

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

**Entomologische und molekulargenetische Untersuchungen zur Gnitzenfauna  
(Diptera: Ceratopogonidae) in Deutschland**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Anja Stephan  
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2012

Journal-Nr.: 3599

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg  
Erster Gutachter: Prof. Dr. Peter-Henning Clausen  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dieter Mehlitz  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Heinz Mehlhorn

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

cattle diseases, bluetongue virus, disease vectors, ceratopogonidae,  
*Culicoides*, molecular genetics techniques, polymerase chain reaction

Tag der Promotion: 21.01.2013

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-86387-281-6

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2012**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

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

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

This document is protected by copyright law.

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

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2013

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

*Meiner Familie in Berlin, Oerlinghausen und Malchin*

*und*

*zur Erinnerung an*

*meine Großmutter*

*Olga Ivanowna Kusmina*

*(Tierärztin aus Odessa, Ukraine)*



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung und Zielsetzung .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Literaturübersicht .....</b>	<b>4</b>
2.1. Die Blauzungenkrankheit.....	4
2.1.1. Der Erreger.....	4
2.1.2. Vorkommen.....	5
2.1.3. Symptome .....	5
2.1.4. Nachweis.....	6
2.1.5. Die Vektoren .....	7
2.1.6. Bekämpfung.....	8
2.1.7. Ausbruch der BTB in Mitteleuropa - Geschichtlicher Überblick.....	9
2.2. Gnitzen als Überträger der Blauzungenkrankheit .....	13
2.2.1. Gnitzenarten und Vorkommen .....	14
2.2.2. Entwicklung und Biologie.....	16
2.2.3. Fangmethoden .....	21
2.2.4. Morphologische Differenzierung .....	22
2.2.5. Differenzierung mittels molekular-genetischer Methoden.....	27
2.3. Epidemiologische Zusammenhänge zwischen Erreger, Vektor und Umwelt .....	29
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>33</b>
3.1. Entomologisches Monitoring in Deutschland .....	33
3.1.1. Aufgabenstellung und Zielsetzung.....	33
3.1.2. Fallenstandorte der Arbeitsgruppe FU Berlin .....	35
3.1.3. Fallentyp und Fangprotokoll .....	36
3.2. Morphologische Differenzierung.....	40
3.2.1. Grobdifferenzierung.....	40
3.2.2. Feindifferenzierung.....	42
3.3. Molekular-genetische Differenzierung .....	52
3.3.1. Extraktion der DNS.....	53
3.3.2. Amplifikation der ITS1-Region mittels konservativer Primer .....	54
3.3.3. Elektrophorese.....	57
3.3.4. Sequenzierung der Amplifikate.....	58
3.3.5. Primerdesign .....	58
3.3.6. Weitere Untersuchungen.....	65
3.3.6.1. Verfahren zur Reduzierung von Kreuzkontaminationen .....	65
3.3.6.2. Untersuchung gepoolter Gnitzenfänge .....	66

<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>68</b>
4.1 Entomologische Untersuchungen.....	68
4.1.1. Saisonale Abundanz von Gnitzen der <i>Obsoletus</i> - und <i>Pulicaris</i> -Gruppe.....	74
4.1.2. Fänge der Innen- und Außenfallen .....	76
4.1.3. Anteil gesogener Gnitzen .....	78
4.1.4. Artenspektrum nach Differenzierung.....	80
4.1.5. Ergebnisse der Untersuchungen auf BTV-Genom .....	81
4.2 Morphologische Differenzierung .....	82
4.2.1. Grob- und Feindifferenzierung.....	82
4.3 Molekular-genetische Differenzierung .....	85
4.3.1. Primerdesign .....	89
4.3.2. Optimierung der PCR.....	94
4.3.3. Analytische Spezifität und Sensitivität der Primer .....	100
4.4. Weitere Untersuchungen.....	103
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>107</b>
5.1. Entomologische Untersuchungen.....	107
5.1.1. Methodenkritik.....	107
5.1.2. Gnitzen-Fauna und Artenspektrum.....	109
5.1.3. Saisonale Abundanz der Gnitzen .....	110
5.1.4. Fänge innen und außen.....	111
5.1.5. Anteil gesogener Gnitzen .....	111
5.1.6. BTV-Status gefangener Gnitzen bzw. beprobter Höfe.....	112
5.2. Molekular-genetische Differenzierung .....	113
5.2.1. Auswahl von ITS1 als Ziel-Genregion.....	114
5.2.2. Primerdesign und PCR-Protokoll.....	114
5.2.3. Analytische Spezifität und Sensitivität der Primer.....	115
5.3. Diskussion der weiteren Untersuchungen.....	116
5.4. Schlussfolgerungen und Ausblick.....	116
5.4.1. Entomologische Untersuchungen.....	116
5.4.2. Einsatz der speziesspezifischen Primer .....	118
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>119</b>
<b>7. Extended Summary .....</b>	<b>121</b>
<b>8. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>123</b>

---

<b>9.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>140</b>
9.1.	Abbildungsverzeichnis.....	140
9.2.	Tabellenverzeichnis .....	148
9.3.	Abkürzungsverzeichnis.....	149
9.4.	Verwendete Materialien .....	150
9.4.1.	Materialien für das entomologische Monitoring .....	150
9.4.2.	Materialien für die entomologische Präparation .....	151
9.4.3.	Materialien für die gentechnischen Arbeiten .....	151
9.4.4.	Rezepturen Lösungen, Puffer und Gele.....	152
9.4.5.	Einwegartikel .....	154
9.4.6.	Mehrwegartikel .....	154
9.4.7.	Geräte .....	155
9.4.8.	Computersoftware.....	156
9.4.9.	Online-Software und Datenbanken .....	156
<b>10.</b>	<b>Publikationen .....</b>	<b>157</b>
<b>11.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>158</b>
<b>12.</b>	<b>Selbstständigkeitserklärung.....</b>	<b>159</b>





## 1. Einleitung und Zielsetzung

Im August 2006 brach die Blauzungenkrankheit (engl. bluetongue disease, BTD) erstmals in Deutschland aus und traf Landwirte, Veterinäre und Behörden völlig unvorbereitet (Kampen u. Kiel, 2006). Diese Tierseuche, die Haus- und Wildwiederkäuer befällt, wird durch ein Arbovirus (engl. arthropode borne virus, dt. von Arthropoden übertragener Virus) hervorgerufen und durch winzige Mücken der Gattung *Culicoides* spp., auch Gnitzen oder Gnitten genannt, übertragen (Liebisch u. Liebisch, 2007). Die ersten Krankheitsfälle traten in den Niederlande auf, schnell gefolgt von Ausbrüchen in Belgien, Deutschland und Frankreich (Kampen u. Kiel, 2006).

Während die Gnitzenart *Culicoides imicola* als Hauptvektor der BTD in Afrika und Südeuropa gilt, werden für die jüngsten Ausbrüche autochthone (heimische) Gnitzenarten als Überträger diskutiert. In den entomologischen Untersuchungen, die in den mitteleuropäischen Restriktionsgebieten für BTD durchgeführt wurden, konnten jedoch keine *C. imicola*-Gnitzen gefangen werden (Savini *et al.*, 2003; De Liberato *et al.*, 2005; Liebisch u. Liebisch, 2007; Meiswinkel *et al.*, 2007). Bei Fängen mittels Lichtfallen, die unmittelbar nach den ersten Krankheitsfällen auf betroffenen Viehbetrieben durchgeführt wurden, ist hingegen bei vielen weiblichen Gnitzen der hier heimischen *Culicoides* spp., mit und ohne Blutmahlzeit im Darm, das Virus der Blauzungenkrankheit (engl. bluetongue virus, BTV) nachgewiesen worden (Mehlhorn *et al.*, 2008c).

Bis in die 1980er Jahre hinein waren die wissenschaftlichen Arbeiten auf dem Gebiet der Gnitzen Deutschlands eher spärlich und konzentrierten sich vordringlich auf bestimmte Standorte wie Niedersachsen (Olbrich, 1987) oder dem hessischen Bergland (Havelka, 1976). In allen Studien wurden zahlreiche *Culicoides*-Arten nachgewiesen, darunter auch *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. dewulfi* und *C. pulicaris*, die mittlerweile als BTV-Vektoren in Frage kommen (Meiswinkel *et al.*, 2007; Mehlhorn *et al.*, 2008c; Carpenter *et al.*, 2009). Während andere, außerhalb der klassischen BTD-Verbreitungsgrenzen gelegene Länder wie z.B. Großbritannien bereits vor Jahren entomologisch-faunistische Untersuchungen starteten, um das Einschleppungsrisiko für BTD und das Ausbreitungsrisiko von *C. imicola* vor dem Hintergrund einer möglichen Klimaerwärmung in Europa zu ermitteln (Jennings u. Mellor, 1988; Blackwell *et al.*, 1994; Wittmann *et al.*, 2002), existierten bis 2007 keine vergleichbaren Monitoringprogramme für Deutschland (Kampen u. Kiel, 2006).

Im Frühjahr 2007 wurde ein deutschlandweites serologisches und entomologisches Monitoringprojekt ins Leben gerufen. Dieses Projekt stand unter Schirmherrschaft des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) und wurde von der Europäischen Union (EU) kofinanziert. Das serologische Monitoring beinhaltete flächendeckende, regelmäßige Blutprobenentnahmen in nach einem Rasterverfahren ausgewählten Rinderbeständen, die auf das Blauzungenvirus untersucht wurden. Im Rahmen des entomologischen Monitorings stand der Fang der potenziellen Vektoren im Vordergrund.

Die Artenbestimmung der Gnitzen stellt die Wissenschaft vor komplexe Herausforderungen. Gnitzen der Gattung *Culicoides* sind je nach Art ca. 0,5 – 4 mm groß und mit bloßem Auge nicht zu unterscheiden. Die Flügelzeichnung kann zur groben Differenzierung der Arten oder Artkomplexe herangezogen werden (Mehlhorn *et al.*, 2008c). Die genaue Artbestimmung von Gnitzen erfolgt jedoch klassischerweise mittels (Stereo-)Mikroskopie anhand morphologischer Merkmale. Ihre Differenzierung bleibt dennoch problematisch, da es sich, wie bei vielen anderen Vektorgruppen auch, bei *C. imicola*, *C. obsoletus* und *C. pulicaris* um Artenkomplexe von mehreren nah verwandten Spezies (sog. Zwillingarten) handelt, die in einigen Entwicklungsstadien morphologisch nicht voneinander zu unterscheiden sind. Insbesondere die Weibchen dieser Arten sind nahezu identisch in ihrer Gestalt, während die Männchen, die allerdings keine Rolle im epidemiologischen Sinne spielen, in der Regel über artcharakteristische Strukturen ihrer Fortpflanzungsorgane identifiziert werden können (Boorman, 2006; Kampen u. Kiel, 2006). Dabei ist es unvermeidlich, die Gnitzen zur Differenzierung auf Objektträger zu präparieren und zu fixieren (Boorman, 2006). Dieses Verfahren ist sehr zeitaufwendig und erfordert spezielle entomologische Kenntnisse und Fähigkeiten, die nicht ohne Weiteres an unerfahrene Personen vermittelt werden können, zumal eine drohende Epidemie rasches Handeln erfordert (Mordue *et al.*, 2007).

Um die Artendifferenzierung zu vereinfachen und um einen größeren Probendurchsatz realisieren zu können, bedient man sich zunehmend molekular-genetischer Methoden (z.B. PCR und DNS-Sequenzierung) (Kampen u. Kiel, 2006). Darüber hinaus können diese Verfahren einen großen Beitrag zur Forschung auf dem Gebiet der Ermittlung von Larvalhabitaten von *Culicoides*-Gnitzen auf BTD-gefährdeten Höfen leisten (Mordue *et al.*, 2007), indem zum Beispiel aufgefundene Larven bereits auf ihre Art- und Spezieszugehörigkeit mittels PCR untersucht werden können.

Einige Projekte befassen sich gegenwärtig mit der Entwicklung PCR-basierter Methoden zur speziesspezifischen Diagnostik von für die BTB-Epidemiologie relevanten *Culicoides*-Arten. Dabei konzentriert man sich vor allem auf DNS-Sequenzen des mitochondrialen Cytochromoxidase-Gens (COI) (Linton *et al.*, 2002; Nolan *et al.*, 2007) oder der ribosomalen Internal Transcribed Spacers Region (ITS) (Gomulski *et al.*, 2006; Perrin *et al.*, 2006).

Die Entwicklung einer PCR-basierten Methode zur Speziesidentifizierung würde einen entscheidenden Beitrag zur Klärung epidemiologischer Fragestellungen in Bezug auf die Vektoren der Blauzungenkrankheit leisten (Mordue *et al.*, 2007).

Ziel dieser Arbeit war es, im Rahmen des deutschlandweiten, entomologischen Monitorings der Jahre 2007/2008 einen Beitrag zur Erforschung der Gnitzenfauna in Deutschland zu leisten. Ein weiteres Ziel war es, speziesspezifische DNS-Primer zu entwickeln, mit deren Hilfe eine deutliche Erleichterung der Differenzierung von autochthonen hämatophagen *Culicoides*-Individuen mittels PCR-Verfahren ermöglicht werden sollte. Als Zielsequenz zur Etablierung der speziesspezifischen Primer wurde die hochvariable ITS1-Region der nukleären, ribosomalen DNS der Gnitze gewählt (Côte-Sossah *et al.*, 2004; Perrin *et al.*, 2006).

## **2. Literaturübersicht**

### **2.1. Die Blauzungenkrankheit**

Die Blauzungenkrankheit ist eine Tierseuche von Haus- und Wildwiederkäuern, die durch ein Virus hervorgerufen und von Gnitzen übertragen wird (Liebisch u. Liebisch, 2007). Diese nicht-ansteckende Tierseuche kann zu hohen Tierverlusten führen und durch handelseinschränkende Sanktionen indirekt hohen wirtschaftlichen Schaden verursachen (Blackwell *et al.*, 2004). Die Blauzungenkrankheit ist in Deutschland und Europa anzeigepflichtig und wird auch von der Weltorganisation für Tierseuchen (Office International des Epizooties, OIE) als wichtige Tierseuche gelistet (Office Internationale des Epizooties / World Organisation for Animal Health, 2010). Darüber hinaus unterliegt diese Krankheit der staatlichen Tierseuchenbekämpfung und dem Tierseuchengesetz (TierSG, Stand: 22.12.2011), sowie den gesetzlichen Vorgaben zur Bekämpfung der Blauzungenkrankheit, festgelegt in der Verordnung zum Schutz gegen die Blauzungenkrankheit (BlauzungenSchV, Stand: 13.12.2011) und der Verordnung zur Durchführung gemeinschaftsrechtlicher Vorschriften über Maßnahmen zur Bekämpfung, Überwachung und Beobachtung der Blauzungenkrankheit (BlauZKVerschlSchV, Stand: 18.12.2009).

#### **2.1.1. Der Erreger**

Bei dem Virus der Blauzungenkrankheit handelt es sich um ein doppelsträngiges RNS-Virus der Gattung Orbivirus aus der Familie der Reoviridae (Boorman, 2006; Mehlhorn *et al.*, 2008c). Der Serotyp des Virus wird durch das virale Protein VP2 festgelegt (Boorman, 2006). Bislang wurden weltweit 24 verschiedene Serotypen identifiziert, von denen 20 Serotypen allein in Afrika aufzufinden sind (Mehlhorn *et al.*, 2008c). Die Virulenz der einzelnen Serotypen kann sehr unterschiedlich ausgeprägt sein (Werner u. Kampen, 2007). Die BTV-Serotypen 1, 2, 4, 9 und 16 waren bisher verantwortlich für Ausbrüche der Blauzungenkrankheit in Südeuropa (Saegerman *et al.*, 2008). Soweit durch Sequenz-Analysen rekonstruierbar, gelangten die Serotypen 1, 9 und 16 aus dem Nahen Osten, der Serotyp 2 aus Afrika und der Serotyp 4 zunächst von Griechenland, später noch einmal von Marokko über Südspanien und Südportugal nach Europa (Purse *et al.*, 2005).

Der für Europa neuartige Serotyp BTV-8, der bei den Krankheitsfällen Nord- und Mitteleuropas 2006-2008 die Hauptrolle spielte, (Mehlhorn *et al.*, 2008c), war außerhalb Afrikas bisher nur in einigen tropischen Regionen aufgetreten. Der Einschleppungsweg und –zeitpunkt sowie Herkunft dieses Serotyps bleiben rätselhaft (Kampen u. Kiel, 2006). Die größte Ähnlichkeit der Nukleotidsequenz für das virale Protein VP2 kodierende Gen, das den Serotyp auf molekularbiologischem Wege zweifelsfrei festlegt, besteht mit einem Stamm, der 1982 in Nigeria isoliert wurde, so dass sein Ursprung mit größter Wahrscheinlichkeit in Afrika südlich der Sahara zu suchen ist (Enserink, 2006, 2008).

### **2.1.2. Vorkommen**

Ursprung der Blauzungkrankheit ist Südafrika (Erasmus, 1990; Purse *et al.*, 2005). Seither verbreitet sich das Virus auf allen Kontinenten und führte bereits zu Ausbrüchen der BTB in Asien, USA, Australien, Südeuropa und erreichte 2006 schließlich auch Mitteleuropa (Mehlhorn *et al.*, 2008c). In Regionen wie Afrika, dem Nahen Osten, Indien, China, Teilen der USA und Mexiko, in denen der entsprechende Vektor das ganze Jahr über aktiv ist, gilt die BTB als endemisch (Werner u. Kampen, 2007).

### **2.1.3. Symptome**

Das Schaf zeigt im Allgemeinen die deutlichsten Krankheitssymptome, wobei zwischen den verschiedenen Schafrassen Unterschiede bezüglich der Empfänglichkeit für das Blauzungvirus bestehen. Rinder und Ziegen erkranken weniger häufig und zeigen gewöhnlich eine schwächere Symptomatik (Werner u. Kampen, 2007).

Zu den klassischen Symptomen der Blauzungkrankheit gehören die katarrhalische Entzündung der Schleimhäute von Nase und Maul, die aufgrund der vorgestreckten, gestauten und zyanotisch blau gefärbten Zunge zu der Namensgebung für die Erkrankung führten. Des Weiteren zeigen sich eine Coronitis des Kronsaums, sowie Steifheit und Torticollis infolge von Atrophie der Muskelfasern. In empfänglichen Schafherden kann die Morbiditätsrate bis zu 100% und die Mortalität bis zu 80% betragen. Bei Rindern verläuft die Infektion, wie bereits erwähnt, vergleichsweise mild. Es kommt vor allem zu Fieber, Ödemen und

Hämorrhagien im Bereich des Kopfes, Entzündungen der Bindehäute und starkem Tränenfluss, Entzündungen des Flotzmauls, der Lippen und Nasenschleimhaut, Ulzerationen des Zahnfleisches und der Maulschleimhaut sowie Erosionen an den Zitzen (Liebisch u. Liebisch, 2007). Wirtschaftlich problematisch sind vor allem die Fruchtbarkeitsstörungen als Folge einer Infektion mit BTV (Hafner-Marx u. Büttner, 2008). Auffällig an den Infektionen mit BTV-8 ist, dass Rinder, die normalerweise kaum Krankheitssymptome zeigen, bei den derzeitigen Ausbrüchen der Blauzungenkrankheit zum Teil klinisch apparent erkrankten (Kampen u. Kiel, 2006). Ebenso wurde bisher bei keinem anderen BTV-Serotyp eine transplazentare Übertragung beobachtet. Als im Februar 2008 trächtige, nachweislich BTV-freie Färsen aus den Niederlanden nach Nordirland importiert wurden und diese kurz darauf viruspositive Kälber gebären, musste die Möglichkeit einer transplazentaren Übertragung allerdings in Betracht gezogen werden (Wilson u. Mellor, 2009; Oura, 2011).

Die Erkrankungsfälle der BTB treten typischerweise saisonal auf, was auf die Aktivität der übertragenden Gnitzen bei warmer und feuchter Witterung zurückzuführen ist (Liebisch u. Liebisch, 2007).

Aufgrund der Ähnlichkeit der Krankheitssymptome wären folgende Erkrankungen bei Verdacht auf BTB differentialdiagnostisch abzuklären: Maul- und Klauenseuche, Moderhinke, Bovine Virusdiarrhoe, bösartiges Katarrhalfieber und vesikuläre Stomatitis (Werner u. Kampen, 2007).

#### **2.1.4. Nachweis**

Der Nachweis einer Infektion mit der Blauzungenkrankheit kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Der Virusnachweis oder Virusgenomnachweis gelingt aus EDTA-Blut, besser noch Milz- oder Lymphknotenbiopaten. Der Antikörpernachweis erfolgt per ELISA aus Vollblut oder besser Serum. PCR-Verfahren beschleunigen den Probendurchsatz und ermöglichen die Serotypisierung, je nach Fragestellung BTV-8-spezifisch oder Serotyp-übergreifend (Hafner-Marx u. Büttner, 2008).

### 2.1.5. Die Vektoren

Nach einer Infektion entwickelt sich bei Rindern und wildlebenden Wiederkäuern häufig eine bis zu 100 Tage dauernde Virämie (Erasmus, 1990). Gnitzen der Gattung *Culicoides* infizieren sich durch Aufnahme von Blut eines virämischen Wirtstieres. Das Virus vermehrt sich mit einer Replikationsdauer von sechs bis acht Tagen in den Zellen von Mitteldarm und Speicheldrüsen der Gnitze. Bei Temperaturen von 25°C dauert es 10-15 Tage, bis in den Imagines eine ausreichend hohe Virusvermehrung für eine Übertragung stattgefunden hat (Mellor, 1990). Die Übertragung des in den Gnitzen vermehrten Virus ist nach der ersten Infektion der Mücke bereits bei der nächsten und den folgenden Blutmahlzeiten möglich. Einmalig infizierte Mücken bleiben lebenslang Virusträger (Liebisch u. Liebisch, 2007). Vertikale Übertragung, vom adulten Insekt auf die nächste Generation, konnte trotz intensiver Untersuchungen bisher nicht nachgewiesen werden (Mellor, 1990, 2000).

Bis heute sind weltweit sieben Arten von *Culicoides* als Vektoren der BTD anerkannt. Durch experimentelle Infektionsversuche wurden jedoch weitere 17 *Culicoides*-Arten als potenzielle Vektoren eingestuft (Mellor, 2000; Carpenter *et al.*, 2006). Nach umfassenden Untersuchungen sprechen Wilson und Mellor (2009) von 50 *Culicoides* spp. weltweit, welche zur Übertragung des BTV fähig sind. Auch in Deutschland wird die Übertragung des Blauzungen-Virus durch Gnitzen der Gattung *Culicoides* angenommen. Bei dem Ausbruch der BTD in Nordrhein-Westfalen 2006 konnte das Virusgenom in der am häufigsten gefangenen Art, *Culicoides obsoletus*, nachgewiesen werden (Mehlhorn *et al.*, 2007). Diese Untersuchungen legen nahe, dass diese Gnitzenart zu den wahrscheinlichsten Überträgern der BTD in Deutschland zählt (Liebisch u. Liebisch, 2007).

Die Versuche, *Culicoides*-Vektoren per PCR zu ermitteln, werden vor allem dadurch erschwert, dass molekular-genetische Methoden für den Nachweis von BTV-RNS so sensibel sind, dass sie auch dann positive Ergebnisse liefern, wenn es sich nur um BTV-kontaminierte Reste einer Blutmahlzeit im Darm der Gnitze handelt und es nicht zwangsweise zu einer Virusvermehrung im Insekt gekommen ist. Daher ist der Nachweis von BTV per PCR in einer Gnitzenart (Meiswinkel *et al.*, 2007) nicht zwingend beweisend für deren Vektorkompetenz (Wilson u. Mellor, 2008).

### 2.1.6. Bekämpfung

Eine Heilung der Blauzungenkrankheit ist aufgrund ihrer viralen Natur nicht möglich, lediglich die Symptome können behandelt und gegebenenfalls gemildert werden. Eine reine Stallhaltung der empfänglichen Tiere bietet keinen ausreichenden Schutz vor Gnitzenbefall und somit auch nicht vor Übertragung der Blauzungenkrankheit (Bundesministerium für Ernährung Landwirtschaft und Verbraucherschutz, 2010).

Ein Weg zur Eindämmung der Tierseuche ist die Vektorbekämpfung. Bei der Bekämpfung von Gnitzen könnten Tierarzneimittel eingesetzt werden, die bisher zur Bekämpfung anderer Lästlingsinsekten zugelassen sind. Pour-on Präparate oder Ohrmarken mit Pyrethroiden als Wirkstoff zeigten im Labor zwar ausreichende Toxizität gegenüber Gnitzen (Mehlhorn *et al.*, 2008a; Mehlhorn *et al.*, 2008b), andere Studien zeigten jedoch bei den verschiedenen Applikationsformen Unterschiede hinsichtlich der Wirksamkeit im Felde (Carpenter *et al.*, 2007; Liebisch *et al.*, 2008). Derzeit ist jedoch kein Mittel auf dem Markt erhältlich, welches ausdrücklich für die Bekämpfung von Gnitzen zugelassen ist.

Eine zweite Möglichkeit zur Bekämpfung der Blauzungenkrankheit ist die Vakzinierung. In den Jahren 2008 und 2009 wurde in Deutschland eine flächendeckende Impfpflicht bei Rindern, Schafen und Ziegen eingeführt (Bundesministerium für Ernährung Landwirtschaft und Verbraucherschutz, 2010). Die seit Mai 2008 verfügbare inaktivierte Vakzine (BTV-8) für Rinder und Schafe wird seitdem europaweit eingesetzt (Mehlhorn *et al.*, 2008c). Da die Zahl der gemeldeten BTB-Fälle 2008 auf 5.125 und 2009 auf 142 abnahm und eine gute Immunitätslage in den Herden Deutschlands erreicht war, erfolgte die Impfung gegen BTV-8 ab Anfang 2010 auf freiwilliger Basis.

Seit dem Jahr 2010 wurden deutschlandweit keine BTB-Fälle mehr gemeldet (Bundesministerium für Ernährung Landwirtschaft und Verbraucherschutz, 2010). Das für die Untersuchung von Tierseuchen zuständige Friedrich-Löffler-Institut empfiehlt allerdings, die Impfung auf freiwilliger Basis weiterhin fortzuführen. Die Impfkation von 2008/2009 habe zwar eine gute Immunität unter den älteren Rindern erzeugt, jedoch sind heranwachsende Generationen für BTV-8 erneut voll empfänglich. Da auch im Jahr 2010 über diverse BTV-Fälle in verschiedenen europäischen Staaten berichtet wurde (International Society for Infectious Diseases, 2010a, b, f, c, d, e), sollte bei nicht geimpften Jungtieren wenigstens eine Grundimmunisierung angestrebt werden (Friedrich-Loeffler-Institut, 2011c). Auch andere



europäische Wissenschaftler mahnen vor einem möglichen Neuausbruch der Blauzungenkrankheit in zukünftigen Jahren und führen als Hauptprobleme die Impfung auf freiwilliger Basis, sowie fehlende Vakzinen gegen weitere, sich von BTV-8 unterscheidende Serotypen an (Roger *et al.*, 2010; Oura, 2011).

### **2.1.7. Ausbruch der BTB in Mitteleuropa - Geschichtlicher Überblick**

Die Blauzungenkrankheit verursachte seit 1924 regelmäßig Krankheitsfälle auf Zypern. Bis 1998 gab es allerdings nur zwei nennenswerte Seuchenzüge: Von 1956 – 1960 führte BTV-10 zu massenhaften Tierverlusten auf der Iberischen Halbinsel mit etwa 180.000 verendeten Tieren innerhalb der ersten vier Monate, während durch BTV-4 hervorgerufene Krankheitsfälle auf einigen griechischen Inseln in der Ägäis zwischen 1979 – 1980 auftraten (Kampen u. Kiel, 2006; Wilson u. Mellor, 2009). Bereits damals zeigte sich, dass ungeachtet der Seltenheit durch BTV ausgelöster Seuchenausbrüche, die Verbreitung der Blauzungenkrankheit in Südeuropa möglich war und sich europäische Viehherden hoch empfänglich für den Virus der Tierseuche zeigten (Wilson u. Mellor, 2009).

Ursprünglich mit dem afrikanischen Vektor *Culicoides imicola* aus Nordafrika und dem Nahen Osten eingewandert, hatte sich das Blauzungenvirus seit 1998 im Mittelmeerraum ausgebreitet (Kampen u. Kiel, 2006). Es kam immer häufiger zu Seuchenausbrüchen in Mittelitalien, Griechenland, auf den Balearen, Korsika und dem Balkan (Mellor u. Wittmann, 2002). Bis 2005 wurden im Mittelmeerraum bereits fünf Serotypen (BTV-1, -2, -4, -9, -16) nachgewiesen (Kampen u. Kiel, 2006). Da warmes und feuchtes Klima das Überleben der Gnitzen und deren Vermehrung fördert, könnte die globale Erwärmung zu einer weiteren Ausbreitung der Mücken und somit der BTB nach Norden beigetragen haben (Purse *et al.*, 2005). Es ist allerdings auch erwiesen, dass Gnitzen aus Endemiegebieten über hunderte Kilometer mit dem Wind in noch nicht befallene Gebiete verweht werden können (Hafner-Marx u. Büttner, 2008; Wilson u. Mellor, 2009). Die trotz Abwesenheit von *Culicoides imicola* durch BTV-9 verursachten Ausbrüche der Blauzungenkrankheit im Kosovo im Jahr 2001 (Djuricic *et al.*, 2007), wiesen erstmals darauf hin, dass eine Übertragung der BTB auch durch paläarktische *Culicoides*-Gnitzen möglich sein musste (Wilson u. Mellor, 2009).

Im August 2006 wurden BTD-Verdachtsfälle in zwei Schafherden im Grenzgebiet des Dreiländerecks Niederlande, Belgien und Deutschland, gemeldet. Nach Feststellung von klinischen Symptomen, die den Verdacht auf die Blauzungenkrankheit lenkten, erfolgte der Virusnachweis durch das europäische Referenzzentrum in Großbritannien (Institute for Animal Health, Pirbright, UK) (Hafner-Marx u. Büttner, 2008). Bei dem isolierten Virustyp handelte es sich um den Serotyp 8, der zwar bereits im südlichen Afrika, in der Karibik, Südamerika, Indien und Pakistan nachgewiesen wurde, jedoch niemals zuvor in Europa in Erscheinung getreten ist (Werner u. Kampen, 2007). Die Gensequenzdaten dieses Serotyps sprechen für eine Herkunft aus Afrika südlich der Sahara (Kampen u. Kiel, 2006). Trotz umfangreicher Untersuchungen konnte jedoch nicht festgestellt werden, wie der Virus nach Mitteleuropa eingeschleppt wurde (Meiswinkel *et al.*, 2007). Neben illegalen Importen infizierter Tiere wird genauso die Einschleppung von Vektoren über Waren- oder Tiertransporte diskutiert (Friedrich-Loeffler-Institut, 2008).

Bis zum Ende der BTV-Saison 2006 (Februar 2007) traten ca. 980 Fälle auf, gefolgt von mehreren Monaten ohne Neuausbrüche (Hafner-Marx u. Büttner, 2008). Während eine empfängliche Gnitze nach Aufnahme BTV-haltigen Bluts lebenslang infektiös bleibt, ist ein mit BTV infiziertes Wirbeltier maximal 100 Tage virämisch und infektiös für den Überträger. Daher ging man davon aus, dass der Krankheitsherd von selbst wieder erlischt, wenn der Vektor länger als 100 Tage verschwunden war, was in vielen Gebieten Südeuropas üblicherweise im Winter der Fall war (z.B. *C. imicola* in Zentralspanien) (Kampen u. Kiel, 2006).

Am 16. Juni 2007 erfolgte die Meldung zum ersten Fall der Blauzungenkrankheit in der BTV-Saison 2007 östlich von Köln/Bonn. Es handelte sich dabei um die Kuh einer Sentinel-Herde Nordrhein-Westfalens (Wilson *et al.*, 2007). Sentinel-Programme werden zur Überwachung einer Tierseuche eingerichtet. Nachweislich nicht mit BTV-8 infizierte Rindergruppen wurden dazu im Restriktionsgebiet des Erstausbruchs ausgewählt und deren Infektionsstatus mittels monatlicher Blutkontrollen auf BTV-8-Antikörper festgestellt. Anhand von Neuinfektionen konnten auf diese Weise frühzeitig Rückschlüsse auf das Fortschreiten bzw. Wiederaufkeimen der Infektionen mit dem Blauzungenvirus im Restriktionsgebiet gezogen werden (Racloz *et al.*, 2006; Gethmann *et al.*, 2008). Es wurde ermittelt, dass die Infektion des oben erwähnten Tieres bereits Ende April 2007 stattgefunden haben musste. Leider konnte nicht mit Sicherheit festgestellt werden, ob es sich um eine Neuinfektion nach

Überwinterung des Virus, einer iatrogenen Infektion durch beispielsweise eine Impfung, oder eine Reinfektion handelte (Wilson *et al.*, 2007). Im weiteren Jahresverlauf kam es jedoch zu einem explosionsartigen Anstieg der Fallzahlen mit einem Höhepunkt im August. Jeden Monat wurden tausende Neuinfektionen gemeldet – insgesamt erfolgte ein Anstieg auf ein Vielfaches der Fallmeldungen vom Vorjahr (Hafner-Marx u. Büttner, 2008). Bis Ende 2007 wurden fast 60.000 Fälle in den betroffenen europäischen Staaten gemeldet (Wilson u. Mellor, 2009). Die verstärkte Aktivität der Gnitzen im warmen Sommer 2007 und der milde Winter 2007/2008 trugen dabei entscheidend zur Ausbreitung der Seuche bei. Auch in den Wintermonaten erfolgten hunderte neuer Meldungen. Insgesamt wurden bis Anfang März 2008 (Ende der BTV-Saison 2007) allein in Deutschland 22.000 Fälle gemeldet (Hafner-Marx u. Büttner, 2008). Die Möglichkeit einer Überwinterung von Virus und/oder Vektor wurde als immer wahrscheinlicher angesehen (Wilson *et al.*, 2007).

Im Verlauf der Saison drang die Seuche weiter in den Osten und Süden Deutschlands vor, so dass das gesamte Bundesgebiet als Restriktionsgebiet ausgewiesen werden musste. Die Blauzungkrankheit und BTV-8 erreichten weitere europäische Staaten: Im Laufe des Jahres 2007 kamen Nordfrankreich, Luxemburg, Großbritannien (Südosten), Dänemark, Schweiz (Norden) und Tschechien (Westen) hinzu. Das europäische Restriktionsgebiet umfasste bald auch Teile Polens und Österreichs. Insgesamt wurden bis Frühsommer 2008 fast 60.000 diagnostizierte Fälle in Mitteleuropa gemeldet (Hafner-Marx u. Büttner, 2008; Wilson u. Mellor, 2009).

Da das Blauzungenvirus entgegen aller Erwartungen 2006/2007 überwintern konnte und um der Verbreitung der Blauzungkrankheit vom Serotyp 8 Einhalt zu gebieten und weitere Tierverluste zu vermeiden, wurde in Deutschland Mitte Mai 2008 mit der Impfung von Rindern, Schafen und Ziegen begonnen. Hierfür wurden monovalente, d.h. nur gegen BTV-8 gerichtete, inaktivierte Impfstoffe eingesetzt. Um mindestens 80% aller empfänglichen Tiere zu erreichen, mussten alle Halter von Rindern, Schafen und Ziegen ihre Tiere obligatorisch impfen lassen (Friedrich-Loeffler-Institut, 2008). Bis September 2008 konnte laut Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (2008) auf diese Weise eine Immunisierung von 70 % der zu impfenden Rinder und fast 90 % der zu impfenden Schafe und Ziegen erreicht werden.

Während der BTV-8-Saison 2008 (01.05.2008-31.12.2008) wurden in Deutschland insgesamt 3.174 Fälle von Blauzungenkrankheit bei 3.067 Betrieben gemeldet (Friedrich-Loeffler-Institut, 2011a). Diese gemeldeten Fälle stammten vor allem aus Niedersachsen und Baden-Württemberg und betrafen vornehmlich nicht oder noch nicht vollständig geimpfte Tiere, da in diesen Regionen aufgrund Lieferschwierigkeiten des Impfstoff die Impfkampagne erst später eingeleitet wurde (Conraths *et al.*, 2009). Es handelte sich dabei überwiegend um Infektionen mit BTV-8, eingeschleppt durch Importtiere aus Holland (Friedrich-Loeffler-Institut, 2008).

Ende des Jahres 2008 wurden Fälle in den Niederlanden (Oktober 2008) und kurz darauf in Deutschland (November 2008) gemeldet, die einen weiteren, für Europa neuartigen BTV-Serotyp aufwiesen (International Society for Infectious Diseases, 2008a, b). Dieser Virustyp wies Ähnlichkeiten zum Virusstamm der südafrikanischen Lebendvaccine gegen BTV-6 auf (Wilson u. Mellor, 2009; Eschbaumer *et al.*, 2010; van Rijn *et al.*, 2012), über seine Verbreitung, klinische Ausprägung und Überwinterungspotential war zunächst nichts bekannt (Carpenter *et al.*, 2009). Es wurde sofort eine Restriktionszone, einschließlich der entsprechenden wirtschaftlichen Einschränkungen, für die Gebiete mit BTV-6 eingerichtet. Im Laufe des Jahres 2009 wurde diese allerdings wieder aufgehoben (Eschbaumer *et al.*, 2010; Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2011). Nachweislich mit BTV-6 infizierte Tiere bekamen lediglich Fieber, sonstige Symptome im Zusammenhang mit BTD blieben aus. Eine Verbreitung durch heimische Gnizenarten schien nicht stattgefunden zu haben (van Rijn *et al.*, 2012). In Deutschland blieb BTV-6 auf Infektionen bei Tieren eines einzigen Landkreises nahe der niederländischen Grenze im Jahr 2008 beschränkt. Seit dem Jahr 2009 wurden keine weiteren Fälle gemeldet. Die Maßnahmen bezüglich BTV-8 behielten jedoch weiterhin ihre Gültigkeit (Eschbaumer *et al.*, 2010; Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2011).

Im Jahr 2009 wurden in Deutschland nur noch 12 Neuinfektionen und ab dem Jahr 2010 kein einziger neuer Fall der Blauzungenkrankheit gemeldet (Friedrich-Loeffler-Institut, 2011a). Im Februar 2012 erklärte sich Deutschland in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Verordnung (EG) Nr. 1266/2007 Artikel 6 Absatz 2 als frei von der Blauzungenkrankheit, da zwei Jahre lang nachweislich keine Viruszirkulation stattgefunden hat. Gleichzeitig wurde die Restriktionszone für BTV-8 aufgehoben und gemäß Richtlinie 2000/75/EG des Europäischen

Rates das Impfen gegen BTV in Deutschland verboten (Rat der Europäischen Union, 2000; Kommission der europäischen Gemeinschaften, 2007; Friedrich-Loeffler-Institut, 2012b).

Im Laufe des Jahres 2007 erfolgten Meldungen über die Einschleppung weiterer BTV-Serotypen nach Europa. Erste Fälle im Zusammenhang mit BTV-1 wurden im Sommer 2007 aus Spanien gemeldet (International Society for Infectious Diseases, 2007c) und verbreitete sich bis November 2007 über die gesamte Iberische Halbinsel bis in den Südwesten Frankreichs (International Society for Infectious Diseases, 2007a, b). Im November 2008 konnte BTV-1 bereits weiter nordwärts in der Bretagne nachgewiesen werden und es wurde befürchtet, dass BTV-1 nach BTV-8 eine weitere Bedrohung für West- und Nordeuropa darstellen könnte (International Society for Infectious Diseases, 2008c; Wilson u. Mellor, 2009). Neben der Feststellung von BTV-6 in den Niederlanden (International Society for Infectious Diseases, 2008a, b) wurde ein dritter, für Europa neuartiger BTV-Serotyp (BTV-11) in Belgien im Januar 2009 ermittelt (International Society for Infectious Diseases, 2009), welcher ebenfalls Ähnlichkeiten zum Virusstamm der entsprechenden südafrikanischen Lebendvaccine aufwies (Wilson u. Mellor, 2009).

Das Seuchengeschehen in Mitteleuropa im Zusammenhang mit BTV-8 Serotyp verursachte den wirtschaftlich größten Schaden in der Geschichte der Blauzungenkrankheit in Europa (Wilson u. Mellor, 2008; 2009).

## 2.2. Gnitzen als Überträger der Blauzungenkrankheit

Als wichtigster und effizientester Vektor des Blauzungenvirus galt bislang *Culicoides imicola*. Diese Wärme liebende Gnitze war ursprünglich nur in Afrika und Südostasien beheimatet und vor allem verantwortlich für die Ausbrüche der Blauzungenkrankheit im Mittelmeerraum. Sie hat sich inzwischen in weiten Teilen Südeuropas etabliert (Kampen u. Kiel, 2006). Seit den neuesten BTD-Ausbrüchen in Mitteleuropa werden nun die folgenden Gnitzenarten als mögliche Vektoren der Blauzungenkrankheit angesehen: der afro-asiatische Hauptvektor *C. imicola* (bisher nur in Südeuropa) und die paläarktischen autochthonen Spezies *C. dewulfi*, *C. obsoletus*, *C. scoticus* und *C. pulicaris* (Mellor u. Pitzolis, 1979; Ortega *et al.*, 1998; Caracappa *et al.*, 2003; Savini *et al.*, 2003; De Liberato *et al.*, 2005; Meiswinkel *et al.*, 2007).

Das Potential heimischer Gnitzen als Überträger des Blauzungenvirus deutete sich bereits 1979 an, als während des BTV-4 Seuchenausbruchs auf Zypern von ungesogenen, paren (d.h. es erfolgte bereits mindestens eine Eiablage) *C. obsoletus*-Weibchen Blauzungenvirusgenom isoliert werden konnte (Mellor u. Pitzolis, 1979). Als sich in den 80er Jahren bei weiteren *Culicoides*-Arten Viruskompetenz im Labor bestätigte (Jennings u. Mellor, 1988), deutete sich die Gefahr der Verbreitung der Blauzungenkrankheit nach Norden durch heimische Gnitzen bereits an (Mellor u. Boorman, 1995). Purse *et al.* (2005) warnten zudem, dass im Rahmen des Klimawandels *C. imicola* bald weiter nordwärts anzutreffen sein dürfte.

Da in zahlreichen entomologischen Untersuchungen der betroffenen europäischen Länder *C. imicola* nie gefangen wurde, werden für die jüngsten Ausbrüche in Deutschland und die angrenzenden Länder hauptsächlich autochthone Gnitzen des *C. obsoletus*- und *C. pulicaris*-Komplexes als Überträger diskutiert (Mehlhorn *et al.*, 2008c), welche bis ins südliche Nordeuropa (70° nördliche Breite) vorkommen (Kampen u. Kiel, 2006). Ihre räumliche Verbreitung innerhalb Europas bietet eine Erklärung für das Auftreten von BTV-Infektionen außerhalb der ursprünglichen Verbreitungsgebiete *C. imicolae* (Wilson u. Mellor, 2008). Die tatsächliche Vektorkompetenz dieser Gnitzenarten ist zwar noch nicht belegt, doch zeigen sie sich in Infektionsversuchen genauso empfänglich für BTV wie *C. imicola* (Carpenter *et al.*, 2006). Aus südeuropäischen Freilandfängen beider Gruppen konnte das Blauzungenvirus wiederholt isoliert werden (Caracappa *et al.*, 2003; Savini *et al.*, 2003). Eine möglicherweise geringere Vektorkompetenz würde vermutlich durch die allgemein hohen Abundanzen der verschiedenen Arten in Europa kompensiert werden. Im Oktober 2006 wurde während niederländischer Studien das BTV in einem Pool von *C. dewulfi* nachgewiesen (Meiswinkel *et al.*, 2007). Da diese Spezies bisher noch nie mit der Übertragung von BTV in Verbindung gebracht wurde, zeigt dieser Befund, dass in Mitteleuropa vermutlich noch andere *Culicoides*-Arten als in Südeuropa an der Übertragung des BTV beteiligt sein dürften (Kampen u. Kiel, 2006).

### 2.2.1. Gnitzenarten und Vorkommen

Die *Ceratopogonidae* sind eine Gruppe kleiner Stechmücken (auch Gnitzen oder Gnitten genannt), die bis auf die Arktis und Antarktis, Neuseeland, Patagonien (Süd-Südamerika) und die Hawaii-Inseln weltweit verbreitet sind. Gnitzen leben sowohl in tropischen als auch

gemäßigten Regionen (Mordue *et al.*, 2007). *Culicoides*-Gnizen gehören zur Familie der *Ceratopogonidae* in der Ordnung der Dipteren. Die Gnizen innerhalb dieser Familie sind in fünf Unterfamilien und ca. 133 Gattungen (davon 24 fossile) eingeteilt. Weltweit sind 1348 *Culicoides*-Spezies (davon 44 fossile) beschrieben (Flytree, 2008), 128 *Culicoides*-Spezies in Europa und 51 davon allein in Deutschland (Fauna Europaea, 2010). Die systemische Einordnung der Imagines wird durch die Entomologen verschiedener Länder und Arbeitsgruppen zum Teil bis heute unterschiedlich vorgenommen. Es existieren viele Synonyma in den verschiedenen Sprachbereichen (Liebisch u. Liebisch, 2007). Weltweit enthalten vier Gattungen blutsaugende Gnizen, deren Wirte Säugetiere sind, wobei *Culicoides* davon die größte Bedeutung für Nutztiere hat. Die übrigen Gattungen saugen Körperflüssigkeiten anderer Insekten. Gut 50 *Culicoides*-Spezies gelten weltweit als Vektoren für Parasiten oder Pathogene für Mensch und Tier (Blackwell *et al.*, 2002).

Die in Deutschland vorkommenden Arten der Gnizen und ihre Biologie sind nur unzureichend bekannt (Liebisch u. Liebisch, 2007). Die Mehrzahl der blutsaugenden *Culicoides*-Arten sind weit verbreitet und können in geeigneten Lebensräumen und unter adäquaten Entwicklungsbedingungen extrem hohe Populationsdichten erreichen (Kampen u. Kiel, 2006).

Die zahlenmäßig größte *Culicoides*-Gruppe wird europaweit von Vertretern des *C. obsoletus*-Komplexes gestellt, gefolgt von Vertretern des *C. pulicaris*-Komplexes (Sarto i Monteys u. Saiz-Ardanaz, 2003; Madder *et al.*, 2006; Mehlhorn *et al.*, 2008c). Carpenter *et al.* (2008) untersuchten die Vektorkompetenz der Gnizenarten *C. obsoletus*, *C. dewulfi*, *C. chiopterus* und *C. dewulfi* und bewiesen die Fähigkeit von *C. scoticus* zur Virusreplikation von BTV-8. Sie lieferten somit einen ersten stichhaltigen Hinweis auf die Vektorkompetenz dieser *Culicoides*-Spezies im Zusammenhang mit der BTD-Epidemie Nord- und Mitteleuropas. Ihre Ergebnisse zu *C. obsoletus*, *C. dewulfi* und *C. chiopterus* bewerteten sie als nicht sehr aussagekräftig, da nur wenige Exemplare dieser Spezies für die Infektionsversuche zur Verfügung standen und somit weiterer Forschungsbedarf besteht.

### 2.2.2. Entwicklung und Biologie

Bislang wurden die Gnitzen in der Forschung vernachlässigt, da man annahm, dass sie als Vektoren von Krankheiten in unseren Breiten keine große Rolle spielen. Daher ist die Zahl der Veröffentlichungen, die sich mit der Gnitze beschäftigen, eher klein und das Wissen um ihre Biologie höchstens rudimentär und auf einige wenige Standorte beschränkt (Mehlhorn *et al.*, 2008c).

Unabhängig von der Spezies haben alle Gnitzen den selben holometabolen Lebenszyklus bestehend aus Eistadium, vier Larvenstadien, einer kurzen Puppenphase und dem kurzlebigen, adulten Insekt (Eichler, 1980; Mordue *et al.*, 2007). Die Habitate und Brutbiotope der Gnitzen sind sehr vielgestaltig (Liebisch u. Liebisch, 2007).

Die meisten Gnitzenarten bilden eine Generation aus, einige jedoch abhängig von den lokalen Gegebenheiten mehrere Generation pro Jahr (Boorman, 2006).

#### ***Ei- und Larvalstadium***

Die Bruthabitate sind je nach Gnitzenart unterschiedlich und reichen von feuchter Erde in Nähe von Sümpfen oder Marschen, Humus, Dung und Gülle über Baumhöhlen bis zu am oder im Wasser wachsenden Pflanzen, Pfützen und Gräben oder Sandböden in Meeresnähe (Kampen u. Kiel, 2006). Jede Gnitzenart hat sich dabei auf ein bestimmtes Brutmedium spezialisiert und legt ihre Eier selten woanders ab (Kettle, 1984). Die bevorzugten Brutgebiete von *C. obsoletus s.s.* beispielsweise liegen in der Nähe von Schaf- oder Rinderstallungen (Mehlhorn *et al.*, 2008c), während die als BTD-Vektor diskutierte Gnitzenart *C. dewulfi* vornehmlich im Kuhdung selbst brütet (Kettle u. Lawson, 1952). Zu regionaler Abundanz und saisonaler Aktivität von *C. dewulfi* gibt es bisher nur wenig Informationen (Meiswinkel *et al.*, 2007).

Die 0,15 – 0,3 mm großen, länglichen Eier mit dünner, formenreicher Schale werden innerhalb der Gattung *Culicoides* einzeln bzw. in lockeren Gruppen abgelegt (Werner u. Kampen, 2007). Die anfangs weißen Eier verfärben sich, sofern sie befruchtet sind, nach ungefähr 15 Minuten schwarz (Boorman, 2006). Aus dem Ei schlüpft, in Abhängigkeit von



der Temperatur, nach drei bis sieben Tagen, es werden auch Zeiten von Stunden bis zu vier Wochen angegeben, die Erstlarve (Eichler, 1980).

