Etofenprox zu Beginn der Methodenentwicklung.	63
Abbildung 36: Chromatogramm der Erweiterung der Methode um die Analyten IR 3535 und Cyfluthrin mit ausreichender Auflösung aller kritischen Paare.....	64
Abbildung 37: Weitere Optimierung der Methode durch Anpassung des Temperaturprogramms und Wechsel der analytischen Säule.	65
Abbildung 38: Overlay zweier Chromatogramme mit alten und neuen internen Standards.....	65
Abbildung 39: Chromatogramm aller Standardsubstanzen im SCAN – Modus. Die Aufnahme erfolgte von 40 bis 400 Masseneinheiten (m/z).....	68
Abbildung 40: Chromatogramm (a) und Massenspektrum (b) von Diethyltoluamid im SCAN - Modus	69
Abbildung 41: Chromatogramm (a) und Massenspektrum (b) Cis-Permethrin im SCAN-Modus ..	70
Abbildung 42: Darstellung einer Kalibration von Diethyltoluamid und Piperonylbutoxid über den Arbeitsbereich von etwa 0,5 bis 60 mg/L.....	71
Abbildung 43: Kalibriergerade Deltamethrin mit Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze sowie Standardabweichung und Variationskoeffizient.	72
Abbildung 44: Residuenplot der Kalibration von Deltamethrin.	73
Abbildung 45: Relative Unpräzision der Kalibration von Deltamethrin.	73
Abbildung 46: Residuenplots der einzelnen Analyten bei Kalibration in der Praxis.....	74

Abbildung 47: Dargestellt ist die prozentuale Wiederfindung der einzelnen Analyten mit der jeweils zugehörigen Standardabweichung. Die obere und untere Grenze kennzeichnen die selbst gesetzten Akzeptanzkriterien, für die Nichtberücksichtigung der Wiederfindungsrate.....	78
Abbildung 48: Ergebnisse der Extraktionsversuche zu den Zeitpunkten 1, 2, 3, 4 und 5 Stunden.	83
Abbildung 49: Ishikawa Diagramm zur Berechnung der Messunsicherheit erstellt durch die Software Uncertainty Manager®	86
Abbildung 50: 10-fache Extraktion einer Probe mit Toluol mit einer Dauer von jeweils 30 min pro Extraktion.....	87
Abbildung 51: Dreimalige erschöpfende Extraktion einer Probe über jeweils 4 Stunden mit Soxhletapparatur.....	88
Abbildung 52: Darstellung der „Kill Time“ von extrahierten und nicht extrahierten Moskitonetzen mit Darstellung des Gesamtpermethringehaltes und logarithmischer Primärachse.	89
Abbildung 53: Netzdiagramm von Kill-Zeit und Gesamtpermethringehalt auf zwei Achsen zur Darstellung der vollständigen Extraktion der aktiven Inhaltsstoffe aus den imprägnierten Moskitonetzen.	90
Abbildung 54: Konzentrationsabhängige Knockdown- und Kill- Aktivität von Etofenprox.....	92
Abbildung 55: Darstellung der Kill- und Knockdown-Aktivitäten von Repellentien und Insektiziden. Als Maß für die Aktivität ist die Zeit in Minuten bis zum Erreichen des jeweiligen Endpunktes gegen die Konzentration des Wirkstoffes im Moskitonetz aufgetragen	93
Abbildung 56: Darstellung der Knockdown-Aktivitäten von Deltamethrin, Cyfluthrin, Permethrin und Etofenprox.....	95
Abbildung 57: Vergleich der Kill-Aktivität von IR 3535 und Diethyltoluamid mit Permethrin	95
Abbildung 58: Mit Etofenprox imprägniertes Moskitonetz im „Arm-in-Cage“ Versuch	96
Abbildung 59: Darstellung der Knockdown-Aktivität von Diethyltoluamid und IR 3535 gegen Nymphen von <i>Ixodes ricinus</i> (Freilandfang).....	97
Abbildung 60: Darstellung der Kill-Aktivität von Diethyltoluamid und IR 3535 gegen Nymphen von <i>Ixodes ricinus</i> (Freilandfang)	97
Abbildung 61: Darstellung der Konzentration und biologischer Wirksamkeit von mit Etofenprox und Diethyltoluamid imprägnierten Moskitonetzen	99
Abbildung 62: Darstellung der Konzentration und biologischer Wirksamkeit von mit Permethrin und Diethyltoluamid imprägnierten Moskitonetzen	100
Abbildung 63: Darstellung der Konzentration und biologischer Wirksamkeit von mit Permethrin und IR 3535 imprägnierten Moskitonetzen	101
Abbildung 64: Gegenüberstellung der Knockdown-Aktivität von mit dem Polymercoatingverfahren imprägnierten LLIN und LLIRN in Abhängigkeit von ihrem Gehalt an aktiven Inhaltsstoffen	102
Abbildung 65: Gegenüberstellung der Kill-Aktivität von mit dem Polymercoatingverfahren imprägnierten LLIN und LLIRN in Abhängigkeit von ihrem Gehalt an aktiven Inhaltsstoffen	103