Alle *Culicoides*-Larven benötigen für ihre Entwicklung Brutmedium mit einer gewissen Feuchtigkeit (Boorman, 2006). Sie bewohnen außerdem unterschiedliche Habitate. Viele Larven leben aquatisch in sauberen Quellen, andere in Jaucheansammlungen oder auch terrestrisch in organischem Material wie Dunghaufen oder unter Baumrinde (Liebisch u. Liebisch, 2007). Die Larven graben sich in die Oberfläche des Substrats und sind nur selten freischwimmend aufzufinden (Kettle, 1984). Die vier Larvenstadien werden je nach Klima in 2 – 10 Wochen durchlaufen (Eichler, 1980), wobei die Larven eine Größe von 4 – 7 mm erreichen können (Werner u. Kampen, 2007). Dabei ernähren sie sich von Pilzen, Algen oder abgestorbenen Pflanzenteilen (Kampen u. Kiel, 2006).

In gemäßigten Klimazonen überwintern viele Arten im vierten Larvalstadium (Kampen u. Kiel, 2006), da in diesem Stadium die Fress- und Wachstumsphase leicht verkürzt oder verlängert werden kann (Werner u. Kampen, 2007). Dieses Larvalstadium kann sich so auf mehrere Monate verlängern (Kampen u. Kiel, 2006).

Untersuchungen in Belgien zeigten, dass Larven vor allem die oberen Schichten feuchter Biotope bevorzugen. So wurden Larven von *C. obsoletus* und *C. scoticus* massenhaft in Maissilageresten gefunden, während *C. dewulfi* und *C. chiopterus* in Kuhdung brüten und überwintern. Die Bruthabitate dieser, als BTV-Vektoren diskutierten Gnitzen liegen demnach in unmittelbarer Nachbarschaft zu Stallungen (Kettle, 1984; Zimmer *et al.*, 2008).

Vermutlich ist es aber der vermeintlich geringen Bedeutung der Gnitze und der großen morphologischen Ähnlichkeiten der Larven der verschiedenen Arten geschuldet, dass es trotz allem bisher wenigen Forschern gelungen ist, *Culicoides* Larven zufriedenstellend zu studieren, so dass nach wie vor zu wenig über Larvalhabitate, Abundanz und Populationsdynamik der einzelnen Spezies bekannt ist (Kettle u. Lawson, 1952; Blackwell *et al.*, 1994; Carpenter *et al.*, 2001).

### ***Puppenstadium***

Die Dauer des Puppenstadiums wird mit 4 – 7 Tagen angegeben (Eichler, 1980). Die 2 – 4 mm großen Puppen finden sich in Einstreu oder sie schwimmen, oft in Ansammlungen, auf freien Wasseroberflächen ihrer Bruthabitate (Eichler, 1980; Boorman, 2006; Werner u. Kampen, 2007). Sie haben einen kompakten Bau, sind gelb-braun bis schwarz gefärbt mit kurzen Hörnchen am Kopfende (Werner u. Kampen, 2007).

### ***Imago***

Die Imagines der *Culicoides*-Gnitzen zählen zu den kleinsten Insekten mit einer Flügelspannweite von nur ein bis zwei Millimetern (Eichler, 1980). Die Männchen schlüpfen im Allgemeinen vor den Weibchen und sind innerhalb von Minuten begattungsfähig (Kettle, 1984). Die adulten Gnitzen halten sich nach dem Schlupf oft in der Nähe der Larvalhabitate auf, wobei sich die Männchen vieler Arten an Bäumen, Büschen oder freistehender Ufervegetation zu Schwärmen zusammen finden (Werner u. Kampen, 2007). Gleich nach dem Schlupf der adulten Insekten erfolgt die ein- oder mehrmalige Begattung, entweder während des Schwärmfluges der männlichen Gnitzen in der Abenddämmerung oder auf den Wirtstieren, wobei die weiblichen Gnitzen ein Pheromon zur Partnerfindung aussenden (Eichler, 1980; Werner u. Kampen, 2007).

Die adulten männlichen, und bei einigen Arten auch die weiblichen Gnitzen, ernähren sich von Pflanzensäften (bevorzugt Doldengewächse, lat. *Umbellifera*) (Boorman, 2006). Allerdings benötigen die meisten Weibchen zur Einleitung und Durchführung der Oogenese das nährstoffreiche Blut von Säugern oder Vögeln (Kampen u. Kiel, 2006). Der ovarielle Zyklus der Gnitze dauert im Sommer bis zu vier Tage (Kettle, 1984).

Manche Gnitzenarten haben eine, andere mehrere Generationen pro Jahr. Der gesamte Entwicklungszyklus dauert beispielsweise bei *Culicoides nubeculosus* bei Zimmertemperatur 50 – 60 Tage (Eichler, 1980). Über den Entwicklungszyklus von *C. nubeculosus* ist am meisten bekannt, da es gelang, sie unter Laborbedingungen zu halten und zu vermehren (Fahrner u. Barthelmess, 1988). Zu regionaler Abundanz und saisonaler Aktivität anderer *Culicoides*-Gnitzen gibt es bisher allerdings nur wenig Informationen (Meiswinkel *et al.*, 2007).

Viele der blutsaugenden Gnitzen sind hauptsächlich während der Dämmerung und den Nachtstunden aktiv (Mehlhorn *et al.*, 2008c). Tagsüber halten sich die adulten Insekten im Gras oder anderen schattigen Verstecken auf (Eichler, 1980). Die Gnitzen fliegen vornehmlich in den Monaten März bis November, wobei einzelne Individuen auch im Dezember und Januar noch gefangen wurden (Mehlhorn *et al.*, 2008c). Dabei entfernen sich die Imagines fliegend nur eine geringe Strecke von ihren Bruthabitaten (Kettle, 1984), können allerdings mit dem Wind über mehrere (hundert) Kilometer verweht werden (Liebisch u. Liebisch, 2007; Hafner-Marx u. Büttner, 2008).

Adulte Gnitzen haben je nach Klimabedingungen eine Lebensdauer von einer Woche bis zu mehr als einem Monat. Unter Laborbedingungen überleben *C. obsoletus*-Weibchen sogar bis zu drei Monaten (Goetghebuer u. Lenz, 1934; Mellor *et al.*, 2000; Boorman, 2006). Die meisten Gnitzen sterben in der Regel mit Einbruch der kalten Jahreszeit, wobei einzelne Individuen auch im Dezember und Januar noch gefangen wurden (Boorman, 2006; Mehlhorn *et al.*, 2008c).

### ***Blutmahlzeit***

Hämatophage Gnitzen sind für die Eiproduktion auf nährstoffreiches Wirbeltierblut angewiesen. Je nach Gnitzenart bevorzugen einige adulte Insekten zur Blutaufnahme die Abenddämmerung oder erste Nachthälfte, während andere am Morgen ihre Wirtsspezies aufsuchen (Kampen u. Kiel, 2006). Bei wenigen Gnitzenarten ist die erste Eiproduktion auch ohne Blutmahl möglich, allerdings benötigen sie für alle folgenden Eiablagen zwingend eine Blutmahlzeit. Diese Strategie garantiert das Überleben der Population in Zeiten von Wirtstiermangel (Kettle, 1977).

Die Weibchen fliegen im Zickzack-Flug um den Wirt (Eichler, 1980) und verschwinden sofort in der Tiefe des Haarkleides, um dort zu stechen (Liebisch u. Liebisch, 2007). Jede Gnitzenart favorisiert bestimmte Körperregionen für ihre Blutmahlzeit. So bevorzugt *C. obsoletus* vor allem den Bauch von Rindern, *C. punctatus* fliegt sowohl Bauch als auch Rücken des Rindes an und *C. chiopterus* ist fast nur an den Beinen zu finden (Nielsen, 1971). *C. obsoletus* und *C. chiopterus* scheinen ihre Wirtstiere dabei vor allem von unten anzufliegen (Kettle, 1977).

Die hochspezialisierten Mundwerkzeuge der weiblichen Gnitze schneiden die Haut wie eine Schere ein, bis sich ein kleiner Blutstropfen bildet, den die Gnitze dann aufnimmt. Der Speichel der Gnitze enthält Antikoagulantien und vermeidet eine frühzeitige Blutstillung. Der Wirtskörper reagiert auf diese Wunde durch Ausschüttung von Histamin, wodurch eine charakteristische Schwellung entsteht und starker Juckreiz auftritt (Blackwell *et al.*, 2002). Bleibt die Gnitze ungestört, dauert der Saugakt 3 – 4 (Blackwell *et al.*, 2002), oft auch bis zu 15 Minuten, wobei die Gnitze mehrmals einsticht (Eichler, 1980). Je nach Gnitzenart können so bis zu zwei Mikroliter Blut aufgenommen werden (Blackwell *et al.*, 2002). Die Weibchen suchen je nach Verfügbarkeit den Wirt alle drei bis vier Tage für eine Blutmahlzeit auf (Birley u. Boormann, 1982).

### ***Wirtstierpräferenzen***

Mehrere Studien haben sich mit der Wirtstierpräferenz von Gnitzen beschäftigt (Humphrey u. Turner, 1973; Koch u. Axtell, 1979; Schmidtman *et al.*, 1980; Bartsch *et al.*, 2009). Sie bevorzugten dabei Lockfallen mit einer großen Vielfalt wilder und domestizierter Wirtstiere: verschiedene Geflügelarten, Ratten, Waschbären, Opossums, diverse kleine und große Wiederkäuer und Ponys. Andere Studien nutzten Duftmarken dieser Wirte als Lockstoff für ihre Fallen (Mands *et al.*, 2004). Ein weiterer Ansatz zur Bestimmung von Wirtstierpräferenzen von Gnitzen ist die Identifikation ihrer Blutmahlzeit mittels ELISA (Blackwell *et al.*, 1994) oder mittels PCR mit wirtsblutspezifischen Primern (Bartsch *et al.*, 2009).

Die Wirtstiere weiblicher *Culicoides*-Gnitzen sind je nach Art Säugetiere oder Vögel (Blackwell *et al.*, 2004). Mehrere Gnitzenarten saugen nachweislich nicht nur an einer Wirbeltierspezies. Liebisch und Liebisch (2007) fanden an Pferden unter gut 5600 gefangenen Gnitzen 13 Spezies, die auch Rinder zur Blutmahlzeit aufsuchten. Davon waren vier Arten (*Culicoides dewulfi*, *C. chiopterus*, *C. obsoletus s.s.* und *C. scoticus*) bei beiden Wirtstierspezies am häufigsten vertreten. Es ist weiterhin bekannt, dass *Culicoides*-BTD-Vektoren trotz Bevorzugung von Rindern und anderen großen Wirbeltieren auch Schafe als Wirte akzeptieren und so die Infektion von Schafherden über den Reservoirwirt Rind unterhalten werden. Allen Studien und den untersuchten Gnitzenspezies gemein war, dass größere Wirtstiere eher angefliegen wurden als kleinere, mit Bevorzugung von Rindern, und

dass kaum Präferenzen hinsichtlich Wildtieren zu beobachten waren (Mordue *et al.*, 2007; Bartsch *et al.*, 2009).

### 2.2.3. Fangmethoden

Es gibt unterschiedliche Methoden, um adulte Gnitzen zu fangen. Die einfachste Art beruht auf dem Abstreifen oder Fangen der Gnitzen mittels eines engmaschigen Netzes. Mundbetriebene Aspiratoren eignen sich zwar, um Gnitzen lebend im Flug oder direkt aus dem Fell der Wirtstiere zu sammeln (Jones, 1978; Liebisch *et al.*, 2008), jedoch ist mit ihnen das Sammeln einer größeren Anzahl von Gnitzen kaum möglich.

Um die Präferenz und Interaktion mit einem Wirt zu studieren, eignen sich so genannte „drop-traps“ (engl. „Käfig-Fallen“). Dabei wird ein potenzielles Wirtstier (beispielsweise Schaf oder Rind) in eine mit Netzen präparierte Käfigvorrichtung gebracht und die Netze nach einer Eingewöhnungsphase herabgelassen. Alle auf dem Wirtstier befindlichen Gnitzen können nun am Tier oder an der Innenseite der Netze abgesammelt und differenziert werden. Intervallweise während eines Tages betrieben, können so Anflugverhalten und Ruhephasen der Gnitzen studiert, sowie das Spektrum der verschiedenen Gnitzenarten und ihr jeweiliger Tagesrhythmus erfasst werden (Jones, 1978).

Viele *Culicoides*-Arten werden von Lichtfallen angezogen, daher bietet sich dieser Fallentyp am ehesten an, um eine allgemeine Übersicht über die Gnitzen-Fauna eines Habitats zu erhalten (Boorman, 2006). Zu beachten ist, dass lichtbetriebene Fallen nur dämmerungs- oder nachtaktive Insekten anlocken und fangen, tagaktive Vektoren dagegen unberücksichtigt bleiben. Aus diesem Grund gehören Gnitzenarten, welche nachts in sehr geringen Zahlen gefangen wurden, nicht zwangsweise einer regional selten vorkommenden Spezies an. Darüber hinaus können Lichtfallenfänge bei Inbetriebnahme über einen längeren Zeitraum von mehreren Monaten oder noch besser Jahren einen Hinweis auf die Saisonalität der Arten am Standort der Falle liefern (Jones, 1978).

Bei Lichtfallen gilt, je heller die Lichtquelle strahlt, desto mehr Insekten werden angelockt und desto zeitaufwendiger wird die Differenzierung der Fangprobe. Schwarz(UV-)licht oder Quecksilberdampfleuchten haben sich als besonders effektiv erwiesen, wobei Schwarzlicht-Leuchten für Feldversuche besser geeignet sind, da sie notfalls auch per Batterie betrieben

werden können. Die Insekten können lebend in einem Netzsäckchen oder tot in 70%igem Alkohol, Wasser oder 0,9%iger Salzlösung (mit ein paar Tropfen Spülmittel zur Brechung der Oberflächenspannung des Wassers bzw. der Lösung) gefangen werden. Die Fangproben sollten möglichst früh am nächsten Tag entnommen werden, da sich die Insekten bei warmem Wetter schnell zersetzen. Etwas Formalin (2%ig) im Wasser kann diesem Effekt entgegenwirken, allerdings bewirken höhere Konzentrationen an Formalin einen für Insekten repellierenden Effekt. Auch Alkohol eignet sich zur Aufbewahrung von Insekten sehr gut, zudem ist der Umgang damit angenehmer als mit einer Formalin-Lösung. Eine auf Alkohol basierende Probe hat allerdings den Nachteil, dass die Insekten darin mit den Jahren dunkler und zerbrechlicher werden und dann weitere Manipulation und Untersuchungen an ihnen unmöglich werden (Boorman, 2006).

Kohlendioxid(CO<sub>2</sub>)-Fallen, bestückt mit Trockeneis, bieten sich an, um auch tagaktive Gnitzen zu fangen. Allerdings spielen dann Windgeschwindigkeit und -richtung sowie Verflüchtigungsrate des Trockeneises eine wesentliche Rolle (Jones, 1978).

Einen weiteren Fallentyp stellen Schlupf-Fallen dar. Diese Bodenfallen werden über ein potenzielles Puppenhabitat positioniert, so dass alle Insekten, die in diesem Bereich schlüpfen, aufgefangen werden. Mit diesen Fallen kann man die besten Aussagen zu Schlupfgebieten und -zeitpunkten machen (Jones, 1978; Braverman u. Mumcuoglu, 2008).

#### **2.2.4. Morphologische Differenzierung**

Von anderen Insekten unterscheidet man die Gnitze allein schon durch ihre Größe von nur 0,5 – 4 mm je nach Art (Mehlhorn *et al.*, 2008c). Weitere Merkmale sind der dorsal gewölbte Rücken, die langen vielgliedrigen Antennen, die kurzen, nach unten gerichteten, stechenden Mundwerkzeuge der Weibchen, die kurzen Vorderbeine und die typische Äderung sowie charakteristisch dunkle Zeichnung der fein behaarten Flügel, welche sie in Ruhe oder bei der Blutmahlzeit scherenartig übereinander falten (Eichler, 1980; Boorman, 2006; Liebisch u. Liebisch, 2007).

Gnitzen weisen einen ausgeprägten Geschlechtsdimorphismus auf. Die Weibchen besitzen nur leicht behaarte Antennen und ein gedrungenes Abdomen, welches gegebenenfalls sichtbar mit Blut und/oder Eiern gefüllt ist, sowie relativ breite und je nach Art deutlich gemusterte

Flügel. Die Männchen verfügen hingegen über stark gefiederte Antennen und ein eher längliches Abdomen. Ihre Fortpflanzungsorgane sind deutlich am hinteren Ende des Abdomens zu erkennen. Ihre Flügel sind im Vergleich zu denen der Weibchen schmal und je nach Art schwächer gezeichnet (Delécolle, 1985; Boorman, 2006).

Die Artbestimmung bei Gnitzen erfolgt klassischerweise unter dem (Stereo-) Mikroskop anhand morphologischer Merkmale (Kampen u. Kiel, 2006), wobei die Flügelzeichnung zur groben Differenzierung der Arten oder Artkomplexe herangezogen werden kann (Mehlhorn *et al.*, 2008c). Allerdings handelt es sich, wie bei vielen anderen Vektorgruppen auch, bei *C. imicola*, *C. obsoletus* und *C. pulicaris* um Artenkomplexe von mehreren nah verwandten Spezies (Zwillingsarten), die in einigen Entwicklungsstadien morphologisch nicht voneinander zu unterscheiden sind. Insbesondere die Weibchen vieler Artkomplexe sind nahezu einheitlich in ihrer Gestalt, während die Männchen in der Regel über artcharakteristische Strukturen ihrer Fortpflanzungsorgane identifiziert werden können (Kampen u. Kiel, 2006).

Die sichere Identifikation der verschiedenen Gnitzenspezies erfordert daher spezielle entomologische Kenntnisse und Fähigkeiten, die bei einem intensiven Monitoring im Falle einer Epidemie nicht problemlos an unerfahrene Mitarbeiter vermittelt werden können (Mordue *et al.*, 2007).

### **Präparation**

Zur korrekten Artdifferenzierung werden die Gnitzen auf Objektträgern präpariert und fixiert. Mit etwas Erfahrung können einige adulte Individuen auch ohne Fixierung mittels des Stereomikroskops differenziert werden. Der Großteil der Arten muss jedoch sorgfältig präpariert werden (Boorman, 2006). Vertreter des *C. obsoletus*-Komplexes sind beispielsweise nur anhand der Fortpflanzungsorgane der männlichen Gnitzen zu unterscheiden (Mordue *et al.*, 2007).

Das Mittel der Wahl zur dauerhaften Fixierung von Gnitzen ist Kanada-Balsam. Allerdings dauert es einige Zeit, bis das Präparat getrocknet ist (Wochen bis Monate) und der Balsam dunkelt mit der Zeit nach (Boorman, 2006).

Die Präparationsmethode der Wahl wurde von Wirth und Marston (1968) entwickelt und beruht auf dem dehydrierenden und aufhellenden Effekt von Phenol. Die Gnitze wird in einer Alkohol-Phenol-Lösung gebadet bis sie ausreichend dehydriert ist und ihre Chitin-Strukturen aufgehellt sind. Danach wird das Individuum auf einem Objektträger mittels einer Phenolalkohol-Kanadabalsam-Mischung fixiert und präpariert. Das Phenol verdunstet sehr langsam und erlaubt so die schonende Aushärtung des Kanadabalsams. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass alle Teile der Gnitze in einem Arbeitsschritt präpariert werden können: Die Chitinstrukturen bleiben elastisch und leicht zu präparieren, die Haare und Antennen brechen nicht so leicht ab und die feinen Flügel müssen nicht separat behandelt werden.

Nachdem das Präparat genügend getrocknet ist, kann die Differenzierung mittels Stereo- bzw. Lichtmikroskop erfolgen. Dunkelfeld-Mikroskopie kann angewandt werden, um die feine Zeichnung der Flügel deutlicher hervorzuheben (Boorman, 2006). Die wichtigsten Charakteristika zur Identifizierung der Gnitzenart werden im Folgenden beschrieben.

### ***Merkmale des Kopfes***

Getrennte (*C. punctatus*) oder an der Mittellinie zusammenstoßende Augen (*C. pulicaris*) sind ein Kriterium zur Unterscheidung mancher Arten, die „Behaarung“ (winzige Borsten zwischen den einzelnen, gleichgroßen Facetten) der Augen ein weiteres (*C. chiopterus*) (Kettle, 1984; Delécolle, 1985; Boorman, 2006; Werner u. Kampen, 2007).

Die Antennen der Gnitzen bestehen aus 13 (Weibchen) bis 15 Segmenten (Männchen) und setzen sich zusammen aus Schaft, Stiel und 11 - 13 unterschiedlich langen Flagellen; das Männchen weist zehn lange und drei kurze Flagellen auf, wobei die Segmente 1 – 8 mit quirlig angeordneten Borsten gefiedert sind; das Weibchen besitzt fünf verlängerte Basisglieder und eine nur leichte Behaarung der Segmente. Die verschiedenen flagellaren Segmente beherbergen wiederum sensorische Organe, deren Ab- oder Anwesenheit und Anzahl ebenfalls zur Speziesidentifizierung herangezogen werden (Kettle, 1984; Delécolle, 1985; Boorman, 2006; Werner u. Kampen, 2007).

Die Form der fünfgliedrigen Palpen (vor allem des dritten Segments) und die Länge des Stechrüssels (Proboscis) sind genauso zu berücksichtigen, wie die Anordnung der

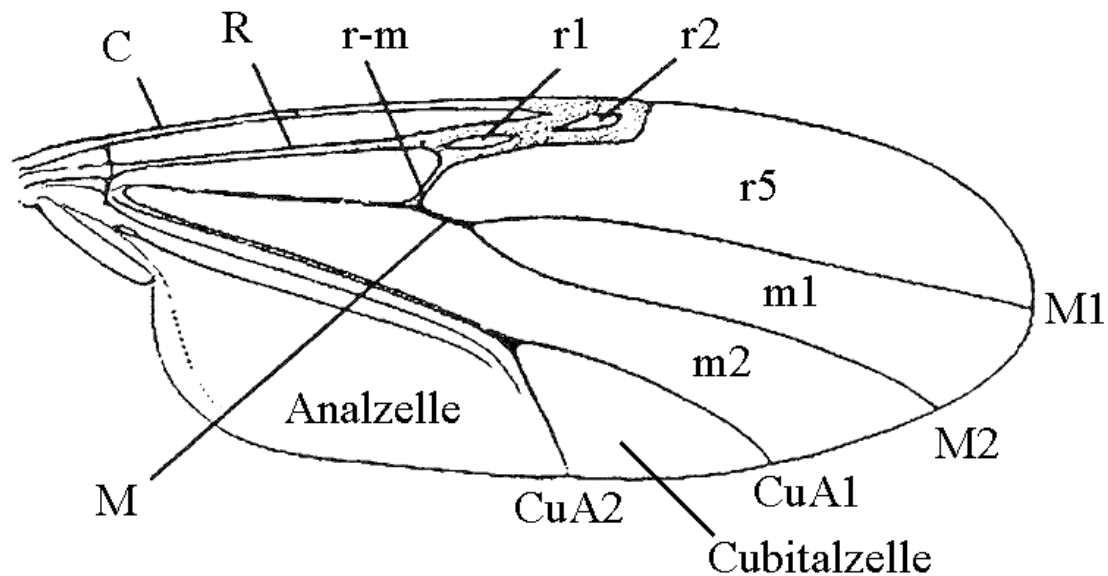


sensorischen Organe (Sensillae) in Nestern (*C. pulicaris*-Komplex) oder sensorischen Gruben (*C. obsoletus*-Komplex) des dritten Segments. Der Stechrüssel zeigt bei allen Gnitzen den gleichen Aufbau aus Epipharynx, Maxille, Mandibel, Hypopharynx und Labium. Der Stechapparat der blutsaugenden Weibchen weist als Besonderheit eine steife Oberlippe (Labrum) sowie sägeartige Mandibeln auf. Der Saugapparat der Männchen ist durch eine weiche, flexible Oberlippe und reduzierte Mundwerkzeuge charakterisiert (Kettle, 1984; Delécolle, 1985; Boorman, 2006; Werner u. Kampen, 2007).

### ***Merkmale des Thorax***

Die Mittelbrust (Mesonotum) der Gnitze kann einfach und ungezeichnet oder mit typischen dunklen Zeichnungen versehen sein (Boorman, 2006).

Die Flügel bilden ein Haupt-Differenzierungsmerkmal der Gnitzen. Auch hier besteht ein Sexualdimorphismus mit breiten, gegebenenfalls deutlich gezeichneten Flügeln bei den Weibchen und eher schmalen, mitunter schwächer gezeichneten Flügeln bei den Männchen. Die Äderung ist typisch und einfach gehalten mit kräftigen vorderen Adern (Costalader, Radialader), zwei Radialzellen und einer gegabelten Mittelader (Abb. 1). Mikrotrichien sind manchmal dicht und flächendeckend ausgebildet, gelegentlich fehlen sie ganz. Die Abwesenheit oder Ausprägung von dunkel pigmentierten Flecken ergibt die Flügelmusterung und ist artspezifisch (Kettle, 1984; Delécolle, 1985; Boorman, 2006; Werner u. Kampen, 2007).



**Abb. 1** Schematische Zeichnung der Flügeladerung und -zellen eines *Culicoides*-Flügels modifiziert nach Goffredo (2004) und Werner u. Kampen (2007). Morphologisch und artspezifisch bedeutsam sind die Radialzellen (r1, r2), die Querader (r-m), sowie die Aufgabelung der Medialader (M). Für die Speziesdifferenzierung von Bedeutung ist die Ausprägung von Merkmalen im Bereich der Radialzellen, als auch auf den Flügelzellen (r5, m1, m2, Anal- und Cubitalzelle) gebildet von den Medialadern und Cubitaladern (CuA1, CuA2).

C: Costalader; R: Radialader; r-m: Verbindungsader zwischen R und M; M, M1, M2: Medialadern; CuA1, CuA2: Cubitaladern; r1, r2: Radialzellen; r5, m1, m2: Flügelzellen.

### ***Merkmale des Abdomens***

Das Abdomen besteht aus 10 Segmenten und beherbergt unter anderem die Fortpflanzungsorgane. Beim Gnizenweibchen ist die Anzahl der funktionellen und rudimentären Spermatheken ein wichtiges diagnostisches Hilfsmittel. Die meisten *Culicoides*-Spezies haben zwei funktionelle und eine oder manchmal zwei rudimentäre Spermatheken (Delécolle, 1985; Boorman, 2006).

Die Ausprägung der männlichen Fortpflanzungsorgane bildet ein weiteres, wichtiges Erkennungsmerkmal. Die Form des neunten abdominalen Segments, die An- (*C. chiopterus*) oder Abwesenheit (*C. obsoletus*) von lateralen Fortsätzen, die Form des Aedeagus (Spermaübertragendes Organ, sklerotisierter Hauptteil des männlichen Begattungsgliedes) und der Paramere (Hilfsorgane des Begattungsorgans) sind zu beachten. Die Ausprägung der ventralen Ausstülpungen der Valven (zu Genitalanhängen umgebildetes letztes Beinpaar) sind ebenfalls charakteristisch (Iglisch, 1977; Delécolle, 1985; Boorman, 2006).

### **Parität**

Zur Differenzierung weiblicher Gnitzen ist es notwendig, nullipare von paren Gnitzen zu unterscheiden, d.h. Gnitzen, bei denen noch keine Eiproduktion und -ablage stattgefunden hat gegenüber solchen, die bereits ein oder mehrere Eigelege produziert haben, um den Anteil der Gnitzen, die bereits eine Blutmahlzeit aufgenommen haben zu erkennen und deren Potential zur Übertragung von Tierseuchen abschätzen zu können (Meiswinkel *et al.*, 2007).

Dyce (1969) beschrieb eine Methode, die die Unterscheidung „leerer“ und frisch-gesogener, nulliparer und parer Gnitzen entscheidend vereinfachte. Er stellte fest, dass bei Gnitzen im Verlauf der Entwicklung der Ovarien während der Eiproduktion ein burgunderrotes Pigment in das die Abdominalhöhle auskleidende Gewebe eingelagert wird. Das Fehlen bzw. die Anwesenheit dieses Pigments ermöglicht die Unterscheidung nulliparer von paren, ungesogenen Gnitzen, ohne deren Ovarien präparieren zu müssen. Die Anwendung dieser Methode auf gesogene Gnitzen stellt sich etwas schwieriger wenn nicht gar unmöglich dar, da das mit Blut gefüllte Abdomen die Erkennung der Pigmentation entscheidend erschwert. Allerdings fanden Braverman und Mumcuoglu (2008) auch bei frisch geschlüpften *Culicoides imicola*, welche nachweislich keine Blutmahlzeit aufgenommen haben konnten, einen gewissen Anteil Gnitzen (23%) mit eingelagerten Pigmenten. Ihre Ergebnisse weisen darauf hin, dass man mit der Altersbestimmung einer Poolprobe scheinbar parer Insekten und deren Vektorkompetenz vorsichtig sein sollte, und gegebenenfalls ein Korrekturfaktor ermittelt werden müsste. Solange dazu jedoch weitere Studien ausstehen, eignet sich Dyces Methode immer noch am besten, um Gnitzenweibchen zur Erregerisolation auszuwählen oder die Alterstruktur einer Probe zu bestimmen (Braverman u. Mumcuoglu, 2008).

### **2.2.5. Differenzierung mittels molekular-genetischer Methoden**

Da es sich bei *C. imicola*, *C. obsoletus* und *C. pulicaris* um morphologisch sehr ähnliche Artenkomplexe handelt, bedient man sich zunehmend molekularbiologischer Methoden (z.B. RAPD-PCR, DNS-Sequenzierung) zur Speziesidentifizierung und Beantwortung taxonomischer Fragestellungen (Kampen u. Kiel, 2006). DNS-basierte Methoden, wie *DNA-Barcoding*, können zusammen mit der klassischen Taxonomie sinnvolle Werkzeuge für Studien zur Verbreitung der Gnitzen in Europa bilden (Bensasson *et al.*, 2001; Paredes-

Esquivel *et al.*, 2009a; Paredes-Esquivel *et al.*, 2009b). Um Larvalhabitate auf gefährdeten Höfen ausfindig zu machen, können molekular-genetische Methoden ebenfalls zur raschen Differenzierung aufgefundenener *Culicoides*-Larven eingesetzt werden (Mordue *et al.*, 2007).

Einen Ansatz stellt das so genannte „DNA-Barcoding“ (dt. „DNS-Strichcode“) (Hebert *et al.*, 2003) oder die „DNS-Taxonomie“ (Tautz *et al.*, 2003) dar, womit die Identifizierung und systematische Zuordnung beschleunigt werden sollen. Vielversprechend sind erste Versuche des DNA-Barcodings von kanadischen (Cywinska *et al.*, 2006) und indischen Mücken (Kumar *et al.*, 2007), weniger eindeutige Ergebnisse lieferte eine entsprechende Studie zu nordamerikanischen Augenfliegen (Skevington *et al.*, 2007). Allerdings basieren diese Studien auf einer Kombination aus Morphometrie und Molekulargenetik, einer Verfahrensart, die für Laien zur Identifikation von Vektoren ungeeignet ist. Für Studien zu vektorübertragenen Tierseuchen muss also eine Methodik entwickelt werden, die Nicht-Spezialisten nutzen können und welche es ermöglicht, nahverwandte Vertreter eines Komplexes sicher zu identifizieren (Mordue *et al.*, 2007).

Andere Projekte befassen sich mit der Entwicklung einer PCR-basierten Methode zur speziesspezifischen Diagnostik von relevanten *Culicoides*-Arten im Rahmen von Untersuchungen zur BTD-Epidemiologie. Vertreter des südafrikanischen *C. imicola*-Komplexes zeigen typische Verwandtschaftslinien auf, wenn man RAPD- (Randomly Amplified Polymorphic DNA) Marker (Sebastiani *et al.*, 2001) oder speziesspezifische Sequenzen des mitochondrialen Cytochromoxidase-Gens (COI: (Cytochrome c Oxidase Subunit 1) verwendet (Linton *et al.*, 2002; Nolan *et al.*, 2004). Für die Identifizierung von Vertretern des *C. obsoletus*-Komplexes eignen sich speziesspezifische Marker in der COI- (Pàges u. Sarto I. Monteys, 2005) bzw. der ribosomalen ITS- (Internal Transcribed Spacer) Region (Gomulski, M L *et al.*, 2005; Perrin *et al.*, 2006) sehr viel besser als die morphologische Artbestimmung. Für verschiedene in Europa heimische Gnitzen wurden bereits PCR-basierte Methoden mit COI (Nolan *et al.*, 2007) oder ITS1 (Mathieu *et al.*, 2007) als Zielregion etabliert. Die aktuellen Bemühungen, molekular-genetische Methoden zur Speziesdifferenzierung zu entwickeln, versprechen eine sicherere Bewertung der BTV-Vektorkompetenz auf Spezieslevel.

### 2.3. Epidemiologische Zusammenhänge zwischen Erreger, Vektor und Umwelt

Die zunehmende Globalisierung mit ihren Auswirkungen auf Handel und Transport von Tieren und Tierprodukten, Ereignisse im Zusammenhang mit dem Klimawandel und nicht zuletzt der Tourismus erhöhen die Gefahr der Einwanderung oder Einschleppung und Etablierung potenzieller Vektoren und folglich von durch Vektoren übertragenen Tierseuchen (Kampen u. Kiel, 2006; Mordue *et al.*, 2007). Die Epidemie der Blauzungenkrankheit unter den Rindern und Schafen Deutschlands und seiner Nachbarländer ist ein aktuelles Beispiel für die Einschleppung einer vektor-übertragenen, exotischen Tierseuche nach Mittel- bzw. Westeuropa (Mordue *et al.*, 2007).

Das Klima spielt, neben zunehmendem globalen Handel und Tourismus, beim Ausbruch und der Erhaltung der Blauzungenkrankheit vermutlich eine große Rolle, da es die Entwicklung und das Verhalten der Gnitzen und dementsprechend auch deren epidemiologischen Konsequenzen beeinflusst (Kampen u. Kiel, 2006; Mordue *et al.*, 2007). Sieben der zehn heißesten Jahre im Zeitraum 1958 – 2007 fielen in die letzte Dekade, wobei der Winter 2006/2007 der wärmste Winter seit Erfassung der Wetterdaten war (Wilson u. Mellor, 2008). Bereits 2002 wurde gewarnt, dass in mittels GIS (engl. *geographical information system*) identifizierten Risikozonen (hauptsächlich am Rhein in Baden-Württemberg, Hessen und Rheinland-Pfalz) die Gefahr bestehe, dass sich nach Einschleppung infizierter Tiere ein BTDAusbruch aufgrund der damaligen Klimaverhältnisse ereignen und das Risikogebiet langfristig stark vergrößern könnte. Dies läge vor allem an verbesserten Bedingungen für heimische *Culicoides* spp., aber auch an der nördlichen Ausdehnung des Verbreitungsgebietes des ursprünglichen Vektors *C. imicola* (Koslowsky, 2002). Die in Europa heimischen Gnitzenarten sind an andere klimatische Verhältnisse angepasst als die thermophile *C. imicola*. So scheint das Entwicklungs- und Überlebensoptimum für *C. obsoletus* u. a. relativ niedrige Temperaturen, für *C. pulicaris* eine hohe, stabile relative Luftfeuchtigkeit zu erfordern (Purse *et al.*, 2005). In den warmen Sommermonaten kann die Entwicklung vom Ei bis zum adulten Insekt innerhalb von drei bis vier Wochen abgeschlossen sein (Wittmann u. Baylis, 2000). Optimale Temperaturen während der Larvalphase erhöhen ebenfalls die Wahrscheinlichkeit von einer zu zwei oder mehreren Gnitzen-Generationen pro Saison (Wilson u. Mellor, 2008). Bei ausreichender Luftfeuchtigkeit geht die Entwicklung der Gnitzen bis zu einer gewissen Obergrenze bei höheren Temperaturen schneller vonstatten, so dass größere Populationsdichten erreicht werden, wenn auch die Lebensdauer der einzelnen

Insekten dabei abnimmt. Da sich mit steigender Temperatur allerdings auch die Stechaktivität einzelner Gnitzen und so die Stechrage insgesamt erhöht, steigt demzufolge die Wahrscheinlichkeit einer Erregerübertragung (Wittmann u. Baylis, 2000). Das Zeitintervall zwischen zwei Blutmahlzeiten einer Gnitze hängt ebenso von den vorherrschenden Temperaturen ab. Die Stechrage ist deshalb ein wichtiger Parameter für die Übertragung des Virus, da im Übertragungszyklus Wirt-Vektor-Wirt der Stechakt zwei Mal erforderlich ist (Wilson u. Mellor, 2008).

In den Herbst- und Wintermonaten scheinen die Gnitzen im vierten Larvalstadium zu überwintern, wodurch sich die Entwicklung zum Imago dementsprechend verzögert. Allerdings häufen sich die Hinweise, dass sich einige Arten im Winter auch innerhalb von Viehstallungen aufhalten und dort sogar brüten (Madder *et al.*, 2006). Umgekehrt nimmt die Lebensspanne von Gnitzen bei niedrigen Temperaturen zu (Wittmann u. Baylis, 2000).

### ***Überwinterungsstrategien von Vektor und Virus***

Im Seuchenverlauf der aktuellen BTD-Epidemie zeigte sich, dass auch die Überwinterung von Vektor und Virus eine wichtige Rolle spielt. Es ist bekannt, dass die meisten Gnitzenarten als Viertlarve überwintern, nur wenige im Eistadium und scheinbar keine als Puppe (Boorman, 2006). Auch wenn die Wirtstiere der Gnitzen über einen längeren Zeitraum virämisch sind, so nimmt die Aktivität und Populationsdichte der Gnitzen in den kalten Wintermonaten erheblich ab, woraus in Europa zumeist die Auslöschung exotischer Tierseuchen, wie der Blauzungkrankheit, resultierte. Da diese Tierseuche in Mitteleuropa jedoch im Jahr 2007 wieder ausbrach, ohne dass eine erneute Übertragung von BTV über die neue Generation der Gnitzen stattfinden konnte, musste man die Überwinterungsmechanismen von *Culicoides* spp. neu analysieren (Wilson *et al.*, 2007). Es werden verschiedene Mechanismen diskutiert, unter anderem die vertikale Übertragung des Blauzungsvirus vom adulten Insekt auf die nächste Generation (White *et al.*, 2005) oder der dauerhaften Infektion wirtseigener T-Lymphozyten, die im Zuge der Hautreaktionen auf eine saugende Gnitze zur Stichstelle gelockt werden und durch Interaktion mit Hautfibroblasten zur erneuten Virusreplikation und –freisetzung gebracht werden können (Takamatsu *et al.*, 2003). Auch der Theorie zur transplazentaren Übertragung des BTV zwischen Mutterkuh und

Kalb wird seit der Geburt viruspositiver Kälber von nachweislich BTV-freien Färsen in Nordirland 2008 wieder Vorschub geleistet (Wilson u. Mellor, 2009; Oura, 2011).

Die Virusreplikation selbst ist ebenfalls an ein Temperaturoptimum (mindestens 14,3°C) gebunden. Optimale Temperaturverhältnisse bestimmen nachweislich die Aktivität der viralen RNS-Polymerase, folglich die Rate der Virusreplikation und letztendlich die Zeitspanne, die das mit der Blutmahlzeit aufgenommene Virus benötigt, um die Speicheldrüsen der Gnitze zu erreichen (Wittmann *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 2007). Bei 25°C dauert diese Zeitspanne etwa sechs bis acht Tage, bei 30°C nur noch etwa vier Tage und bei Temperaturen unter 10°C kommt die Virusreplikation völlig zum Erliegen. Bei besseren Verhältnissen, also steigenden Temperaturen, nimmt das Virus seine Replikation wieder auf (Wittmann *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 2007). Da einige Gnitzen in Belgien auch im Winter 2006/2007 gefangen wurden, liegt die Vermutung nahe, dass in Gnitzen, welche sich zum Ende der vorherigen Saison infizierten und in den Wintermonaten lange genug überlebten, bei steigenden Temperaturen wieder eine Virusreplikation bis auf infektiöses Niveau erfolgt. Computer-gestützte Klima-Berechnungen stützen diese Theorie insofern, als dass bereits in der zweiten Aprilhälfte 2007 das Klima ausreichte, um eine erneute Virusreplikation im Vektor zur gewährleisten (Wilson *et al.*, 2007).

### **Die „Vektor-freie Zeit“**

Bei Erklärung einer Vektor-freien Periode wären Erleichterungen der durch die gesetzlichen Verordnungen verhängten Sanktionen möglich. Da man bisher annahm, dass Gnitzen vornehmlich in den Monaten März bis November fliegen (Boorman, 2006; Mehlhorn *et al.*, 2008c), war bis zum Jahr 2007 die Vektor-freie Periode dadurch definiert, dass weniger als zehn *Culicoides*-Gnitzen pro Fangnacht in einer Standardfalle gefangen wurden, wie es normalerweise für den mitteleuropäischen Winter zutreffen sollte. Seit dem Winter 2007/2008 wurde diese Definition auf „weniger als fünf *Culicoides*-Gnitzen pro Nacht“ verschärft (Carpenter *et al.*, 2009), da Individuen auch im Dezember und Januar noch gefangen wurden (Boorman, 2006; Mehlhorn *et al.*, 2008c). Balenghien *et al.* (2008) fingen bei milden Herbsttemperaturen im Zeitraum von 10.00 – 14.00 Uhr eine große Anzahl Gnitzen (*C. obsoletus*, *C. dewulfi*, *C. chiopterus* und *C. scoticus*) direkt am Schaf, was den Rückschluss zulässt, dass sich diese Gnitzenpezies durchaus auch tagsüber an milden

Wintertagen auf Wirtssuche befinden können – ein weiterer Fakt, der die so genannte „Vektor-freie Saison“ (Winter) erheblich in Frage stellt.



### 3. Material und Methoden

Ein ausführliches Verzeichnis über die verwendeten Materialien, Geräte und Programme sowie weitere Unterlagen sind im Anhang (Kapitel 9) zu finden.

#### 3.1. Entomologisches Monitoring in Deutschland

Um vor dem Hintergrund der Blauzungenkrankheit mehr über die *Culicoides*-Fauna in Deutschland zu erfahren, wurden von März 2007 bis Mai 2008 deutschlandweit entomologische Studien durchgeführt, die von der EU genehmigt und zusammen mit dem BMELV finanziert wurden. Mehrere Institutionen, darunter auch eine Arbeitsgruppe der Freien Universität Berlin, waren für die Durchführung dieses Monitorings verantwortlich.

##### 3.1.1. Aufgabenstellung und Zielsetzung

Im Rahmen der entomologischen Untersuchungen sollten unter anderem folgende Fragen beantwortet werden:

- Wurde im Untersuchungszeitraum *C. imicola* gefangen?
- Welche *Culicoides*-Arten herrschen in Deutschland vor?
- Gibt es eine so genannte Gnitzen-freie Zeit?
- Wann konnten die ersten Viren der Blauzungenkrankheit in Gnitzen auf den beprobten Höfen nachgewiesen werden und welche Gnitzenarten erwiesen sich als viruspositiv?
- Gab es gleichzeitig positive Gnitzen und erkrankte Rinder auf den beprobten Höfen?

Die entomologischen Untersuchungen wurden an 89, über Deutschland verteilten Standorten durchgeführt (Abb. 2). Die Standorte befanden sich innerhalb der 150 km breiten Restriktionszone, welche im Januar 2007 eingerichtet wurde und das Hauptausbruchsgebiet der Blauzungenkrankheit im Jahr 2006 umfasste (Hoffmann B. *et al.*, 2009). Diese Region wurde in Planquadrate von 45 x 45 km<sup>2</sup> unterteilt. Pro Planquadrat wurde jeweils ein

Milchviehbetrieb ausgewählt, auf dem je eine Falle zum Fang der Zielinsekten und eine Wetterstation zur Erfassung verschiedener Klimadaten installiert wurde.



**Abb. 2** Übersicht über die geographische Lage der 89 Fallenstandorte des Entomologischen Monitorings zur *Culicoides*-Fauna in Deutschland (Punkte) im Untersuchungszeitraum März 2007 – Mai 2008, die innerhalb oder nahe der BTD-Restriktionszone (dunkelgraue Linie) installiert wurden. (Hoffmann B. *et al.*, 2009)

Die Auswahl der Höfe erfolgte unter Mitwirkung der örtlichen Amtstierärzte durch das LAVES (Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz, Ernährung und Lebensmittelsicherheit).

### 3.1.2. Fallenstandorte der Arbeitsgruppe FU Berlin

Die Arbeitsgruppe Berlin betreute 15 Fallenstandorte in Norddeutschland, davon befanden sich acht Fallenstandorte im Westen Niedersachsens, fünf Fallenstandorte in Sachsen-Anhalt und je ein Fallenstandort im Westen Brandenburgs und Westen Mecklenburg-Vorpommerns (siehe Abb. 3).



**Abb. 3** Kartenausschnitt zur Übersicht über die 15 durch die Arbeitsgruppe Berlin (Punkte, Nummerierung siehe Tab. 1) im Rahmen des Entomologischen Monitorings über das Vorkommen von Gnitzen in Deutschland betreuten Fallenstandorte, März 2007 - Mai 2008.

Tabelle 1 listet die Fallenstandorte und ihre Koordinaten, sowie den Standort der jeweiligen Falle in Relation zum Stall auf. Die Fallen wurden möglichst nahe der Tiere installiert, um eine optimale Ausbeute der am Rind Blut saugenden Gnitzen zu erhalten. Abhängig von den örtlichen Gegebenheiten wurde die Falle direkt im Stall, außen an der Stallwand und an einem

Standort aufgrund ganzjähriger Weidehaltung, in einem zu allen Seiten offenen Wanderwagen befestigt. Die ausgewählten Installationsorte mussten zudem ausreichenden Schutz vor Schlagregen bieten.

**Tab. 1** Übersicht über die Fallenstandorte durch die Arbeitsgruppe Berlin betreuten Entomologischen Monitorings und die Positionierung der Falle am jeweiligen Standort, März 2007-Mai 2008.

lfd. Nr.	Code	Ortsname	Koordinaten		Fallenposition
1	ST WB	Dabrun	51° 49' 26" N,	12° 43' 46" O	Stall außen
2	ST BTF	Brösa	51° 36' 39" N,	12° 30' 55" O	Stall innen
3	NI OHA	Walkenried	51° 34' 30" N,	10° 37' 10" O	Stall innen
4	NI NI	Rehburg-Loccum	52° 27' 12" N,	09° 15' 12" O	Stall innen
5	NI SFA	Rethem	52° 44' 45" N,	09° 24' 01" O	Stall außen
6	NI ROW	Tarmstedt	53° 13' 45" N,	09° 04' 41" O	Stall innen
7	NI PE	Edemissen	52° 22' 35" N,	10° 15' 15" O	Stall innen
8	NI WOB	Wolfsburg-Hattorf	52° 22' 07" N,	10° 43' 14" O	Weide
9	ST OK	Niendorf	52° 26' 32" N,	11° 02' 55" O	Stall außen
10	NI UE	Bad Bodenteich OT Schostorf	52° 50' 27" N,	10° 42' 31" O	Stall außen
11	ST SDLA	Beuster-Ostorf	52° 55' 01" N,	11° 48' 03" O	Stall außen
12	ST SDLB	Beuster-Dorfstr	52° 55' 48" N,	11° 46' 28" O	Stall außen
13	BB PR	Eldenburg/Lenzen	53° 06' 28" N,	11° 25' 14" O	Stall außen
14	NI LG	Tripkau	53° 11' 01" N,	11° 07' 25" O	Stall innen
15	MV LWL	Niendorf/Weselsdorf	53° 21' 43" N,	11° 26' 01" O	Stall außen

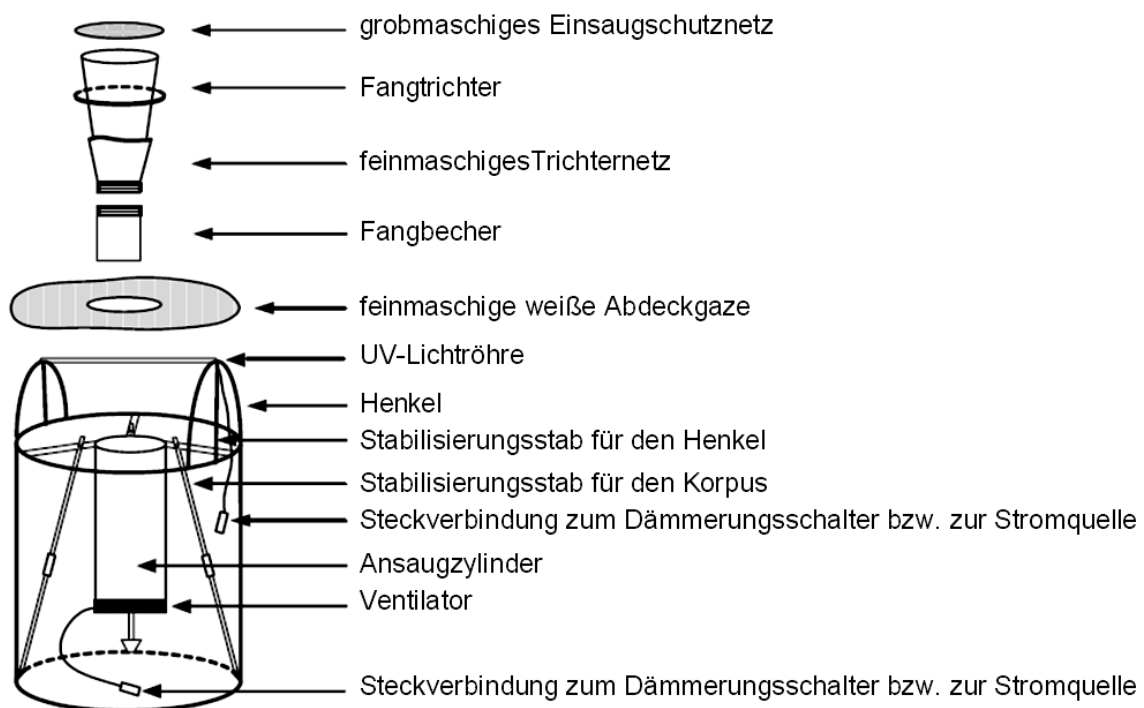
### 3.1.3. Fallentyp und Fangprotokoll

#### *Fallentyp*

Während des Monitorings wurden UV-Licht-Fallen (auch Schwarzlicht-Fallen genannt) vom Typ BG-Sentinel von BioGents<sup>®</sup> (Regensburg) verwendet. Die Fallen sind zusammenklappbar und aus wetterbeständigem Material. Zudem kann dieser Fallentyp abhängig von der Fragestellung mit unterschiedlichen Lockmitteln (chemischen Lockstoffen, UV-Licht, Kohlendioxid) ausgestattet werden. Für das Monitoring wurde die Ausstattung mit UV-Licht gewählt. Durch die UV-Licht-Leuchtstoffröhre (siehe Abb. 4) werden Insekten im

Umkreis der Falle angelockt und durch den vom Ventilator erzeugten zirkulierenden Luftstrom in den Fangbecher mit Ethanol gesaugt.