Abbildung 66: „Arm-in-Cage“ Tests: 1: Unimprägniertes Netz, 2: Netz mit etwa 5000 mg/m ² IR 3535, 3: Netz mit etwa 6700 mg/m ² IR 3535, 4: Netz mit etwa 1500 mg/m ² IR 3535 und 10 mg/m ² Permethrin, 5: Netz mit etwa 3600 mg/m ² Diethyltoluamid und 1200 mg/m ² Permethrin,	104
Abbildung 67: Konzentrationen und biologische Aktivitäten einer Serie imprägnierter Moskitonetze jeweils mit und ohne Piperonylbutoxid	106
Abbildung 68: Vergleich der Konzentrationen an Diethyltoluamid und IR 3535 auf Baumwollnetzen (P1-P8 BW) und Polyesternetzen (P1-P8 PE) nach Imprägnierung mit demselben Verfahren	108
Abbildung 69: Vergleich der Konzentrationen an Diethyltoluamid, IR 3535 und Permethrin auf Baumwollnetzen (P1-P8 BW) und Polyesternetzen (P1-P8 PE) nach Imprägnierung mit demselben Verfahren	109
Abbildung 70: Darstellung der Kill-Aktivität von imprägnierten Baumwoll- und Polyesternetzen bei gleichzeitiger Abbildung der Konzentration an aktiven Inhaltsstoffen auf den Netzen	109
Abbildung 71: Kill-Aktivität von Baumwoll- und Polyesternetzen mit IR 3535 oder Diethyltoluamid imprägniert im Vergleich.....	110
Abbildung 72: Elektronenmikroskopische Aufnahme (a) eines unimprägnierten Polyester- und (b) eines imprägnierten Baumwollnetzes (Polymercoatingverfahren) bei gleicher Vergrößerung	110
Abbildung 73: Konzentration und Bioaktivität von Lenonetzen mit Diethyltoluamid, IR 3535 und Rückständen von Permethrin.....	112
Abbildung 74: Konzentrationsabhängige Bioaktivität von Lenonetzen hinsichtlich Verunreinigungen mit Permethrin.....	113
Abbildung 75: Bioaktivität und Gehalte von mit IR 3535 und Permethrin imprägnierten Lenonetzen	114
Abbildung 76: Vergleich von Knockdown- und Kill-Aktivitäten von Lenonetzen mit Bezug zu den enthaltenen Gehalten an Repellent und/oder Insektizid	115
Abbildung 77: Gehalte und Knockdown-Aktivitäten unterschiedlicher Lenonetze mit verschiedenen Wirkstoffen.....	116
Abbildung 78: Gehalte und Kill-Aktivitäten unterschiedlicher Lenonetze mit verschiedenen Wirkstoffen	117
Abbildung 79: Darstellung der Konzentrationen und der prozentualen Gehalte an Insektiziden bezogen auf die Anzahl an Waschgängen von LLINs, die mit dem Polymercoatingverfahren imprägniert worden sind.	123
Abbildung 80: Darstellung der Konzentrationen und der prozentualen Gehalte an Etofenprox und Diethyltoluamid bezogen auf die Anzahl an Waschgängen von LLIRNs, die mit dem Polymercoatingverfahren imprägniert worden sind.	126