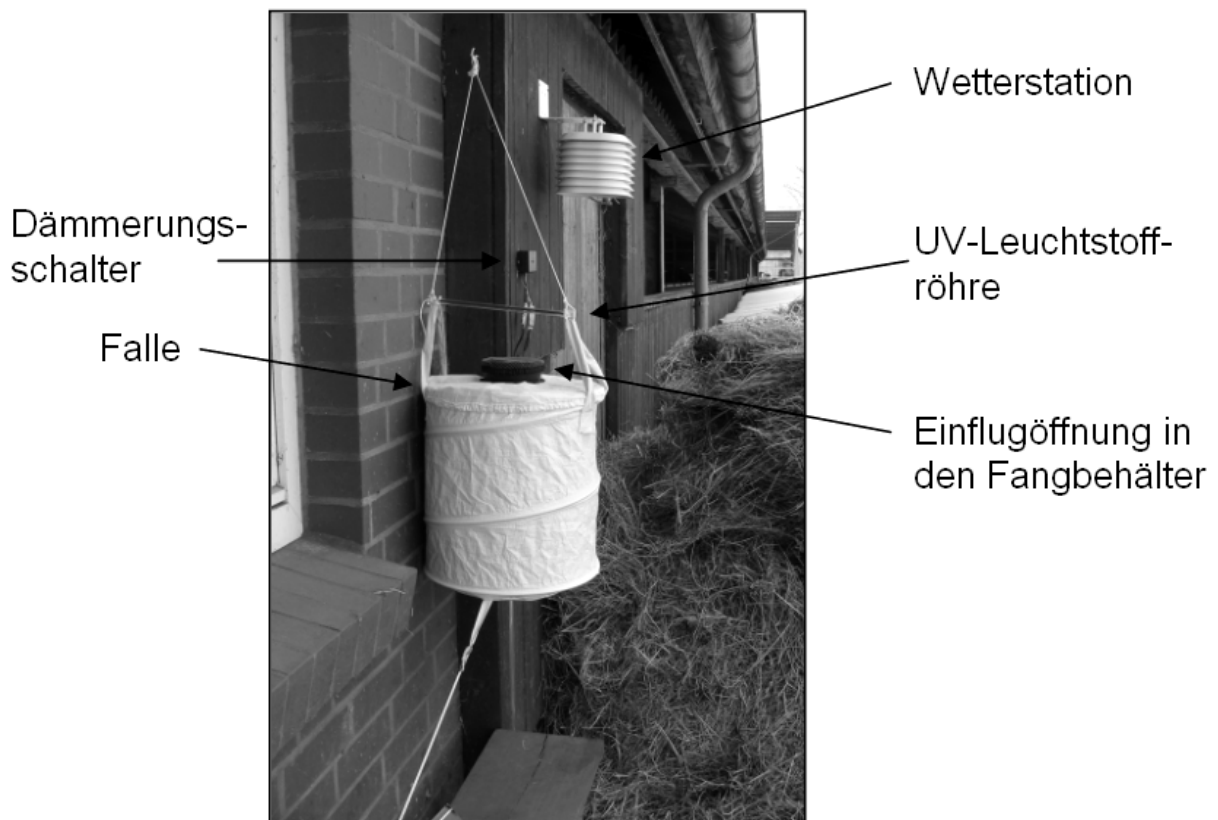
Die Energieversorgung der Falle von 12 Volt (V) konnte über das hofeigene Stromnetz per Netzanschluss oder über eine 12 V Autobatterie erfolgen. Die Autobatterien mussten für einen reibungslosen Ablauf nach jeder Fangwoche über das Stromnetz wieder aufgeladen werden.



**Abb. 4** Schematische Darstellung der BG-Sentinel UV-Licht Falle (BioGents<sup>®</sup>, Regensburg).

Die Fallen wurden hängend angebracht, wobei darauf geachtet wurde, dass sich die Fallenöffnung auf einer Höhe von ca. 1,50 m befand. Sie wurden mit Schnüren fixiert, um Pendelbewegungen auszuschließen (Beispiel einer installierten Falle siehe Abb. 5). Die Stromversorgung wurde durch Anschluss an das Stromnetz des Hofes oder mittels Installation einer Autobatterie sichergestellt. Die Stromzufuhr der Falle wurde durch einen photosensitiven Schalter abhängig vom Einbruch der Dämmerung geregelt, also bei Sonnenuntergang eingeschaltet und bei Sonnenaufgang wieder unterbrochen. So vorbereitet, musste in den Fangwochen nur der Fangbecher manipuliert werden. Die Bedienung der Fallen

oblag den Landwirten der untersuchten Höfe. Sie wurden bei Fallenaufbau in den Gebrauch der Fallen eingewiesen und mehrmals während der Fangperiode mit Versandbecher, Versandtaschen und Alkohol versorgt. Darüber hinaus wurden im Laufe der Fangperiode an zwei Terminen die Wetterdaten durch die Arbeitsgruppe aus den Wetterstationen ausgelesen und die Fallen auf ihre Funktionstüchtigkeit hin gewartet.



**Abb. 5** Beispiel einer installierten BG-Sentinel UV-Licht Falle (BioGents<sup>®</sup>, Regensburg) am Standort Nr. 15 (MV LWL, Niendorf/Ludwigslust), 2007/2008.

### ***Fangprotokoll***

Die Fangperiode dauerte von Ende März 2007 bis Mai 2008. Gefangen wurde jeweils in den ersten sieben Nächten des Monats (beispielsweise abends 01.06. bis 08.06.2007 morgens). Vor Einschalten der Falle wurde der Fangbecher mit 300 ml Ethanol befüllt und in die Falle eingesetzt. Die Stromzufuhr wurde angeschlossen. Um zu verhindern, dass der Alkohol während der Fangwoche vollständig verdunstet, musste regelmäßig der Flüssigkeitsspiegel im

Fangbecher kontrolliert und gegebenenfalls durch Auffüllen mit Alkohol korrigiert werden. Am Morgen der siebten Fangnacht wurde der Inhalt der Fangbecher in die Transportgefäße um- und die Gefäße bis zum Rand mit Alkohol aufgefüllt, um übermäßiges Schütteln während des Transports zu vermeiden. In insektenreichen Fangwochen mussten die Fangbecher auch während der Fangwoche geleert und neu mit Alkohol aufgefüllt werden. Ein Kurierunternehmen (TNT) holte die Proben am 9. Tag des Monats bzw. am nächsten Werktag ab und transportierte die Proben zum Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin, Freie Universität Berlin, wo die weitere Untersuchung der Proben erfolgte.

Im Institut wurden die *Culicoides*-Mücken mittels Stereomikroskop aus der Fangprobe aussortiert und in folgende Gruppen nach Art, Geschlecht und Ernährungszustand aufgeteilt:

<i>Obsoletus männlich</i>	<i>Obsoletus</i> -Gruppe, männliche Individuen.
<i>Obsoletus weiblich nüchtern</i>	<i>Obsoletus</i> -Gruppe, weibliche Individuen, nüchtern (ungesogen).
<i>Obsoletus weiblich voll</i>	<i>Obsoletus</i> -Gruppe, weibliche Individuen, voll (gesogen).
dito <i>Pulicaris</i>	Aufteilung der <i>Pulicaris</i> -Gruppe analog zur <i>Obsoletus</i> -Gruppe.
dito <i>Rest</i>	Aufteilung der Rest-Gruppe (alle <i>Culicoides</i> -Arten, die den Gruppen <i>Obsoletus</i> oder <i>Pulicaris</i> nicht zugeordnet werden konnten) analog zur <i>Obsoletus</i> -Gruppe.

In die *Obsoletus*-Gruppe wurden all diejenigen Gnitzen einsortiert, welche in ihrer Flügelzeichnung *C. obsoletus* s.s. ähnelten und in die *Pulicaris*-Gruppe all diejenigen Gnitzen, welche in ihrer Flügelzeichnung *C. pulicaris* s.s. ähnelten (Abb. 7 und 11).

Die restlichen Insekten wurden in Alkohol konserviert und für die Untersuchung möglicher weiterer biologischer Fragestellungen aufbewahrt.

Alle männlichen Individuen der Gruppen *Obsoletus*, *Pulicaris*, und *Rest* sowie mindestens 10% der weiblichen Individuen der entsprechenden Gruppen wurden an das Deutsche

Entomologische Institut in Müncheberg (Dr. Doreen Werner) zur weiteren Differenzierung gesandt.

Bis zu 500 nüchterne bzw. voll gesogene weibliche Gnitzen der *Obsoletus*-Gruppe, der *Pulicaris*-Gruppe, sowie der *Rest*-Gruppe wurden an das FLI zur Untersuchung auf das BTV-Genom gesandt.

Die restlichen *Culicoides*-Gnitzen verblieben als Rückstellprobe im Institut beziehungsweise dienten unter anderem als Material für die molekulargenetischen Arbeiten dieser Dissertation.

### **3.2. Morphologische Differenzierung**

Gnitzen, welche zur Extraktion der DNS und letztendlich der Entwicklung speziesspezifischer Primer dienten, wurden zunächst morphologisch nach verschiedenen Bestimmungsschlüsseln (siehe 3.2.2. Bestimmungsschlüssel) identifiziert. Die morphologische Differenzierung dient als Gold-Standard für die Entwicklung speziesspezifischer Primer, da die individuelle Gnitze morphologisch eindeutig bestimmt werden kann und so ein direkter Abgleich zwischen phänotypischer Differenzierung und den Resultaten der speziesspezifischen PCR möglich ist.

Aufgrund der Artenvielfalt unter den Gnitzen, konzentrierte sich die Entwicklung speziesspezifischer Primer auf die sechs *Culicoides*-Arten, welchen im Zusammenhang mit der Epidemiologie der Blauzungenkrankheit in Europa eine potenzielle Vektorrolle zugesprochen wird und die in den europaweiten Fängen jeweils die zahlenmäßig größten Gruppen darstellten. Dabei handelt es sich um *Culicoides chiopterus*, *C. dewulfi*, *C. obsoletus* s.s., *C. scoticus*, *C. pulicaris* und *C. punctatus*.

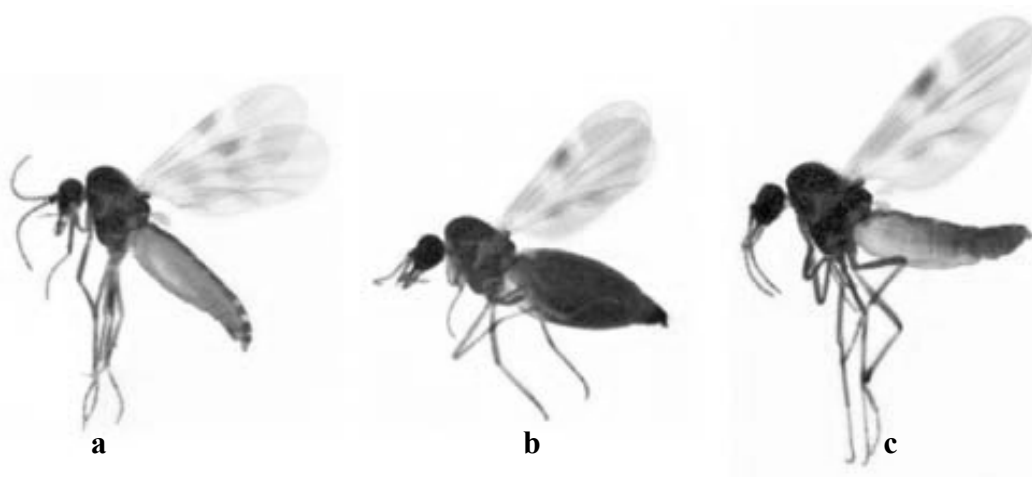
#### **3.2.1. Grobdifferenzierung**

Die Grobdifferenzierung der Gnitzen erfolgte unter dem Stereomikroskop bei 10-40facher Vergrößerung. Dabei wurde als erstes auf die Merkmale geachtet, die den Körperbau der Familie der Gnitzen ausmacht, um sie von den anderen gefangenen Insekten zu trennen. Verschiedene Bestimmungsschlüssel wurden verwendet, um die artspezifischen Merkmale der Flügel zu bestimmen (siehe Bestimmungsschlüssel unter 3.2.2.).



Ein Teil der Fangprobe wurde in eine durch Querlinien unterteilte Petrischale gegeben und durchgemustert. Gnitzen unterscheiden sich schon allein in ihrer Größe von anderen Insekten, da sie je nach Art nur 0,5 – 4 mm groß sind. Als weitere Merkmale wurden der dorsal gewölbte Rücken, die langen vielgliedrigen Antennen, die kurzen, nach unten gerichteten, stechenden Mundwerkzeuge der Weibchen, die kurzen Vorderbeine und die typische Äderung sowie charakteristisch dunkle Zeichnung der fein behaarten Flügel herangezogen. Die weiblichen Gnitzen wurden von den männlichen getrennt und aufgrund der spezifischen Flügelzeichnung und ihres Fütterungszustandes in die unter 3.1.3 bereits erwähnten Gruppen einsortiert

(Abb. 6).



**Abb. 6** Weibliche Gnitzen der *Obsoletus*-Gruppe in verschiedenen Stadien vor und nach der Blutaufnahme. a, ungesogen; b, voll gesogen; c, nur noch Reste verdauten Blutes im Abdomen vorhanden (Bartsch et al., 2009).

Da es sich bei vielen Arten um Zwillingsarten handelt, die sich in ihrer Morphologie und Flügelzeichnung sehr ähnlich sind, wurden diese Arten jeweils einer gemeinsamen Gruppe zugeordnet: Zur Gruppe der *Obsoletus*-ähnlichen gehörten demnach die Arten *C. obsoletus* s.s., *C. dewulfi*, *C. scoticus* und *C. chiopterus*. In die Gruppe der *Pulicaris*-ähnlichen wurden *C. pulicaris* s.s. und *C. punctatus* einsortiert. Alle anderen Arten, die weder zu den *Obsoletus*-ähnlichen noch den *Pulicaris*-ähnlichen zugeordnet werden konnten, kamen in die *Rest*-Gruppe.

### 3.2.2. Feindifferenzierung

Die Feindifferenzierung erfolgte zur Orientierung zunächst ebenfalls mit dem Stereomikroskop, jedoch war eine eindeutige Bestimmung der Artzugehörigkeit meist nur nach Anfertigung eines Präparates und der Untersuchung mittels Mikroskop bei 20-60facher Vergrößerung möglich.

#### *Mikroskopische Präparation*

Für die Anfertigung eines Dauerpräparates mussten zuvor einige Materialien selbst hergestellt werden.

Zur Herstellung feiner Präparierwerkzeuge wurden am wattefreien Ende zweier Holztupfer mittels eines Kleberpunktes Präparatnadeln befestigt.

Um die gesättigte Alkohol-Phenol-Lösung für das Aufhellen der Chitinstrukturen und die Phenol-Kanadabalsam-Mischung zur Fixierung herzustellen, wurde in Anlehnung an die Methode von Wirth und Marston (1968) einem Teil kristallinen Phenols tropfenweise so viel 99%iger Alkohol zugegeben, bis alle Kristalle gerade in Lösung übergegangen waren. Dabei wurde die Lösung ständig geschwenkt, um den Zeitpunkt der Sättigung genau abzuspassen. Sollte im Laufe der Zeit wieder kristallines Phenol entstehen, kann es durch Zugabe einiger Tropfen Alkohol wieder gelöst werden. Für das Phenol-Kanadabalsam-Gemisch wurden je ein Teil Phenolalkohol und Kanadabalsam verrührt, bis der Balsam eine eher visköse, nicht-fadenziehende Konsistenz angenommen hatte.

Vor der eigentlichen Präparation auf dem Objektträger, wurde jedes Individuum einige Zeit im Alkohol-Phenol gewaschen, bis die Chitinstrukturen ausreichend aufgehellt waren und das Insekt ohne große Beschädigung manipuliert werden konnte. Die Waschkdauer betrug dabei mindestens eine Stunde.

Auf jeden Objektträger wurden zwei Tropfen des Phenol-Kanadabalsams aufgetragen. In den rechten Tropfen wurde mittels einer Pinzette das aufgehellte, zu präparierende Insekt gelegt und mittels der feinen Präpariernadeln seziiert. Im rechten Tropfen verblieben dabei Kopf und Flügel, in den linken Tropfen wurde das letzte Drittel des Abdomens platziert. Der Rest (Thorax mit Beinen und oberem Abdomen) wurde wieder in die Alkohol-Phenol-Lösung

gegeben, um das Kanadabalsam vor dem molekulargenetischen Arbeitsschritt weitestgehend wieder auszuwaschen.

Der Kopf wurde dabei so platziert, dass die Augen nach oben, die Stechwerkzeuge und Antennen möglichst gerade nach vorne ausgerichtet waren. Die Flügel wurden flach und vollständig entfaltet positioniert.

Das Abdomen musste mit der Unterseite nach oben fixiert werden, damit die feinen Fortpflanzungsorgane möglichst nicht durch die dunkleren Bänder der abdominalen Segmente verdeckt wurden. Verdrehungen mussten vor allem beim männlichen Fortpflanzungstrakt vermieden werden, um alle Strukturen eindeutig erkennen zu können.

Das vorsichtige Auflegen der runden Deckgläschen fixierte die präparierten Strukturen in der gewünschten Lage. Zum Abschluss erfolgten die eindeutige Beschriftung des Objektträgers und der Trocknungsvorgang entweder für mehrere Tage bei Zimmertemperatur oder für fünf bis sieben Stunden bei 55 °C im Trocknungsschrank.

### ***Bestimmungsschlüssel***

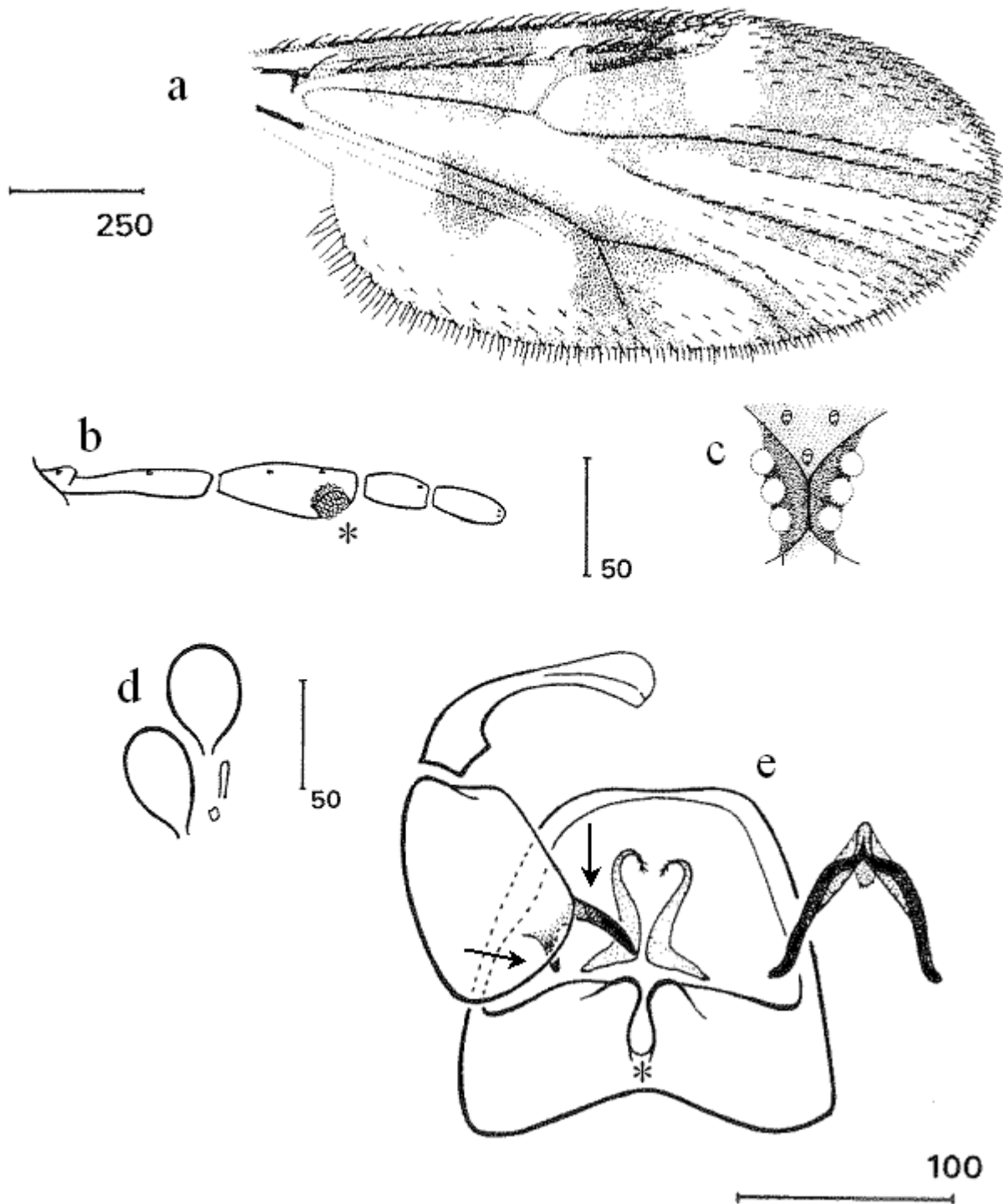
Die Artbestimmung erfolgte anhand von verschiedenen Bestimmungsschlüsseln. Diese Schlüssel ermöglichen durch Abfrage der einzelnen Flügelcharakteristika eine Eingrenzung der gesuchten Spezies. Goffredo und Meiswinkel (2004) haben folgenden Schlüssel zur Bestimmung von *C. imicola* und anderen *Culicoides* spp. aus der Mittelmeer-Region erarbeitet (Bezeichnungen in der Flügelmorphologie siehe Abb. 1).

1. Flügel zeigt deutliches Muster aus hellen und dunklen Flecken..... weiter bei 2.  
  
Flügel zeigt keine Musterung..... Ignorieren.
2. Zweite Radialzelle ist vollständig dunkel..... weiter bei 3.

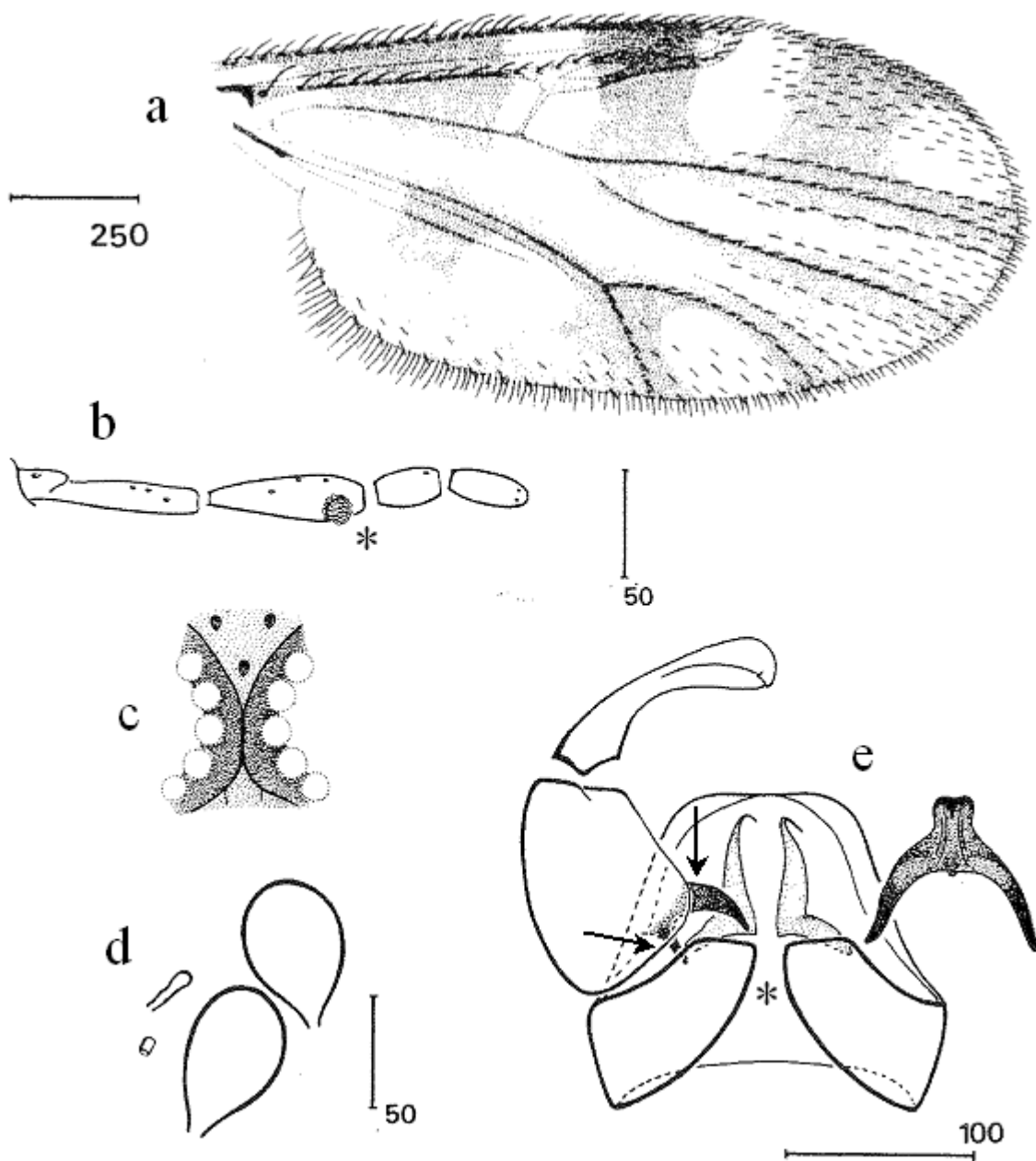
- Zweite Radialzelle ist teilweise oder vollständig hell..... weiter bei 5.
3. Flügel zeigt einen hellen, unregelmäßig geformten Fleck im Zentrum von Zelle r5 (nicht zu verwechseln mit einem hellen Fleck, der sich vom Apex zum Zentrum der Zelle ausbreitet)..... weiter bei 4.
- Heller Fleck im Zentrum von Zelle r5 ist rund oder fehlt ganz..... Ignorieren.
4. Dunkler Fleck im Zentrum der Cubitalzelle ist exzentrisch geformt..... *Nubeculosus-Komplex*.
- Abwesenheit eines dunklen Flecks im Zentrum der Cubitalzelle..... weiter bei 8.
5. Flügel zeigt einen deutlichen runden Fleck im Zentrum der Cubitalzelle..... *Pulicaris-Komplex*.
- Abwesenheit eines dunklen Flecks im Zentrum der Cubitalzelle..... weiter bei 6.
6. Flügel ist überwiegend oder vollständig (inklusive der Cubitalzelle) behaart..... Ignorieren.
- Ausschließlich apikale(s)  $\frac{1}{2}$  -  $\frac{1}{3}$  des Flügels behaart, Analzelle unbehaart..... weiter bei 7.
7. Heller Fleck im oberen Teil von r5 fehlt manchmal; bei Anwesenheit kann er klein/schwach bis groß/besser definiert sein; der Fleck ist entweder eiförmig, rund oder quadratisch geformt; Flügelader M2 ohne ausgeprägten preapikalen Einschnitt..... *Obsoletus-Komplex*
- Heller Fleck im Apex von r5 ist groß/deutlich definiert, sein vorderer Rand läuft deutlich spitz zu; Flügelader M2 mit deutlichem preapikalen Einschnitt..... *C. imicola*

8. Flügel behaart, mit kleinem, deutlichem, runden Fleck, welcher die Flügelader M1 mittig überlagert..... *C. paolae*
- Flügel schwach behaart, ohne runden Fleck, der M1 mittig überlagert..... Schultzei-Komplex

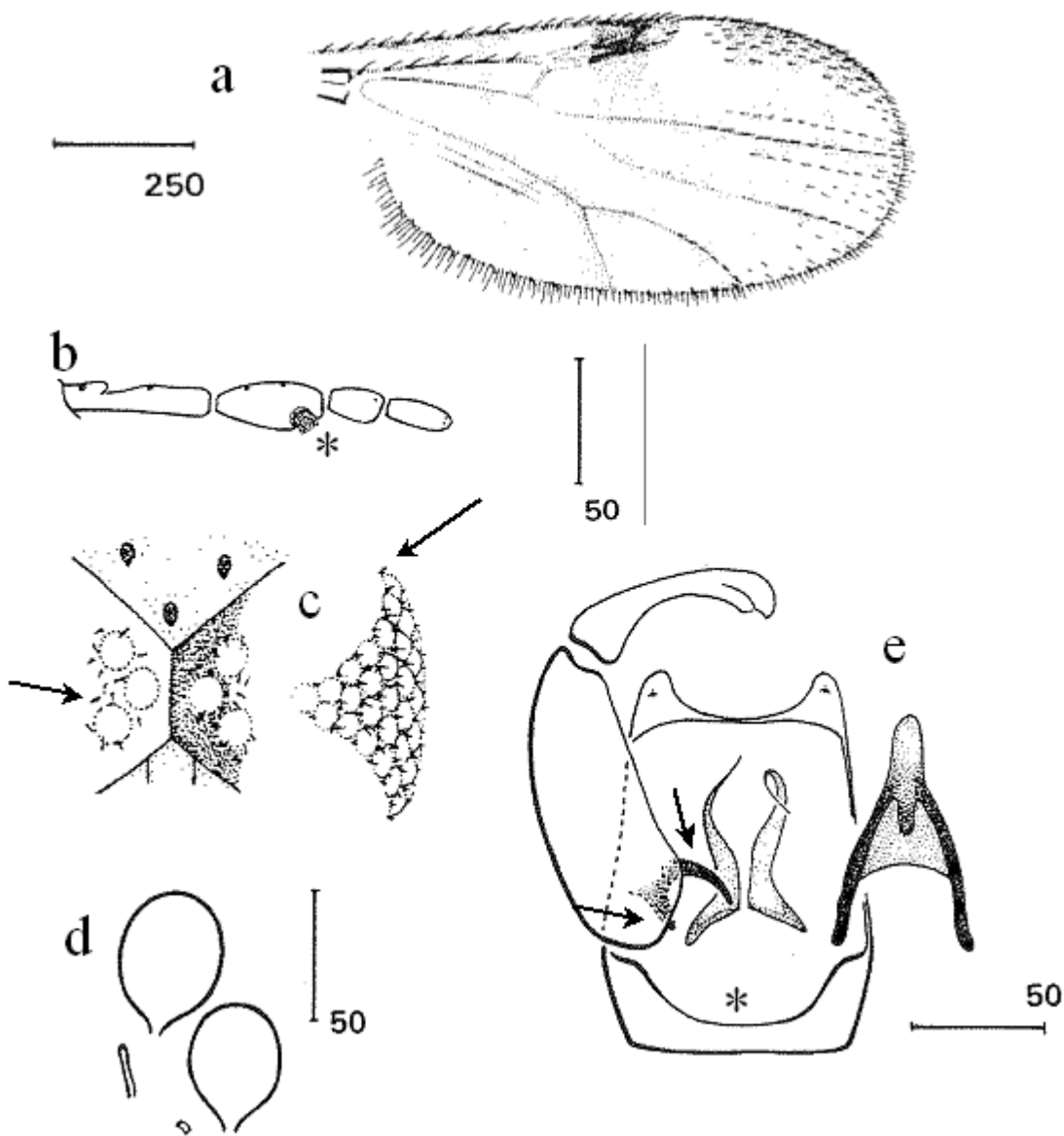
Des Weiteren wurden Arbeiten zur Speziesidentifizierung mit grafischen Darstellungen der speziestypischen Merkmale herangezogen (Delécolle, 1985; Goffredo u. Meiswinkel, 2004; Boorman, 2006). Anhand dieser Schlüssel wurde die Art der jeweiligen Gnitzen bestimmt, wobei die Flügelzeichnung, Merkmale der Augen und Palpen und der Fortpflanzungsorgane als Hauptdifferenzierungsmerkmale gewählt wurden (Abb. 7 – 12).



**Abb. 7** Schematische Zeichnungen der Merkmale von *Culicoides obsoletus*. a, Flügel mit komplexspezifischer Zeichnung; b, Palpe mit in einer einzelnen, relativ breiten Grube angeordneten keulenförmigen sensorischen Organen (\*); c, Zwischenaugenbereich mit sich berührenden Augenfeldern; d, Fortpflanzungsorgane ♀ mit einer rudimentären und zwei funktionellen Spermatheken, e, Fortpflanzungsorgane ♂ mit Aedeagus (lat. Sperma-übertragendes Organ; abgesetzt, rechts), Apodemen (sklerotisierte Einfaltungen und Ansatzpunkte für Muskulatur; ↑) und artspezifischen Vorwölbungen (\*) des neunten abdominalen Segments. (Delécolle, 1985)

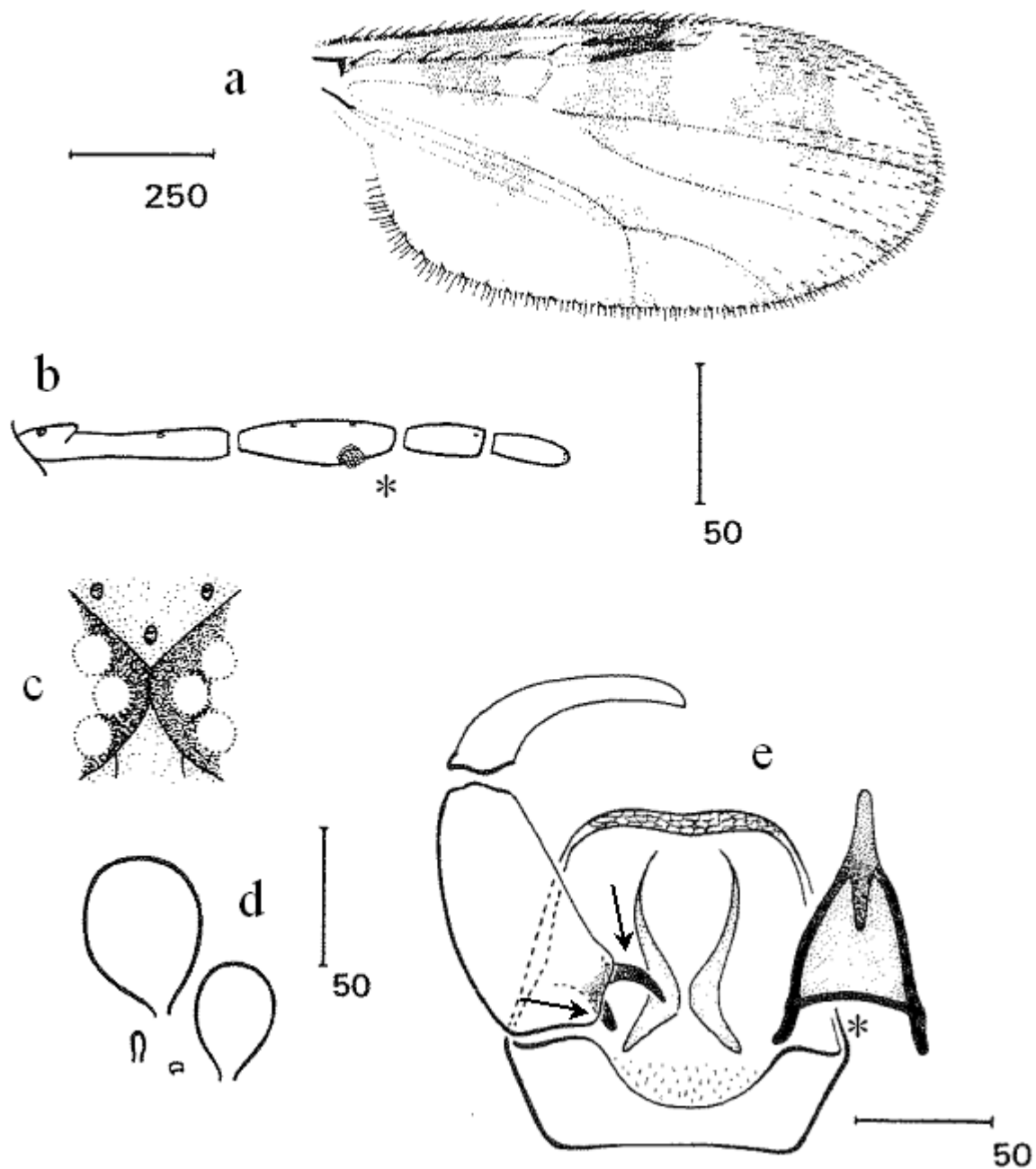


**Abb. 8** Schematische Zeichnungen der Merkmale von *Culicoides scoticus*. a, Flügel mit komplexspezifischer Zeichnung; b, Palpe mit in einer einzelnen, kleinen Grube angeordneten keulenförmigen sensorischen Organen (\*); c, Zwischenaugenbereich mit sich berührenden Augenfeldern; d, Fortpflanzungsorgane ♀ mit einer rudimentären und zwei funktionellen Spermatheken, e, Fortpflanzungsorgane ♂ mit sehr kräftigem Aedeagus (abgesetzt, rechts), Apodemen (↑) und artspezifischem Einschnitt (\*) des neunten abdominalen Segments. (Delécolle, 1985)

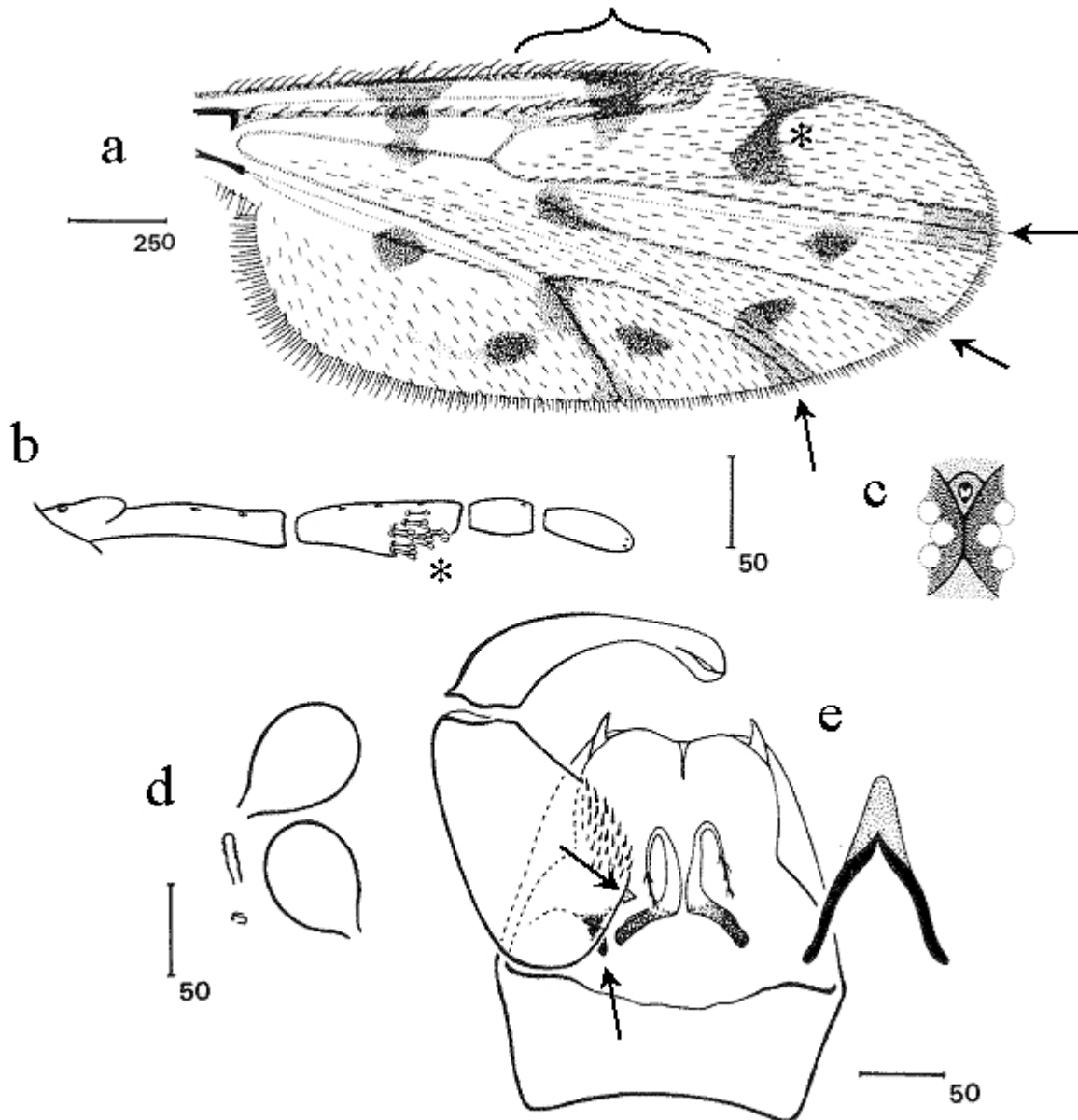


**Abb. 9** Schematische Zeichnungen der Merkmale von *Culicoides chiopterus*. a, Flügel mit komplexspezifischer Zeichnung; b, Palpe mit in einer einzelnen, kleinen Grube angeordneten keulenförmigen sensorischen Organen (\*); c, Zwischenaugenbereich mit sich berührenden Augenfeldern und Augenhaaren (↑); d, Fortpflanzungsorgane ♀ mit einer rudimentären und zwei funktionellen Spermatheken, e, Fortpflanzungsorgane ♂ bestehend aus Aedeagus (abgesetzt, rechts) mit artspezifischem, durchscheinendem „Chitinhäutchen“, Apodemen (↑) und artspezifischer Einbuchtung (\*) des neunten abdominalen Segments. (Delécolle, 1985)

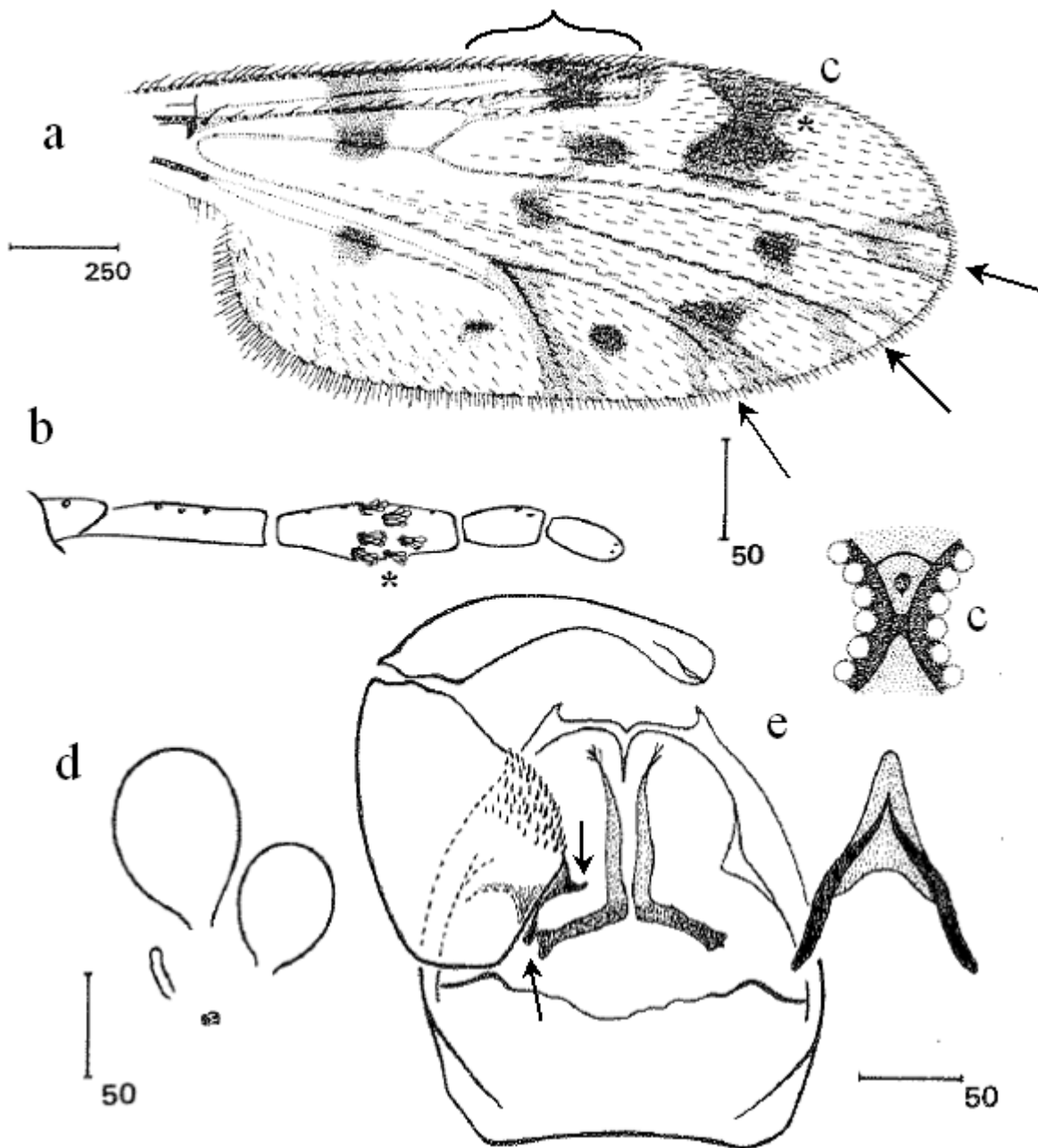




**Abb. 10** Schematische Zeichnungen der Merkmale von *Culicoides dewulfi*. a, Flügel mit komplexspezifischer Zeichnung; b, Palpe mit in einer einzelnen, kleinen Grube angeordneten keulenförmigen sensorischen Organen (\*); c, Zwischenaugenbereich mit sich berührenden Augenfeldern; d, Fortpflanzungsorgane ♀ mit einer rudimentären und zwei funktionellen Spermatheken (eine größer als die andere), e, Fortpflanzungsorgane ♂ mit Aedeagus (abgesetzt, rechts) mit artspezifischem distalen Steg (\*) und Apodemen (↑). (Delécolle, 1985)



**Abb. 11** Schematische Zeichnungen der Merkmale von *Culicoides pulicaris*. a, Flügel mit keilförmiger Zeichnung im Bereich der Radialzellen (geschweifte Klammer), Sanduhrförmiger Zeichnung im oberen Bereich des Flügels (\*), dunkel abgesetzte Endungen der gegabelten Medialader (↑); b, Palpe mit in flachen Grübchen angeordneten keulenförmigen sensorischen Organen (\*); c, Zwischenaugenbereich mit sich berührenden Augenfeldern; d, Fortpflanzungsorgane ♀ mit einer rudimentären und zwei funktionellen Spermatheken, e, Fortpflanzungsorgane ♂ mit Aedeagus (abgesetzt, rechts) und Apodemen (↑). (Delécolle, 1985)

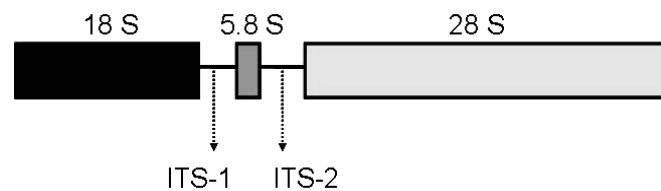


**Abb. 12** Schematische Zeichnungen der Merkmale von *Culicoides punctatus*. a, Flügel mit unregelmäßiger Zeichnung im Bereich der Radialzellen, v.a. r2 (geschweifte Klammer), große, unregelmäßige Zeichnung im oberen Bereich des Flügels (\*), helle, von dunklen Dreiecken eingefasste Endungen der gegabelten Medialader (↑); b, Palpe mit in flachen Grübchen, gehäuft angeordneten keulenförmigen sensorischen Organen (\*); c, Zwischenaugenbereich mit sich kaum berührenden bzw. durch eine Brücke verbundenen Augenfeldern; d, Fortpflanzungsorgane ♀ mit einer rudimentären und zwei funktionellen Spermatheken, e, Fortpflanzungsorgane ♂ mit kräftigem Aedeagus (abgesetzt, rechts) und deutlichen Apodemen (↑). (Delécolle, 1985)

### 3.3. Molekular-genetische Differenzierung

Für die Entwicklung eines PCR-gestützten Verfahrens zur raschen und zuverlässigen Identifizierung von Gnitzenarten wurde die ITS1 Region der ribosomalen DNS ausgewählt.