Abbildung 81: Darstellung der Konzentration und der prozentualen Gehalte an aktiven Inhaltsstoffen von kommerziell verfügbaren LLINs bezogen auf die Anzahl an Waschgängen.	127
Abbildung 82: Vergleichende Darstellung der prozentualen Restgehalte von kommerziell verfügbaren LLIN und den nach dem neuen Polymercoatingverfahren imprägnierten LLINs.	128
Abbildung 83: Darstellung der Bioaktivität (hier 100% Knockdown) von vier kommerziell verfügbaren LLINs in Abhängigkeit von der Anzahl an Waschgängen gemäß DIN EN ISO 6330.	129
Abbildung 84: Darstellung der Bioaktivität (hier 100% Knockdown) von fünf simultan untersuchten Care Plus® Netzen	130
Abbildung 85: Darstellung von durchgeführten „Arm-in-Cage“ Tests: 1: Care Plus®, 2: PermaNet® 2.0, 3: NetProtect®, 4: Conmanet®, 5: LLIRN mit IR 3535 und Permethrin und 6: Nichtimprägniertes Baumwollnetz.....	132
Abbildung 86: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Moskitonetzen unterschiedlicher Hersteller, aufgenommen in der Laborgruppe Elektronenmikroskopie des Zentralen Institutes der Bundeswehr Koblenz: 1.McKinley® Netz, 2. Netprotect® Netz, 3. Conmanet®, 4. PermaNet® 2.0, 5. PC-Netz Utexbel, 6. PC-Netz Utexbel stärkere Vergrößerung. Die Abbildung zeigt die großen Unterschiede hinsichtlich der verwendeten Materialien und Fasereigenschaften.	146

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Darstellung der unterschiedlichen Symptomatik der Malaria in Abhängigkeit von dem auslösenden Erreger.....	8
Tabelle 2: Auflistung der verfügbaren Malariamittel mit Hauptangriffsziel und den am häufigsten auftretenden unerwünschten Wirkungen.....	10
Tabelle 3: Toxikologische Kenndaten einiger Pyrethroide.....	29
Tabelle 4: Anforderungen an ein ideales Repellent.....	31
Tabelle 5: Ziele und Prinzipien eines IVM nach (BEIER <i>et al.</i> , 2008).....	39
Tabelle 6: Übersicht über die in einem IVM kombiniert angewandten Vektorbekämpfungsmaßnahmen, mit den Punkten 1 und 2, die gegen die adulten Stechmücken gerichtet sind und den Punkten 3 bis 5, die sich gegen die Larven der Stechmücken richten (RTI, 2007).....	40
Tabelle 7: Von der WHO empfohlene Pestizide für die konventionelle Imprägnierung von Moskitonetzen.....	43
Tabelle 8: Von der WHO empfohlene LLIN (WHO, 2011).....	44
Tabelle 9: Geräteparameter für die Messung der Proben am Gaschromatographen im SIM.....	51
Tabelle 10: Auflistung der Analyten mit Retentionszeit, Peak-Peak Auflösung, Symmetrie, Fragmentionenverhältnis und relativer Retentionszeit bezogen auf den internen Standard Diethylhexylphthalat.....	69
Tabelle 11: Darstellung der Arbeitsbereiche der unterschiedlichen Analyten mit Angabe der Korrelationskoeffizienten.....	71
Tabelle 12: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Methode zur Bestimmung von Repellentien und Insektiziden in mg/L nach DIN 32645 (Kalibriergeradenmethode) und über Signal-Rausch-Verhältnis.....	76
Tabelle 13: Statistische Auswertung des Wiederfindungsversuches mit Darstellung von Mittelwert, Standardabweichung, Grubbs- und T-Test.....	78
Tabelle 14: Statistische Auswertung der Wiederholpräzision (n=8) mit Darstellung von Mittelwert, Standardabweichung, relativer Standardabweichung, Grubbs- und Shapiro-Wilk-Test.....	80
Tabelle 15: Statistische Auswertung der Laborpräzision (n=8) mit Darstellung von Mittelwert, Standardabweichung, relativer Standardabweichung, Grubbs- und Shapiro-Wilk-Test.....	80
Tabelle 16: Übersicht über die statistische Auswertung der Analysenserien (n=2) mit dem SAAD Programm von Dr. Hauke Petersen.....	81
Tabelle 17: Darstellung der Messunsicherheiten der einzelnen Analyten in Prozent.....	85
Tabelle 18: Ergebnisse des Versuches zum Nachweis der Extraktion aller aktiven Inhaltsstoffe...89	
Tabelle 19: Ergebnisse der Berechnung von KD_{60} und $Kill_{100}$ für verschiedene Wirkstoffe.....	94
Tabelle 20: Eigenschaften verschiedener zur Imprägnierung verwendeter Moskitonetze.....	107

Tabelle 21: Space-Effekt und schützende Eigenschaften von LLRNs and LLIRNs untersucht mit „Arm-in-Cage“-Tests für 5 Minuten und <i>A. aegypti</i> als Versuchstier.....	119
Tabelle 22: Wirkstoffgehalte von imprägnierten Moskitonetzen vor dem Waschen und nach 1, 5, 10 und 20 Wäschen gemäß DIN EN ISO 6330.....	121
Tabelle 23: Prozentuale Wirkstoffgehalte von imprägnierten Moskitonetzen vor dem Waschen und nach 1, 5, 10 und 20 Wäschen gemäß DIN EN ISO 6330.....	122
Tabelle 24: Wirkstoffgehalte von mit Diethyltoluamid und Etofenprox imprägnierten Moskitonetzen vor dem Waschen und nach 1, 5, 10 und 20 Wäschen gemäß DIN EN ISO 6330.....	124
Tabelle 25: Prozentuale Gehalte von mit Diethyltoluamid und Etofenprox imprägnierten Moskitonetzen vor dem Waschen und nach 1, 5, 10 und 20 Wäschen gemäß DIN EN ISO 6330.....	125

10. Zusammenfassung

Durch Vektoren, wie Stechmücken, übertragene Infektionskrankheiten (z.B. Malaria, Dengue-Fieber oder Leishmaniose) sind seit Jahrtausenden ein Problem, das jährlich mehrere Millionen Menschen das Leben kostet. Insbesondere in den afrikanischen Endemiegebieten entstehen durch diese Krankheiten darüberhinaus wirtschaftliche Schäden, die die ökonomische Entwicklung ganzer Landstriche massiv behindert.

Da für viele Infektionskrankheiten keine Impfung zur Verfügung steht und eine medikamentöse Therapie, u.a. aus wirtschaftlichen Gründen, bislang nicht flächendeckend realisiert werden konnte, kommt einer Vermeidung der Exposition gegenüber den krankheitsübertragenden Vektoren eine herausragende Bedeutung zu. Während früher versucht wurde, die Exposition mit Einzelmaßnahmen (z.B. durch großflächigen Einsatz von DDT) zu reduzieren, wird heute der Ansatz eines integrierten Vektorenmanagements verfolgt, bei dem durch Kombination verschiedener Verfahren eine Reduktion des Expositionsrisikos erreicht werden soll. Integraler Bestandteil eines integrierten Vektorenmanagements ist die Verwendung von imprägnierten Moskitonetzen, die sowohl auf physikalischem als auch auf chemischem Weg die Übertragung von Infektionskrankheiten verhindern.

Trotz Fortschritten in der Entwicklung von Moskitonetzen, von unimprägnierten Netzen über einfach imprägnierte Netze bis hin zu imprägnierten Netzen mit erhöhter Waschresistenz, besteht auf diesem Gebiet weiterer Forschungsbedarf, um die Wirksamkeit und Effizienz von imprägnierten Moskitonetzen zu optimieren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine Multimethode entwickelt, die es ermöglicht den biologisch verfügbaren Gehalt an verschiedenen aktiven Inhaltsstoffen quantitativ zu erfassen. Diese Methode wurde im Verlauf der Arbeit validiert, erweitert und revalidiert, so dass zum jetzigen Zeitpunkt die qualitative und quantitative Bestimmung der bioaktiven Anteile der Repellentien Diethyltoluamid und IR 3535, der Insektizide Cyfluthrin, Deltamethrin, Permethrin und Etofenprox sowie des Synergisten Piperonylbutoxid möglich ist. Durch die Bestimmung der biologischen Aktivität imprägnierter Moskitonetze vor und nach der Extraktion wurde nachgewiesen, dass durch das verwendete Extraktionsverfahren die biologisch aktiven Wirkstoffanteile quantitativ aus den Moskitonetzen entfernt werden.