Die ribosomale DNS enthält neben hoch konservierten Regionen, dabei handelt es sich um Gensequenzen, welche zwischen den Spezies einer Gattung identisch sind (dazu gehören die 5.8S und 18S rDNS Gene; siehe Abb. 13), auch variabelere Regionen, die speziesspezifische Gensequenzen darstellen (dazu gehören ITS1 und -2; siehe Abb. 13).



**Abb. 13** Schematische Darstellung der ribosomalen DNS und der ITS1 Region.

Im Allgemeinen erfolgten molekular-genetische Differenzierung und Primerdesign nach folgendem, vereinfachtem Schema:

1. Extraktion der DNS aus dem nach der Präparation verbliebenen Gnitzenmaterial.
2. Verifizierung der Spezieszugehörigkeit der verwendeten DNS durch Amplifikation der ITS1 Region mittels bereits publizierter konservativer Primer und a) anschließender Visualisierung des amplifizierten DNS-Teilstücks mittels Auftrennung in der Gelelektrophorese und b) Sequenzierung, sowie Abgleich der amplifizierten DNS (engl. *alignment*) mit den Ergebnissen der morphologischen Identifikation der extrahierten Gnitze.
3. Ermittlung einer speziesspezifischen Primerregion mittels Spezial-Software und Synthese dieses Primers durch ein beauftragtes Speziallabor.
4. Amplifikation des spezifischen ITS1-Teilbereichs aus der in Schritt 1 extrahierten DNS mittels der speziesspezifischen Primer.

5. Überprüfung der Funktionalität der Primer auf Sensitivität und Spezifität unter Verwendung von DNS der Zielspezies sowie weiterer morphologisch identifizierter Gnitzenarten.

Sämtliche im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Primer wurden von der Firma TIB-MOLBIOL (Berlin, Deutschland) synthetisiert.

### 3.3.1. Extraktion der DNS

Die Extraktion der DNS erfolgte mittels des Extraktionskits innuPREP<sup>®</sup> DNA Mini Kit (Analytik Jena) gemäß den Anweisungen des Herstellers. Es wurden die mitgelieferten Puffer, Proteinkinase K und Einwegröhrchen sowie DNS-Filter verwendet. Der ebenfalls verwendete PBS-Puffer (pH 7,2 – 7,4) kam aus dem Laborbestand (Rezeptur im Anhang unter 9.4.4.).

Um den Proteinabbau durch die Proteinkinase zu unterstützen, wurde das zu extrahierende Gnitzenmaterial vor der eigentlichen Extraktion zerkleinert. Hierzu wurden 25µl PBS-Puffer in einem 1,5ml Mikro-Schraubröhrchen vorgelegt, die Gnitze hinzugegeben und diese mit einer Pipette, deren Spitze mittels Flamme zum Stößel geschmolzen wurde, zerstampft.

Zum PBS-Puffer-Gnitzen-Gemisch wurden 380µl Lysis-Puffer und 25µl Proteinkinase K gegeben. Das Röhrchen wurde für 15 sec im Zellaufschluss-Schüttelgerät (Disruptor Genie<sup>®</sup>, Scientific Industries, Bohemia, USA) aufgeschüttelt, kurz abzentrifugiert und bei 50°C und 1150 U/min ( $g \approx 6$ ) im Thermomischer (Thermoblock comfort<sup>®</sup>, Eppendorf, Hamburg) über Nacht (ca. 12 h) inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Röhrchen für 1 min bei 13000 U/min ( $g = 10000$ ) abzentrifugiert. Zum Lysat wurden 400µl Bindepuffer (Binding Solution TBS) hinzugegeben und das Röhrchen im Disruptor kurz aufgeschüttelt. Das Gemisch wurde nun in den DNS-Filter (Spin Filter) des Kits und ein separates Auffangröhrchen übertragen. Als Filtermedium dient ein Silicagel-Pellet. In Gegenwart von Na-Ionen (im Bindepuffer) bindet die DNS im Lysat an die Silicapartikel (Vogelstein u. Gillespie, 1979). Der genaue Bindungsmechanismus ist zwar noch unklar, jedoch werden in den elektrostatischen Anziehungskräften, der Ausbildung von Wasserstoffbrücken und der Dehydrierung von DNS und Silicapartikeln bedeutende Funktionen vermutet (Melzak *et al.*, 1996; Nguyen *et al.*, 2010). Das Röhrchen wurde dann für 2 min bei 13000 U/min

zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und der Filter in ein neues Auffangröhrchen überführt. Nach Bindung der DNS an den Filter können die restlichen Bestandteile des Lysats (Puffer, Proteine, Enzyme etc.) durch verschiedene Waschschriffe ausgewaschen werden. Für den ersten Waschschriff wurden 500µl Waschlösung (Washing Solution HS) hinzugefügt. Es erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschriff für 1 min bei 13000 U/min. Der Durchfluss wurde abermals verworfen und der Filter in ein neues Auffangröhrchen überführt. Für die zweite Waschung wurden 750µl einer anderen Waschlösung (Washing Solution MS) hinzugefügt und das Röhrchen erneut für 1 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Die Zentrifugation wurde nach Verwerfen des Durchflusses und Umsetzen des Filters in ein neues Auffangröhrchen nochmals für 2 min wiederholt, um alle Restmengen an Ethanol der Waschlösungen zu entfernen. Danach wurde der Filter in das letzte Röhrchen verbracht, in dem die DNS letztendlich aufgefangen werden sollte. Um die Ausbeute an DNS zu maximieren, wurde die Auswaschung zwei Mal mit je 25-50µl Elutionspuffer (Elution Buffer) durchgeführt und Röhrchen und Filter dabei jeweils für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und für 1 min bei 9000 U/min ( $g = 6000$ ) zentrifugiert. Der Elutionspuffer löst in diesem Schriff die an die Säule gebundene DNS. Die gesamte extrahierte DNS der Gnitze befand sich nun in einem Volumen von 50-100µl Elutionspuffer und wurde bis zur weiteren Verwendung bei  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 3.3.2. Amplifikation der ITS1-Region mittels konservativer Primer

Nach der Extraktion erfolgte die Vervielfältigung der ITS1 Region der DNS der *Culicoides*-Gnitze mittels der konservativen Primer PanCulF (Vorwärts-Primer) und PanCulR (Rückwärts-Primer) nach Cêtre-Sossah et al. (2004) (Tab. 2). Dieser Arbeitsschriff wies die erfolgreiche Extraktion nach und ermöglichte darüber hinaus die DNS-gestützte Identifizierung und Zuordnung der extrahierten Gnitze in Bezug auf Komplex- (beispielsweise *Obsoletus*-Komplex) oder sogar bis auf Speziesebene (*C. pulicaris*, *C. punctatus*) anhand der Länge der Amplifikate (siehe 3.3.3., Tab. 5).

**Tab. 2** Übersicht über die konservativen Primer für *Culicoides* spp. nach Cêtre-Sossah *et al.* (2004)

Primer	Länge (Basen)	T <sub>m</sub> ( °C)	Sequenz (5'– 3')
PanCulF	20	54	GTAGGTGAACCTGCGGAAGG
PanCulR	21	58	TGCGGTCTTCATCGACCCAT

PanCulF, Vorwärtsprimer; PanCulR, Rückwärtsprimer; T<sub>m</sub>, Schmelztemperatur

Zusammen mit der morphologischen Identifizierung ließen sich auf diese Weise einzelne *Culicoides*-Gnizen eindeutig bestimmen, deren DNS anschließend für die Entwicklung speziesspezifischer Primer herangezogen werden sollte.

Jede PCR-Reaktion mit den Primern PanCulF / PanCulR erfolgte in einem 45µl-Ansatz nach dem Schema aus Tabelle 3 (die Herkunft der verwendeten Chemikalien ist unter 9.4.3 im Anhang aufgeführt); die Zutaten wurden im Gefrierschrank bei -80 °C aufbewahrt und nach dem Auftauen kurz abzentrifugiert.

**Tab. 3** Rezept für die PCR-Ansätze mit PanCulF/R angelehnt an das Protokoll von Cêtre-Sossah *et. al* (2004).

PCR-Mastermix	Zusatz je Tube (µl)
10x PCR-Puffer	5,000
25 mM MgCl <sub>2</sub>	5,000
PanCulF (200ng)	1,404
PanCulR (200ng)	1,212
dNTPs	0,500
H <sub>2</sub> O	26,484
TaqGold	0,400
<b>Gesamtvolumen je Ansatz ohne DNS</b>	<b>40,000</b>
<b>DNS je Tube</b>	<b>0,500</b>

Die Zutaten und Tubes wurden während des Ansatzes durchgängig mittels Kühlakku auf 0°C gekühlt. Es wurde zunächst ein Mastermix (ohne DNS) für  $n+1$ -Tubes angesetzt. Dabei stellt  $n$  die Anzahl der benötigten Tubes dar und ein zusätzlicher Ansatz (+1) erfolgte um Pipettierfehler auszugleichen. Der Mastermix wurde gründlich aufgeschüttelt und in der Biofuge pico<sup>®</sup> (Heraeus Sepatech GmbH, Osterode) kurz abzentrifugiert. Nun wurde die benötigte Anzahl 1,5 ml-Mikroröhren mit jeweils 40µl des Mastermixes befüllt und dann die entsprechende DNS dazu gegeben. Das Röhrchen wurde kurz aufgeschüttelt, mit einem Tropfen Mineralöl versiegelt, um eine Kondensation des Inhalts zu verhindern.

Die PCR erfolgte im Biometra Trio-Thermoblock<sup>®</sup> (biomed. Analytik GmbH, Göttingen) nach dem Protokoll von Cêtre-Sossah et. al (2004), modifiziert nach institutsinternen Erfahrungswerten (Tab. 4).

**Tab. 4** Standard PCR-Protokoll, modifiziertes PCR-Protokoll von Cêtre-Sossah et al. (2004).

<b>Schritt</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>
1.	Schmelzen (Denaturierung, engl. <i>melting</i> )	95 °C	10 min
2.	Primerhybridisierung (engl. <i>annealing</i> )	58 °C	30 sec
3.	Amplifikation (Polymerisation, engl. <i>elongation</i> )	72 °C	30 sec
4.	Schmelzen	94 °C	1 min
5.	Primerhybridisierung	58 °C	1 min
6.	Amplifikation	72 °C	1 min
<i>Schritte 4. - 6. werden 30 Mal wiederholt</i>			
7.	abschließende Amplifikationsphase	72 °C	10 min
8.	Abkühlungsphase (engl. <i>cool down</i> )	4 °C	bis Ende
Gesamtdauer: 2 h 39 min 57 sec			

Nach Ablauf der PCR wurden die Amplifikate bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.



### 3.3.3. Elektrophorese

Für die Elektrophorese wurde ein mit Ethidiumbromid eingefärbtes 2%iges Agarosegel hergestellt. Es wurden die Biometra Agagel Mini / Maxi-Kammer<sup>®</sup> mit Tablett (biomed. Analytik GmbH, Göttingen) und als Stromwandler das Biometra Power Pack P25T<sup>®</sup> (biomed. Analytik GmbH, Göttingen) verwendet.

Je nach Tablettgröße wurden 25 ml (Mini-Tablett, 8 große bzw. 12 kleine Taschen) bzw. 75 ml (Maxi-Tablett, 22 große bzw. 44 kleine Taschen) flüssiges Agarosegel mit 5 µl bzw. 15 µl Ethidiumbromid versetzt, zügig in das vorbereitete Tablett gegossen, der entsprechende Kamm für die gewünschte Anzahl Taschen eingesetzt und über 15 min abgekühlt. Die Amplifikate wurden mit je 5 µl Ladepuffer (Rezept siehe 9.4.4) versetzt und kurz abzentrifugiert, damit der Ladepuffer durch den Öltropfen in das Amplifikat fließt. Die Elektrophoresekammer wurde mit 1x Elektrophoresepuffer befüllt, das Tablett eingesetzt und je nach Slotgröße 15 bzw. 10 µl der PCR-Produkte in die Taschen gefüllt. Ein 100 bp-Marker lief zur Längenbestimmung der PCR-Fragmente mit. Die Elektrophorese erfolgte bei 89 V für ca. 30-45 min.

Die Visualisierung erfolgte unter UV-Licht mittels UV-Transilluminator<sup>®</sup> und anschließender Dokumentation durch Fotografie mittels Polaroid-Kamera. Tabelle 5 führt die zu erwartenden Längen der PCR-Produkte auf.

**Tab. 5** Übersicht über die Länge der PCR-Produkte nach Amplifikation mit den konservativen Primern PanCulR/F (Cêtre-Sossah et. al, 2004).

<b>Amplifikatlänge (Basenpaare)</b>	<b>Spezies</b>
391	<i>Culicoides dewulfi</i>
388	<i>Culicoides chiopterus</i>
397	<i>Culicoides obsoletus</i>
401	<i>Culicoides scoticus</i>
512	<i>Culicoides pulicaris</i>
400	<i>Culicoides punctatus</i>

### 3.3.4. Sequenzierung der Amplifikate

Einige Amplifikate wurden zu Beginn der Arbeiten zur Sequenzierung an entsprechende Fachlabore geschickt (zunächst SeqLab, Göttingen, später Services in Molecular Biology, Berlin), um daraufhin die Basensequenzen der heimischen Gnitzen mit den in der Internetdatenbank GenBank<sup>®</sup> bereits veröffentlichten Sequenzen zu vergleichen (siehe 3.3.5. Tab. 6). Es sollte überprüft werden, ob zwischen den von französischen Arbeitsgruppen in GenBank<sup>®</sup> veröffentlichten und den von heimischen Gnitzen erhaltenen DNS-Sequenzen Abweichungen vorliegen. Zudem konnte auf diesem Wege überprüft werden, ob die bereits veröffentlichten Basensequenzen verschiedener *Culicoides*-Arten zur Konstruierung speziesspezifischer Primer herangezogen werden konnten.

Zum Auslesen der Datensätze der Sequenzierung heimischer Gnitzen dienten die Programme Bioedit<sup>®</sup> und Chromas Lite<sup>®</sup>. Diese Basensequenzen sowie die in GenBank<sup>®</sup> veröffentlichten Sequenzen wurden per Alignment im Genetik-Programm GeneDoc<sup>®</sup> abgeglichen und Unterschiede und Gemeinsamkeiten festgestellt. Ein Download dieser Programme steht im Internet zur Verfügung, die Internet-Adressen sind im Anhang unter 9.4.8. bzw. 9.4.9. vermerkt.

### 3.3.5. Primerdesign

Aufgrund der Artenvielfalt unter den Gnitzen, konzentrierte sich die Entwicklung speziesspezifischer Primer auf die sechs *Culicoides*-Arten, welche nach der aktuellen Literatur im Zusammenhang mit der Epidemiologie der Blauzungenkrankheit in Europa eine Rolle zu spielen scheinen und die in den europaweiten Fängen jeweils die zahlenmäßig größten Gruppen darstellten. Dabei handelt es sich um *Culicoides chiopterus*, *C. dewulfi*, *C. obsoletus* s.s., *C. scoticus*, *C. pulicaris* und *C. punctatus*.

Zur Entwicklung der speziesspezifischen Primer waren verschiedene Arbeitsschritte notwendig:

1. Ermittlung potenzieller Primer-Regionen mit Hilfe entsprechender Primer-Design-Programme.

2. Nach Auswahl und Konstruktion eines speziesspezifischen Primers erfolgte die Optimierung des PCR-Protokolls für jedes Primerpaar (bestehend aus speziesspezifischem Vorwärts-Primer und konservativem Rückwärts-Primer) durch Feststellung der optimalen  $MgCl_2$ -Konzentration sowie der optimalen Annealing-Temperatur.
3. Nach Etablierung der PCR erfolgte die Ermittlung der analytischen Spezifität sowie Sensitivität.

### ***Ermittlung potenzieller Primer-Regionen***

Als Zielregion für einen speziesspezifischen Primer wurde die gesamte ITS1-Region herangezogen. Der universelle *Culicoides*-Primer PanCulR sollte weiterhin als Rückwärts-Primer dienen. Der potenzielle Vorwärtsprimer musste spezifisch innerhalb der ITS1-Region binden und verschiedenste Bedingungen erfüllen, um eine erfolgreiche Amplifikation zu gewährleisten. Dieffenbach *et al.* (1993) haben diese Bedingungen wie folgt definiert:

1. Eine Länge von 18 - 24 Basen gewährleistet die spezifische Bindung des Primers an die Ziel-DNS-Sequenz und ermöglicht eine möglichst hohe Zahl von Amplifikationen.
2. Ein Guanin/Cytosin-Anteil der Basensequenz von ca. 50% gewährleistet die Bindung des Primers in einem Temperaturbereich von 56-62 °C.
3. Das 3'-Ende des Vorwärtsprimers darf nicht komplementär zum 3' Ende des Rückwärtsprimers PanCulR sein, da sonst Primer-Dimere entstehen können und für die Amplifikation der Zielregion nicht genügend Primer zur Verfügung stehen.
4. Das 3'-Ende des Vorwärtsprimers darf nicht komplementär zum eigenen 5' Ende sein, da sonst interne Haarnadelschleifen ausgebildet werden und wiederum für die Amplifikation der Zielregion nicht genügend Primer zur Verfügung stehen.
5. Längere Sequenzen sich wiederholender Basen (beispielsweise AAAAAGGGGAAA) sollen vermieden werden, da dies zu Anlagerungsfehlern führen kann.

Um das Einhalten dieser Kriterien beim Primerdesign zu gewährleisten wurden daher verschiedene Genetik-Programme herangezogen. Dazu zählten BLAST<sup>®</sup>, GeneDoc<sup>®</sup> und Primer3 Input 0.4.0<sup>®</sup> (ein Download der Programme bzw. ihre über das Internet nutzbare Version wurden im Internet zur Verfügung gestellt, die Internet-Adressen sind im Anhang unter 9.4.8. bzw. 9.4.9. vermerkt). Die in Tabelle 6 aufgelisteten Sequenzen bzw. Zugangsnummern aus GenBank dienten nach den Ergebnissen der Sequenzierung jeweils als Vorlage für die potenziellen Primer.

**Tab. 6** Auflistung der Genbank Zugriffsnummer für die einzelnen *Culicoides*-Spezies.

Spezies	Genbank und NCBI Zugangsnummer
<i>Culicoides dewulfi</i>	DQ408545
<i>Culicoides chiopterus</i>	DQ408543
<i>Culicoides obsoletus</i>	AY861152
<i>Culicoides scoticus</i>	AY861160
<i>Culicoides pulicaris</i>	AY861156
<i>Culicoides punctatus</i>	AY861157

Die Hauptkriterien für die Auswahl der von den Programmen vorgeschlagenen Vorwärtsprimer-Sequenzen waren eine Länge von ca. 20 Basen, eine Schmelztemperatur ( $T_m$ ) von weniger als 60 °C (da PanCulR eine  $T_m$  von 58 °C besitzt) und das PCR-Produkt sollte im Bereich von 100-300 bp liegen (die ITS1-Sequenzen der Zielspezies variieren von 388-512 bp, siehe Tab. 5).

Des Weiteren wurde die potenzielle Primersequenz zur Kontrolle mit allen Zielsequenzen dieser Arbeit per Alignment in GeneDoc<sup>®</sup> und BLAST<sup>®</sup> abgeglichen, um die Spezifität vor praktischem Einsatz der Primer auch theoretisch abzusichern. Dabei wurde die potenzielle Basensequenz auch in immer kürzerer Form (jeweils eine Base vom 3' bzw. 5' Ende weniger) überprüft, um falsch positive Bindung durch Fehler bei der Polymerisation während der PCR von Vorneherein möglichst auszuschließen.

Erfüllte eine potenzielle Primersequenz alle Anforderungen, so wurde sie kommerziell bestellt (Fa. TIB-MOLBIOL) und in den folgenden PCR-Reaktionen in einer Menge von 200 ng pro Reaktionsansatz eingesetzt.

### ***Optimierung des PCR-Protokolls***

Die Test-PCRs zur Ermittlung des optimalen PCR-Protokolls für die speziesspezifischen Primer orientierten sich im ersten Durchlauf am PCR-Protokoll für PanCulF/R nach Cêtre-Sossah (2004), modifiziert nach institutsinternen Erfahrungen (analog PCR-Protokoll unter 3.3.2., Tab. 4).

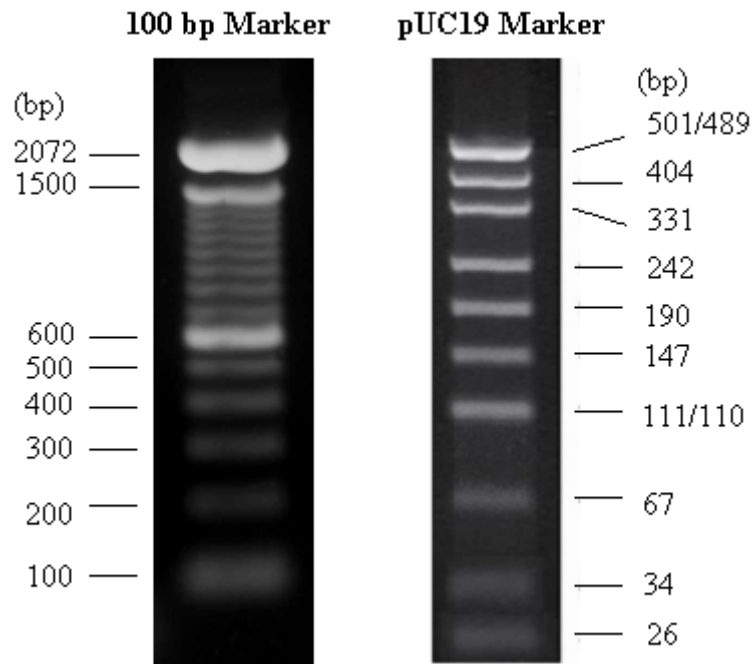
Nach Abschluss der PCR wurde das Gemisch bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

Die Überprüfung der Ergebnisse erfolgte mittels Auftrennung der Amplifikate in der Gelelektrophorese (analog Prozedur unter 3.3.3.) unter Verwendung eines 100 bp Markers. Bei einigen Reaktionen wurde statt des 100bp Markers ein pUC19 / Msp1 Marker (Carl Roth GmbH&Co., Karlsruhe) verwendet, der aufgrund seines Trennprofils eine genauere Schätzung der Länge der PCR-Produkte ermöglichte.

Die Dokumentation der Elektrophorese erfolgte unter UV-Licht per Polaroid-Aufnahme bzw. digital mit einer Nikon 300D<sup>®</sup> Kamera.

Bei unzureichenden Resultaten (undeutliche oder verschmierte Banden, Kreuzreaktionen mit Kontrollproben) wurde das jeweilige PCR-Protokoll durch Optimierung der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration, Änderung der Annealing-Temperatur (Hybridisierungsphase der PCR) oder einer Kombination aus beidem angepasst.

Abbildung 14 zeigt die Trennungsprofile des in der Gelelektrophorese verwendeten 100bp Markers bzw. des pUC19 / Msp1 Marker (Carl Roth GmbH&Co., Karlsruhe).



**Abb. 14** Trennprofile des 100 bp Markers (Invitrogen, Paisley, UK) und pUC19 / MspI Markers (Carl Roth GmbH&Co., Karlsruhe) im Vergleich.

### ***Ermittlung der optimalen MgCl<sub>2</sub>-Konzentration***

Im ersten Schritt wurde zur Optimierung des PCR-Protokolls die optimale MgCl<sub>2</sub>-Konzentration ermittelt. MgCl<sub>2</sub> stellt einen Cofaktor der DNS-Polymerase dar, wird allerdings in geringem Ausmaß auch durch dNTP und DNS gebunden und ist für die Polymerase dann nicht mehr verfügbar (Innis u. Gelfand, 1990); eine ausreichende Menge an MgCl<sub>2</sub> ist daher essentiell für optimale PCR-Ergebnisse.

Die MgCl<sub>2</sub>-Konzentration wurde in den PCR-Ansätzen zu jeweils 1,5 / 2,0 / 2,5 / 3,0 µl MgCl<sub>2</sub> pro Reaktionsansatz zugesetzt. Auf diese Weise wurden pro 45 µl Ansatz Konzentrationen von 0,83 – 1,66 mMol erreicht. Da das Gesamtreaktionsvolumen gleich bleiben musste, wurde das H<sub>2</sub>O-Volumen entsprechend verringert bzw. erhöht.

Die PCR-Konditionen wurden zunächst nicht verändert, sondern das Standard-PanCulF/R-Protokoll verwendet (siehe 3.3.2.). Es folgten Elektrophorese und Dokumentation per Fotografie unter UV-Licht.

### ***Ermittlung der optimalen Hybridisierungstemperatur (Annealing Temperatur)***

Neben der  $MgCl_2$ -Konzentration spielt vor allem die optimale Annealing-Temperatur eine Hauptrolle bei der Optimierung von PCR-Protokollen (Innis u. Gelfand, 1990). Von ihrem Wert hängt ab, wie spezifisch ein Primer an die zu vervielfältigende DNS-Region bindet. Bei zu niedrigen Temperaturen besteht die Gefahr des fehlerhaften Bindens der Primer (engl. *mispriming*), was zu falschen PCR-Produkten führt, während zu hohe Temperaturen ein Binden unter Umständen ganz verhindert und so zu geringerer Ausbeute führt.

Zur Ermittlung der optimalen Annealing-Temperatur wurden PCRs analog des Standard-Protokolls für PanCulF/R durchgeführt, jedoch die Annealing-Temperatur (Schritte 2. und 5. im Protokoll unter 3.3.2.) im Bereich von 57- 62°C variiert.

Da bei einigen PCR-Reaktionen unspezifische Produkte entstanden, wurden diese PCRs nach der *touchdown*-Methode wiederholt. Durch ein *touchdown*-Protokoll wird eine höhere spezifische Bindung der Primer und somit eine Erhöhung der gesuchten Amplifikatmenge ermöglicht. Hierzu wird während der Zyklusphase (Wiederholung der Schritte 4.-6.) die *annealing*-Temperatur bei jeder Wiederholung um 0,2°C gesenkt (beispielsweise von 60°C auf 54°C nach 30 Zyklen). Dies ermöglicht die hochspezifische Bindung des Primers an die Zielsequenz und verringert gleichzeitig die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von Fehlbindungen (Hecker u. Roux, 1996). Die Starttemperatur liegt dabei etwas oberhalb der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) des Primers. Während der zyklusweisen Erniedrigung der Annealing-Temperatur nähert man sich der optimalen Annealing-Temperatur an, wodurch eine hochspezifische Primerbindung ermöglicht wird. Während der weiteren Erniedrigung verschiebt sich das Reaktionsverhältnis von unspezifischer zu hochspezifischer Primerbindung.

In der Regel wurde die Starttemperatur im Bereich von 60 °C gewählt, da die optimale Temperatur des Rückwärtsprimers PanCulR bei 58 °C liegt.

### ***Ermittlung der analytischen Spezifität***

Nach Etablierung eines speziesspezifischen PCR-Protokolls für den jeweiligen Primer wurden zwei Methoden angewandt, um die Spezifität der PCR zu überprüfen. Als Spezifität einer PCR wird deren Fähigkeit bezeichnet, nur die gewünschte Gensequenz zu amplifizieren.

Zunächst wurde eine PCR durchgeführt, die mit DNS verschiedener Gnitzen derselben Spezies durchgeführt wurde (beispielsweise drei verschiedenen *C. obsoletus*-Gnitzen). Das positive Resultat entsprach dabei der Amplifikation aller Individuen.

Die zweite PCR erfolgte in Form eines Kreuztestes: DNS der Zielspezies für den jeweiligen spezifischen Primer und DNS von Gnitzen anderer Spezies wurden gleichzeitig eingesetzt. Im Falle des *C. obsoletus*-Primers beispielsweise drei *C. obsoletus*-Gnitzen und jeweils drei Gnitzen von *C. dewulfi*, *C. scoticus* und *C. chiopterus*, sowie zwei *C. punctatus*-Gnitzen. Als positive Resultate galten hier die jeweiligen Amplifikationen der bekannten Sequenz der Zielspezies, sowie das Ausbleiben einer Amplifikation der anderen Gnitzenspezies.

### ***Ermittlung der analytischen Sensitivität***

Die Sensitivität eines Primers beschreibt dessen Fähigkeit, auch kleinste DNS-Mengen der Zielsequenz in einer PCR zu amplifizieren.

Die Sensitivität der speziesspezifischen Primer wurde mittels Verdünnungsreihen ermittelt. Dabei wurde die DNS einer Zielspezies in immer höherer Verdünnung in der PCR eingesetzt, um die niedrigste DNS-Konzentration zu ermitteln, bei der nach der Amplifikation in der Elektrophorese noch sichtbare PCR-Produkte entstehen. Dazu wurde vorerst von mehreren Extraktionen einer Gnitzenspezies die DNS-Konzentration mittels Spektrophotometrie ermittelt. Das Prinzip der Spektrophotometrie beruht auf der Absorption eines Lichtstrahls mit bekannter Wellenlänge (230-650nm) und Intensität durch eine Flüssigkeit mit in diesem Fall unbekannter Konzentration an DNS im Vergleich zu einer Flüssigkeit bekannter Konzentration. Als Referenzflüssigkeit wurde hier der reine Elutionspuffer aus der Extraktion verwendet (Null-Wert). Nach Ermittlung der DNS-Konzentration in ng/ $\mu$ l konnte nun berechnet werden, in welchem Volumen die jeweilige DNS eingesetzt werden musste, um Verdünnungsstufen von 20ng bis 1 fg zu erhalten. So konnte ermittelt werden, bis zu welcher



Verdünnung bzw. welchem DNS-Gehalt der jeweilige Primer Amplifikate in ausreichender Menge, also sichtbare Bande nach der Elektrophorese, produziert.

### 3.3.6. Weitere Untersuchungen

#### 3.3.6.1. Verfahren zur Reduzierung von Kreuzkontaminationen

Die ersten Versuchsreihen wurden mit DNS von Gnitzen durchgeführt, die aus gepoolten Gnitzenproben stammten. Als *Pool* wird dabei eine Gesamtprobe aus wahlweise nur nach Art (*Culicoides* spp.) oder nach Spezies (beispielsweise *C. dewulfi*) vorsortierten Gnitzen bezeichnet. Da im Vorfeld zu dieser Arbeit bereits ermittelt wurde, dass die DNS-Menge eines Gnitzenflügels oder -beines ausreicht, um eine positive PCR-Reaktion auszulösen, musste die Möglichkeit der Kontamination durch kleinste Gewebemengen anderer Gnitzenspezies in diesem Pool in Betracht gezogen werden. Um daher den Einfluss von Kreuzkontaminationen bei der Untersuchung gepoolter Gnitzenfänge in den Untersuchungen so gering wie möglich zu halten, wurde ein Waschverfahren zur Vorbehandlung der Einzelgnitzen und/oder Gnitzenpools entwickelt. Dazu wurde eine Gnitzenprobe bestehend aus vier *C. obsoletus* und zwei *C. dewulfi*-Gnitzen mit unterschiedlichen Waschverfahren behandelt und dann deren Zusammensetzung in der PCR mit entsprechenden speziesspezifischen Primern ermittelt. Da es in den Fangproben allerdings nur sehr wenige männliche und daher eindeutig differenzierbare *C. pulicaris* und *C. chiopterus* sowie *C. scoticus*-Gnitzen gab, beschränkte sich dieser Versuch auf männliche *C. obsoletus* und *C. dewulfi*-Gnitzen.

**Waschung A, Waschen der Poolprobe in 75%igem Ethanol** – Die Poolprobe bestehend aus vier *C. obsoletus* und zwei *C. dewulfi*-Gnitzen wurde in einem Blockschälchen für eine Stunde und unter viertelstündlichem Schwenken in 75%igem Ethanol gewaschen, wobei die Flüssigkeit nach dem Schwenken mit einer Einmalpipette vorsichtig abgesaugt und durch frischen Alkohol ersetzt wurde. Danach wurde die DNS-Extraktion durchgeführt, wobei die sechs Gnitzen einzeln und in zufälliger Reihenfolge extrahiert wurden. Eine PCR mit den konservativen Primern PanCulF/R bestätigte die erfolgreiche Extraktion. In den darauf folgenden spezifischen PCRs für *C. obsoletus* bzw. *C. dewulfi* sollten nur jeweils vier bzw. zwei der sechs Proben amplifiziert werden.

**Waschung B, Waschen der Poolprobe für eine Stunde in 2%iger Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)**

– Der Versuchsaufbau entspricht im Wesentlichen Waschung A, jedoch wurde die Poolprobe, erneut bestehend aus vier *C. obsoletus* und zwei *C. dewulfi*-Gnitzen, diesmal in einem Schraubglas für eine Stunde und unter viertelstündlichem Schwenken in 2%iger H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gewaschen, wobei die Schwefelsäure nach dem Schwenken mit einer Einmalpipette vorsichtig abgesaugt und durch frische Lösung ersetzt wurde. Danach folgten wieder DNS-Extraktion und PCR mit den konservativen Primern PanCulF/R zur Bestätigung der erfolgreichen Extraktion. In den darauf folgenden spezifischen PCRs für *C. obsoletus* bzw. *C. dewulfi* sollten wiederum nur jeweils vier bzw. zwei der sechs Proben amplifiziert werden.

**Waschung C, Waschen der Poolprobe für sechs Stunden in 2%iger (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)**

– Der Versuchsaufbau entspricht Waschung B, jedoch wurde die Poolprobe, erneut bestehend aus vier *C. obsoletus* und zwei *C. dewulfi*-Gnitzen, diesmal für sechs Stunden und unter halbstündlichem Schwenken in 2%iger H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gewaschen, wobei die Schwefelsäure nach dem Schwenken mit einer Einmalpipette vorsichtig abgesaugt und durch frische Lösung ersetzt wurde. Danach folgten erneut DNS-Extraktion und PCR mit den konservativen Primern PanCulF/R zur Bestätigung der erfolgreichen Extraktion. In den darauf folgenden spezifischen PCRs für *C. obsoletus* bzw. *C. dewulfi* sollten wiederum nur jeweils vier bzw. zwei der sechs Proben amplifiziert werden.

Die Ergebnisse der Waschvorgänge wurden dann vergleichend hinsichtlich DNS-Gehalt nach der Extraktion und Erfolg der spezifischen PCRs beurteilt (jeweils anhand deutlicher Banden im Elektrophoresegel).

**3.3.6.2. Untersuchung gepoolter Gnitzenfänge**

Eine der wichtigsten Anwendungsmöglichkeit der speziesspezifischen PCR besteht darin, Proben mit einer größeren Anzahl Gnitzen unbekannter Spezies (sog. Poolproben), mittels der PCR mit wenig Aufwand zuverlässig auf deren Artspektrum hin untersuchen zu können. Um das Potential der im Rahmen dieser Dissertation entwickelten spezifischen PCRs zu ermitteln, wurde daher ein Versuchsansatz zum Einsatz der Primer erprobt.

**Versuch mit „gespiketen“ Poolproben** – Unter gespiketen Poolproben verstehen sich Proben mit einer bestimmten Anzahl von Gnitzen einer Spezies, denen eine einzelne Gnitze einer

anderen Spezies zugegeben wird. Beispielsweise wurde in einer Probe aus 10, 25 und 50 Gnitzen der *Pulicaris*-Gruppe (genauer *C. punctatus*) je eine morphologisch differenzierte *C. obsoletus*-Gnitze zugegeben. Die gesamte Probe wurde daraufhin extrahiert und mit der für *C. obsoletus* spezifischen PCR (siehe 4.3.2., Tab. 11) amplifiziert. Ziel war es zu ermitteln, bis zu welcher Poolprobengröße eine einzelne Gnitze mittels spezifischer PCR detektiert werden kann. Da es in den Fangproben nur sehr wenige *C. pulicaris*-Gnitzen gab, beschränkte sich dieser Versuch aus praktischen Gründen auf Gnitzen der *Obsoletus*-Gruppe.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Entomologische Untersuchungen

Die Fallen der Arbeitsgruppe der FU Berlin wurden an den 15 Standorten im Zeitraum 29. – 31.03.2007 installiert. Der erste Fangdurchlauf startete jeweils in der folgenden Nacht. Alle weiteren Fänge erfolgten nach den Vorgaben des Fangprotokolls. Der letzte Fang fand in den Nächten vom 01. – 08.05.2008 statt. Es wurden 14 Fänge pro Standort ausgewertet (210 Fangproben im gesamten Fangzeitraum) und insgesamt 225.018 Gnitzen gezählt. Davon gehörten 156.611 (69,6%) zur *Obsoletus*-Gruppe, 59.997 (26,7%) zur *Pulicaris*-Gruppe und 8.410 (3,6%) zu anderen *Culicoides* spp. Eine Zusammenfassung der Fangzahlen pro Falle und Gruppe über den gesamten Fangzeitraum kann Tabelle 7 entnommen werden.

**Tab. 7** Gefangene *Culicoides*-Gnitzen des entomologischen Monitorings (Arbeitsgruppe Berlin) zwischen März 2007 – Mai 2008 aufgeführt nach Falle und Gruppe.

Fallen-Nr.	Code	<i>Obsoletus</i> - Gruppe	<i>Pulicaris</i> - Gruppe	Rest	Gesamt
1	ST WB	3713	1979	307	5999
2	ST BTF	21741	2625	431	24797
3	NI OHA	39672	633	668	40973
4	NI NI	11879	2768	1072	15719
5	NI SFA	7690	1555	205	9450
6	NI ROW	13830	7115	206	21151
7	NI PE	4921	1998	286	7205
8	NI WOB	2087	2546	2068	6701
9	ST OK	9669	5129	388	15186
10	NI UE	6439	4626	123	11188
11	ST SDLA	6681	4215	180	11076
12	ST SDLB	9453	13249	942	23644
13	BB PR	1979	2423	1260	5662
14	NI LG	11220	6331	96	17647
15	MV LWL	5637	2805	178	8620

Über den gesamten Fangzeitraum gerechnet wurden die meisten Gnitzen (40.973) demnach am Standort 3 (NI OHA, Walkenried, Niedersachsen) und die wenigsten Gnitzen (5.662) am Standort 13 (BB PR, Eldenburg/Lenzen, Brandenburg) gefangen. Eine detaillierte Aufstellung über die monatlichen Fänge an den einzelnen Standorten sind den Abbildungen 15 - 19 zu entnehmen.

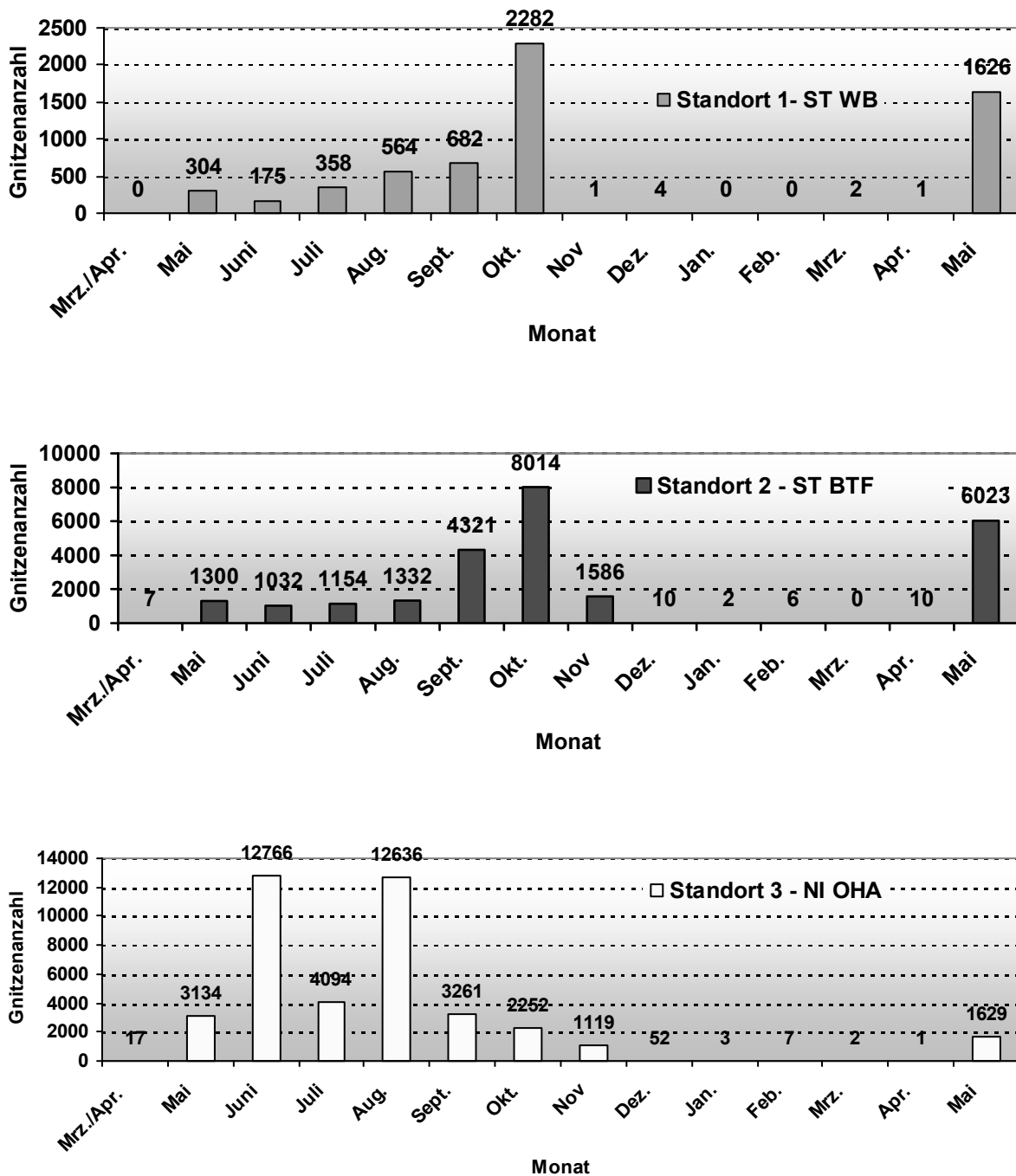


Abb. 15 Monatliche Fangzahlen der Standorte 1 – 3 (Entomologisches Monitoring, März/April 2007 – Mai 2008).

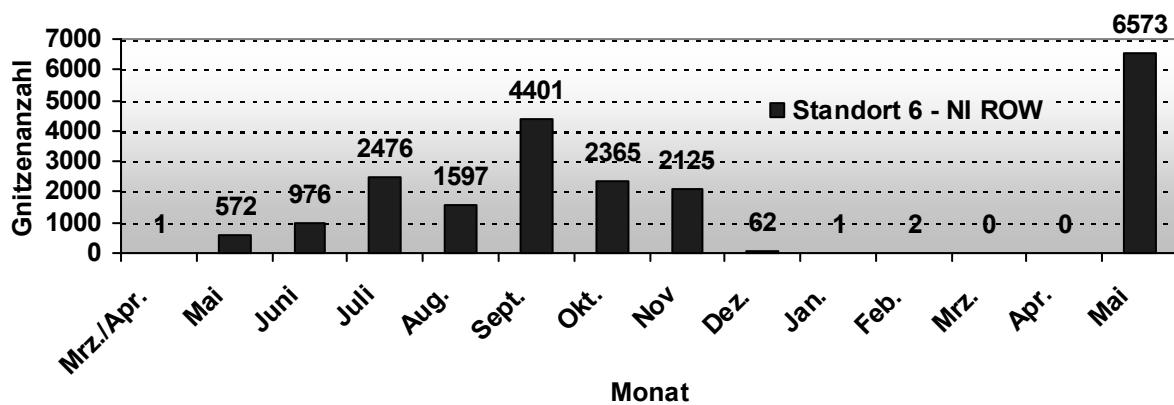
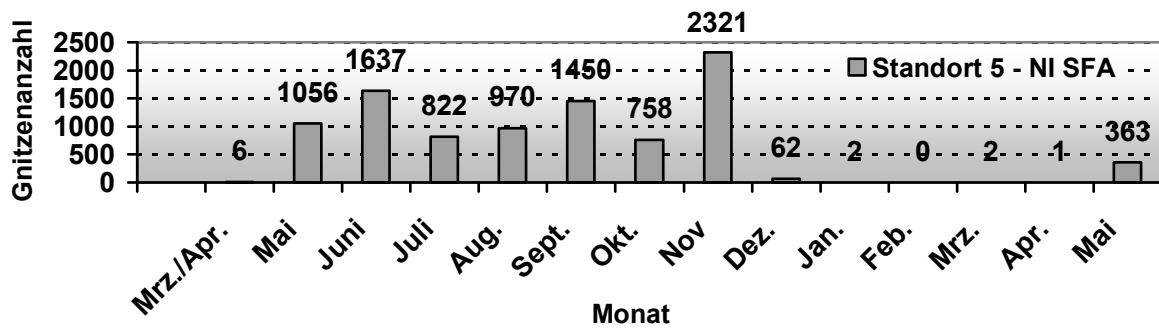
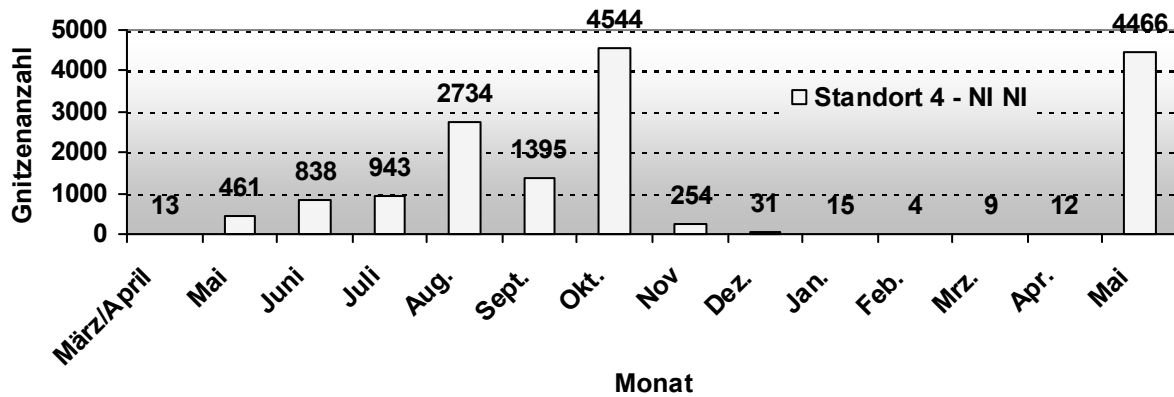


Abb. 16 Monatliche Fangzahlen der Standorte 4 – 6 (Entomologisches Monitoring, März/April 2007 – Mai 2008).

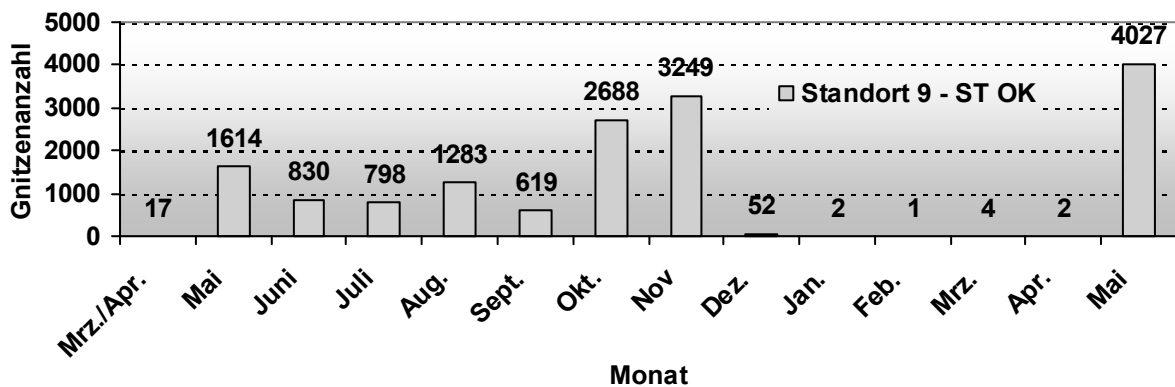
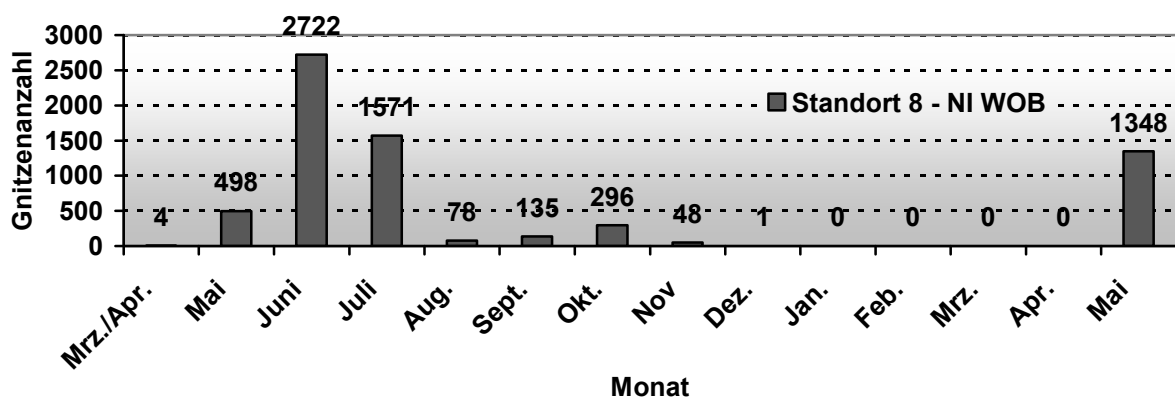
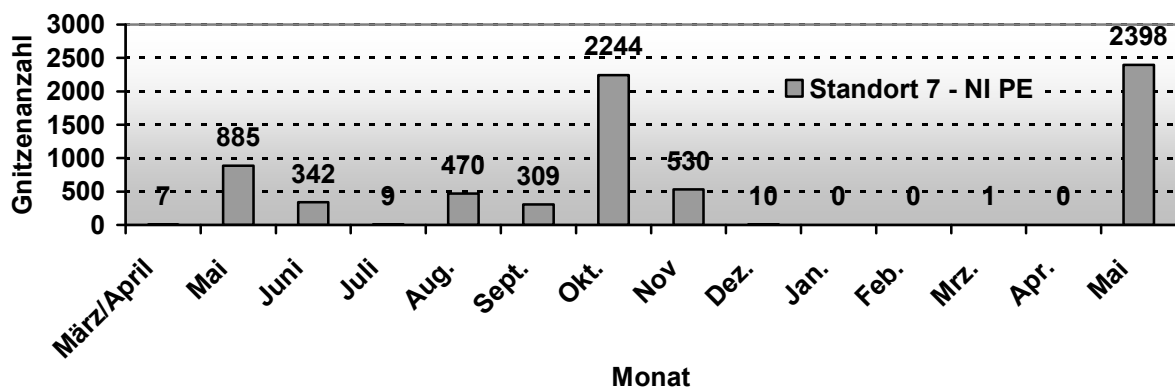


Abb. 17 Monatliche Fangzahlen der Standorte 7 – 9 (Entomologisches Monitoring, März/April 2007 – Mai 2008).

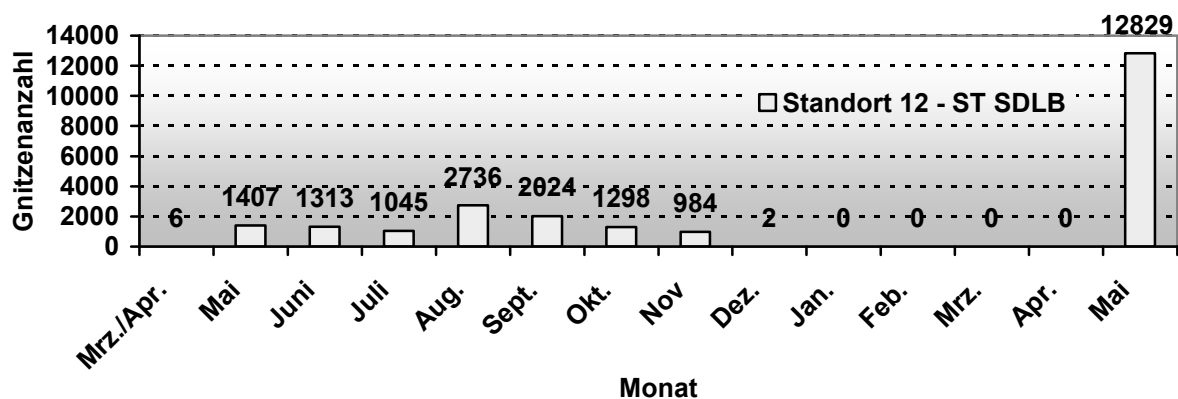
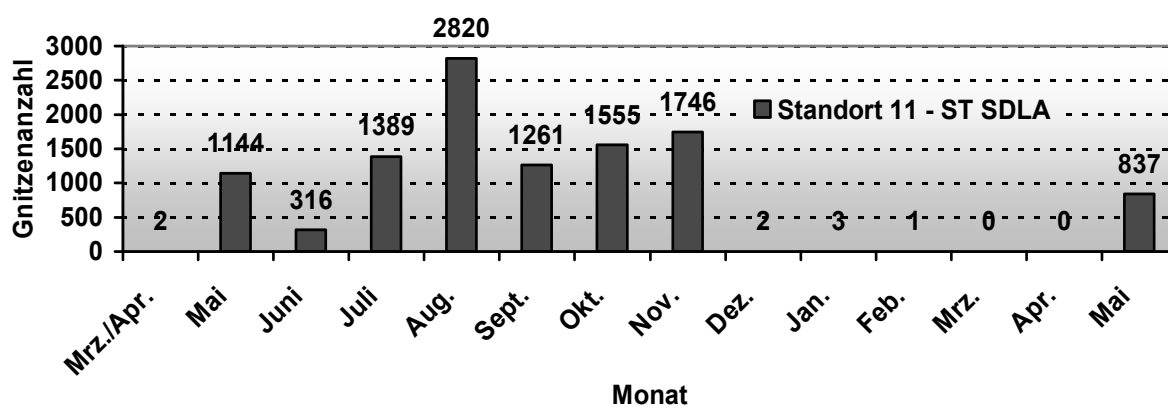
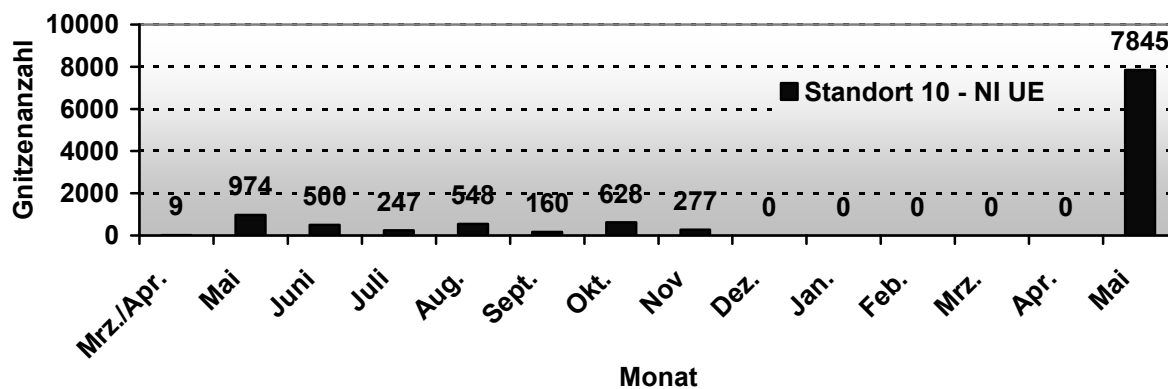


Abb. 18 Monatliche Fangzahlen der Standorte 10 – 12 (Entomologisches Monitoring, März/April 2007 – Mai 2008).



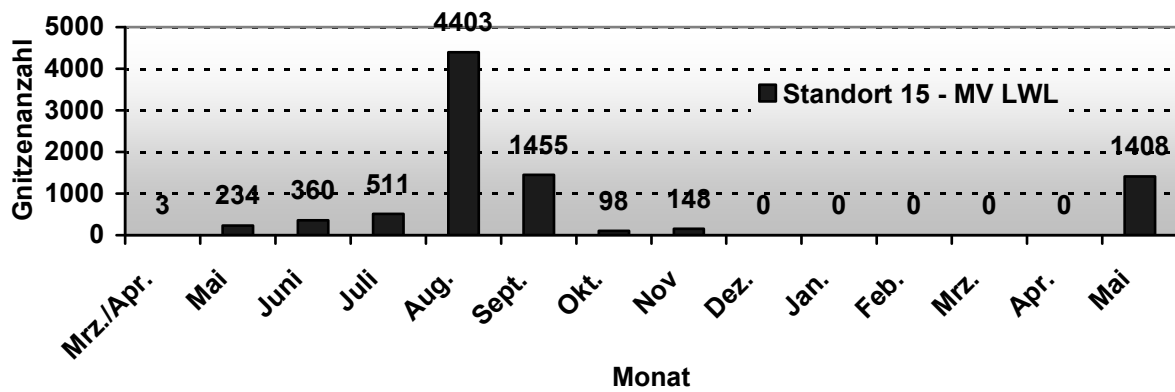
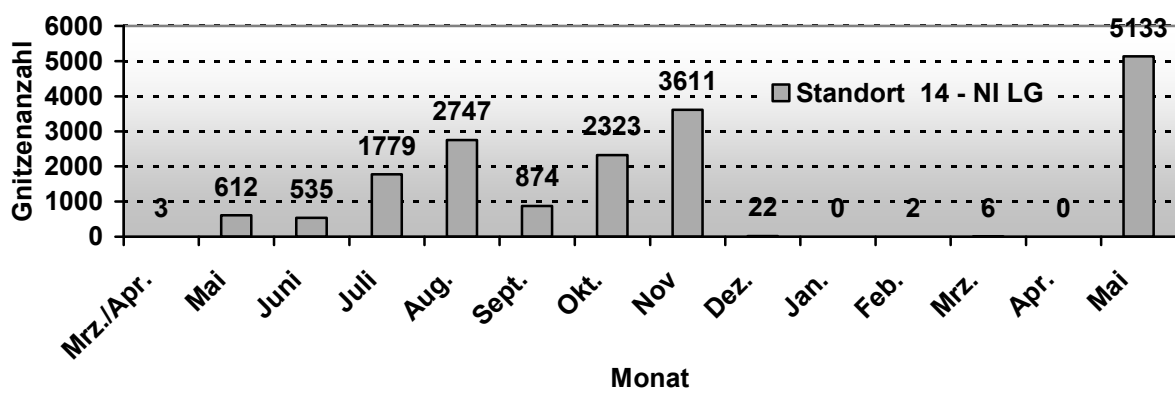
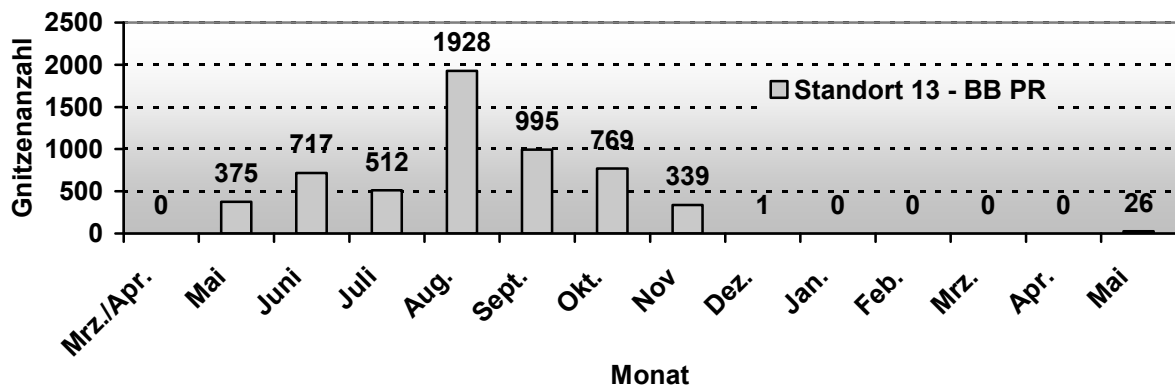


Abb. 19 Monatliche Fangzahlen der Standorte 13 – 15 (Entomologisches Monitoring, März/April 2007 – Mai 2008).

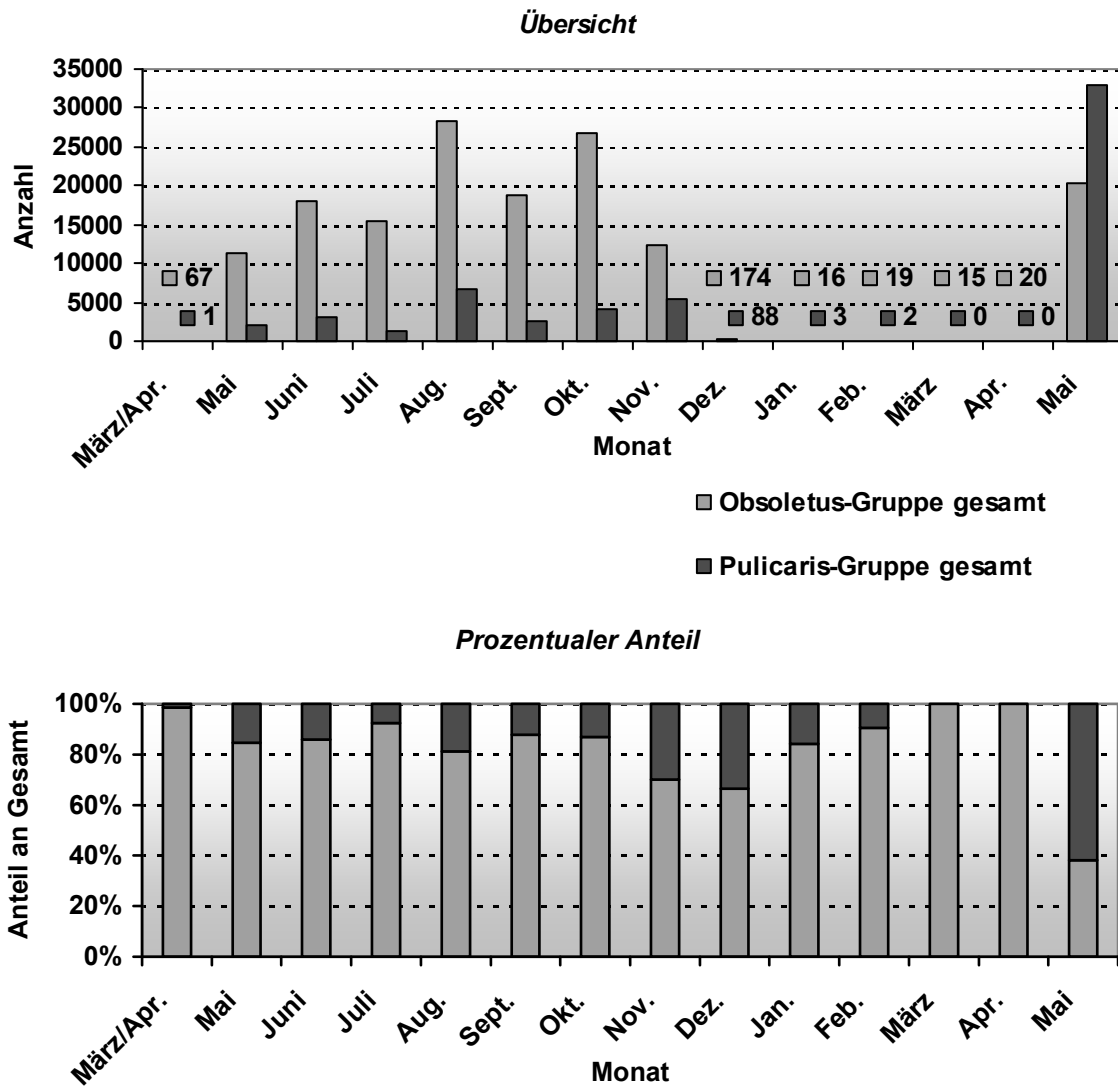
Die monatlichen Fangzahlen fielen je nach Standort und Monat sehr unterschiedlich aus. Im Juni 2007 beispielsweise variierte die Zahl der gefangenen Gnitzen deutlich zwischen den Fallenstandorten. Während durchschnittlich ca. 1.000 Gnitzen gezählt wurden, gab es unter den Fallenstandorten einen „Ausreißer“, in dessen Fangprobe in diesem Monat über 12.000 Gnitzen gezählt wurden. Im Mai 2008 hingegen, wurden in allen Fallenstandorten weitaus mehr Gnitzen gefangen als im Vorjahr (durchschnittlich 4.000 ggü. 1.000 im Mai 2007). Schließlich lässt sich festhalten, dass die Fangzahlen in allen Fallen in den Frühsommer- und Sommermonaten höher, als in den Herbst- und Wintermonaten ausfielen.

Die Auswertung der Wetterdaten erfolgte im Zuge der Auswertungen des Monitoring-Projekts vom FLI und ist kein Bestandteil der Untersuchungen dieser Arbeit.

#### **4.1.1. Saisonale Abundanz von Gnitzen der *Obsoletus*- und *Pulicaris*-Gruppe**

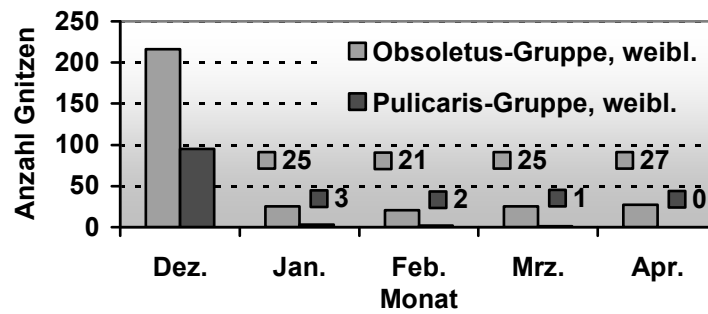
Da der Anteil der zur „Rest“-Gruppe zugeordneten *Culicoides* spp. nur 3,7% (n=8.410) an der Gesamtfangzahl betrug und ihre Rolle im Seuchengeschehen der BTB bislang ungeklärt ist, wurden die Fangdaten dieser Gnitzengruppe bei den folgenden Auswertungen nicht berücksichtigt.

Die meisten Gnitzen wurden in den Monaten Mai bis November 2007 gefangen (Minimum 13.274 Gnitzen im Mai und Maximum 34.907 Gnitzen im August). Gnitzen der *Obsoletus*-Gruppe bildeten dabei jeweils mit über 60-92,5% des Gesamtfanges die zahlenmäßig stärkste Fraktion (Abb. 20 Oberes Diagramm). Eine Ausnahme bildeten die Fangproben vom Mai 2008, welche im Vergleich zum Mai des Vorjahres besonders hohe Fangzahlen aufwiesen. In dieser Fangprobe bildeten überraschenderweise Gnitzen der *Pulicaris*-Gruppe zahlenmäßig die stärkste Fraktion (>60%) (Abb. 20 Unteres Diagramm).



**Abb. 20** Übersicht über die monatlichen Gesamtfangzahlen aller 15 Standorte des Entomologischen Monitorings (März/April 2007 - Mai 2008) aufgegliedert in *Obsoletus*- und *Pulicaris*-Gruppe, (oberes Diagramm), sowie deren prozentualer Anteil am Gesamtfang des jeweiligen Monats (unteres Diagramm).

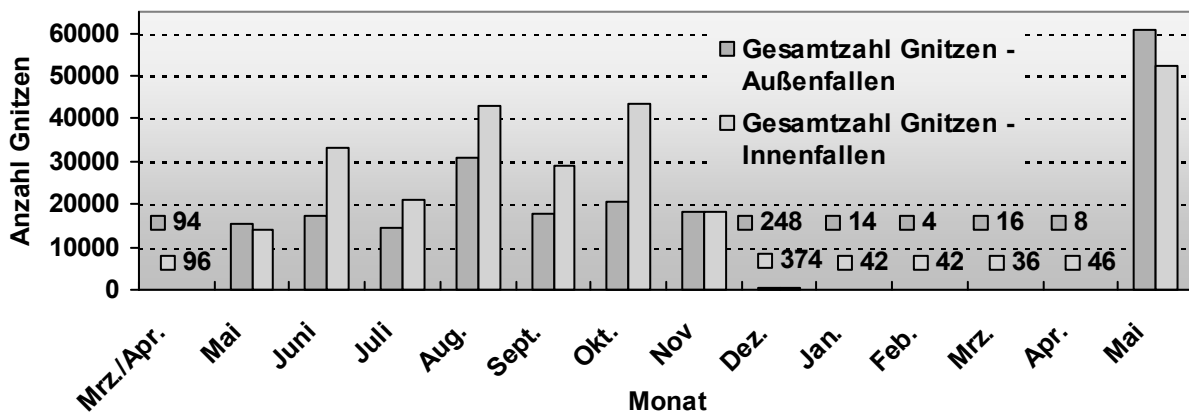
Auch in den Winter- und Vorfrühlingsmonaten Dezember 2007 ( $n=311$ ) bis April 2008 ( $n=27$ ) wurden noch Gnitzen in den Fallen gefangen, wobei es sich fast ausschließlich um Gnitzen der *Obsoletus*-Gruppe handelte (Abb. 21).



**Abb. 21** Übersicht über die Fangzahlen von weiblichen Gnitzen der *Obsoletus*- und *Pulicaris*-Gruppe, in den Wintermonaten Dezember 2007 – April 2008 des Entomologischen Monitorings.

#### 4.1.2. Fänge der Innen- und Außenfallen

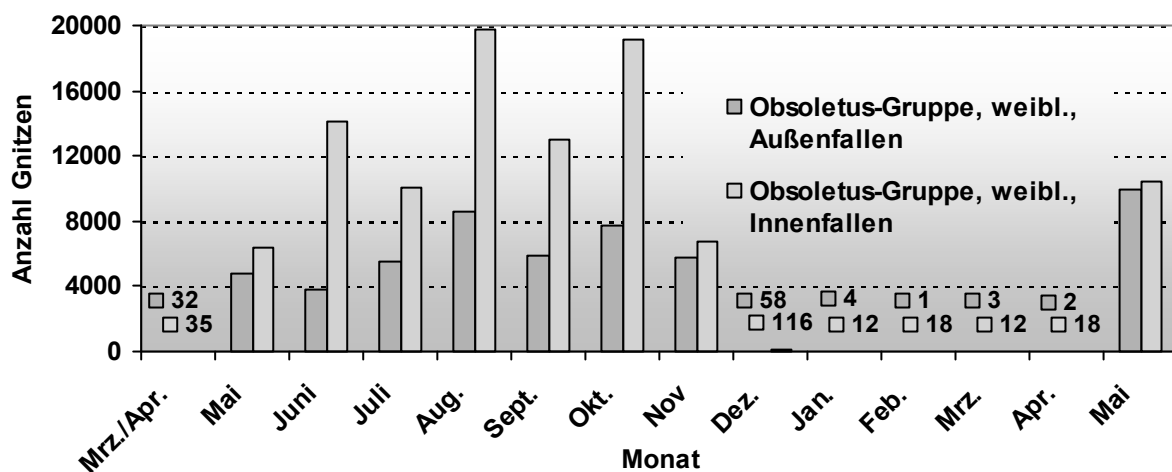
Sechs der 15 Fallen waren im Inneren der Ställe installiert, neun außerhalb der Stallungen (genaue Aufstellung siehe Tab. 1 unter Abschnitt 3.1.2.). Von den insgesamt 225.018 gefangenen Gnitzen (*Obsoletus*-, *Pulicaris*-Gruppe und Rest) wurden 127.492 (56,7%) in Fallen innerhalb und 97.526 (43,3%) in Fallen im Außenbereich der Stallungen gefangen. Abbildung 22 zeigt die Verteilung der Fänge der Innen- und Außenfallen auf die einzelnen Monate im Zeitraum März/April 2007 – Mai 2008.



**Abb. 22** Vergleich der Gesamtfangzahlen der Innen-/Außen-Fallen während des Entomologischen Monitorings über den gesamten Zeitraum März/April 2007 - Mai 2008.

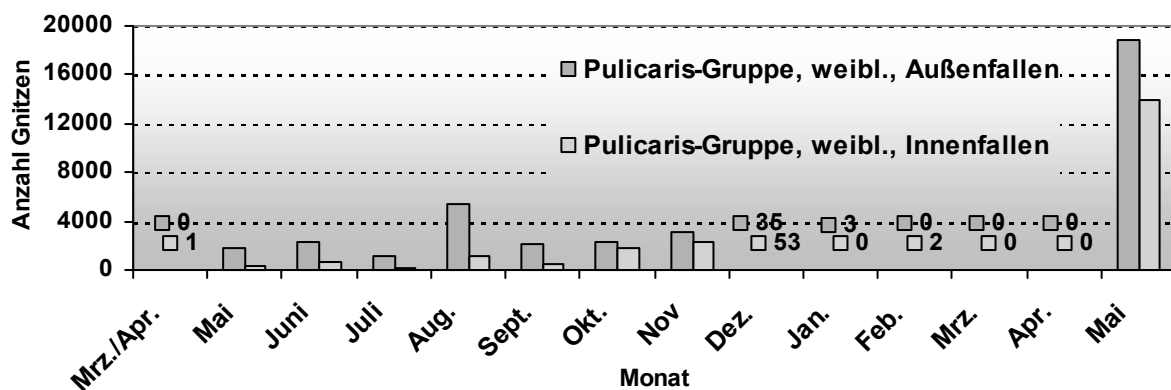
Sowohl in den Fallen innerhalb als auch außerhalb der Stallungen wurden die meisten Gnitzen in den Monaten Mai bis November gefangen, während die Gnitzenzahl in den Winter- und Vorfrühlingsmonaten Dezember bis April stark abnahm. Dabei wurden in den Außenfallen in der Regel weniger Gnitzen gefangen als in den Fallen im Stallinneren. Interessanterweise wurden einzig im Monat Mai (sowohl 2007 als auch 2008) mehr Gnitzen außerhalb der Stallungen gefangen, als innerhalb. Des Weiteren wurden im Winter sowohl in den Innen- als auch Außenfallen noch Gnitzen gefangen.

Betrachtet man die Fangzahlen der Gnitzen getrennt nach der Gruppe, so wurden Gnitzen der *Obsoletus*-Gruppe überwiegend in den Innenfallen gefangen (Abb. 23). In den Monaten August und Oktober 2007 wurden dort mit bis zu 20.000 Gnitzen pro Monat die meisten Gnitzen der *Obsoletus*-Gruppe gefangen.



**Abb. 23** Aufstellung über die Fangzahlen von weiblichen Gnitzen der *Obsoletus*-Gruppe getrennt nach der Fallenposition im Außen- oder Innenbereich der Stallungen (März 2007 – Mai 2008).

Gnitzen der *Pulicaris*-Gruppe wurden hingegen vor allem in den Fallen im Außenbereich der Stallungen gefangen (Abb. 24).



**Abb. 24** Aufstellung über die Fangzahlen von weiblichen Gnitzen der *Pulicaris*-Gruppe getrennt nach der Fallenposition im Außen- oder Innenbereich der Stallungen (März 2007 – Mai 2008).

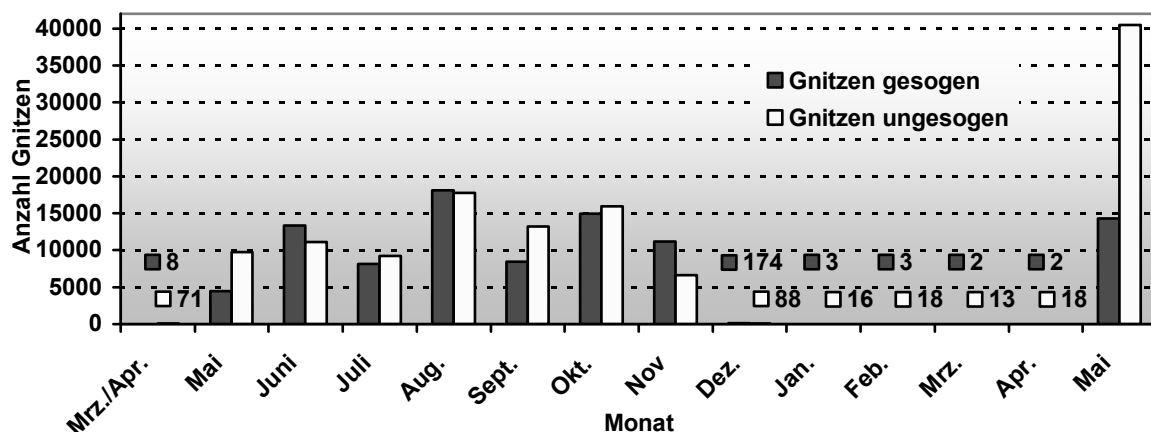
Im Monat August 2007 wurden dort gut 5.000 Gnitzen der *Pulicaris*-Gruppe gefangen. Allerdings spielt auch in dieser Betrachtung der Monat Mai 2008 eine Sonderrolle, in dem knapp 19.000 Gnitzen der *Pulicaris*-Gruppe in den Außenfallen gefangen wurden.

#### 4.1.3. Anteil gesogener Gnitzen

Da männliche Gnitzen aufgrund ihrer Lebensweise bei der Übertragung der Blauzungenkrankheit keine Rolle spielen und sich ihr Anteil auf nur 3,4% (n=7580) der Gesamtfangzahl belief, wurden in den folgenden Auswertungen nur die Fangdaten der weiblichen Gnitzen berücksichtigt.

Da der Anteil anderer als der zur *Obsoletus*- oder *Pulicaris*-Gruppe zugeordneten *Culicoides* spp. nur 3,7% (n=8410) an der Gesamtfangzahl betrug und ihre Rolle im Seuchengeschehen der BTB bislang ungeklärt ist, wurden die Fangdaten dieser Gnitzengruppe ebenfalls nicht für die folgenden Auswertungen verwendet.

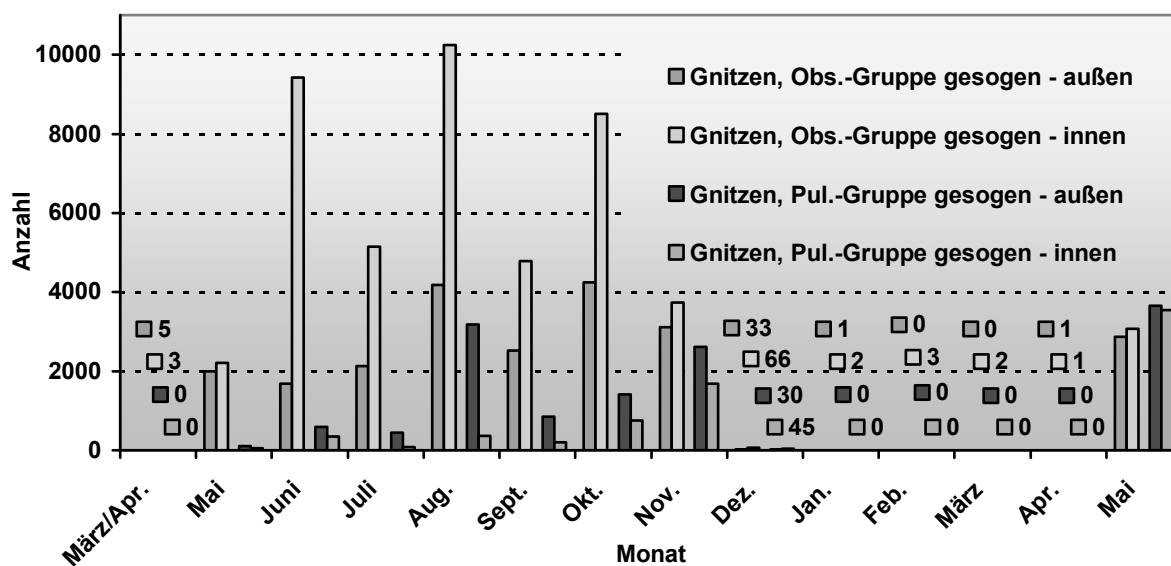
Es wurden in den 15 Fallen insgesamt 216.023 weibliche Gnitzen der *Obsoletus*- und *Pulicaris*-Gruppe gefangen. Davon waren 91.678 (42,4%) Gnitzen mit Blut vollgesogen und 124.345 (57,6%) Gnitzen ungesogen. Der Anteil gesogener Gnitzen am monatlichen Fang schwankte allerdings deutlich (Abb. 25) und betrug zwischen 10% im März/April 2007 bzw. 2008 und bis zu 65% im August 2007.



**Abb. 25** Darstellung zur Verteilung mit Blut voll gesogener und ungesogener weiblicher *Culicoides*-Gnitzen (*Obsoletus*- und *Pulicaris*-Gruppe) in den Fängen im Rahmen des Entomologischen Monitorings März 2007 – Mai 2008.

Im Dezember 2007 wurde überraschenderweise immer noch eine verhältnismäßig große Zahl gesogener Gnitzen sowohl der *Obsoletus*- als auch der *Pulicaris*-Gruppe gefangen (174 von insgesamt 262 gefangenen Gnitzen), während in den Monaten Januar – April 2008 meist nur noch ungesogene Gnitzen der *Obsoletus*-Gruppe in den Fallen zu finden waren.

Betrachtet man die Verteilung der gesogenen Gnitzen auf die Fallen außerhalb bzw. innerhalb der Stallungen (Abb. 26) lässt sich feststellen, dass gesogene Gnitzen der *Obsoletus*-Gruppe vor allem in den Fallen innerhalb der Stallungen gefangen wurden, während gesogene Gnitzen der *Pulicaris*-Gruppe vor allem in den Fallen außerhalb der Stallungen gefangen wurden.



**Abb. 26** Gegenüberstellung der Fangzahlen weiblicher, gesogener bzw. ungesogener Gnizen der *Obsoletus*- bzw. *Pulicaris*-Gruppe aus den Fallen außerhalb bzw. innerhalb der Stallungen (Entomologisches Monitoring März/April 2007 – Mai 2008).

#### 4.1.4. Artenspektrum nach Differenzierung

Die Grobdifferenzierung fand zeitgleich mit dem Einsortieren der Gnizen in die jeweiligen Gruppen statt. Allerdings wurden aufgrund der teilweise immens hohen Fangzahlen keine Aufzeichnungen über die genaue Anzahl an Individuen einer Art gemacht, so dass es sich bei der Einschätzung der Anteile nur um subjektive Schätzungen handelt.

Die Ergebnisse zum Artenspektrum umfassten folgende Daten:

- *Culicoides imicola* wurde nicht nachgewiesen.
- Als zur *Obsoletus*-Gruppe gehörend fanden sich die Arten: *C. obsoletus* s.s., *C. chiopterus*, *C. dewulfi*, *C. scoticus*. Da sich die Weibchen dieser Arten morphologisch zu ähnlich sind, wurden die angegebenen Arten anhand männlicher Exemplare ermittelt. Die Fraktion der Weibchen konnte demnach nicht auf Artstufe bestimmt werden, so dass keine absoluten Zahlen zu den einzelnen Arten angegeben werden können. Auffallend war jedoch, dass unter den Männchen vor allem *C. obsoletus* s.s. vertreten waren.



- Als zur *Pulicaris*-Gruppe gehörend fanden sich *C. punctatus* und *C. pulicaris*. Diese beiden Arten ließen sich besser auseinander halten als die unterschiedlichen Arten der *Obsoletus*-Gruppe. Auch hier wurden aufgrund der hohen Fangzahlen keine Aufzeichnungen zu absoluten Zahlen gemacht, allerdings wurden überwiegend *C. punctatus* s.s. identifiziert und nur einzelne Exemplare von *C. pulicaris*.
- Zu anderen *Culicoides* spp. gehörend fanden sich v.a. *C. festivipennis*, *C. newsteadi*, *C. riethi*, *C. vexans* und *C. circumscriptus*, welche allein am Flügelmuster bestimmt wurden. Andere Arten hätten nur durch Methoden der Feindifferenzierung identifiziert werden können, worauf aus Zeitgründen jedoch verzichtet wurde.

#### 4.1.5. Ergebnisse der Untersuchungen auf BTV-Genom

Die Ermittlung von BTV-Genom in den gefangenen Gnitzen erfolgte stichprobenweise am FLI in Riems mittels real-time RT-PCR. Dabei wurden elf der 710 eingesendeten Proben positiv für das BTV-Genom getestet. Der erste positive Befund betraf eine Probe vom August 2007, die meisten positiven Pools (sechs von elf) stammten allerdings aus Fangproben vom November 2007 (Tab. 8). Mit Ausnahme einer Poolprobe stammten alle positiv getesteten Fangproben aus niedersächsischen Fallen. Sieben der für BTV-8-Genom positiven Proben stammten von Fallen aus dem Stallinneren (Höfe Nr. 3, 4, 7, 14), die restlichen von Fallen im Außenbereich (Höfe Nr. 5, 7, 9) der Stallungen bzw. von einer Weide (Hof Nr. 8). Der Hauptteil der positiven Pools enthielt gesogene Gnitzen der *Obsoletus*-Gruppe, allerdings wurden ebenfalls Gnitzen der *Pulicaris*-Gruppe, sowie ungesogene Gnitzen beider Gruppen positiv auf das BTV-8-Genom getestet.

**Tab. 8** Auflistung der BTV-8-Genom positiven Gnitzenpools und deren Fallenzugehörigkeit (Entomologisches Monitoring März 2007-Mai 2008).

Hof	Code	August	September	Oktober	November
3	NI OHA			2 Pools gesogene ♀ <i>Obsoletus</i> -Gruppe	1 Pool gesogene ♀ <i>Obsoletus</i> -Gruppe
4	NI NI				1 Pool gesogene ♀ <i>Obsoletus</i> -Gruppe
5	NI SFA				1 Pool gesogene ♀ <i>Obsoletus</i> -Gruppe
7	NI PE				1 Pool gesogene ♀ <i>Obsoletus</i> -Gruppe, 1 Pool ungesogene ♀ <i>Obsoletus</i> -Gruppe
8	NI WOB			1 Pool ungesogene ♀ <i>Pulicaris</i> -Gruppe	
9	ST OK			1 Pool gesogene ♀ <i>Pulicaris</i> -Gruppe	
10	NI UE	1 Pool ungesogene ♀ <i>Obsoletus</i> -Gruppe			
14	NI LG				1 Pool gesogene ♀ <i>Pulicaris</i> -Gruppe

Nach Befragung der Landwirte zeigte sich, dass auf drei Betrieben (Höfe Nr. 4, 5, 7), von denen BTV-8 positiven Poolproben stammten, ebenfalls Rinder nachweislich mit BTV-8 infiziert waren.

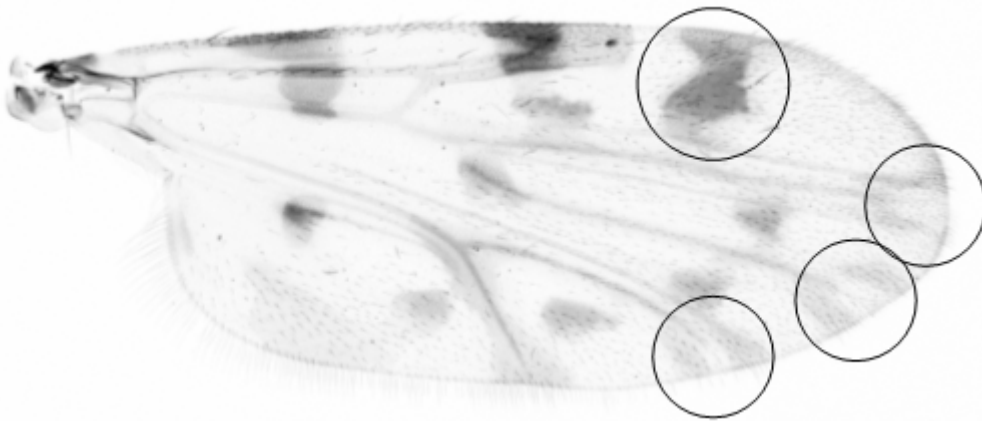
## 4.2 Morphologische Differenzierung

Die folgenden Ausführungen beschränken sich ausschließlich auf die für die Primer-Entwicklung berücksichtigten Arten *C. obsoletus* s.s., *C. chiopterus*, *C. dewulfi* und *C. scoticus*, sowie *C. punctatus* und *C. pulicaris*.

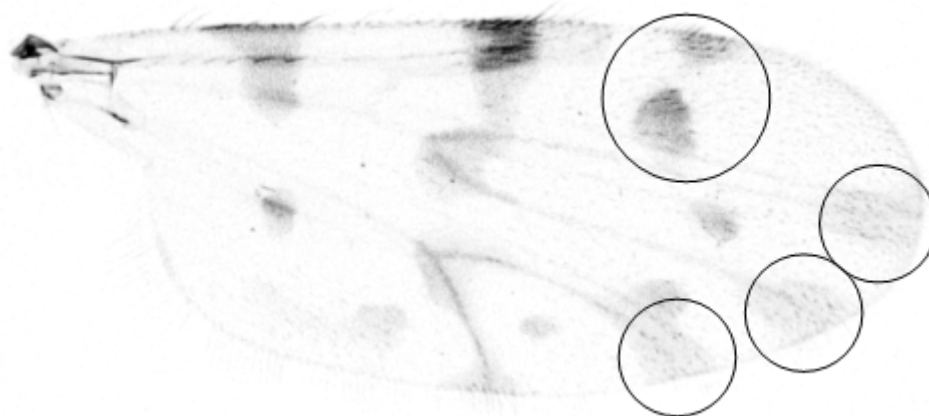
### 4.2.1. Grob- und Feindifferenzierung

Es wurden insgesamt 309 Gnitzen aus den Rückstellproben der Fangproben des Entomologischen Monitorings morphologisch grob differenziert, fortlaufend nummeriert und einzeln in mit 70%igem Alkohol gefüllten 2,5 ml-Röhrchen aufbewahrt. Von 88 dieser Gnitzen wurden mikroskopische Präparate angefertigt. Die Methode von Wirth und Marston

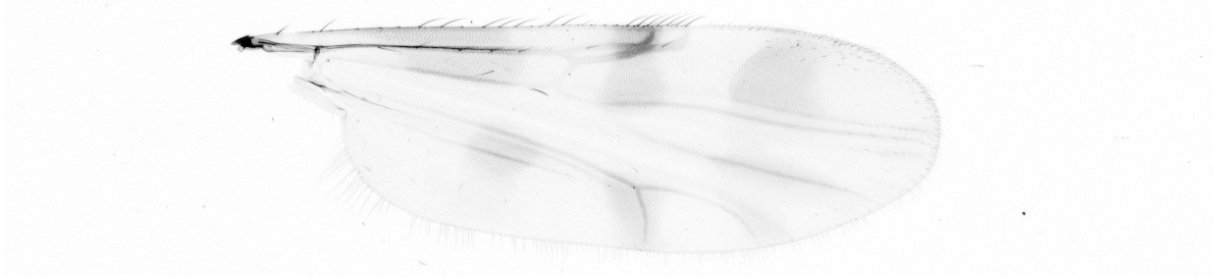
(1968) erwies sich dabei als sehr gut geeignet, um die Chitinpanzer der Insekten soweit aufzuweichen, dass sie im viskösen Phenol-Kanadabalsam-Gemisch gut manipuliert werden konnten und die einzelnen Strukturen danach unter dem Mikroskop sehr gut zu differenzieren waren. Besonders gut gelungene Präparate wurden nach ausreichender Trocknung zur Anschauung fotografiert und digitalisiert (Beispiele siehe Abb. 27 - 31).



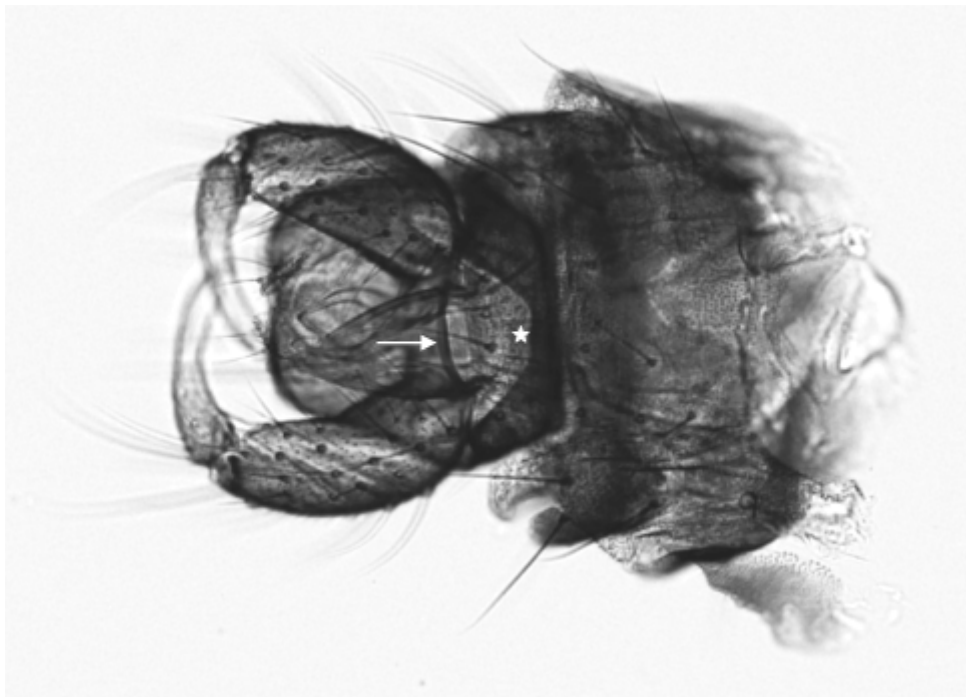
**Abb. 27** Beispiel eines Flügelpräparates (*C. punctatus*, ♀). Gut zu erkennen ist die typische, annähernd dreieckige dunkle Zeichnung an den Enden der Flügeladern und der unregelmäßige Fleck im oberen Bereich des Flügels (Vgl. siehe Abb. 22).



**Abb. 28** Beispiel eines Flügelpräparates (*C. pulicaris*, ♀). Gut zu erkennen ist die sanduhrförmige Zeichnung im oberen Bereich des Flügels sowie die in dunklen Flecken endenden Flügeladern (Vgl. siehe Abb. 21).



**Abb. 29** Beispiel eines Flügelpräparates (*C. obsoletus*, ♂). Da die Flügelzeichnungen der Flügel aus der *Obsoletus*-Gruppe sehr ähnlich sind (Vgl. siehe Abb. 7-10), wurde das Individuum, zu dem dieser Flügel gehörte, vor allem durch Charakterisierung seiner Fortpflanzungsorgane bestimmt.



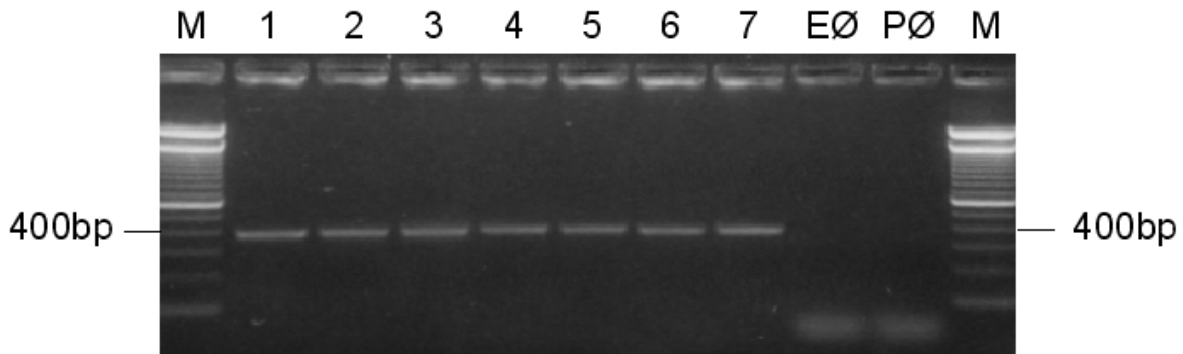
**Abb. 30** Beispiel eines Präparates der männlichen Fortpflanzungsorgane (*C. dewulfi*). Gut zu erkennen sind der Aedeagus mit artspezifischem distalen Steg (→), sowie die Einbuchtung des neunten abdominalen Segments (\*) (Vgl. siehe Abb. 10).



**Abb. 31** Beispiel eines Präparates der weiblichen Fortpflanzungsorgane (*C. punctatus*). Gut zu erkennen sind die rudimentäre (→) und die zwei funktionellen Spermatheken (\*).

### 4.3 Molekular-genetische Differenzierung

Diejenigen Gnitzen, deren morphologische Differenzierung am eindeutigsten war, wurden als DNS-Quelle zur Entwicklung der speziesspezifischen Primer herangezogen. Die meisten dieser Gnitzen stammten aus der Feindifferenzierung. Einige Gnitzen (v.a. männliche Gnitzen der *Obsoletus*-Gruppe) konnten bereits unter dem Stereomikroskop ohne Anfertigung eines Präparates eindeutig bestimmt werden, da die speziesspezifischen Strukturen (beispielsweise die männlichen Geschlechtsorgane) bereits bei 10-40facher Vergrößerung deutlich differenzierbar waren. Insgesamt wurden von 94 Gnitzen DNS-Extraktionen vorgenommen und die ITS1 Region daraufhin mittels der konservativen Primer PanCulF/R (Cêtre-Sossah *et al.*, 2004) amplifiziert (Beispiel siehe Abb. 32).

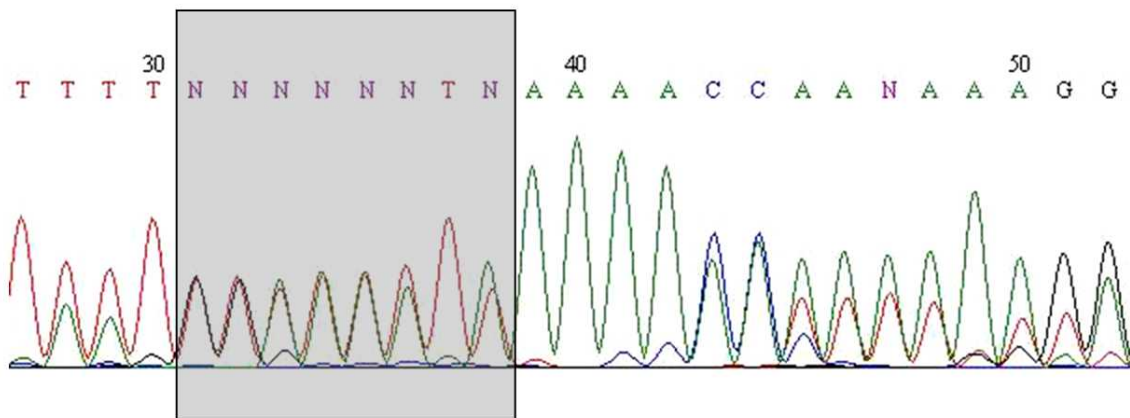


**Abb. 32** Beispiel einer erfolgreichen Extraktion und Amplifikation der ITS1 Region (388-401bp) von Gnitzen der *Obsoletus*-Gruppe, amplifiziert mit PanCulF/R und dem Standard PCR-Protokoll angelehnt an Cêtre-Sossah *et al.* (2004).