Unter Verwendung der neu entwickelten Methode wurde im weiteren Verlauf der Arbeit zunächst die toxikologische Wirkung einzelner Wirkstoffe auf Moskitonetzen untersucht, die mit einem neuen Polymercoatingverfahren imprägniert waren. Als Versuchstier wurde in der überwiegenden Zahl der Versuche die Gelbfiebermücke *Aedes aegypti* verwendet. Einige Versuche wurden darüberhinaus mit der Schildzecke *Ixodes ricinus* durchgeführt. Die Ergebnisse aus dieser Versuchsserie zeigten unterschiedliche Wirkstärken der Einzelsubstanzen auf den imprägnierten Moskitonetzen. Die Typ II Pyrethroide Cyfluthrin und Deltamethrin zeigten die stärkste

Wirksamkeit gefolgt von dem Typ I Pyrethroid Permethrin und Etofenprox (Non-Ester Pyrethroid). Überraschenderweise wurde bei den Repellentien Diethyltoluamid und IR 3535 ebenfalls eine insektizide Wirkung festgestellt. Zusätzlich zu dieser insektiziden Wirkung konnte eine akarizide Wirkung der Repellentien gegen *Ixodes ricinus* gezeigt werden.

Im Anschluss an die Bestimmung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen der Einzelwirkstoffe wurde die Wirksamkeit der Kombination von Repellent und Insektizid auf einem imprägnierten Moskitonetz untersucht. Die Ergebnisse zeigen für diese Kombination eine signifikant stärkere Wirkung, als aus den Wirkstärken der Einzelwirkstoffe anzunehmen gewesen wäre, so dass von einem synergistischen Effekt für die Kombination von Repellent und Insektizid auszugehen ist. Eine erhöhte Wirksamkeit des als Synergisten eingesetzten Piperonylbutoxids konnte in den durchgeführten Versuchen an nicht pyrethroidresistenten Stämmen von *Aedes aegypti* nicht festgestellt werden.

Mit Hilfe der Versuchsanordnung eines „Arm-in-Cage Tests“ wurden die imprägnierten Netze hinsichtlich eines Durchstichschutzes und somit einer unmittelbaren Protektion des Anwenders geprüft. Hierbei wurde festgestellt, dass nur die Moskitonetze, die mit einem hohen Gehalt an Repellentien imprägniert waren, die Versuchstiere davon abhielten auf den Moskitonetzen zu landen und zu stechen. Eine alleinige Imprägnierung mit einem Insektizid ist für diesen Durchstichschutz demnach nicht ausreichend.

Des Weiteren konnte konstatiert werden, dass bei der Anwendung des Polymercoatingverfahrens für die Imprägnierung unterschiedlicher Fasermaterialien in jedem Einzelfall eine Betrachtung der Bindungskapazität des Netzmaterials erforderlich ist, da eine Imprägnierung unterschiedlicher Materialien mit der gleichen Polymerlösung zu unterschiedlichen Gehalten an biologisch verfügbaren Wirkstoffen führt.

Hinsichtlich der Waschresistenz von Moskitonetzen, die nach dem Polymercoatingverfahren imprägniert wurden, zeigte sich, dass bei allen untersuchten Wirkstoffen die Waschresistenz mindestens vergleichbar mit der Waschresistenz kommerziell verfügbarer Moskitonetze war; häufig war sogar eine erhöhte Waschresistenz zu verzeichnen.

Mit den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Wirksamkeit von imprägnierten Moskitonetzen durch die Verwendung einer Kombinationen aus Repellent und Insektizid signifikant verbessert werden kann und dass für die Gewährleistung eines Durchstichschutzes die Anwesenheit eines Repellents zwingend erforderlich ist.

11. Publikationen

FAULDE, M. K., ALBIEZ, G. and NEHRING, O. (2010). "Insecticidal, acaricidal and repellent effects of DEET- and IR3535-impregnated bed nets using a novel long-lasting polymer-coating technique." Parasitology Research 106(4): 957-965.

FAULDE, M., ALBIEZ, G. and NEHRING, O. (2011). "Novel long-lasting impregnation technique transferred from clothing to bednets: extended efficacy and residual activity of different pyrethroids against *Aedes aegypti* as shown by EN ISO 6330-standardized machine laundering." Parasitology Research: 1-10.

FAULDE, M. K. and NEHRING, O. (2012). " Synergistic insecticidal and repellent effects of combined pyrethroid and repellent-impregnated bed nets using a novel long-lasting polymer-coating multi-layer technique" Parasitology Research: accepted