M – 100bp Marker, 1 – Gnitze Nr. 67 *C. obsoletus* s.s. (397 bp), 2 – Gnitze Nr. 68 *C. obsoletus* s.s. (397 bp), 3 – Gnitze Nr. 69 *C. obsoletus* s.s. (397 bp), 4 – Gnitze Nr. 64 *C. scoticus* (401 bp), 5 – Gnitze Nr. 58 *C. scoticus* (401 bp), 6 – Gnitze Nr. 59 *C. dewulfi* (391 bp), 7 – Gnitze Nr. 73 *C. dewulfi* (391 bp), EØ – Extraktion mit Wasser, PØ- Amplifikation mit Wasser.

Von einigen dieser Gnitzen wurden Proben im Anschluss an die erfolgreiche PCR zur Sequenzierung an ein externes Labor (Seqlab, Göttingen oder SMB, Berlin) geschickt. Das Sequenzierungsverfahren orientiert sich dabei an der „Kettenabbruch-Methode“ von Sanger und Coulson (1975), wobei Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt an die eingesetzten dNTPs unter Laserbestrahlung farbiges Licht emittieren und so einen Rückschluss auf die jeweilige Position der Nukleotidbasen innerhalb der Basensequenz ermöglichen. Die Fluoreszenzwerte werden dann in einem Chromatogramm wiedergegeben. Die ermittelten Basensequenzen wurden digital übermittelt und konnten mit entsprechender Bearbeitungssoftware dargestellt werden (Programm BioEdit<sup>®</sup>, Beispiel siehe Abb. 33). Der farbige Graph entspricht dem Chromatogramm in 5'–3'-Richtung, wobei die verschiedenen Linienfarben den verschiedenen Basen entsprechen. Eine hohe Amplitude markiert dabei die Position der entsprechenden Base innerhalb der Sequenz. Die Basensequenz wird gleichzeitig als Buchstabenfolge aufgeschlüsselt (ebenfalls in 5'–3'-Richtung), wobei einerseits die bekannten Basen Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymin (T) abzulesen sind. Basen, die nicht eindeutig identifiziert werden konnten wurden andererseits mit Hilfe des „Ambiguity Codes“ (eingeführt vom Nomenklaturkomitee der International Union of Biochemistry and Molecular Biology) codiert. Sinn dieses Codes ist es, Basen, die im Sequenzierungsprozess nur grob anhand gewisser Strukturmerkmale klassifiziert werden konnten (beispielsweise das Vorhandensein eines Pyrimidinrings oder der Stärke ihrer Wasserstoffbrückenbindungen), zu

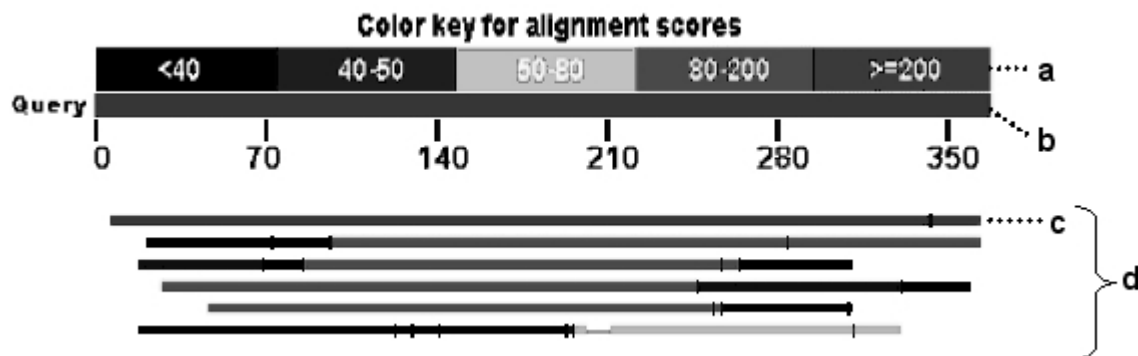
betiteln. Dabei steht beispielsweise ein *N* für jede mögliche der vier Nukleotidbasen, d.h. dass im Sequenzierungsprozess an dieser Position keine der vier Basen eindeutig bestimmt werden konnte (Abb. 33) oder ein *Y* für eine Base mit Pyrimidinring, also Cytosin oder Thymin (ohne Abb.). Dies ermöglicht die Darstellung einer Basensequenz, auch wenn die Basen an einzelnen Positionen nicht eindeutig identifiziert werden konnten.



**Abb. 33** Beispiel einer Basensequenz nach der Sequenzierung: Ausschnitt der Vorwärts-Basensequenz von Gnitze Nr. 67 *C. obsoletus* s.s. (5'–3'-Richtung) unter Verwendung des Programms BioEdit<sup>®</sup>. A – Adenin; C – Cytosin; G – Guanin; T – Thymin; N – jede Base (A, C, G oder T). Grauer Kasten: Überlagerungen von Basensequenzen.

Ingesamt wurde die ITS1 Region von 24 Gnitzten (darunter morphologisch differenzierte *C. obsoletus* s.s., *C. scoticus*, *C. dewulfi*, *C. chiopterus*, *C. punctatus* und einige Gnitzten aus der Rest-Gruppe wie *C. riethi* und *C. festivipennis*) sequenziert. Leider waren die Ergebnisse unzufriedenstellend: Es zeigten sich häufig Überlagerungen in der chromatographischen Darstellung, d.h. an einigen Stellen konnte keine Base eindeutig ermittelt werden (siehe grauer Kasten in Abb. 33), die an dieser Position eindeutig bzw. überwiegend auftrat (in diesem Beispiel *N*).

Aufgrund dieser Schwierigkeiten wurden die aus der Sequenzierung ermittelten Basensequenzen zum Vergleich mit bereits veröffentlichten Basensequenzen herangezogen, um alternativ die Eignung der Sequenzen der Datenbank für die Ermittlung potenzieller Primer-Regionen zu prüfen. Mittels des Online-Tools BLAST<sup>®</sup> wurde ein Sequenzabgleich (engl. *sequence alignment*) mit bereits veröffentlichten Basensequenzen durchgeführt (Beispiel siehe Abb. 34).

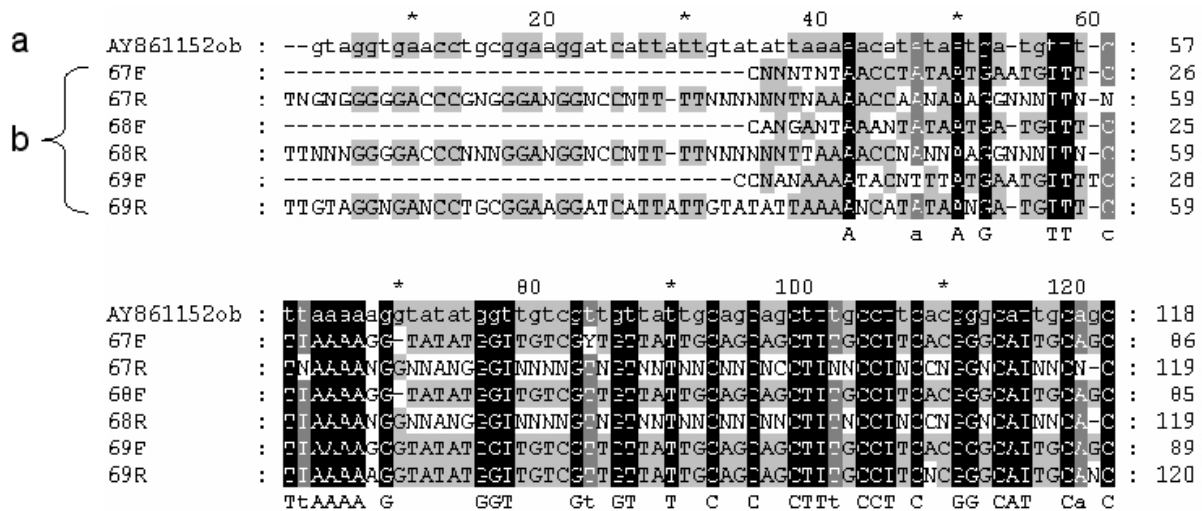


**Abb. 34** Ergebnis des Sequenzvergleiches in BLAST<sup>®</sup> zur Basensequenz aus Abb. 34. a – Farbschlüssel zur Bestimmung der Zahl übereinstimmender Basen im Vergleich zur Ausgangssequenz; b – schematische Darstellung der Ausgangssequenz (Basensequenz aus der Sequenzierung von Gnitze Nr. 67); c – GenBank-Sequenz mit der höchsten Übereinstimmung, hier *C. obsoletus* s.s., GenBank Accession Nr. AY 861152; d – Auswahl der ermittelten GenBank-Sequenzen mit absteigender Übereinstimmung.

Die als Ergebnis der BLAST<sup>®</sup>-Suche ermittelte Gensequenz mit der höchsten Übereinstimmung zur Ausgangssequenz entsprach somit der Gnitzenart, von der die Ausgangs-DNS stammte. Trotz fehlender oder uneindeutiger Basen führte die BLAST<sup>®</sup>-Recherche bei der Hälfte der DNS-Sequenzen zu höchstwahrscheinlichen Übereinstimmungen, jedoch auch genauso häufig zu keinem eindeutigen Ergebnis.

Zusätzlich wurden die in der Sequenzierung ermittelten DNS-Basensequenzen mit einer weiteren Software (GenDoc<sup>®</sup>) per Alignment mit der aus BLAST<sup>®</sup> ermittelten Sequenz verglichen, um die Positionen fehlender Basen genauer ermitteln zu können (Bsp. Abb. 35). Meist handelte es sich bei den fehlenden Basen um die mit *N* verschlüsselten Positionen.





**Abb. 35** Ausschnitt zum Alignment von *C. obsolete* s.s. Basensequenzen mit der GenBank-Sequenz AY861152 *C. obsolete* s.s. erstellt in GenDoc® (abgebildet sind die ersten ca. 120 Basen bezogen auf die GenBank-Sequenz).  
 a – GenBank Sequenz AY861152 *C. obsolete* s.s.; b – Alignment-Sequenzen der Gnitzen Nr. 67 / 68 / 69, jeweils (F) Vorwärtssequenzen (in 5' – 3' Richtung) und (R) Rückwärtssequenzen (in 3'- 5' Richtung). Schwarz unterlegte Basen stimmen bei allen Sequenzen mit der entsprechenden Base der GenBank-Sequenz komplett überein. Grau unterlegte Basen stimmen überwiegend überein (dunkelgrau unterlegte Basen bei sechs der sieben untersuchten Sequenzen, hellgrau unterlegte Basen bei immer noch fünf der untersuchten Sequenzen). Striche bezeichnen jeweils fehlende Basen.

Zusammenfassend lässt sich ableiten, dass die in Deutschland gefangenen Gnitzen in ihrer Gensequenz eine sehr hohe Homologie (>80%) zu den publizierten Sequenzen von Gnitzen aus dem französischen Raum aufweisen (Perrin *et al.*, 2006; Mathieu *et al.*, 2007). Daher wurde entschieden, dass zur Ermittlung einer potenziellen speziesspezifischen Primerregion die in GenBank veröffentlichten Gensequenzen herangezogen werden sollen.

### 4.3.1. Primerdesign

Es wurden verschiedene Primerdesign-Programme getestet. Als bedienerfreundlichstes Programm stellte sich das Online-Tool Primer3 Input v0.4.0® heraus. Das Prinzip aller Programme war ähnlich. Nach Eingabe der Zielsequenz (also der Basensequenz, auf der sich Vorwärts- und Rückwärtsprimer befinden sollten), schlug das Programm einige Primer-Paare vor, welche die Kriterien des Primerdesigns (siehe 3.3.5) am besten erfüllten. Da der

Rückwärtsprimer bereits fest stand (PanCulR), wurde der Vorwärtsprimer ausgewählt, der in Zusammenhang mit PanCulR das längste Amplifikat erzeugen würde.

Die Sequenz des potenziellen Vorwärtsprimers wurde zur Überprüfung nochmals in BLAST<sup>®</sup> eingegeben und analysiert. Sie wurde erst dann für die Synthetisierung ausgewählt, wenn ihre Spezifität gewährleistet war, d.h. BLAST<sup>®</sup> als Resultat nur die gewünschte Gnitzenpezies lieferte. Dabei wurde die potenzielle Primersequenz auch in immer weiter verkürzter Form eingelesen, um die Auswirkung von Fehlanlagerungen zu simulieren: Die Primersequenz wurde von beiden Enden her um eine Base verkürzt und getestet. Selbst eine Reduktion um mehrere Basen an jedem Ende erzeugte immer noch eine ausreichende theoretische Spezifität.

In Tabelle 9 sind die auf diese Weise ermittelten Basensequenzen der speziesspezifischen Primer aufgelistet.

**Tab. 9** Aufstellung der Basensequenzen der speziesspezifischen Primer.

Gnitzenpezies	Primer	Länge	Basensequenz	Produktlänge
			5' – 3' Richtung	
<i>C. obsoletus s.s.</i>	CulObsF2	22 bp	CTTAAGTGGATATGCATTGATT	132
<i>C. dewulfi</i>	CulDewF	21 bp	CTTTAACC GGCTTGGCAGCTC	295
<i>C. chiopterus</i>	CulChioF	21 bp	ATGCTTCGGTATAGCAGCTCG	293
<i>C. punctatus</i>	CulPunctF	25 bp	TCTAGGTATGGTGTGTTGTCATTAC	343
<i>C. pulicaris</i>	CulPulF	26 bp	TCATAAGACACTCACTTCGTGGTTGT	288

In den folgenden Abbildungen (Abb. 36 – 40) wurde die Position des jeweiligen speziesspezifischen Vorwärtsprimers sowie des gattungsspezifischen Rückwärtsprimers PanCulF in der Basensequenz der ITS1 Region der jeweiligen *Culicoides* spp. markiert.

```

      *      20      *      40      *      60
AY861152ob : gtaggtgaacctgcggaaggatcattattgtatattaaaaacatataatgatgtttcttaaaaggta : 68

      *      80      *      100      *      120      *
AY861152ob : tatggtgtcgttgattattgcagcagcttgccttcacgggcattgcagctcgctataaagatgtagt : 136

      140      *      160      *      180      *      200
AY861152ob : ttattatgtcttaagcgggtgctgtgattcaacaaaaatttcttggtagctttattgaagagcttt : 204

      *      220      *      240      *      260      *
AY861152ob : aaagacttgtttgccaaggcccccttaaaactagtgattcagttcgctagtagtatgcatattcttaact : 272

      280      *      300      *      320      *      340
AY861152ob : gagtatgcattgatttttatcaagatactttggagtgagtacaaatgtacatgaaaataaaataaaa : 340

      *      360      *      380      *
AY861152ob : aaagatcaaaaccttaaacgggggatcacttggctcatgggtcgatgaagaccgca : 397

```

**Abb. 36** Abbildung der Basensequenz von *C. obsoletus* s.s. (GenBank AY861152) mit den Positionen des speziesspezifischen Vorwärtsprimers CulObsF2 (grau unterlegt) und des gattungsspezifischen Rückwärtsprimers PanCulR (schwarz unterlegt).

```

      *      20      *      40      *      60
DQ408545de : gtaggtgaacctgcggaaggatcattattgtatattaaaaaatataatgatgtattcttatatagtg : 68

      *      80      *      100      *      120      *
DQ408545de : atggtgtggtgttatcgagcggcttcgctttaaccggcttggcagctcgctataaagatgtagt : 136

      140      *      160      *      180      *      200
DQ408545de : ttatgtcttaagcgggtgctgtggtacaacgaaaaatttcttggtagctttatagaagagctt : 204

      *      220      *      240      *      260      *
DQ408545de : gacttgtttgccaaggccccgtaaaaactagcgatttcgtgctgtagtagtatgcatattctttcgggga : 272

      280      *      300      *      320      *      340
DQ408545de : tatgcattgatttatatcaagatactttggaatgagtacgaatgtacaataaaatacaaaaaaaaaaaga : 340

      *      360      *      380      *
DQ408545de : tcaaaaccttaaacgggggatcacttggctcatgggtcgatgaagaccgca : 391

```

**Abb. 37** Abbildung der Basensequenz von *C. dewulfi* (GenBank DQ408545) mit den Positionen des speziesspezifischen Vorwärtsprimers CulDewF (grau unterlegt) und des gattungsspezifischen Rückwärtsprimers PanCulR (schwarz unterlegt).

```

          *      20      *      40      *      60
DQ408543ch : gtaggtgaacctgcggaaggatcattattgtatattaaaaacatataatgatgtttctttaaggat : 68

          *      80      *      100     *      120     *
DQ408543ch : atggttgtcgttgttattgcagcagctatgcttcggtatagcagctcgctataaagatgtagcttatt : 136

          140     *      160     *      180     *      200
DQ408543ch : atgtcttaagcgagtgctgtgattcaacaaaaatttcttgggtagctttattgaagagctttaaga : 204

          *      220     *      240     *      260     *
DQ408543ch : cttgtttgcccaaggccccctaaaactagtgattcaattcgctagtatgcatattctttattgagta : 272

          280     *      300     *      320     *      340
DQ408543ch : tgcattgatttttatacaagatacttggagtgagtacgaatgtacaataaaaaataaaaaaaagatca : 340

          *      360     *      380
DQ408543ch : aaaccttaaacgggggatcacttggctcatgggtcgatgaagaccgca : 388

```

**Abb. 38** Abbildung der Basensequenz von *C. chiopterus* (GenBank DQ408543) mit den Positionen des speziesspezifischen Vorwärtsprimers CulChioF (grau unterlegt) und des gattungsspezifischen Rückwärtsprimers PanCulR (schwarz unterlegt).

```

          *      20      *      40      *      60
AY861157pc : gtaggtgaacctgcggaaggatcattattgtattataaaacatataatgatgttcattcttaggtatgg : 68

          *      80      *      100     *      120     *
AY861157pc : tgtgttgtcattacaagagtcatttagttggcagctctctataaaggcatagtttattatgttttaag : 136

          140     *      160     *      180     *      200
AY861157pc : ggggtaccttgtagtgtgacacaaaaaattacttgggtagctttatagaagagctttaagacttgtt : 204

          *      220     *      240     *      260     *
AY861157pc : tgcccaaggccccgtaaaactagtaaacccattgaggtggctagtatgcatataacttaattgtatat : 272

          280     *      300     *      320     *      340
AY861157pc : gcattgatttatttcaaagatacattggagtgagtataaattgtaacaaaattgtacataaacaaaaaa : 340

          *      360     *      380     *      400
AY861157pc : aaaaagtaataaaaaaccttaaacgggggatcacttggctcatgggtcgatgaagaccgca : 400

```

**Abb. 39** Abbildung der Basensequenz von *C. punctatus* (GenBank AY861157) mit den Positionen des speziesspezifischen Vorwärtsprimers CulPulF (grau unterlegt) und des gattungsspezifischen Rückwärtsprimers PanCulR (schwarz unterlegt).

```

      *      20      *      40      *      60
AY861156pl : gtaggtgaacctgcggaaggatcattattgtattataaaacttataataatgttcattcaacaaaaaa : 68

      *      80      *      100     *      120     *
AY861156pl : aattgttgtcatccacaagagtcattcgtttggcagctctctacaaaagacatagattactgtgtttt : 136

      140      *      160      *      180      *      200
AY861156pl : taagtgagtatttgtgatgcagcagcccttatgctaggtagttgttattttttcagaactataatgat : 204

      *      220      *      240      *      260      *
AY861156pl : ttttttttcgcctagcgaatccataagacactcacttcgtggtgtcgagagatataattattgtgtg : 272

      280      *      300      *      320      *      340
AY861156pl : aaaataacttgggtagctttatagaagagctttaagacttgtttgcccaggccccgtaaaactagt : 340

      *      360      *      380      *      400
AY861156pl : aaccattgagaggtggctagtagtatatacacttagttgggtatgcattgatattaattcaaagatac : 408

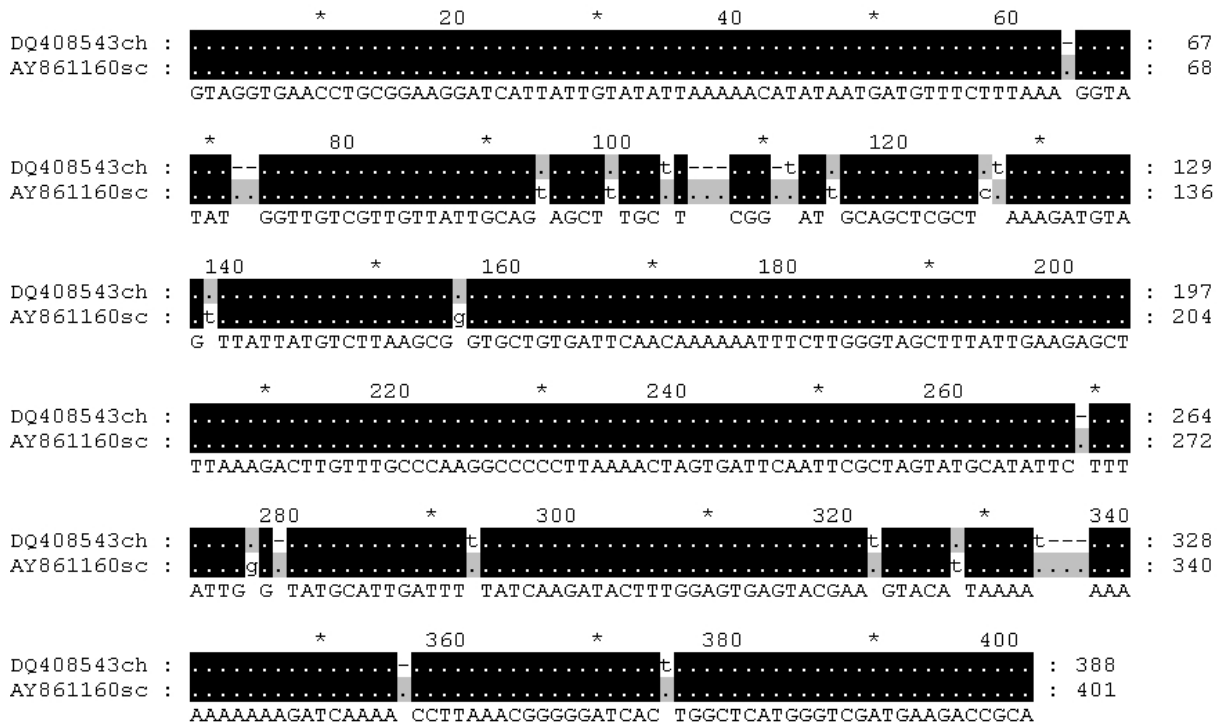
      *      420      *      440      *      460      *
AY861156pl : attggagagcgtataaattgtaatgaattgtacataaacaaaaaaaaaaaaattataaaccttaaacg : 476

      480      *      500      *
AY861156pl : ggggatcacttggctcatgggtcgatgaagaccgca : 512

```

**Abb. 40** Abbildung der Basensequenz von *C. pulicaris* (GenBank AY861156) mit den Positionen des speziesspezifischen Vorwärtsprimers CulPulF (grau unterlegt) und des gattungsspezifischen Rückwärtsprimers PanCulR (schwarz unterlegt).

Die Basensequenzen der gewählten ITS1 Region von *C. chiopterus* und *C. scoticus* ähneln sich so stark, dass es nicht möglich war, nach der Bestimmung der Primersequenz für *C. chiopterus* (CulChioF) noch eine weitere, einzigartige Primersequenz zu ermitteln, die ausschließlich spezifisch für *C. scoticus* wäre (Alignment der beiden Basensequenzen siehe Abb. 41). Diese Spezies kann somit nur durch ein Ausschlussverfahren ermittelt werden, indem nach morphologischer Zuordnung zur *Obsoletus*-Gruppe die Amplifikation mit allen anderen spezifischen Primern der *Obsoletus*-Gruppe (CulObsF2, CulDewF, CulChioF) negativ ausfällt.



**Abb. 41** Alignment der Basensequenzen der ITS1 Region von *C. chiopterus* (GenBank DQ408543) und *C. scoticus* (GenBank AY861160). Die schwarz unterlegten Punkte verdeutlichen übereinstimmende Basen in beiden Gensequenzen, während grau bzw. weiß unterlegte Bereiche Abweichungen darstellen.

Die Primersequenzen wurden an ein Syntheselabor (TIB-MOLBIOL, Berlin) übermittelt und in gefriergetrockneter Form angeliefert. Das Lyophilisat wurde in DNase-freiem Wasser aufgelöst bis eine Konzentration von  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in der Primerlösung erreicht wurde.

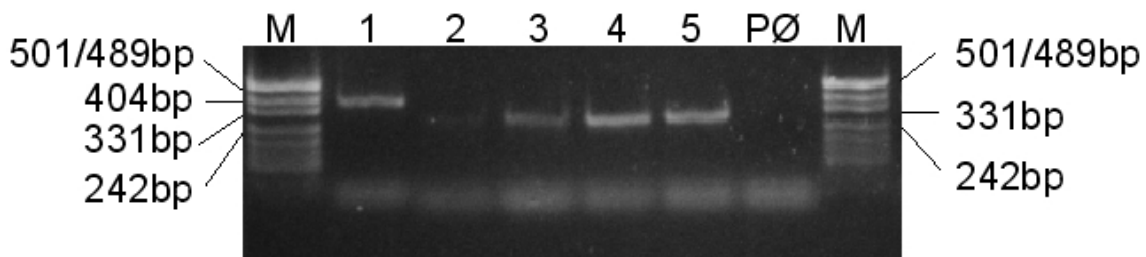
#### 4.3.2. Optimierung der PCR

Für die folgenden Versuche zur Optimierung der PCR-Protokolle wurden jeweils 200ng Vorwärts- und Rückwärtsprimer pro Probe eingesetzt.

##### *Ermittlung der optimalen $\text{MgCl}_2$ -Konzentration*

Im ersten PCR-Durchlauf zur Ermittlung der optimalen  $\text{MgCl}_2$ -Konzentration wurden 1,5 / 2,0 / 2,5 / 3,0  $\mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$  pro Reaktionsansatz zugesetzt. Die PCR-Konditionen wurden vorerst

nicht verändert, sondern das Standard-PanCulF/R-Protokoll verwendet (siehe 3.3.2.). Lieferte dieser erste Durchlauf keine befriedigenden Ergebnisse, so wurde die Alignment-Temperatur in den Bereich der mittleren Schmelztemperatur des Vorwärts-Primers verschoben. Abbildung 42 zeigt das Ergebnis dieses Durchlaufs am Beispiel des spezifischen Primers CulChioF.



**Abb. 42** Beispiel einer PCR zur Ermittlung der optimalen  $MgCl_2$ -Konzentration von CulChioF (PanCulF/R-Protokoll mit  $61^\circ C$  Annealing-Temperatur) mit DNS der Gnitze Nr. 118 *C. chiopterus* (spezifisches Produkt mit 293bp).

M – pUC19-Marker; 1 – Positiv-Probe (Primerpaar PanCulF/R); 2-5 Primerpaar CulChioF/PanCulR: 2 –  $1,5\mu l$   $MgCl_2$ , 3 –  $2,0\mu l$   $MgCl_2$ , 4 –  $2,5\mu l$   $MgCl_2$ , 5 –  $3,0\mu l$   $MgCl_2$ , PØ – Amplifikation mit Wasser.

Welche  $MgCl_2$ -Konzentrationen die besten PCR-Resultate bei den spezifischen Primern erzeugten, zeigt Tabelle 10.

**Tab. 10** Übersicht über die Menge  $MgCl_2$ , welche die besten PCR-Resultate bei den spezifischen Primern erzeugte.

Primer	$MgCl_2$ -Konzentration
CulObsF2	$3,0 \mu l$
CulDewF	$2,5 \mu l$
CulChioF	$2,5 \mu l$
CulPunctF	$2,5 \mu l$
CulPulF	$3,0 \mu l$

### ***Ermittlung der optimalen Hybridisierungstemperatur (Annealing Temperatur)***

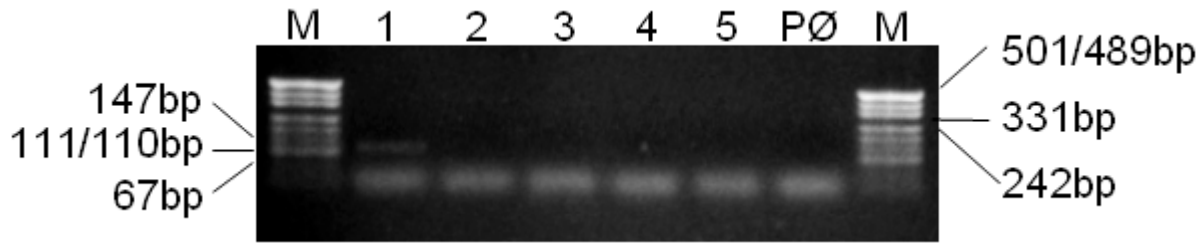
Um die Entstehung unspezifischer PCR-Produkte zu verhindern, wurde nach der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration die optimale Hybridisierungstemperatur ermittelt – entweder durch Wahl einer höheren oder niedrigeren Hybridisierungstemperatur oder, sofern immer noch unspezifische Produkte entstanden, durch Einsatz der touchdown-Methode (Prinzip siehe 3.3.5 Ermittlung der optimalen Hybridisierungstemperatur).

Für die spezifischen Primer wurden so individuelle PCR-Protokolle entwickelt, welche in den folgenden Tabellen (Tab. 11 – 15) aufgeführt wurden. Die dazugehörigen Abbildungen (Abb. 43 – 47) zeigen die entsprechenden PCR-Resultate. Für die PCRs wurden DNS verschiedener Extraktionen eingesetzt, um die Spezifität zu überprüfen.

**Tab. 11** touchdown-PCR-Protokoll für CulObsF2.

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>
1. Schmelzen	95°C	15 min
2. Primerhybridisierung	60°C	30 sec
3. Amplifikation	72°C	2 min
4. Schmelzen	94°C	30 sec
5. Primerhybridisierung - Verringerung der Temperatur von 60°C um 0,2°C pro Wiederholung bis zur Endtemperatur von 54°C	60°C → 54°C	30 sec
6. Amplifikation	72°C	2 min
<i>Schritte 4. – 6. 30 Male wiederholen</i>		
7. abschließende Amplifikationsphase	72°C	10 min
8. Abkühlungsphase	4°C	bis Ende

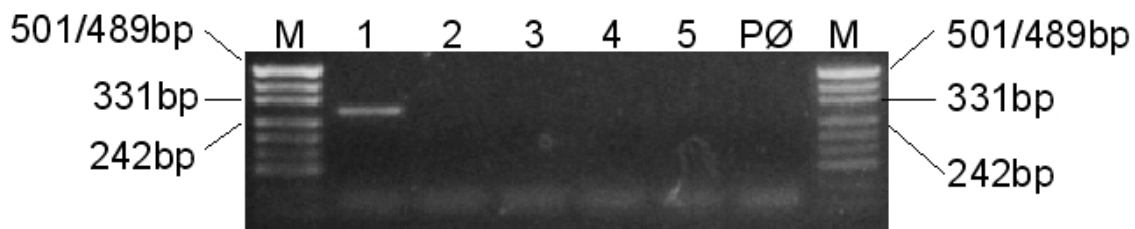




**Abb. 43** touchdown- PCR-Ergebnis für CulObsF2 mit dem touchdown-PCR-Protokoll aus Tab. 8. M – pUC19-Marker; 1 – positive Probe (spezifisches Produkt bei 132bp), Gnitze Nr. 52 *C. obsoletus*; 2 – Gnitze Nr. 109 *C. chiopterus*; 3 – Gnitze Nr. 108 *C. dewulfi*; 4 – Gnitze Nr. 113 *C. scoticus*; 5 – Gnitze Nr. 6 *C. punctatus*; PØ – Amplifikation mit Wasser.

**Tab. 12** touchdown-PCR-Protokoll für CulDewF.

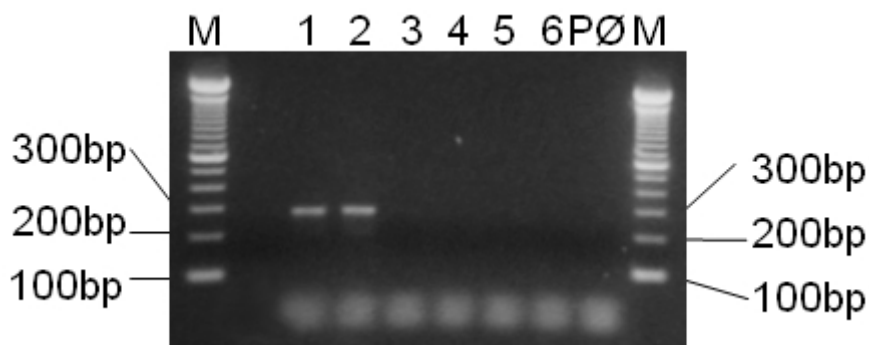
Schritt	Temperatur	Dauer
1. Schmelzen	95°C	15 min
2. Primerhybridisierung	60°C	30 sec
3. Amplifikation	72°C	2 min
4. Schmelzen	94°C	30 sec
5. Primerhybridisierung - Verringerung der Temperatur von 60°C um 0,2°C pro Wiederholung bis zur Endtemperatur von 54°C	60°C → 54°C	30 sec
6. Amplifikation	72°C	2 min
<i>Schritte 4. – 6. 30 Male wiederholen</i>		
7. abschließende Amplifikationsphase	72°C	10 min
8. Abkühlungsphase	4°C	bis Ende



**Abb. 44** touchdown- PCR-Ergebnis für CulDewF mit dem touchdown-PCR-Protokoll aus Tab. 9. M – pUC19-Marker; 1 – positive Probe (spezifisches Produkt bei 295bp), Gnitze Nr. 59 *C. dewulfi*; 2 – Gnitze Nr. 112 *C. chiopterus*; 3 – Gnitze Nr. 50 *C. obsoletus*; 4 – Gnitze Nr. 58 *C. scoticus*; 5 – Gnitze Nr. 122 *C. punctatus*; PØ – Amplifikation mit Wasser.

**Tab. 13** PCR-Protokoll für CulChioF.

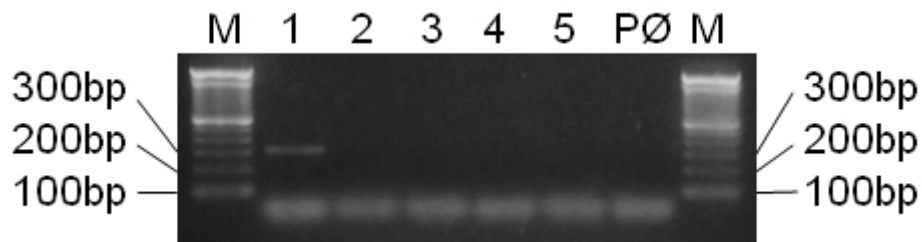
Schritt	Temperatur	Dauer
1. Schmelzen	95°C	15 min
2. Primerhybridisierung	60°C	30 sec
3. Amplifikation	72°C	2 min
4. Schmelzen	94°C	30 sec
5. Primerhybridisierung	61°C	30 sec
6. Amplifikation	72°C	2 min
<i>Schritte 4. – 6. 30 Male wiederholen</i>		
7. abschließende Amplifikationsphase	72°C	10 min
8. Abkühlungsphase	4°C	bis Ende



**Abb. 45** PCR-Ergebnis für CulChioF mit dem PCR-Protokoll aus Tab. 10. M – 100bp-Marker; 1 – positive Probe (spezifisches Produkt bei 293bp), Gnitze Nr. 112 *C. chiopterus*; 2 – Gnitze Nr. 118 *C. chiopterus*; 3 – Gnitze Nr. 107 *C. dewulfii*; 4 – Gnitze Nr. 51 *C. obsoletus*; 5 – Gnitze Nr. 113 *C. scoticus*; 6 – Gnitze Nr. 6 *C. punctatus*; PØ – Amplifikation mit Wasser.

**Tab. 14** touchdown-PCR-Protokoll für CulPunctF.

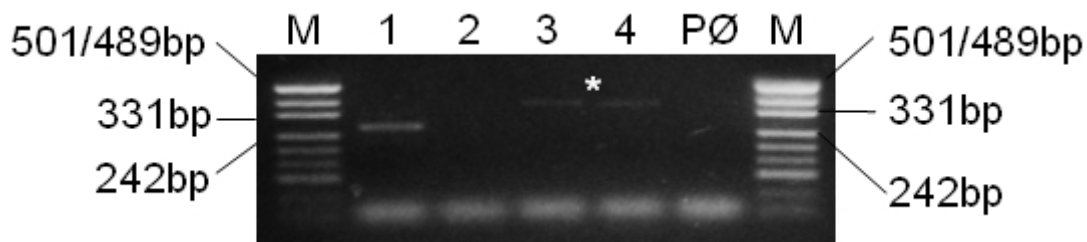
Schritt	Temperatur	Dauer
1. Schmelzen	95°C	15 min
2. Primerhybridisierung	60°C	30 sec
3. Amplifikation	72°C	2 min
4. Schmelzen	94°C	30 sec
5. Primerhybridisierung - Verringerung der Temperatur von 60°C um 0,2°C pro Wiederholung bis zur Endtemperatur von 54°C	60°C → 54°C	30 sec
6. Amplifikation	72°C	2 min
<i>Schritte 4. – 6. 30 Male wiederholen</i>		
7. abschließende Amplifikationsphase	72°C	10 min
8. Abkühlungsphase	4°C	bis Ende



**Abb. 46** PCR-Ergebnis für CulPunctF mit dem PCR-Protokoll aus Tab. 11. M – 100bp-Marker; 1 – positive Probe (spezifisches Produkt bei 343bp), Gnitze Nr. 93 *C. punctatus*; 2 – Gnitze Nr. 10 *C. pulicaris*; 3 – Gnitze Nr. 1 *C. riethi*; 4 – Gnitze Nr. 43 *C. nubeculosus*; 5 – Gnitze Nr. 109 *C. dewulfi*; PØ – Amplifikation mit Wasser.

Tab. 15 touchdown-PCR-Protokoll für CulPulF.

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Schmelzen	95°C	15 min
2. Primerhybridisierung	60°C	30 sec
3. Amplifikation	72°C	2 min
4. Schmelzen	94°C	30 sec
5. Primerhybridisierung - Verringerung der Temperatur von 58°C um 0,2°C pro Wiederholung bis zur Endtemperatur von 52°C	58°C → 52°C	30 sec
6. Amplifikation		
7. Schritte 4. – 6. 30 Male wiederholen	72°C	2 min
8. abschließende Amplifikationsphase	72°C	10 min
9. Abkühlungsphase	4°C	bis Ende



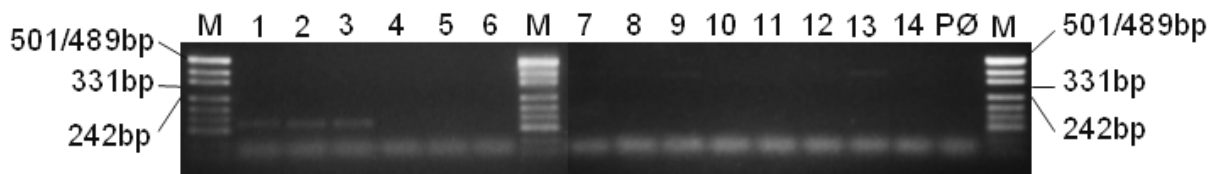
**Abb. 47** PCR-Ergebnis für CulPulF mit dem PCR-Protokoll aus Tab. 12. M – pUC19-Marker; 1 – positive Probe (spezifisches Produkt bei 288bp), Gnitze Nr. 187 *C. pulicaris*; 2 – Gnitze Nr. 126 *C. punctatus*; 3 – Gnitze Nr. 28 *C. riethi*; 4 – Gnitze Nr. 4 *C. scoticus*; PØ – Amplifikation mit Wasser; \* - unspezifisches Produkt bei ca. 400bp.

### 4.3.3. Analytische Spezifität und Sensitivität der Primer

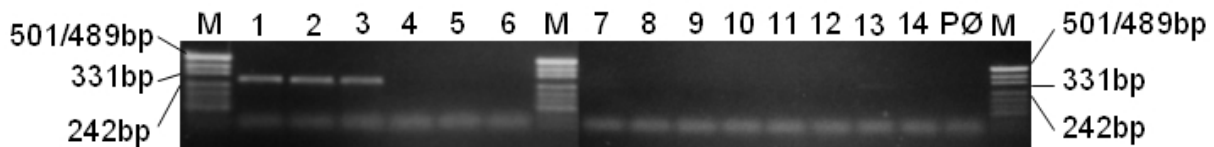
#### *Kreuztests*

Zur Ermittlung der analytischen Spezifität wurden weitere Kreuztests durchgeführt. Eingesetzt wurden die Ziel-DNS und Fremd-DNS sowie die spezifischen Primer und PCR-Protokolle. Teilweise stellten bereits die Test-PCRs zur Ermittlung der optimalen Annealing Temperatur verwertbare Kreuztests dar. Die Kreuztests für CulObsF2 und CulDewF fielen

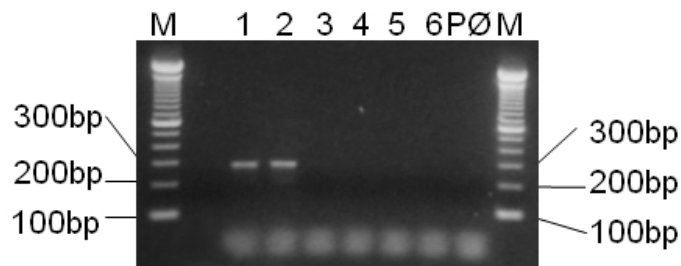
sehr umfangreich aus, da genügend DNS-Material vorlag. Die Abbildungen 48 – 52 zeigen die Ergebnisse der Kreuztests.



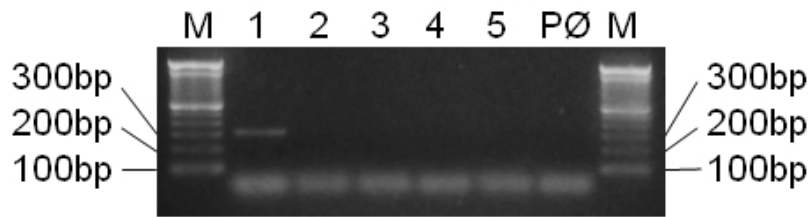
**Abb. 48** PCR-Ergebnis für den Kreuztest von CulObsF2. M – pUC19-Marker; 1 – 3: positive Proben (spezifisches Produkt bei 288bp), Gnitzen Nr. 50 / 51 / 52 *C. obsoletus* s.s.; 4 – 6: Gnitzen Nr. 109 / 116 / 119 *C. dewulfi*; 7 – 9: Gnitzen Nr. 108 / 112 / 118 *C. chiopterus*; 10 – 12: Gnitzen Nr. 113 / 114 / 115 *C. scoticus*; 13 – 14: Gnitzen Nr. 6 / 122 *C. punctatus*; PØ – Amplifikation mit Wasser.



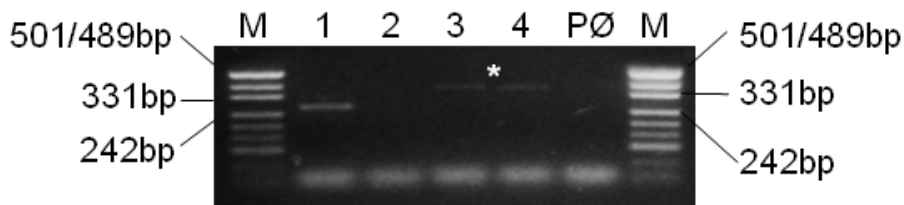
**Abb. 49** PCR-Ergebnis für den Kreuztest von CulDewF. M – pUC19-Marker; 1 – 3: positive Proben (spezifisches Produkt bei 295bp), Gnitzen Nr. 109 / 116 / 119 *C. dewulfi*; 4 – 6: Gnitzen Nr. 50 / 51 / 52 *C. obsoletus* s.s.; 7 – 9: Gnitzen Nr. 108 / 112 / 118 *C. chiopterus*; 10 – 12: Gnitzen Nr. 113 / 114 / 115 *C. scoticus*; 13 – 14: Gnitzen Nr. 6 / 122 *C. punctatus*; PØ – Amplifikation mit Wasser.



**Abb. 50** PCR-Ergebnis für den Kreuztest von CulChioF. M – 100bp-Marker; 1 – positive Probe (spezifisches Produkt bei 293bp), Gnitze Nr. 112 *C. chiopterus*; 2 – Gnitze Nr. 118 *C. chiopterus*; 3 – Gnitze Nr. 107 *C. dewulfi*; 4 – Gnitze Nr. 51 *C. obsoletus*; 5 – Gnitze Nr. 113 *C. scoticus*; 6 – Gnitze Nr. 6 *C. punctatus*; PØ – Amplifikation mit Wasser.



**Abb. 51** PCR-Ergebnis für den Kreuztest von CulPunctF. M – 100bp-Marker; 1 – positive Probe (spezifisches Produkt bei 343bp), Gnitze Nr. 93 *C. punctatus*; 2 – Gnitze Nr. 10 *C. pulicaris*; 3 – Gnitze Nr. 1 *C. riethi*; 4 – Gnitze Nr. 43 *C. nubeculosus*; 5 – Gnitze Nr. 109 *C. dewulfi*; PØ – Amplifikation mit Wasser.



**Abb. 52** PCR-Ergebnis für den Kreuztest von CulPulF. M – pUC19-Marker; 1 – positive Probe (spezifisches Produkt bei 288bp), Gnitze Nr. 187 *C. pulicaris*; 2 – Gnitze Nr. 126 *C. punctatus*; 3 – Gnitze Nr. 28 *C. riethi*; 4 – Gnitze Nr. 4 *C. scoticus*; PØ – Amplifikation mit Wasser; \* - unspezifisches Produkt bei ca. 400bp.

Alle spezifischen Primer zeigten deutliche PCR-Produkte der gewünschten Länge in den Ziel-DNS-Proben, während die Amplifikation von Proben anderer DNS negativ verlief. Nur bei der Kreuztest-PCR von CulPulF zeigte sich die Ausbildung unspezifischer Produkte von ca. 400bp bei einigen Fremd-DNS-Proben.

### **Verdünnungsreihen**

Zur Bestimmung der analytischen Sensitivität wurden die spezifischen PCRs mit der jeweiligen spezifischen DNS in Verdünnungsstufen von 20ng bis 1 fg durchgeführt (Prinzip siehe 3.3.5 Ermittlung der Sensitivität).

Die Sensitivitätsgrenzen der unterschiedlichen Primer variierten zwischen 100pg und 1ng und sind in Tabelle 16 dargestellt.

**Tab. 16** PCR-Ergebnisse für die Sensitivitätstests der spezifischen Primer (n.a.: diese Sensitivität wurde in der PCR nicht ermittelt).

Primer	20ng	10ng	1ng	100pg	10pg	1pg	100fg	10fg	1fg	PØ
CulObsF2	+	+	+	+	-	-	-	-	n.a.	-
CulDewF	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
CulChioF	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
CulPunctF	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
CulPulF	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

#### 4.4. Weitere Untersuchungen

##### *Vorversuche zur Verhinderung von Kreuzkontaminationen*

Mit Beginn der Versuchsreihen zu einigen Anwendungsmöglichkeiten der Primer, stellten sich sehr bald Probleme bei der Interpretierung der Elektrophoresebanden ein, welche durch Kontamination mit nicht-Ziel-DNS erklärt werden konnten. So war es nicht möglich, eindeutige Ergebnisse zu erzielen, wenn die Testinsekten aus einer großen, unsortierten Poolprobe von Gnitzen unterschiedlicher Spezies stammten, welche sich schon länger im Institut befand und nicht weiter vorbehandelt wurde. In einer Testreihe wurde daher das beste Verfahren ermittelt, mit dem diese Proben vor der Extraktion und spezifischen PCR vorbehandelt werden konnten, ohne die Ergebnisse der PCR negativ zu beeinflussen. Dazu wurde eine Kombination aus Waschungen mit 75%igem Ethanol oder 2%iger Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) und einer ein- oder sechsstündigen Einwirkzeit vergleichend getestet. Waschungen mit Ethanol jeglicher Einwirkzeit waren weniger erfolgreich, dagegen erwiesen sich Waschungen mit 2%iger Schwefelsäure und einer Einwirkzeit von ein oder sechs Stunden als ausreichend, um Kontaminationen innerhalb der Poolproben genügend zu minimieren, ohne die darauf folgenden Extraktionen und Amplifikationen negativ zu beeinträchtigen.

### **Untersuchung gepoolter Gnitzenfänge**

Um das Potential der im Rahmen dieser Dissertation entwickelten spezifischen PCRs zur Untersuchung größerer Gnitzenfänge zu ermitteln, wurden verschiedene Versuchsansätze zum Einsatz der Primer erprobt.

**Versuch mit „gespiketen“ Poolproben** - Da es in den Fangproben nur sehr wenige *C. pulicaris*-Gnitzen gab, sollte sich dieser Versuch aus Zeitgründen auf Gnitzenpools aus *C. punctatus* und Gnitzen der *Obsoletus*-Gruppe beschränken. Für die erste Versuchsreihe wurden Poolproben von je 10, 25 und 50 *C. punctatus*-Gnitzen und je einer morphologisch differenzierten *C. obsoletus*-Gnitze gebildet. Die gesamte Poolprobe wurde jeweils extrahiert und mit der für *C. obsoletus* spezifischen PCR amplifiziert.

Bei Auswertung des Elektrophoresebilds zeigte sich ein „Schmier“ von DNS- und Primermaterial zum Ende der Bande bis auf Höhe der erwarteten Bande. Diese ließ sich auch durch Verdünnung der jeweiligen Probe und erneuter PCR nicht reduzieren. Daher wurde vorerst von weiteren Versuchsreihen dieser Art abgesehen.

**Versuch von Einzelbestimmungen mit bekannten DNS-Proben** - Aus Mangel an ausreichend männlichen Gnitzen der anderen Spezies, beschränkte sich dieser Versuch auf die spezifischen PCRs für *C. obsoletus* und *C. dewulfi*.

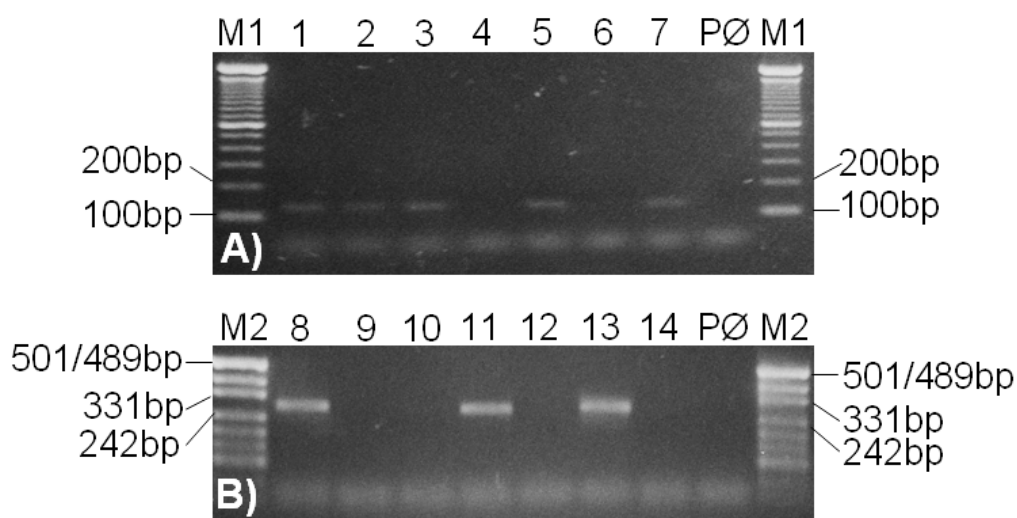
Es wurden speziesspezifische PCRs mit DNS von sechs morphologisch differenzierten Gnitzen (vier *C. obsoletus*- und zwei *C. dewulfi*-Gnitzen) und den für *C. obsoletus* s.s. bzw. *C. dewulfi* spezifischen Primer und PCR-Protokollen durchgeführt. Der Versuch wurde zwei Mal durchgeführt mit insgesamt 12 Gnitzen. Beim ersten Durchlauf wurden die zu extrahierenden sechs Gnitzen für die Dauer von einer Stunde in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gewaschen (Bandenmuster der PCR siehe Abb. 53). Beim zweiten Durchlauf erfolgte vor der Extraktion der Gnitzen eine Waschung für sechs Stunden in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Bandenmuster der PCR siehe Abb. 54).

Die sechs DNS-Proben einer Waschung wurden in zufälliger Reihenfolge eingesetzt (nummeriert von 1 – 6) und die Reihenfolge in den folgenden PCRs beibehalten. Es erfolgte

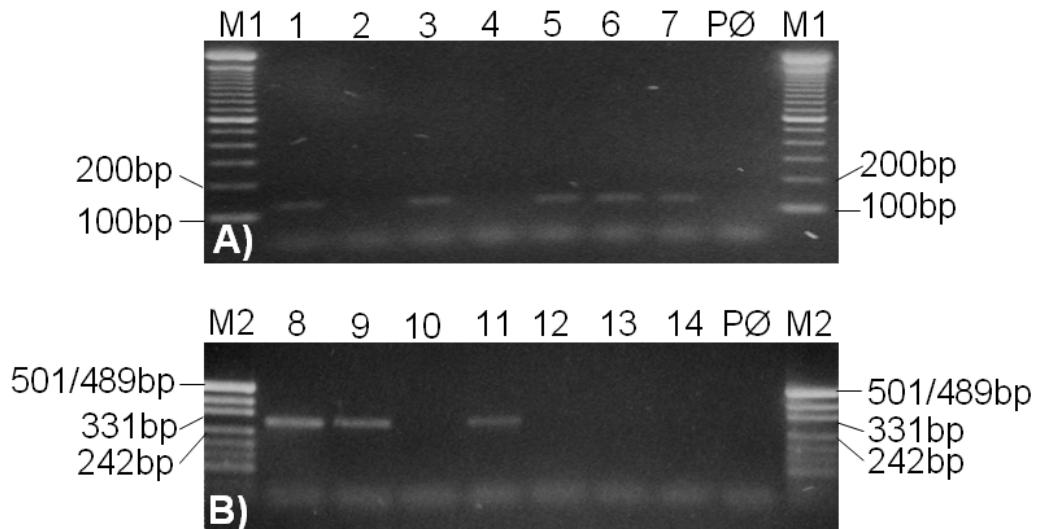


jeweils eine erste PCR mit dem für *C. obsoletus* spezifischen Primer und dem entsprechenden PCR-Protokoll (siehe 4.3.2., Tab. 11). Das zu erwartende Ergebnis bestand aus der Amplifikation von vier der sechs Proben (den *C. obsoletus*-Gnitzen). Daraufhin wurde eine zweite PCR mit dem für *C. dewulfi* spezifischen Primer und dem entsprechenden PCR-Protokoll (siehe 4.3.2., Tab. 12) durchgeführt. Da die sechs DNS-Proben in derselben Reihenfolge wie im ersten Durchlauf eingesetzt wurden, bestand das zu erwartende Ergebnis aus der Amplifikation der zwei *C. dewulfi*-Proben, während die vier anderen Proben diesmal negativ bleiben.

Die Amplifikationen der Pools verliefen erfolgreich. In der für *C. obsoletus* s.s. spezifischen PCR (Abb. 53A bzw. 54A) wurden die Positiv-Probe sowie vier der Test-Proben amplifiziert, während in der für *C. dewulfi* spezifischen PCR die anderen zwei Proben erfolgreich amplifiziert wurden (Abb. 53B bzw. 54B). In beiden Durchläufen wurden demnach vier der sechs Testgnitzen richtig als *C. obsoletus* s.s. und zwei korrekt als *C. dewulfi* identifiziert.



**Abb. 53** PCR-Ergebnis für den Versuch von Einzelbestimmungen mit sechs bekannten DNS-Proben in unbekannter Probenreihenfolge, Waschung erfolgte für die Dauer von einer Stunde mit  $H_2SO_4$ . **A)** spezifische PCR mit Primer CulObsF2; **B)** spezifische PCR mit Primer CulDewF. Vier Testgnitzen (Banden 2, 3, 5, 7 resp. 9, 10, 12, 14) waren positiv in PCR A und negativ in PCR B und wurden somit als *C. obsoletus* s.s. identifiziert, zwei Testgnitzen (Banden 4, 6 resp. 11, 13) waren negativ in PCR A und positiv in PCR B und wurden somit als *C. dewulfi* identifiziert. M1 – 100bp-Marker; M2 – pUC19-Marker; 1 – positive Probe (spezifisches Produkt bei 132bp) Gnitze Nr. 51 *C. obsoletus* s.s.; 8 – positive Probe (spezifisches Produkt bei 295bp) Gnitze Nr. 119 *C. dewulfi*; 2-7 bzw. 9-14 – Testgnitzen; PØ – Amplifikation mit Wasser.



**Abb. 54** PCR-Ergebnis für den Versuch von Einzelbestimmungen mit sechs bekannten DNS-Proben in unbekannter Probenreihenfolge, Waschung erfolgte für die Dauer von sechs Stunden mit  $H_2SO_4$ . **A)** spezifische PCR mit Primer CulObsF2; **B)** spezifische PCR mit Primer CulDewF. Vier Testgnitzen (Banden 3, 5, 6, 7 resp. 10, 12, 13, 14) waren positiv in PCR A und negativ in PCR B und wurden somit als *C. obsoletus* s.s. identifiziert, zwei Testgnitzen (Banden 3, 4 resp. 9, 11) waren negativ in PCR A und positiv in PCR B und wurden somit als *C. dewulfi* identifiziert. M1 – 100bp-Marker; M2 – pUC19-Marker; 1 – positive Probe (spezifisches Produkt bei 132bp) Gnitze Nr. 51 *C. obsoletus* s.s.; 8 – positive Probe (spezifisches Produkt bei 295bp) Gnitze Nr. 119 *C. dewulfi*; 2-7 bzw. 9-14 – Testgnitzen; PØ – Amplifikation mit Wasser.

## **5. Diskussion**

Ziel dieser Arbeit war es, vor dem Hintergrund des Ausbruchs der Blauzungenkrankheit in den Jahren 2006/2007 einen Beitrag zur Kenntnis der Gnitzenfauna in Deutschland zu leisten und methodisch speziesspezifische Primer für die schnelle und eindeutige Identifizierung relevanter Gnitzenarten zu entwickeln.

### **5.1. Entomologische Untersuchungen**

#### **5.1.1. Methodenkritik**

Betrachtet man die Kriterien für die Standortwahl (pro Planquadrat von 45 x 45 km<sup>2</sup> ein Milchbetrieb, siehe 3.1) und die tatsächliche räumliche Verteilung der Fallenstandorte, so kann nicht unbedingt von einer „gleichmäßigen“ Verteilung im Sinne einer standardisierten Entfernung der Fallenstandorte zueinander gesprochen werden. Die Anzahl sowie geographische Verteilung der Milchviehbetriebe ist regional sehr unterschiedlich und eine „gleichmäßige“ Verteilung ausgewählter Höfe daher in manchen Regionen schwer einzuhalten. Eine bundesweite oder zumindest auf das Untersuchungsgebiet bezogene repräsentative Untersuchung wäre darüber hinaus nicht nur hinsichtlich der Auswahl der Höfe und zeitgleichem Aufbau aller Fallen, sowie der Logistik (Versand der Proben bzw. Abholung durch Kurierdienste) sehr aufwendig, sondern vor allem im Hinblick auf die Durchführung der entomologischen Untersuchungen (Differenzieren der Proben u.a. labortechnische Untersuchungen) und nicht zuletzt der Finanzierung wegen nicht durchführbar gewesen. Demnach kann nur von einer stichprobenhaften Erfassung der Gnitzen-Fauna im Untersuchungsgebiet gesprochen werden. Ebenso wünschenswert, und aus den bereits genannten Gründen bundesweit schwer durchführbar, wäre eine durchgängige, 24-stündige Beprobung (an jedem Tag des Monats) gewesen. Aussagen zu Saisonalität und Artenspektrum der heimischen Gnitzen hätten so noch genauer ausfallen können. Da der Untersuchungszeitraum auf 14 aufeinander folgende Monate (April 2007 – Mai 2008) begrenzt wurde und sich so nur an zwei Monaten Überschneidungen (Monate April und Mai in beiden Jahren) ergaben, konnte leider ebenfalls kein Jahresvergleich hinsichtlich Gnitzenzahl, Saisonalität etc. erfolgen. Weiterhin könnte die unterschiedliche Windexposition der Fallenstandorte die Fangzahlen beeinflusst haben, da die Flugaktivität von Gnitzen bereits

bei Windgeschwindigkeiten über 3 m/s nahezu vollständig eingestellt wird (Kettle, 1977; Walker, 1977).

Die verwendete BG-Sentinel UV-Licht Falle von BioGents<sup>®</sup> (Regensburg) wurde erstmals für ein Monitoring von *Culicoides* spp. eingesetzt, da die bislang gängigste Falle (Onderstepoort suction light trap) aufgrund der Vielzahl entomologischer Untersuchungen in der Folge der BTD-Epidemie vergriffen war. Ein Vergleich dieser neuen Falle mit drei weiteren, bisher zum Fangen von *Culicoides* spp. eingesetzten Fabrikaten zeigte, dass die BG-Sentinel-Falle den bisherigen Fallen in Bezug auf Fangzahlen und Artenspektrum von Gnitzen durchaus ebenbürtig ist (Venter *et al.*, 2009). Die Falle war sowohl im Auf- und Abbau, als auch während des Untersuchungszeitraums einfach zu bedienen. Die Installation der Falle am Standort richtete sich nach den örtlichen Gegebenheiten, so dass keine einheitliche Entfernung zum Tierbestand eingehalten werden konnte. Die Entscheidung auf Anbringung der Falle inner- oder außerhalb der Stallung orientierte sich an den baulichen Gegebenheiten der Stallgebäude, da sichergestellt werden musste, dass die Falle zwar möglichst nahe am Viehbestand installiert wurde, die Rinder jedoch keinen direkten Zugang zur Falle oder der versorgenden Elektronik haben sollten. Einzig die Höhe der Einflugsöffnung war mit 1,50m einheitlich definiert. Schwachpunkte der Falle waren die je nach Standort sehr hohe Verdunstung des Ethanol im Fangbecher, dessen Pegel vor allem in den sommerlichen Fangperioden täglich kontrolliert und korrigiert werden musste, und der wiederum standortabhängig hohe Verschmutzungsgrad der weißen Schutzgaze, die die Falle nach oben hin vor dem Einfall von größeren Insekten, Schmutz und Blattwerk schützte und welche bei starker Verschmutzung regelmäßig gewaschen werden musste, um die Zirkulation des Luftstroms zu gewährleisten und damit die Funktion der Falle nicht zu beeinträchtigen.

Die Zusammenarbeit mit den Landwirten erfolgte einwandfrei. Da diese in den meisten Fällen auch die Wartung der Fallen und kleinere Reparaturen der Elektrik übernahmen, beschränkte sich die Kontrolle der Fallen und Wetterstationen auf zwei planmäßige Außentermine, an denen die Wetterdaten abgelesen werden mussten. Keine der Fallen fiel während des Untersuchungszeitraums aus, was für die Widerstandsfähigkeit dieses Fallentyps spricht.

### 5.1.2. Gnitzen-Fauna und Artspektrum

Da die Fänge in ihrer Gesamtheit nicht vollständig bis auf Spezieslevel identifiziert wurden und sich die morphologische Differenzierung vor allem auf potenzielle Überträger der Blauzungenkrankheit bezog, kann keine abschließende Aussage zur Gesamtheit der Gnitzen-Fauna an den jeweiligen Fallenstandorten getroffen werden. Hinzu kommt, dass tagaktive Gnitzenarten mit dem verwendeten Fallenprinzip nicht erfasst wurden, obwohl Tagaktivität bei bestimmten Gnitzenarten (*C. obsoletus*-Komplex) und anderen *Ceratopogonidae* (*Lasiohelea* spp., *Leptoconops* spp.) bereits beschrieben und diskutiert wurde (Kettle, 1977; Balenghien *et al.*, 2008; European Food Safety Authority, 2008).

Es lässt sich jedoch feststellen, dass das Spektrum und die anteilmäßige Verteilung der gefangenen und differenzierten Gnitzenarten sowohl mit den Ergebnissen anderer entomologischer Studien in Mittel- und Westeuropa weitestgehend übereinstimmen (Sarto i Monteys u. Saiz-Ardanaz, 2003; Madder *et al.*, 2006; Baldet *et al.*, 2008; De Deken *et al.*, 2008; Meiswinkel *et al.*, 2008), als auch den Ergebnissen der anderen am deutschen Projekt beteiligten Arbeitsgruppen (Mehlhorn *et al.*, 2009); Gnitzen des *Obsoletus*- und *Pulicaris*-Komplexes bildeten auch in diesen Studien die zahlenmäßig größten Fraktionen unter den erfassten Gnitzen.

Auch die Abwesenheit von *C. imicola* (Hauptvektor der BTB in südeuropäischen und afrikanischen Regionen) auf dem Bundesgebiet entspricht den Studienresultaten benachbarter Länder, wie den Niederlanden (Meiswinkel *et al.*, 2008), Belgien (De Deken *et al.*, 2008; Fassotte *et al.*, 2008), Nordfrankreich (Baldet *et al.*, 2008) oder Österreich (Sehnal *et al.*, 2008).

Nichtsdestotrotz muss bedacht werden, dass die in den Fallen gefangenen Gnitzen dieser und jeder anderen Studie immer nur einen Bruchteil der tatsächlich anwesenden Gnitzenpopulation ausmachen (unter 0,0001%) und somit nur „die Spitze des Eisbergs“ bilden (Venter *et al.*, 2009).

### 5.1.3. Saisonale Abundanz der Gnitzen

Die monatlichen Fänge fielen je nach Standort und Fangmonat unterschiedlich hoch aus. Aufgrund der Entfernung der Fallenstandorte zueinander und der landschaftlich unterschiedlichen Regionen, sowie der unregelmäßigen Installation der Fallen im Außen- oder Innenbereich der Stallungen und deren unterschiedliche Windexposition, ist es nur sehr bedingt möglich, die Fänge der Fallen untereinander zu vergleichen.

An allen Standorten fielen die größten Fangzahlen in den Frühsommer- und Sommermonaten (Juni – August) an, teilweise mit einem zweiten, wenn auch etwas geringerem Anstieg im Herbst (Oktober – November). Dieser Zeitraum entspricht im Großen und Ganzen der beschriebenen Saisondynamik der Gnitzen (Liebisch u. Liebisch, 2007; Werner u. Kampen, 2007) und wurde auch in anderen Studien in ähnlicher Weise beschrieben (bspw. Sarto i Monteys u. Saiz-Ardanaz, 2003; Fassotte *et al.*, 2008). Gründe für das breite Spektrum an Fangzahlen sind schwer zu ergründen. Die stündliche Wetterdatenaufzeichnung kann leider nicht für die Interpretation der Fänge herangezogen werden, da diese Gesamtproben von sieben Nächten darstellen und angenommen werden kann, dass Umweltfaktoren, wie Temperatur, Luftfeuchtigkeit (Niederschlag) und Windgeschwindigkeit Einfluss auf die tägliche Aktivität der Zielinsekten hatten.

Die Tatsache, dass auch im Winter noch Gnitzen gefangen wurden, die zwar hauptsächlich nullipar und ungesogen, aber auch nach erfolgter Blutmahlzeit in die Falle gingen, ist ein starker Hinweis darauf, dass Gnitzen in Rinderställen im adulten Stadium überwintern und am Wirt Blut saugen können. Somit werden die Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen bestätigt, die ebenfalls von einer Überwinterung adulter Gnitzen berichteten (z.B. Baldet *et al.*, 2008). Die Definition einer „vektor-freien Periode“ (European Food Safety Authority, 2008) sollte somit zumindest in Frage gestellt werden. Ob diese überwinternde Population allerdings eine Rolle im Seuchengeschehen der BTM spielt, bleibt als Fragestellung weiteren Untersuchungen vorbehalten. Erste statistische Berechnungen deuten an, dass selbst bei Annahme einer Überwinterung adulter Vektoren im Stallinnern die Wahrscheinlichkeit einer Virusübertragung verschwindend gering ist (Napp *et al.*, 2011). Allerdings betonen diese Ergebnisse (sowohl entomologisch als auch statistisch) die Aktualität des Themas und die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen zur Biologie der Gnitze und Übertragung des Blauzungenvirus.

#### 5.1.4. Fänge innen und außen

Baldet *et al.* (2008) fanden ähnliche Verhältnisse in ihrer entomologischen Studie, in der die Aktivität von *Culicoides* spp. im Stallinneren und –äußeren vergleichend untersucht wurde. Demnach war auch bei ihnen der Anteil der im Stallinneren gefangenen Gnitzen höher, als der Anteil außerhalb der Stallungen gefangener Gnitzen. Des Weiteren fingen sie Gnitzen der *Obsoletus*-Gruppe vor allem in den innen aufgestellten Fallen und Gnitzen der *Pulicaris*-Gruppe vor allem im Außenbereich. Um die Fänge von Innen- und Außenfallen jedoch ohne einen Zeit-Bias statistisch auswerten zu können, wäre die gleichzeitige Installation einer Außen- und Innenfallen an jedem Standort wünschenswert gewesen. Für folgende Erhebungen dieser Art wäre es daher sicher von Vorteil, an jedem Fallenstandort sowohl eine Falle im Stallinneren als auch außerhalb des Stallgebäudes zu installieren. Des Weiteren wäre eine genaue Analyse der Stallumgebung notwendig, um etwaige Brutplätze von *Culicoides*-Gnitzen zu lokalisieren. Schlupffallen (engl. *emergence traps*) könnten beispielsweise eingesetzt werden, um der Frage nachzugehen, ob *Culicoides* spp. auch im Dung innerhalb von Stallungen (z.B. bei Tretmist- oder Tiefstreuhaltung) Eier legen und sich so endophile Populationen entwickeln könnten.

Nicht zuletzt sollten die Fänge täglich ausgewertet werden, um auf diese Weise den Einfluss der Umweltbedingungen auf den täglichen Fang besser einschätzen zu können.

#### 5.1.5. Anteil gesogener Gnitzen

Es ist nicht weiter verwunderlich, dass der Anteil männlicher Gnitzen am Gesamtfang so gering ausfiel, da männliche Gnitzen keiner Blutmahlzeit bedürfen und die Paarung in der Regel abseits der Stallungen im Schwarm erfolgt (Eichler, 1980; Werner u. Kampen, 2007).

Die Aufteilung der weiblichen Gnitzen nach ihrem Ernährungszustand wurde durch burgunderrote Pigmentation des Abdomens vieler weiblicher Gnitzen erschwert. Da Dyce (1969) diese Pigmentation als Unterscheidungsmerkmal parer und nulliparer Gnitzen beschrieb und davon ausgegangen werden kann, dass einer Eiablage eine Blutmahlzeit vorausgegangen sein muss, wurden Gnitzen mit burgunderfarbenen Pigmenten im Abdomen zur gesogenen Gruppe gezählt. In zukünftigen Auswertungen sollte jedoch genauer darauf geachtet werden, Gnitzen nach ihrem Ernährungszustand in frisch gesogene und ältere

Individuen zu unterteilen. Oftmals reicht dazu je nach Größe der Gnitze die stereomikroskopische oder mikroskopische (10x Vergrößerung) Beurteilung bereits aus.

#### **5.1.6. BTV-Status gefangener Gnitzen bzw. beprobter Höfe**

Hoffmann *et al.* (2009) veröffentlichten die Methode und Resultate zur Bestimmung des BTV-Genoms in den Fangproben des Entomologischen Monitorings. Sie bestätigten erneut die Abwesenheit von *C. imicola* in den deutschen Fangproben. Ihren Untersuchungen zufolge ermittelten sie vor allem in den Proben mit Gnitzen der *Obsoletus*-Gruppe BTV-Genom, welche auch ihren Untersuchungen zufolge jeweils die zahlenmäßig größte Fraktion bildeten.

In unseren Fallen zeigten sich elf der eingesandten Proben positiv für das BTV-8-Genom. Die ersten positiven Gnitzenpools stammten aus Fangproben vom August 2007, daraufhin erfolgte ein Anstieg BTV-8 positiver Probenpools bis zum Höhepunkt im November 2007. Auch wenn von einigen Landwirten ebenfalls mit BTV-8 infizierte Rinder gemeldet wurden, kann ein Rückschluss auf die Infektiosität der Gnitzenpopulation der entsprechenden Fallenstandorte jedoch nicht ohne weiteres erfolgen. Die real-time RT-PCR lässt keine Unterscheidung zwischen infektiösem Virusgenom oder nicht-infektiöser virusspezifischer RNS zu (European Food Safety Authority, 2008). Es kann daher nur mit Sicherheit gesagt werden, dass diese positiven Gnitzen Blut von einem virämischen Tier gesogen haben. Nur echte Infektionsversuche, die eindeutig das Vektorpotential der heimischen Gnitzen für BTV-8 nachweisen könnten, hätten eine solche Aussagekraft.

Durch den Umstand, dass vor allem Gnitzen der *Obsoletus*-Gruppe positiv auf BTV-8 getestet wurden, scheint sich die Hypothese, dass der Hauptvektor für das Seuchengeschehen der Blauzungkrankheit in Deutschland unter Gnitzen der *Obsoletus*-Gruppe zu finden ist, zu erhärten (Hoffmann B. *et al.*, 2009). Allerdings muss auch diese Behauptung erst durch Infektionsversuche bestätigt oder widerlegt werden.



## 5.2. Molekular-genetische Differenzierung

Die im Rahmen des entomologischen Monitorings gefangenen Gnitzen *C. obsoletus* s.s., *C. chiopterus*, *C. dewulfi* und *C. scoticus*, sowie *C. punctatus* und *C. pulicaris* wurden als Ausgangsmaterial für die molekular-biologischen Differenzierungen verwendet.

Voraussetzung für die Verwendung der in Ethanol aufbewahrten Gnitzen war, dass die DNS-Extraktion und folgende molekulargenetischen Arbeiten durch den Alkohol nicht beeinträchtigt wurden. Diese Frage wurde bereits in Vorbereitung des entomologischen Monitorings durch Mitarbeiter des FLI geklärt, da ein Teil der Gnitzen auf das Bluetongue-Virus hin untersucht werden sollten. Demnach wurde keine negativer Einfluss vergällten Ethanols auf die Stabilität der DNS festgestellt (Hoffmann, 2007).

Die Extraktion der Gnitzen-DNS und Amplifikation der ITS1-Region mittels der konservativen Primer PanCulF/R verliefen erfolgreich.

Die Sequenzierung der DNS einiger Gnitzen verlief leider nicht wie erwartet. Es zeigten sich in vielen Chromatogrammen Überlagerungen, die nicht durch Sequenzierungsfehler allein erklärt werden können. Eine Erklärung wäre, dass es sich hierbei um ein verfahrenstechnisches Problem handelt. Bei der Sequenzierung komplexer Proben kann es zu Überlagerungen kommen, da einzelne Basen nicht mehr aufgetrennt und als Einzelpeaks („Spitze“ im Chromatogramm) dargestellt werden. Mittels mathematischer Formeln können die der Überlagerung zugrunde liegenden Peaks rechnerisch bestimmt und in die entsprechenden Basen aufgetrennt werden (Hillebrandt *et al.*, 2008). Ähnliche Probleme wurden ebenfalls bei molekulargenetischen Untersuchungen der ITS-Region der Kriebelmücke *Simulium damnosum* (Tang *et al.*, 1996) und der Kleiderlaus *Pediculus humanus* (Leo u. Barker, 2002), aber auch bei Untersuchungen zu *C. impunctatus* (Ritchie *et al.*, 2004) beschrieben und wurden von den Autoren als intra-spezifischer Polymorphismus bezeichnet.

Die wohl gängigste Methode diesem Problem entgegenzuwirken ist die Klonierung der DNS eines einzigen Individuums mittels Vektor und Amplifikation der klonierten, nun in tausendfacher Kopie vorliegenden DNS mit Restriktionsenzymen und anschließender Sequenzierung dieser klonierten DNS (Li *et al.*, 2003; Ritchie *et al.*, 2004; Kiehl *et al.*, 2009). Die vorsorgliche Anwendung dieses Verfahrens könnte auch eine Erklärung dafür sein,

weshalb andere Arbeitsgruppen, die sich ebenfalls mit der Entwicklung von Primern für die Differenzierung von *Culicoides* spp. beschäftigen, diese Chromatogramm-Problematik bisher kaum beobachtet oder beschrieben haben. Weitere Untersuchungen müssen demnach durchgeführt werden, um zu klären, ob es sich bei den Überlagerungen in den Sequenzen der hier untersuchten *Culicoides* spp. tatsächlich um verfahrenstechnisches Problem oder ebenfalls um intra-spezifischen Polymorphismus handelt.

### 5.2.1. Auswahl von ITS1 als Ziel-Genregion

Die ITS1-Region wurde vorangehend hinreichend als für molekular-genetische Untersuchung von *Culicoides* spp. geeignet beschrieben (Li *et al.*, 2003; Gomulski *et al.*, 2006; Perrin *et al.*, 2006). In früheren Untersuchungen wurden bereits die ITS2-Region (Gomulski, L. M. *et al.*, 2005) als auch die Genregion der Cytochromoxidase subunit 1 (COI) zur Entwicklung von Primern zur Differenzierung verschiedener *Culicoides* spp. verwendet (Linton *et al.*, 2002; Pâges u. Sarto I. Monteys, 2005; Nolan *et al.*, 2007). Die ITS2-Region schien für die molekulargenetischen Arbeiten im Rahmen dieser Dissertation nicht geeignet, da sich die ITS2-Sequenzen der Zielspezies so stark ähneln, dass die Entwicklung speziesspezifischer Primer für jede einzelne der gewünschten *Culicoides* spp. nicht möglich gewesen wäre. Die COI-Region wurde von einer anderen Arbeitsgruppe des entomologischen Monitorings für die Entwicklung von Primern gewählt.

### 5.2.2. Primerdesign und PCR-Protokoll

Die Entscheidung, einen speziesspezifischen Vorwärts-Primer zu bestimmen und PanCulR (aus dem gattungsspezifischen Primerpaar) als Rückwärts-Primer zu belassen, wurde aus mehreren Gründen gefällt. Das Amplifikat sollte eine Länge von 100-300bp je nach *Culicoides* spp. aufweisen, da Amplifikate dieser Größe mit Standard-Gelen in der Elektrophorese gut aufzutrennen und darzustellen sind. Die ITS1-Region der Ziel-*Culicoides* spp. ist jedoch maximal 512bp (*C. pulicaris*) groß und die Wahl eines Primerpaares außerhalb der Gensequenzen von PanCulF/R führte zu sehr kurzen Amplifikaten. Potenzielle Rückwärtsprimersequenzen wurden letztendlich meist in der

Region des bereits beschriebenen PanCulR-Primers vorgeschlagen, so dass die Verwendung des PanCulR-Primers nahe lag.

Ein speziesspezifischer Primer für *C. scoticus* wurde nicht bestimmt, da die ITS1-Basensequenz zu große Ähnlichkeiten zur Sequenz von *C. chiopterus* aufwies, um eine selektierende Primerregion zu ermitteln. Auch Mathieu *et al.* (2007) konnten in ihrer Arbeit *C. scoticus* nur im Ausschlussprinzip nach morphologischer Differenzierung und Anwendung der von ihnen entwickelten Multiplex-PCR bestimmen.

Nach Ermittlung der optimalen MgCl<sub>2</sub>-Konzentration und Annealing-Temperatur bzw. eines geeigneten touchdown-Protokolls, zeigten sich die speziesspezifischen Vorwärts-Primer CulObsF2, CulDewF, CulChioF, CulPunctF und CulPulF als gut geeignet, *Culicoides* spp. anhand der PCR voneinander zu unterscheiden.

### 5.2.3. Analytische Spezifität und Sensitivität der Primer

Die Spezifität der Primer wurde vorab gründlich durch Abgleich mit Genbank (über BLAST) überprüft. Die PCR-Ergebnisse der spezifischen PCRs entsprachen durchweg der morphologischen Differenzierung der amplifizierten Gnitzen. Die Kreuztests zeigten in der praktischen Anwendung der speziesspezifischen PCRs, dass Gnitzen der gleichen Gruppe (beispielsweise *Obsoletus*-Gruppe) trotz hoher morphologischer und genetischer Ähnlichkeit sicher voneinander unterschieden werden konnten. Die analytische Spezifität der entwickelten Primer beträgt somit 100%.

Zur Bestimmung der analytischen Sensitivität wurden Verdünnungsreihen eingesetzt. Dabei wurde die Menge an Ziel-DNS in der Probe stufenweise verkleinert. Die analytische Sensitivität lag bei einer Nachweisgrenze von 1ng – 100pg Ziel-DNS je nach Primer.

Ein Vergleich der Nachweisgrenzen der hier entwickelten Primern mit denen anderer Autoren ist schwierig, da jeweils andere Verfahren zur Ermittlung der analytischen Spezifität gewählt wurden (Cêtre-Sossah *et al.*, 2004; Wenk *et al.*, 2012)

### 5.3. Diskussion der weiteren Untersuchungen

Im Anschluss an die erfolgreiche Etablierung der speziesspezifischen PCRs, sowie einem erfolgreichen Waschverfahren zur Reduzierung von Kreuzkontaminationen in Poolproben wurden in einigen Untersuchungen die Anwendungsmöglichkeiten der speziesspezifischen Primer getestet.

Die Versuche mit gespiketen Poolproben (Versuchsaufbau siehe 3.3.6.2) verliefen im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgreich. Die Vermutung liegt nahe, dass zu viel Template-DNS in einer PCR eingesetzt wurde, woraus die beobachteten „Schmierbanden“ resultieren (Mülhardt, 2006). Auch wenn durch Verdünnung der extrahierten Proben bereits ein Versuch zur Reduzierung der DNS-Menge und Eliminierung der Schmierbanden erfolgte, konnte das Ergebnis zunächst nicht verbessert werden. Weitere Versuche sind daher notwendig, um die Anwendbarkeit dieses Versuchsaufbaus in Zusammenhang mit den in dieser Arbeit entwickelten speziesspezifischen Primern zu ermitteln oder gar auszuschließen.

Der Versuch, die Spezieszugehörigkeit einzelner, vorher morphologisch bestimmter Gnitzen zu ermitteln (Versuchsaufbau siehe 4.4), verlief erfolgreich. Allerdings beschränkte sich dieser Versuch auf Gnitzen der *Obsoletus*-Gruppe, genauer auf die Spezies *C. obsoletus s.s.* und *C. dewulfi*. Eine entsprechende Ausweitung des Versuchs auf *C. chiopterus* oder Gnitzen der *Pulicaris*-Gruppe wäre zwar wünschenswert gewesen, konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit mangels ausreichender Anzahl gefangener Testgnitzen der relevanten Spezies nicht durchgeführt werden. Allerdings lassen die Ergebnisse der im Vorfeld durchgeführten Kreuztests ähnlich erfolgreiche PCR-Läufe erwarten.

### 5.4. Schlussfolgerungen und Ausblick

#### 5.4.1. Entomologische Untersuchungen

Die entomologischen Untersuchungen im Zeitraum März/April 2007 – Mai 2008 konnten einen Überblick zur Gnitzen-Fauna im Bereich von Milchviehbetrieben liefern. Damit wurde ein großer Schritt zur Erforschung der Gnitzen-Fauna Deutschlands getan. Jedoch bleiben immer noch viele Fragen zur Biologie der Gnitze und ihrer Rolle im Seuchengeschehen der Blauzungenkrankheit unbeantwortet.

Am wichtigsten ist sicher die Erkenntnis, dass der ursprüngliche Vektor der Blauzungenkrankheit *C. imicola* derzeit (noch) nicht zum Spektrum der in Deutschland heimischen Gnitzenarten gehört. Die zahlenmäßig größte Gruppe der in Deutschland vorkommenden Gnitzen setzt sich aus der *Obsoletus*- und *Pulicaris*-Gruppe zusammen. Da in diesen Gnitzen BTV-8 Genom nachgewiesen werden konnte und auf einigen Höfen infizierte Rinder standen, kann davon ausgegangen werden, dass der Hauptvektor für die Blauzungenkrankheit unter diesen Gnitzen zu finden ist. Ob tagaktive Gnitzenarten oder andere Insekten ebenfalls als Überträger der BTD in Frage kommen, wurde im Rahmen dieser Studie allerdings nicht näher erörtert.

Eindeutig ist, dass von einer „gnitzenfreien Zeit“, vor allem wenn es um Viehhaltung in Stallungen geht, kaum ausgegangen werden kann. Es wurden auch im Winter noch viele Gnitzen, vor allem im Stallinneren, gefangen. Der Einfluss von in Stallungen überwinterten Gnitzenpopulationen auf dieses und eventuell folgende Seuchengeschehen muss in zukünftigen Studien abgeklärt werden.

Bei der Durchführung künftiger Studien sollten daher (zusätzlich) Fallen eingesetzt werden, die Auskünfte zur Tagaktivität von Gnitzen liefern können. Es wäre von Vorteil, wenn am Standort je eine Falle sowohl im Außen- als auch im Innenbereich der Stallungen installiert würde. Das Entnahmeprotokoll sollte verfeinert werden (tägliche Entnahme ohne Fangpause). Wenn möglich, sollte über den Einsatz von Schlupffallen nachgedacht werden, um potenzielle Brutgebiete in der Nähe der Stallungen oder gar im Stallinneren beproben zu können.

Gerade im Hinblick auf das aktuelle Tierseuchengeschehen im Zusammenhang mit dem so genannten „Schmallenberg-Virus“, benannt nach dem Herkunftsort der ersten Proben, welcher seit Herbst 2011 in Deutschland und den Nachbarländern bei Wiederkäuern zu Aborten und missgebildeten Neugeborenen führt und eine Übertragung durch Gnitzen diskutiert wird (Friedrich-Loeffler-Institut, 2011b, 2012a), muss die Erforschung der heimischen Gnitzen-Fauna fortgeführt und verfeinert werden.

### 5.4.2. Einsatz der speziesspezifischen Primer

Der Einsatz der im Rahmen dieser Dissertation entwickelten speziesspezifischen Primer bietet eine wertvolle Unterstützung zur Beantwortung noch offener Fragen zur Populationsdynamik von *Culicoides*-Gnitzen. Über die reine Speziesbestimmung adulter Gnitzen hinaus, wäre beispielsweise der Einsatz der Primer bei der Speziesbestimmung von vor Ort gesammelten *Culicoides*-Larven denkbar.

Die Versuche zeigten jedoch auch, dass weitere Versuche hinsichtlich der Entwicklung eines PCR-Protokolls zur Untersuchung größerer Gnitzenzahlen, beispielsweise als real-time PCR, notwendig sind.

Analog zu dem in Rahmen dieser Untersuchungen verwendeten Verfahren zur Entwicklung speziesspezifischer Primer für *Culicoides obsoletus* s.s., *C. dewulfi*, *C. chiopterus*, *C. punctatus* und *C. pulicaris*, ist die Entwicklung weiterer *Culicoides* spp.-spezifischer Primer und PCR-Protokolle denkbar.

## 6. Zusammenfassung

Aufgrund schwerer Ausbrüche der Blauzungenkrankheit in den Jahren 2006/2007 in Deutschland in Abwesenheit des afrikanischen Hauptvektors *Culicoides imicola* wurden heimische Gnitzenarten als mögliche Vektoren des Blauzungenvirus diskutiert. Da es bisher nur wenige und zudem standortbasierte Studien zur Gnitzenfauna Deutschlands gab, wurde ein bundesweites entomologisches Monitoring-Projekt ins Leben gerufen. Dafür wurden an 89 Standorten, welche sich innerhalb der Restriktionszone des Hauptausbruchsgebietes der Blauzungenkrankheit im Jahr 2006 befanden, Milchbetriebe ausgewählt, auf denen je eine Falle zum Fang der Zielinsekten und eine Wetterstation zur Erfassung verschiedener Klimadaten installiert wurde. Die Auswertung der Fänge erfolgte über den Zeitraum von März 2006 bis Mai 2007 und bestand aus der Ermittlung der Fangzahlen, des Geschlechtsverhältnisses der Gnitzen, ihrer artspezifischen Gruppenzugehörigkeit (*Obsoletus*-, *Pulicaris*-Gruppe, restliche Arten) sowie ihres Ernährungszustandes hinsichtlich einer erfolgten Blutmahlzeit. Darüber hinaus wurde von einem Teil der Proben in Zusammenarbeit mit externen Instituten die genaue Spezies bestimmt, sowie von einem weiteren Teil gesogener Gnitzen das Vorhandensein von BTV-8-Genom getestet. Im Zuge des Monitorings konnte die Abwesenheit des afrikanischen Hauptvektors *C. imicola* auf dem Gebiet des Seuchenausbruchs 2006/2007 bestätigt werden. Gnitzen der *Obsoletus*-Gruppe gehörten zu den häufigsten Gnitzenarten, gefolgt von Gnitzen der *Pulicaris*-Gruppe. BTV-8-Genom konnte v.a. in Gnitzen der *Obsoletus*-Gruppe, aber auch in Gnitzen der *Pulicaris*-Gruppe nachgewiesen werden, womit sich deren Vektorkompetenz bestätigte. Da auch in den Wintermonaten noch viele Gnitzen gefangen wurden, kann eine „vektor-freie Zeit“ nicht mehr festgelegt werden.

Die Frage nach der exakten Speziesbestimmung der gefangenen Gnitzen machte es notwendig, eine möglichst schnelle und einfach zu handhabende Methode zu entwickeln, um heimische *Culicoides*-Gnitzen sicher identifizieren zu können. Da die morphologische Differenzierung zeitraubend ist und spezielle Fachkenntnisse zur Präparation und morphologischen Identifizierung erfordert, bot sich die Entwicklung eines PCR-gestützten Verfahrens mit speziesspezifischen Primern zur Identifizierung von Gnitzenarten an. Die ribosomale DNS-Region des Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1) wurde zur Bestimmung speziesspezifischer Primer ausgewählt. Für die Entwicklung der Primer wurde DNS von Gnitzen der Arten *Culicoides obsoletus* s.s., *C. dewulfi*, *C. scoticus*, *C. chiopterus*,

*C. punctatus* und *C. pulicaris* verwendet, welche im Rahmen des entomologischen Monitorings von März 2007 – Mai 2008, gefangen wurden. Zur Festlegung des Gold-Standards wurden Teile (Flügel, Kopf und Abdomen mit Geschlechtsorganen) der verwendeten Gnitzen präpariert und zur morphologischen Identifizierung auf Objektträgern fixiert. Nach Extraktion der DNS aus den verbleibenden Körperteilen (Thorax mit Beinen und oberem Abdomen) und Amplifikation der ITS1-Region mit den gattungsspezifischen Primern PanCulF/PanCulR (Cêtre-Sossah *et al.*, 2004), erfolgte die Ermittlung potenzieller Vorwärts-Primerregionen für jede der Zielspezies mittels spezieller Software; als Rückwärtsprimer diente der rückwärtige Primer PanCulR aus dem gattungsspezifischen Primerpaar. Die Eignung der ermittelten Primer wurde softwaregestützt getestet und die Synthese der Primer CulObsF2, CulDewF, CulChioF, CulPunctF und CulPulF daraufhin bei einem Speziallabor veranlasst. Für jeden dieser Primer wurde das ideale PCR-Protokoll (teilweise touchdown-Protokoll) durch Bestimmung der optimalen MgCl<sub>2</sub>-Konzentration und Annealing-Temperatur ermittelt. Die entwickelten Primer wurden in verschiedenen Verfahren auf ihre analytische Spezifität und Sensitivität hin getestet. Der Einsatz der Primer wurde mittels verschiedener Untersuchungen getestet. Verbesserungsvorschläge für zukünftige entomologische Untersuchungen und der Einsatz der speziesspezifischen Primer bei künftigen Studien wurden diskutiert.



## 7. Extended Summary

### **Entomological and molecular genetic studies regarding the midge fauna (*Diptera: Ceratopogonidae*) of Germany**

Due to the severe outbreaks of bluetongue disease in the years 2006/2007 in Germany in the absence of the main African vector *Culicoides imicola*, the role of autochthonous midges as possible vectors of the bluetongue disease were discussed. Only few local studies regarding the midge fauna of Germany existed therefore an entomological monitoring project covering a great part of Germany was launched. At 89 dairy farms located within the restriction zone of the bluetongue epidemic of 2006 UV-light traps for catching target insects as well as weather stations for collecting climate data were installed. The catches were performed during March 2006 and May 2007 and were analysed regarding the numbers of caught midges, their sex ratio, their belonging to the *C. obsoletus* group, *C. pulicaris* group or other, as well as their status of blood engorgement. Furthermore, a certain number of midges were analysed down to species level as well as tested for BTV-8 genome by cooperating institutes. The results of the monitoring project confirmed the absence of the main vector *C. imicola* in the region of the epidemic of 2006/2007. Midges of the *C. obsoletus* group were caught most numerous, followed by midges of the *C. pulicaris* group. BTV-8 genome was mostly found in midges of the *C. obsoletus* group but also in some of the *C. pulicaris* group affirming their vector potential. Because midges were still caught in the months of winter a “vector-free period” could not be defined.

In order to identify caught midges down to species level, a rapid and easy applicable method for identification of autochthonous *Culicoides* spp. had to be developed. Since morphological differentiation is time-consuming and demands specialised knowledge of preparation and identification, a polymerase chain reaction (PCR)-based procedure in connection with species-specific primers provided a solution. The region of internal transcribed spacer 1 (ITS1) of the ribosomal DNA was chosen as target sequence for the development of species-specific primers. The DNA used for the development of primers originated from *Culicoides obsoletus* s.s., *C. dewulfi*, *C. scoticus*, *C. chiopterus*, *C. punctatus* and *C. pulicaris* midges captured during the entomological monitoring of March/April 2007 – May 2008. In order to determine a gold standard body parts of the chosen midges (wings, head, abdomen with genitals) were mounted on slides for morphological identification. The DNA was extracted from the remaining parts (thorax with legs and upper abdomen) and the ITS1-region

amplified using the conservative primers PanCulF/PanCulR (Cêtre-Sossah *et al.*, 2004). Potential forward-primer regions were determined with the help of DNA-software; PanCulR was kept as reverse primer. The qualification of the potential primers was tested using DNA-software and the synthesisation of the primers CulObsF2, CulDewF, CulChioF, CulPunctF and CulPulF was carried out by a specialised laboratory. For each primer an optimized PCR protocol was developed by determining the ideal MgCl<sub>2</sub> concentration and annealing temperature; for some primers a touchdown method was applied. Using different procedures the primers's analytical specificity and sensitivity was defined. The deployment of the primers was tested through different methods. Suggestions of improvement for subsequent entomological investigations were mentioned and the utilization of species-specific primers in future studies discussed.

## 8. Literaturverzeichnis

- Baldet, T., Delécolle, J. C., Cêtre-Sossah, C., Mathieu, B., Meiswinkel, R., Gerbier, G., 2008. Indoor activity of *Culicoides* associated with livestock in the bluetongue virus (BTV) affected region of northern France during autumn 2006. *Preventive Veterinary Medicine* 87, 84-97
- Balenghien, T., Cêtre-Sossah, C., Grillet, C., Delécolle, J.-C., Mathieu, B., Baldet, T., 2008. Diurnal activity of potential bluetongue vectors in northern Europe. *Veterinary Record* 323-324
- Bartsch, S., Bauer, B., Wiemann, A., Clausen, P.-H., Steuber, S., 2009. Feeding patterns of biting midges of the *Culicoides obsoletus* and *Culicoides pulicaris* groups on selected farms in Brandenburg, Germany. *Parasitology Research* 105, 373-380
- Bensasson, D., Zhang, D.-X., Hartl, D. L., Hewitt, G. M., 2001. Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends in Ecology & Evolution* 16, 314-321
- Birley, M. H., Boormann, J. P. T., 1982. Estimating the survival and biting rates of haematophagous insects with special reference to *Culicoides obsoletus* group in Southern England. *Journal of Animal Ecology* 51, 135-148
- Blackwell, A., Evans, K. A., Strang, R. H., Cole, M., 2004. Toward development of neem-based repellents against the Scottish Highland biting midge *Culicoides impunctatus*. *Medical & Veterinary Entomology* 18, 449-452
- Blackwell, A., Mordue, A. J., Mordue, W., 1994. Identification of bloodmeals of the Scottish biting midge, *Culicoides impunctatus*, by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Medical & Veterinary Entomology* 8, 20-24
- Blackwell, A., Ritchie, A., Hillman, J. R., Fenton, B., 2002. Meanbh-chuileag - the Highland biting midge. von [www.scri.ac.uk/scri/file/individualreports/2002/09midges.pdf](http://www.scri.ac.uk/scri/file/individualreports/2002/09midges.pdf) abgerufen am 15.08.2008
- Boorman, J., 2006. A guide to the British *Culicoides*. von <http://www.iah.bbsrc.ac.uk/bluetongue/culicoides/index.html> abgerufen am 15.07.2009

- Braverman, Y., Mumcuoglu, K., 2008. Newly emerged nulliparous *Culicoides imicola* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae) with pigmented abdomen. *Veterinary Parasitology*
- Bundesministerium für Ernährung Landwirtschaft und Verbraucherschutz, 2008. Pressemitteilung 133: Impfung gegen Blauzungenkrankheit läuft erfolgreich. von <http://www.schattenblick.de/infopool/tiere/fakten/tfvet212.html> abgerufen am 10.10.2011
- Bundesministerium für Ernährung Landwirtschaft und Verbraucherschutz, 2010. Impfung gegen das Virus der Blauzungenkrankheit Serotyp 8 (BTV-8). von <http://www.bmelv.de/SharedDocs/Standardartikel/Landwirtschaft/Tier/Tiergesundheit/Blauzungenkrankheit/Blauzungenkrankheit-Impfung.html> abgerufen am 12.09.2011
- Caracappa, S., Torina, A., Guercio, A., Vitale, F., Calabro, A., Purpari, G., Ferrantelli, V., Vitale, M., Mellor, P. S., 2003. Identification of a novel bluetongue virus vector species of *Culicoides* in Sicily. *Veterinary Record* 153, 71-74
- Carpenter, S., Lunt, H. L., Arav, D., Venter, G. J., Mellor, P. S., 2006. Oral susceptibility to bluetongue virus of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) from the United Kingdom. *Journal of Medical Entomology* 43, 73-78
- Carpenter, S., McArthur, C., Selby, R., Ward, R., Nolan, D. V., Mordue (Luntz), A. J., Dallas, J. F., Tripet, F., Mellor, P. S., 2008. Experimental infection studies of UK *Culicoides* species midges with bluetongue virus serotypes 8 and 9. *Veterinary Record* 163, 589-592
- Carpenter, S., Mellor, P. S., Torr, S., 2007. Bluetongue and midge control. *Veterinary Record* 161, 633
- Carpenter, S., Mordue, A. J., Mordue, W., 2001. Oviposition in *Culicoides impunctatus* under laboratory conditions. *Entomol Exp Appl* 101, 123-129
- Carpenter, S., Wilson, A., Mellor, P. S., 2009. *Culicoides* and the emergence of bluetongue virus in northern Europe. *Trends in Microbiology* 17, 172-178
- Cêtre-Sossah, C., Baldet, T., Delecolle, J. C., Mathieu, B., Perrin, A., Grillet, C., Albina, E., 2004. Molecular detection of *Culicoides* spp. and *Culicoides imicola*, the principal vector of bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) in Africa and Europe. *Veterinary Research* 35, 325-337

- Conraths, F. J., Gethmann, J. M., Staubach, C., Mettenleiter, T. C., Beer, M., Hoffmann, B., 2009. Epidemiology of Bluetongue Virus Serotype 8, Germany. *Emerging Infectious Diseases* 15, 433-435
- Cywinska, A., Hunter, F. F., Hebert, P. D. N., 2006. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. *Medical & Veterinary Entomology* 20, 413-424
- De Deken, G., Madder, M., Deblauwe, I., De Clercq, K., Fassotte, C., Losson, B., Haubruge, E., De Deken, R., 2008. Vector monitoring at Belgian outbreak sites during the bluetongue epidemic of 2006. *Preventive Veterinary Medicine* 87, 64-73
- De Liberato, C., Scavia, G., Lorenzetti, R., Scaramozzino, P., Amaddeo, D., Cardeti, G., Scicluna, M., Ferrari, G., Autorino, G. L., 2005. Identification of *Culicoides obsoletus* (Diptera: Ceratopogonidae) as a vector of bluetongue virus in central Italy. *Veterinary Record* 156, 301-304
- Delécolle, J.-C., 1985. Nouvelle contribution à l'étude systématique et iconographique des espèces du genre *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) du Nord-Est de la France. Université Louis Pasteur, Strasbourg
- Dieffenbach, C. W., Lowe, T. M., Dveksler, G. S., 1993 General concepts for PCR primer design. *Genome Research* 3, 30-37
- Djuricic, B., Nedic, D., Lausevic, D., Pavlovic, M., 2007. The epizootiological occurrence of bluetongue in the central Balkans. *Vet Ital* 40, 105-107
- Dyce, A. L., 1969. The recognition of nulliparous and parous *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) without dissection. *Journal of the Australian Entomological Society* 8, 11-15
- Eichler, W., 1980, Die Stechnitzengattung *Culicoides* als Vertreter der Ceratopogoniden. aus: Eichler, W. (Herausg.), *Grundzüge der veterinärmedizinischen Entomologie*. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena. 40-43
- Enserink, M., 2006. During a hot summer, bluetongue virus invades Northern Europe. *Science* 313, 1218-1219

- Enserink, M., 2008. Exotic disease of farm animals tests Europe's responses. *Science* 319, 710-711
- Erasmus, B. J., 1990, Bluetongue virus. aus: Dinter, Z. u. Morein, B. (Herausg.), *Virus infections of ruminants*. Elsevier, Amsterdam. 227–237
- Eschbaumer, M., Hoffmann, B., Moss, A., Savini, G., Leone, A., König, P., Zemke, J., Conraths, F., Beer, M., 2010. Emergence of bluetongue virus serotype 6 in Europe—German field data and experimental infection of cattle. *Veterinary Microbiology* 143, 189-195
- European Food Safety Authority, 2008. Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare on a request from the European Commission (DG SANCO) on Bluetongue. *The EFSA Journal*, 1-69
- Fahrner, J., Barthelmess, C., 1988. Rearing of *Culicoides nubeculosus* (Diptera: Ceratopogonidae) by natural or artificial feeding in the laboratory. *Veterinary Parasitology* 28, 307-313
- Fassotte, C., Delécolle, J. C., Cors, R., Defrance, T., De Deken, R., Haubruge, E., Losson, B., 2008. *Culicoides* trapping with Rothamsted suction traps before and during the bluetongue epidemic of 2006 in Belgium. *Preventive Veterinary Medicine* 87, 74-83
- Fauna Europaea, 2010. Fauna Europaea Web Service version 2.3. von <http://www.faunaeur.org> abgerufen am 31.01.2010
- Flytree, 2008. World Catalogue of extant and fossil species. von <http://www.inhs.uiuc.edu/research/FLYTREE/WorldCatalogtaxa.pdf> abgerufen am 31.03.2009
- Friedrich-Loeffler-Institut, 2008. Blauzungenkrankheit in Deutschland. von [http://www.fli.bund.de/253.html?&no\\_cache=1&tx\\_ttnews\[tt\\_news\]=297&cHash=0111265f06](http://www.fli.bund.de/253.html?&no_cache=1&tx_ttnews[tt_news]=297&cHash=0111265f06) abgerufen am 23.06.2009
- Friedrich-Loeffler-Institut, 2011a. Blauzungenkrankheit in Deutschland - Aktueller Stand: Mai 2011. von [http://www.fli.bund.de/no\\_cache/de/startseite/aktuelles/tierseuchengeschehen/blauzungenkrankheit.html](http://www.fli.bund.de/no_cache/de/startseite/aktuelles/tierseuchengeschehen/blauzungenkrankheit.html) abgerufen am 10.10.2011

Friedrich-Loeffler-Institut, 2011b. Hinweis auf neues Virus bei Rindern in Deutschland (Pressemitteilung vom 21.11.2011). von <http://www.fli.bund.de/de/startseite/presse/presse-informationsseite/Pressemitteilung/hinweis-auf-neues-virus-bei-rindern-in-deutschland.html> abgerufen am 03.02.2012

Friedrich-Loeffler-Institut, 2011c. Stellungnahme des Friedrich-Löffler-Instituts zur Impfung gegen das Virus der Blauzungenkrankheit in Deutschland (Stand: Mai 2011). von [http://www.fli.bund.de/253.html?&no\\_cache=1&tx\\_ttnews\[tt\\_news\]=297&cHash=0111265f06](http://www.fli.bund.de/253.html?&no_cache=1&tx_ttnews[tt_news]=297&cHash=0111265f06) abgerufen am 12.09.2011

Friedrich-Loeffler-Institut, 2012a. Informationen des Friedrich-Loepler-Instituts zum "Schmallenberg-Virus". von [http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam\\_uploads/tierseuchen/Schmallenberg\\_Virus/Schmallenberg-Virus-Factsheet-20120131.pdf](http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/tierseuchen/Schmallenberg_Virus/Schmallenberg-Virus-Factsheet-20120131.pdf) abgerufen am 03.02.2012

Friedrich-Loeffler-Institut, 2012b. Qualitative Risikobewertung zum Risiko des Wiederauftretens der Blauzungenkrankheit in Deutschland, Stand März 2012 von [http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam\\_uploads/tierseuchen/FLI-Risikobewertung\\_BTV201203.pdf](http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/tierseuchen/FLI-Risikobewertung_BTV201203.pdf) abgerufen am 06.05.2012

Gethmann, J. M., Conraths, F. J., Staubach, C., Ziller, M., Fröhlich, A., 2008. Blauzungenkrankheit – Monitoring und Surveillance in Deutschland. Tagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft - Fachgruppe Epidemiologie und Dokumentation, Graz, 1-27

Goetghebuer, M., Lenz, F., 1934, Heleidae (Ceratopogonidae). aus: Lindner, E. (Herausg.), Die Fliegen der palaearktischen Region. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.

Goffredo, M., Meiswinkel, R., 2004. Entomological surveillance of bluetongue in Italy: methods of capture, catch analysis and identification of *Culicoides* biting midges. *Vet Ital* 40, 260-265

Gomulski, L. M., Meiswinkel, R., Delécolle, J.-C., Goffredo, M., Gasperi, G., 2005. Phylogenetic relationships of the subgenus *Avaritia* Fox, 1955 including *Culicoides obsoletus*

(Diptera, Ceratopogonidae) in Italy based on internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences. *Systematic Entomology* 30, 619-631

Gomulski, L. M., Meiswinkel, R., Delécolle, J.-C., Goffredo, M., Gasperi, G., 2006. Phylogeny of the subgenus *Culicoides* and related species in Italy, inferred from internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences. *Medical and Veterinary Entomology* 20, 229-238

Gomulski, M. L., Meiswinkel, R., Delécolle, J.-C., Goffredo, M., Gasperi, G., 2005. Phylogenetic relationships of the subgenus *Avaritia* Fox, 1955 including *Culicoides obsoletus* (Diptera: Ceratopogonidae) in Italy based on internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences. *Syst Entomol* 30, 619-631

Hafner-Marx, A., Büttner, M., 2008. Die Blauzungenkrankeheit – eine neue Tierseuche in Mitteleuropa. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 3, 400-404

Havelka, P., 1976. Limnologische und systematische Studien an Ceratopogoniden (Diptera: Nematocera). *Beiträge für Entomologie* 26, 211 - 305

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., De Waard, J. R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 270, 313-321

Hecker, K. H., Roux, K. H., 1996. High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. *Biotechniques* 20, 478-485

Hillebrandt, M., Kuss, H.-J., Kromidas, S., 2008. Die Dekonvolution als Methode zur Quantifizierung überlagerter chromatographischer Peaks. von <http://www.kromidas.de/Uploads/Dokumente/Dekonvolution.pdf> abgerufen am 20.05.2012

Hoffmann, B., 2007. Untersuchungen zu den Nukleinsäure-konservierenden Eigenschaften von vergälltem 70%igem Ethanol. 3. Projektmeeting der Arbeitsgruppen des Entomologischen Monitorings, Insel Riems, Greifswald, Brandenburg

Hoffmann B., Bauer B., Bauer C., Bätza H.-J., Beer M., Clausen P.-H., Geier M., Gethmann J. M., Kiel E., Liebisch G., Liebisch A., Mehlhorn H., Schaub G. A., Werner D., J., C. F.,



2009. Monitoring of Putative Vectors of Bluetongue Virus Serotype 8, Germany. *Emerging Infectious Diseases* 15 (9), 1481-1484

Humphrey, J., Turner, E. C., 1973. Blood-feeding activity of female *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *Journal of Medical Entomology* 10, 79-83

Iglisch, I., 1977. "Hausmücken" (*Culex-pipens*-Gruppe) als möglicher Überträger des Serumhepatitis-Virus: Untersuchungen zur Genitalmorphologie. *Zeitschrift für angewandte Zoologie* 64, 257-290

Innis, M. A., Gelfand, D. H., 1990, Optimization of PCRs. aus: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. u. White, T. J. (Herausg.), *PCR Protocols: A guide to methods and application*. Academic Press Inc., 1-12

International Society for Infectious Diseases, 2007a. Newsletter: Bluetongue - Europe (60): France, BT-1, OIE. von

[http://promedmail.org/pls/apex/f?p=2400:1202:3463644998602344::NO::F2400\\_P1202\\_CHECK\\_DISPLAY,F2400\\_P1202\\_PUB\\_MAIL\\_ID:X,40186](http://promedmail.org/pls/apex/f?p=2400:1202:3463644998602344::NO::F2400_P1202_CHECK_DISPLAY,F2400_P1202_PUB_MAIL_ID:X,40186) abgerufen am 10.10.2010

International Society for Infectious Diseases, 2007b. Newsletter: Bluetongue - Portugal (Beja): BTV-1, OIE. von

[http://promedmail.org/pls/apex/f?p=2400:1202:3463644998602344::NO::F2400\\_P1202\\_CHECK\\_DISPLAY,F2400\\_P1202\\_PUB\\_MAIL\\_ID:X,39518](http://promedmail.org/pls/apex/f?p=2400:1202:3463644998602344::NO::F2400_P1202_CHECK_DISPLAY,F2400_P1202_PUB_MAIL_ID:X,39518) abgerufen am 10.10.2010

International Society for Infectious Diseases, 2007c. Newsletter: Bluetongue, ovine - Spain (Andalusia): BTV-1, OIE. von

[http://promedmail.org/pls/apex/f?p=2400:1202:3463644998602344::NO::F2400\\_P1202\\_CHECK\\_DISPLAY,F2400\\_P1202\\_PUB\\_MAIL\\_ID:X,39026](http://promedmail.org/pls/apex/f?p=2400:1202:3463644998602344::NO::F2400_P1202_CHECK_DISPLAY,F2400_P1202_PUB_MAIL_ID:X,39026) abgerufen am 10.10.2010

International Society for Infectious Diseases, 2008a. Newsletter: Bluetongue - Europe (61): Netherlands, new strain suspected, request for information. von

[http://promedmail.org/pls/apex/f?p=2400:1202:3463644998602344::NO::F2400\\_P1202\\_CHECK\\_DISPLAY,F2400\\_P1202\\_PUB\\_MAIL\\_ID:X,74505](http://promedmail.org/pls/apex/f?p=2400:1202:3463644998602344::NO::F2400_P1202_CHECK_DISPLAY,F2400_P1202_PUB_MAIL_ID:X,74505) abgerufen am 10.10.2010

International Society for Infectious Diseases, 2008b. Newsletter: Bluetongue - Europe (64): Netherlands, BTV-6. von

[http://promedmail.org/pls/apex/f?p=2400:1202:3463644998602344::NO::F2400\\_P1202\\_CHECK\\_DISPLAY,F2400\\_P1202\\_PUB\\_MAIL\\_ID:X,74505](http://promedmail.org/pls/apex/f?p=2400:1202:3463644998602344::NO::F2400_P1202_CHECK_DISPLAY,F2400_P1202_PUB_MAIL_ID:X,74505) abgerufen am 10.10.2010

International Society for Infectious Diseases, 2008c. Newsletter: Bluetongue - Europe (68): BTV-8, BTV-1, France, Update. von

[http://promedmail.org/pls/apex/f?p=2400:1202:3463644998602344::NO::F2400\\_P1202\\_CHECK\\_DISPLAY,F2400\\_P1202\\_PUB\\_MAIL\\_ID:X,39518](http://promedmail.org/pls/apex/f?p=2400:1202:3463644998602344::NO::F2400_P1202_CHECK_DISPLAY,F2400_P1202_PUB_MAIL_ID:X,39518) abgerufen am 10.10.2010

International Society for Infectious Diseases, 2009. Newsletter: Bluetongue - Europe (03): Belgium, BTV-11. von

[http://promedmail.org/pls/apex/f?p=2400:1202:3463644998602344::NO::F2400\\_P1202\\_CHECK\\_DISPLAY,F2400\\_P1202\\_PUB\\_MAIL\\_ID:X,75993](http://promedmail.org/pls/apex/f?p=2400:1202:3463644998602344::NO::F2400_P1202_CHECK_DISPLAY,F2400_P1202_PUB_MAIL_ID:X,75993) abgerufen am 10.10.2010

International Society for Infectious Diseases, 2010a. Newsletter: Bluetongue - Europe (03): Spain (Andalusia), BTV-4, OIE. von

[http://www.promedmail.org/pls/apex/f?p=2400:1202:2125664506031614::NO::F2400\\_P1202\\_CHECK\\_DISPLAY,F2400\\_P1202\\_PUB\\_MAIL\\_ID:X,85186](http://www.promedmail.org/pls/apex/f?p=2400:1202:2125664506031614::NO::F2400_P1202_CHECK_DISPLAY,F2400_P1202_PUB_MAIL_ID:X,85186) abgerufen am 06.10.2010

International Society for Infectious Diseases, 2010b. Newsletter: Bluetongue - Europe (04): Spain, Serotypes 1, 4. von

[http://www.promedmail.org/pls/apex/f?p=2400:1202:2125664506031614::NO::F2400\\_P1202\\_CHECK\\_DISPLAY,F2400\\_P1202\\_PUB\\_MAIL\\_ID:X,85343](http://www.promedmail.org/pls/apex/f?p=2400:1202:2125664506031614::NO::F2400_P1202_CHECK_DISPLAY,F2400_P1202_PUB_MAIL_ID:X,85343) abgerufen am 16.10.2010

International Society for Infectious Diseases, 2010c. Newsletter: Bluetongue - Europe (05): Declining. von

[http://www.promedmail.org/pls/apex/f?p=2400:1202:2125664506031614::NO::F2400\\_P1202\\_CHECK\\_DISPLAY,F2400\\_P1202\\_PUB\\_MAIL\\_ID:X,85638](http://www.promedmail.org/pls/apex/f?p=2400:1202:2125664506031614::NO::F2400_P1202_CHECK_DISPLAY,F2400_P1202_PUB_MAIL_ID:X,85638) abgerufen am 03.11.2010

International Society for Infectious Diseases, 2010d. Newsletter: Bluetongue - Europe (06): Spain (Andalusia) Serotype 8, suspected, request for information. von

[http://www.promedmail.org/pls/apex/f?p=2400:1202:2125664506031614::NO::F2400\\_P1202\\_CHECK\\_DISPLAY,F2400\\_P1202\\_PUB\\_MAIL\\_ID:X,86006](http://www.promedmail.org/pls/apex/f?p=2400:1202:2125664506031614::NO::F2400_P1202_CHECK_DISPLAY,F2400_P1202_PUB_MAIL_ID:X,86006) abgerufen am 26.11.2010

International Society for Infectious Diseases, 2010e. Newsletter: Bluetongue - Greece, Cyprus: OIE, BTV-16, request for Information. von

[http://www.promedmail.org/pls/apex/f?p=2400:1202:2125664506031614::NO::F2400\\_P1202\\_CHECK\\_DISPLAY,F2400\\_P1202\\_PUB\\_MAIL\\_ID:X,86382](http://www.promedmail.org/pls/apex/f?p=2400:1202:2125664506031614::NO::F2400_P1202_CHECK_DISPLAY,F2400_P1202_PUB_MAIL_ID:X,86382) abgerufen am 27.12.2010

International Society for Infectious Diseases, 2010f. Newsletter: Bluetongue, Ovine - Turkey: (Antalya), OIE. von

[http://www.promedmail.org/pls/apex/f?p=2400:1202:2125664506031614::NO::F2400\\_P1202\\_CHECK\\_DISPLAY,F2400\\_P1202\\_PUB\\_MAIL\\_ID:X,85370](http://www.promedmail.org/pls/apex/f?p=2400:1202:2125664506031614::NO::F2400_P1202_CHECK_DISPLAY,F2400_P1202_PUB_MAIL_ID:X,85370) abgerufen am 18.10.2010

Jennings, D. M., Mellor, P. S., 1988. The vector potential of British *Culicoides* species for bluetongue virus. *Veterinary Microbiology* 17, 1-10

Jones, R. H., 1978, *Culicoides* and *Leptoconops* (family Ceratopogonidae). aus: Bram, R. A. (Herausg.), Surveillance and collection of arthropods of veterinary importance. Animal and Plant Health Inspection Service in cooperation with Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, 31-34

Kampen, H., Kiel, E., 2006. Die Ceratopogoniden Deutschlands aus (veterinär) medizinisch-entomologischer Sicht, mit besonderer Berücksichtigung ihrer Rolle als Überträger des Blauzungenvirus. *Nutztier aktuell* 19, 48-56

Kettle, D. S., 1977. Biology and bionomics of bloodsucking ceratopogonids. *Annual Review of Entomology* 22, 33-51

Kettle, D. S., 1984, Ceratopogonidae (Biting Midges). aus: Kettle (Herausg.), *Medical and Veterinary Entomology*. Croom Helm, London. 137-155

Kettle, D. S., Lawson, J. W. H., 1952. The early stages of British biting midges *Culicoides latreille* and allied genera. *Bulletin of Entomological Research* 43, 421-467

Kiehl, E., Walldorf, V., Klimpel, S., Al-Quraishy, S., Mehlhorn, H., 2009. The European vectors of Bluetongue virus: are there species complexes, single species or races in *Culicoides obsoletus* and *C. pulicaris* detectable by sequencing ITS-1, ITS-2 and 18S-rDNA? *Parasitology Research* 105, 331-336

Koch, H. G., Axtell, R. C., 1979. Attraction of *Culicoides furens* and *Culicoides hollensis* (Diptera: Ceratopogonidae) to animal hosts in a salt-marsh habitat. *Journal of Medical Entomology* 15, 494-499

Kommission der europäischen Gemeinschaften, 2007. Verordnung (EG) Nr. 1266/2007 der Kommission vom 26. Oktober 2007 mit Durchführungsvorschriften zur Richtlinie 2000/75/EG des Rates hinsichtlich der Bekämpfung, Überwachung und Beobachtung der Blauzungenkrankheit sowie der Beschränkungen, die für Verbringungen bestimmter Tiere von für die Blauzungenkrankheit empfänglichen Arten gelten. von <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32007R1266:DE:HTML> abgerufen am 06.05.2012

Koslowsky, S., 2002. Bluetongue Disease in Deutschland? Risikoabschätzung mit Hilfe eines Geographischen Informationssystems (GIS). Freien Universität Berlin, Berlin

Kumar, N. P., Rajavel, A. R., Natarajan, R., Jambulingam, P., 2007. DNA barcodes can distinguish species of Indian mosquitos (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 44, 1-7

Leo, N. P., Barker, S. C., 2002. Intragenomic variation in ITS2 rDNA in the louse of humans, *Pediculus humanus*: ITS2 is not a suitable marker for population studies in this species. *Insect Molecular Biology* 11, 651-657

Li, G. Q., Hu, Y. L., Kanu, S., Zhu, X. Q., 2003. PCR amplification and sequencing of ITS1 rDNA of *Culicoides arakawae*. *Veterinary Parasitology* 112, 101-108

Liebisch, A., Liebisch, G., 2007. Biologie und Bekämpfung von *Culicoides*-Mücken als Vektor der Bluetongue bei Rindern in Deutschland. *Praktischer Tierarzt* 88, 440-444

Liebisch, A., Liebisch, G., Heine, S., Thienel, S., Hinrichs, P., 2008. Wirksamkeit von Auriplak Ohrclips (Permethrin) gegen Gnitzen (*Culicoides*) als Überträger des Bluetongue Virus bei Rindern. *Praktischer Tierarzt* 89, 128-141

Linton, Y. M., Mordue (Luntz), A. J., Cruickshank, R. H., Meiswinkel, R., Mellor, P. S., Dallas, J. F., 2002. Phylogenetic analysis of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene of five species of the *Culicoides imicola* species complex. *Medical & Veterinary Entomology* 16, 139-146.

Madder, A., De Deken, R., De Deken, G., Fassotte, C., Cors, R., Defrance, T., Cavelier, M., Losson, B., Haubruge, E., Bortels, J., Francis, F., Besch, A., 2006. Entomological monitoring of *Culicoides* species in Belgium and the Grand Duchy of Luxemburg (Report). 1-17

- Mands, V., Kline, D. L., Blackwell, A., 2004. *Culicoides* midge trap enhancement with animal odour baits in Scotland. *Medical & Veterinary Entomology* 18, 336-342
- Mathieu, B., Perrin, A., Baldet, T., Delécolle, J.-C., Albina, E., Cetré-Sossah, C., 2007. Molecular identification of Western European species of *Obsoletus* Complex (Diptera: Ceratopogonidae) by an internal transcribed spacer-1 rDNA multiplex polymerase chain reaction assay. *Journal of Medical Entomology* 44, 1019-1025
- Mehlhorn, H., Schmahl, G., D'Haese, J., Schumacher, B., 2008a. Butox® 7.5 pour on: a deltamethrin treatment of sheep and cattle: pilot study of killing effects on *Culicoides* species (Ceratopogonidae). *Parasitology Research* 102, 515-518
- Mehlhorn, H., Schmahl, G., Schumacher, B., D'Haese, J., Walldorf, V., Klimpel, S., 2008b. Effects of Bayofly™ on specimens of *Culicoides* species when incubated in hair taken from the feet of previously treated cattle and sheep. *Parasitology Research* 102, 519-522
- Mehlhorn, H., Walldorf, V., Klimpel, S., Jahn, B., Jaeger, F., Eschweiler, J., Hoffmann, B., Beer, M., 2007. First occurrence of *Culicoides obsoletus* -transmitted Bluetongue virus epidemic in Central Europe. *Parasitology Research* 101, 219-228
- Mehlhorn, H., Walldorf, V., Klimpel, S., Schaub, G., Kiel, E., Focke, R., Liebisch, G., Liebisch, A., Werner, D., Bauer, C., Clausen, H., Bauer, B., Geier, M., Hörbrand, T., Bätza, H.-J., Conraths, F., Hoffmann, B., Beer, M., 2009. Bluetongue disease in Germany (2007–2008): monitoring of entomological aspects. *Parasitology Research* 105, 313-319
- Mehlhorn, H., Walldorf, V., Klimpel, S., Schmahl, G., 2008c. Outbreak of bluetongue disease (BTD) in Germany and the danger for Europe. *Parasitology Research* 103, 79-86
- Meiswinkel, R., Goffredo, M., Leijds, P., Conte, A., 2008. The *Culicoides* 'snapshot': A novel approach used to assess vector densities widely and rapidly during the 2006 outbreak of bluetongue (BT) in The Netherlands. *Preventive Veterinary Medicine* 87, 98-118
- Meiswinkel, R., van Rijn, P., Leijds, P., Goffredo, M., 2007. Potential new *Culicoides* vector of bluetongue virus in northern Europe. *Veterinary Record* 161, 564-565
- Mellor, P. S., 1990. The replication of bluetongue virus in *Culicoides* vectors. *Curr Top Microbiol Immunol* 162, 143-161

- Mellor, P. S., 2000. Replication of Arboviruses in Insect Vectors. *Journal of Comparative Pathology* 123, 231-247
- Mellor, P. S., Boorman, I., Baylis, M., 2000. *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annual Review of Entomology* 45, 307-340
- Mellor, P. S., Boorman, J., 1995. The transmission and geographical spread of African horse sickness and bluetongue viruses. *Annals of Tropical Veterinary Medicine and Parasitology* 89, 1-15
- Mellor, P. S., Pitzolis, G., 1979. Observations on breeding sites and light-trap collections of *Culicoides* during an outbreak of bluetongue in Cyprus. *Bulletin of Entomological Research* 69, 229-234
- Mellor, P. S., Wittmann, E. J., 2002. Bluetongue virus in the Mediterranean Basin 1998 - 2001. *Veterinary Journal* 164, 20-37
- Melzak, K. A., Sherwood, C. S., Turner, R. F. B., Haynes, C. A., 1996. Driving Forces for DNA Adsorption to Silica in Perchlorate Solutions. *J Colloid Interface Sci* 181, 635-644
- Mordue, A. J., Dallas, J. F., Nolan, D. V., Logan, J. G., 2007, Novel methods for the identification and control of *Culicoides* midges as vectors of emerging diseases. aus: Takken, W. u. Knols, B. J. (Herausg.), *Ecology and Control of Vectors of Infectious Diseases Vol 1: Emerging pests and vector-borne diseases in Europe* Wageningen Academic Publishers, Wageningen. 307-325
- Mülhardt, C., 2006, *Der Experimentator - Molekularbiologie/Genomics*. Elsevier - Spektrum Akademischer Verlag, München, 1-298
- Napp, S., Gubbins, S., Calistri, P., Allepuz, A., Alba, A., Garcia-Bocanegra, I., Giovannini, A., Casal, J., 2011. Quantitative assessment of the probability of bluetongue virus overwintering by horizontal transmission: application to Germany. *Veterinary Research* 42, 1-10
- Nguyen, T. H., Chen, K. L., Elimelech, M., 2010. Adsorption Kinetics and Reversibility of Linear Plasmid DNA on Silica Surfaces: Influence of Alkaline Earth and Transition Metal Ions. *Biomacromolecules* 11, 1225-1230

- Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2011. Blauzungenkrankheit - Stand: 14.09.2011. von [http://www.tierseucheninfo.niedersachsen.de/portal/live.php?navigation\\_id=7700&article\\_id=21712&\\_psmand=24#top](http://www.tierseucheninfo.niedersachsen.de/portal/live.php?navigation_id=7700&article_id=21712&_psmand=24#top) abgerufen am 10.10.2011
- Nielsen, B. O., 1971. Some observations on biting midges attacking grazing cattle in Denmark. *Entomology of Scandinavia* 2, 95-98
- Nolan, D. V., Carpenter, S., Barber, J., Mellor, P. S., Dallas, J. F., Mordue, A. J., Pierrney, S. B., 2007. Rapid diagnostic PCR assays for members of the *Culicoides obsoletus* and *Culicoides pulicaris* species complexes, implicated vectors of bluetongue virus in Europe. *Veterinary Microbiology* 124, 82-94
- Nolan, D. V., Dallas, J. F., Mordue (Luntz), A. J., 2004. Molecular taxonomy and population structure of a *Culicoides* midge vector. *Vet Ital* 40, 352-359
- Office Internationale des Epizooties / World Organisation for Animal Health, 2010. Listed Animal Diseases. von [http://www.oie.int/eng/maladies/en\\_classification.htm#ListeOIE](http://www.oie.int/eng/maladies/en_classification.htm#ListeOIE) abgerufen am 21.01.2010
- Olbrich, S., 1987. Untersuchungen zur Biologie von Gnitzen der Gattung *Culicoides Latreille* (Diptera: Ceratopogonidae) an Weidetieren in Norddeutschland. Ergebnisse aus dem Freiland und dem Laboratorium. Tierärztliche Hochschule Hannover
- Ortega, M. D., Mellor, P. S., Rawlings, P., Pro, M. J., 1998. The seasonal and geographical distribution of *Culicoides imicola*, *C. pulicaris* group and *C. obsoletus* biting midges in central and southern Spain. *Archives of Virology* 14 (Suppl.), 85-91
- Oura, C., 2011. Bluetongue: new insights and lessons learnt. *Veterinary Record* 168, 375-376
- Pàges, N., Sarto I. Monteys, V., 2005. Differentiation of *Culicoides obsoletus* and *Culicoides scoticus* (Diptera: Ceratopogonidae) based on mitochondrial cytochrome oxidase subunit I. *Journal of Medical Entomology* 42, 1026-1034
- Paredes-Esquivel, C., Del Río, R., Miranda, M. A., Garros, C., 2009a. Standardization of DNA barcoding techniques to identify *Culicoides* species in Europe. von

[http://medreonet.cirad.fr/content/download/1121/5729/file/01\\_Paredes\\_esquivelbarcoding.pdf](http://medreonet.cirad.fr/content/download/1121/5729/file/01_Paredes_esquivelbarcoding.pdf)  
abgerufen am 20.05.2012

Paredes-Esquivel, C., Garros, C., Cêtre-Sossah, C., Miranda, M. A., Del Río, R., 2009b. Standardization of DNA Barcoding Techniques to Identify *Culicoides* Species in Europe. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux* 62, 131

Perrin, A., Cetre-Sossah, C., Mathieu, B., Baldet, T., Delecolle, J. C., Albina, E., 2006. Phylogenetic analysis of *Culicoides* species from France based on nuclear ITS1-rDNA sequences. *Medical & Veterinary Entomology* 20, 219-228

Purse, B. V., Mellor, P. S., Rogers, D. J., Samuel, A. R., Mertens, P. P. C., Baylis, M., 2005. Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nat Rev Micro* 3, 171-181

Racloz, V., Griot, C., Stärk, K. D. C., 2006. Sentinel surveillance systems with special focus on vector-borne diseases. *Animal Health Research Reviews* 7, 71-79

Rat der Europäischen Union, 2000. Richtlinie 2000/75/EG des Rates vom 20. November 2000 mit besonderen Bestimmungen für Maßnahmen zur Bekämpfung und Tilgung der Blauzungenkrankheit. von <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2000:327:0074:0083:DE:PDF> abgerufen am 06.05.2012

Ritchie, A., Blackwell, A., Malloch, G., Fenton, B., 2004. Heterogeneity of ITS1 sequences in the biting midge *Culicoides impunctatus* (Goetghebuer) suggests a population in Argyll, Scotland, may be genetically distinct. *Genome* 47, 546-558

Roger, P., Clayton, N., Hateley, G., 2010. Continuing risk of bluetongue. *Veterinary Record* 166, 570

Saegerman, C., Berkvens, D., Mellor, P. S., 2008. Bluetongue epidemiology in the European Union *Emerging Infectious Diseases* 14, 539-544

Sanger, F., Coulson, A. R., 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology* 94, 441-446



- Sarto i Monteys, V., Saiz-Ardanaz, M., 2003. *Culicoides* midges in Catalonia (Spain), with special reference to likely bluetongue virus vectors. *Medical & Veterinary Entomology* 17, 288-293
- Savini, G., Goffredo, M., Monaco, F., De Santis, P., Meiswinkel, R., 2003. Transmission of bluetongue virus in Italy. *Veterinary Record* 152, 119
- Schmidtman, E. T., Abend, J. F., Valla, M. E., 1980. Nocturnal blood-feeding from pastured calves by the Ceratopogonid midge, *Culicoides venustus*, in New York State. *Mosquito News* 40, 571-577
- Sebastiani, F., Meiswinkel, R., Gomulski, M. L., Guglielmino, C. R., Mellor, P. S., Malacrida, A. R., Gasperi, G., 2001. Molecular differentiation of the Old World *Culicoides imicola* species complex (Diptera: Ceratopogonidae), inferred using random amplified polymorphic DNA markers. *Molecular Ecology* 10, 1773-1786
- Sehnal, P., Schweiger, S., Schindler, M., Anderle, F., Schneemann, Y., 2008. Bluetongue: Vector surveillance in Austria in 2007. *Wiener Klinische Wochenschrift* 120, 34-39
- Skevington, J. H., Kehlmaier, C., Stahls, G., 2007. DNA barcoding: mixed results for big-headed flies (Diptera: Pipunculidae). *Zootaxa* 1423, 1-26
- Takamatsu, H., Mellor, P. S., Mertens, P. P. C., Kirkham, P. A., Burroughs, J. N., Parkhouse, R. M. E., 2003. A possible overwintering mechanism for bluetongue virus in the absence of the insect vector. *Journal of General Virology* 84, 227-235
- Tang, J., Toè, L., Back, C., Unnasch, T. R., 1996. Intra-specific heterogeneity of the rDNA internal transcribed spacer in the *Simulium damnosum* (Diptera: Simuliidae) complex. *Molecular Biology and Evolution* 13, 244-252
- Tautz, D., Arctander, P., Minelli, A., Thomas, R. H., Vogler, A. P., 2003. A plea for DNA taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution* 18, 70-74
- van Rijn, P. A., Geurts, Y., van der Spek, A. N., Veldman, D., Gennip, R. G. P. v., 2012. Bluetongue virus serotype 6 in Europe in 2008—Emergence and disappearance of an unexpected non-virulent BTV. *Veterinary Microbiology* 158, 23-32

- Venter, G. J., Labuschagne, K., Hermanides, K. G., Boikanyo, S. N. B., Majatladi, D. M., Morey, L., 2009. Comparison of the efficiency of five suction light traps under field conditions in South Africa for the collection of *Culicoides* species. *Veterinary Parasitology* 166, 299-307
- Vogelstein, B., Gillespie, D., 1979 Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci* 76 (2), 615–619
- Walker, A. R., 1977. Seasonal fluctuations of *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae) in Kenya. *Bulletin of Entomological Research* 67, 217-233
- Wenk, C. E., Kaufmann, C., Schaffner, F., Mathis, A., 2012. Molecular characterization of Swiss Ceratopogonidae (Diptera) and evaluation of real-time PCR assays for the identification of *Culicoides* biting midges. *Veterinary Parasitology* 184, 258-266
- Werner, D., Kampen, H., 2007. Gnitzen (Diptera: Ceratopogonidae). Informationsschrift zur Morphologie, Lebensweise und Verbreitung der Mücken sowie zum Schadbild und zur Epidemiologie der Blauzungenkrankheit in Deutschland. *Studia dipterologica* 14, 231-257
- White, D. M., Wilson, W. C., Blair, C. D., Beaty, B. J., 2005. Studies on overwintering of bluetongue viruses in insects. *Journal of General Virology* 86, 453-462
- Wilson, A., Carpenter, S., Gloster, J., Mellor, P., 2007. Re-emergence of bluetongue in northern Europe in 2007. *Veterinary Record* 161, 487-489
- Wilson, A., Mellor, P., 2008. Bluetongue in Europe: vectors, epidemiology and climate change. *Parasitology Research*, 69-77
- Wilson, A. J., Mellor, P. S., 2009. Bluetongue in Europe: past, present and future. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364, 2669-2681
- Wirth, W. W., Marston, N., 1968. A method for mounting small insects on microscope slides in Canada Balsam. *Annals of the Entomological Society of America* 61, 783-784
- Wittmann, E. J., Baylis, M., 2000. Review: Climate change: Effects on *Culicoides*-transmitted viruses and implications for the UK. *Veterinary Journal* 160, 107-117

Wittmann, E. J., Mellor, P. S., Baylis, M., 2002. Effect of temperature on the transmission of orbiviruses by the biting midge, *Culicoides sonorensis*. *Veterinary Journal* 16, 147-156

Zimmer, J.-Y., Haubruge, E., Francis, F., Bortels, J., Simonon, G., Losson, B., Mignon, B., Paternostre, J., De Deken, R., De Deken, G., Deblauwe, I., Fassotte, C., Cors, R., Defrance, T., 2008. Breeding sites of bluetongue vectors in northern Europe. *Veterinary Record*, 131

## 9. Anhang

### 9.1. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1* Schematische Zeichnung der Flügeläderung und –zellen eines *Culicoides*-Flügels modifiziert nach Goffredo (2004) und Werner u. Kampen (2007). Morphologisch und artspezifisch bedeutsam sind die Radialzellen (r1, r2), die Querader (r-m), sowie die Aufgabelung der Medialader (M). Für die Speziesdifferenzierung von Bedeutung ist die Ausprägung von Merkmalen im Bereich der Radialzellen, als auch auf den Flügelzellen (r5, m1, m2, Anal- und Cubitalzelle) gebildet von den Medialadern und Cubitaladern (CuA1, CuA2). ..... 26
- Abb. 2* Übersicht über die geographische Lage der 89 Fallenstandorte des Entomologischen Monitorings zur *Culicoides*-Fauna in Deutschland (Punkte) im Untersuchungszeitraum März 2007 – Mai 2008, die innerhalb oder nahe der BTD-Restriktionszone (dunkelgraue Linie) installiert wurden. (Hoffmann B. *et al.*, 2009) ..... 34
- Abb. 3* Kartenausschnitt zur Übersicht über die 15 durch die Arbeitsgruppe Berlin (Punkte, Nummerierung siehe Tab. 1) im Rahmen des Entomologischen Monitorings über das Vorkommen von Gnitzen in Deutschland betreuten Fallenstandorte, März 2007 - Mai 2008. .... 35
- Abb. 4* Schematische Darstellung der BG-Sentinel UV-Licht Falle (BioGents<sup>®</sup>, Regensburg). ..... 37
- Abb. 5* Beispiel einer installierten BG-Sentinel UV-Licht Falle (BioGents<sup>®</sup>, Regensburg) am Standort Nr. 15 (MV LWL, Niendorf/Ludwigslust), 2007/2008. .... 38
- Abb. 6* Weibliche Gnitzen der *Obsoletus*-Gruppe in verschiedenen Stadien vor und nach der Blutaufnahme. a, ungesogen; b, voll gesogen; c, nur noch Reste verdauten Blutes im Abdomen vorhanden (Bartsch *et al.*, 2009). .... 41
- Abb. 7* Schematische Zeichnungen der Merkmale von *Culicoides obsoletus*. a, Flügel mit komplexspezifischer Zeichnung; b, Palpe mit in einer einzelnen, relativ breiten Grube angeordneten keulenförmigen sensorischen Organen (\*); c, Zwischenaugenbereich mit sich berührenden Augenfeldern; d, Fortpflanzungsorgane ♀ mit einer rudimentären und

- zwei funktionellen Spermatheken, e, Fortpflanzungsorgane ♂ mit Aedeagus (lat. Sperma-übertragendes Organ; abgesetzt, rechts), Apodemen (sklerotisierte Einfaltungen und Ansatzpunkte für Muskulatur; ↑) und artspezifischen Vorwölbungen (\*) des neunten abdominalen Segments. (Delécolle, 1985)..... 46
- Abb. 8* Schematische Zeichnungen der Merkmale von *Culicoides scoticus*. a, Flügel mit komplexspezifischer Zeichnung; b, Palpe mit in einer einzelnen, kleinen Grube angeordneten keulenförmigen sensorischen Organen (\*); c, Zwischenaugenbereich mit sich berührenden Augenfeldern; d, Fortpflanzungsorgane ♀ mit einer rudimentären und zwei funktionellen Spermatheken, e, Fortpflanzungsorgane ♂ mit sehr kräftigem Aedeagus (abgesetzt, rechts), Apodemen (↑) und artspezifischem Einschnitt (\*) des neunten abdominalen Segments. (Delécolle, 1985)..... 47
- Abb. 9* Schematische Zeichnungen der Merkmale von *Culicoides chiopterus*. a, Flügel mit komplexspezifischer Zeichnung; b, Palpe mit in einer einzelnen, kleinen Grube angeordneten keulenförmigen sensorischen Organen (\*); c, Zwischenaugenbereich mit sich berührenden Augenfeldern und Augenhaaren (↑); d, Fortpflanzungsorgane ♀ mit einer rudimentären und zwei funktionellen Spermatheken, e, Fortpflanzungsorgane ♂ bestehend aus Aedeagus (abgesetzt, rechts) mit artspezifischem, durchscheinenden „Chitinhäutchen“, Apodemen (↑) und artspezifischer Einbuchtung (\*) des neunten abdominalen Segments. (Delécolle, 1985)..... 48
- Abb. 10* Schematische Zeichnungen der Merkmale von *Culicoides dewulfi*. a, Flügel mit komplexspezifischer Zeichnung; b, Palpe mit in einer einzelnen, kleinen Grube angeordneten keulenförmigen sensorischen Organen (\*); c, Zwischenaugenbereich mit sich berührenden Augenfeldern; d, Fortpflanzungsorgane ♀ mit einer rudimentären und zwei funktionellen Spermatheken (eine größer als die andere), e, Fortpflanzungsorgane ♂ mit Aedeagus (abgesetzt, rechts) mit artspezifischem distalen Steg (\*) und Apodemen (↑). (Delécolle, 1985)..... 49
- Abb. 11* Schematische Zeichnungen der Merkmale von *Culicoides pulicaris*. a, Flügel mit keilförmiger Zeichnung im Bereich der Radialzellen (geschweifte Klammer), Sanduhrförmiger Zeichnung im oberen Bereich des Flügels (\*), dunkel abgesetzte Endungen der gegabelten Medialader (↑); b, Palpe mit in flachen Grübchen angeordneten keulenförmigen sensorischen Organen (\*); c, Zwischenaugenbereich mit sich

berührenden Augenfeldern; d, Fortpflanzungsorgane ♀ mit einer rudimentären und zwei funktionellen Spermatheken, e, Fortpflanzungsorgane ♂ mit Aedeagus (abgesetzt, rechts) und Apodemen (↑). (Delécolle, 1985).....	50
<i>Abb. 12</i> Schematische Zeichnungen der Merkmale von <i>Culicoides punctatus</i> . a, Flügel mit unregelmäßiger Zeichnung im Bereich der Radialzellen, v.a. r2 (geschweifte Klammer), große, unregelmäßige Zeichnung im oberen Bereich des Flügels (*), helle, von dunklen Dreiecken eingefasste Endungen der gegabelten Medialader (↑); b, Palpe mit in flachen Grübchen, gehäuft angeordneten keulenförmigen sensorischen Organen (*); c, Zwischenaugenbereich mit sich kaum berührenden bzw. durch eine Brücke verbundenen Augenfeldern; d, Fortpflanzungsorgane ♀ mit einer rudimentären und zwei funktionellen Spermatheken, e, Fortpflanzungsorgane ♂ mit kräftigem Aedeagus (abgesetzt, rechts) und deutlichen Apodemen (↑). (Delécolle, 1985).....	51
<i>Abb. 13</i> Schematische Darstellung der ribosomalen DNS und der ITS1 Region. ....	52
<i>Abb. 14</i> Trennprofile des 100 bp Markers (Invitrogen, Paisley, UK) und pUC19 / Msp1 Markers (Carl Roth GmbH&Co., Karlsruhe) im Vergleich.....	62
<i>Abb. 15</i> Monatliche Fangzahlen der Standorte 1 – 3 (Entomologisches Monitoring, März/April 2007 – Mai 2008). ....	69
<i>Abb. 16</i> Monatliche Fangzahlen der Standorte 4 – 6 (Entomologisches Monitoring, März/April 2007 – Mai 2008). ....	70
<i>Abb. 17</i> Monatliche Fangzahlen der Standorte 7 – 9 (Entomologisches Monitoring, März/April 2007 – Mai 2008). ....	71
<i>Abb. 18</i> Monatliche Fangzahlen der Standorte 10 – 12 (Entomologisches Monitoring, März/April 2007 – Mai 2008). ....	72
<i>Abb. 19</i> Monatliche Fangzahlen der Standorte 13 – 15 (Entomologisches Monitoring, März/April 2007 – Mai 2008). ....	73
<i>Abb. 20</i> Übersicht über die monatlichen Gesamtfangzahlen aller 15 Standorte des Entomologischen Monitorings (März/April 2007 - Mai 2008) aufgegliedert in <i>Obsoletus</i> -	

- und *Pulicaris*-Gruppe, (oberes Diagramm), sowie deren prozentualer Anteil am Gesamtfang des jeweiligen Monats (unteres Diagramm). ..... 75
- Abb. 21* Übersicht über die Fangzahlen von weiblichen Gnitzen der *Obsoletus*- und *Pulicaris*-Gruppe, in den Wintermonaten Dezember 2007 – April 2008 des Entomologischen Monitorings. .... 76
- Abb. 22* Vergleich der Gesamtfangzahlen der Innen-/Außen-Fallen während des Entomologischen Monitorings über den gesamten Zeitraum März/April 2007 - Mai 2008. .... 76
- Abb. 23* Aufstellung über die Fangzahlen von weiblichen Gnitzen der *Obsoletus*-Gruppe getrennt nach der Fallenposition im Außen- oder Innenbereich der Stallungen (März 2007 – Mai 2008). .... 77
- Abb. 24* Aufstellung über die Fangzahlen von weiblichen Gnitzen der *Pulicaris*-Gruppe getrennt nach der Fallenposition im Außen- oder Innenbereich der Stallungen (März 2007 – Mai 2008). .... 78
- Abb. 25* Darstellung zur Verteilung mit Blut voll gesogener und ungesogener weiblicher *Culicoides*-Gnitzen (*Obsoletus*- und *Pulicaris*-Gruppe) in den Fängen im Rahmen des Entomologischen Monitorings März 2007 – Mai 2008. .... 79
- Abb. 26* Gegenüberstellung der Fangzahlen weiblicher, gesogener bzw. ungesogener Gnitzen der *Obsoletus*- bzw. *Pulicaris*-Gruppe aus den Fallen außerhalb bzw. innerhalb der Stallungen (Entomologisches Monitoring März/April 2007 – Mai 2008). .... 80
- Abb. 27* Beispiel eines Flügelpräparates (*C. punctatus*, ♀). Gut zu erkennen ist die typische, annähernd dreieckige dunkle Zeichnung an den Enden der Flügeladern und der unregelmäßige Fleck im oberen Bereich des Flügels (Vgl. siehe Abb. 22). .... 83
- Abb. 28* Beispiel eines Flügelpräparates (*C. pulicaris*, ♀). Gut zu erkennen ist die sanduhrförmige Zeichnung im oberen Bereich des Flügels sowie die in dunklen Flecken endenden Flügeladern (Vgl. siehe Abb. 21). .... 83
- Abb. 29* Beispiel eines Flügelpräparates (*C. obsoletus*, ♂). Da die Flügelzeichnungen der Flügel aus der *Obsoletus*-Gruppe sehr ähnlich sind (Vgl. siehe Abb. 7-10), wurde das

- Individuum, zu dem dieser Flügel gehörte, vor allem durch Charakterisierung seiner Fortpflanzungsorgane bestimmt..... 84
- Abb. 30* Beispiel eines Präparates der männlichen Fortpflanzungsorgane (*C. dewulfi*). Gut zu erkennen sind der Aedeagus mit artspezifischem distalen Steg (→), sowie die Einbuchtung des neunten abdominalen Segments (\*) (Vgl. siehe Abb. 10)..... 84
- Abb. 31* Beispiel eines Präparates der weiblichen Fortpflanzungsorgane (*C. punctatus*). Gut zu erkennen sind die rudimentäre (→) und die zwei funktionellen Spermatheken (\*)..... 85
- Abb. 32* Beispiel einer erfolgreichen Extraktion und Amplifikation der ITS1 Region (388-401bp) von Gnitzen der *Obsoletus*-Gruppe, amplifiziert mit PanCulF/R und dem Standard PCR-Protokoll angelehnt an Cêtre-Sossah *et al.* (2004). M – 100bp Marker, 1 – Gnitze Nr. 67 *C. obsoletus* s.s. (397 bp), 2 – Gnitze Nr. 68 *C. obsoletus* s.s. (397 bp), 3 – Gnitze Nr. 69 *C. obsoletus* s.s. (397 bp), 4 – Gnitze Nr. 64 *C. scoticus* (401 bp), 5 – Gnitze Nr. 58 *C. scoticus* (401 bp), 6 – Gnitze Nr. 59 *C. dewulfi* (391 bp), 7 – Gnitze Nr. 73 *C. dewulfi* (391 bp), EØ – Extraktion mit Wasser, PØ- Amplifikation mit Wasser. .. 86
- Abb. 33* Beispiel einer Basensequenz nach der Sequenzierung: Ausschnitt der Vorwärts-Basensequenz von Gnitze Nr. 67 *C. obsoletus* s.s. (5'–3'-Richtung) unter Verwendung des Programms BioEdit<sup>®</sup>. A – Adenin; C – Cytosin; G – Guanin; T – Thymin; N – jede Base (A, C, G oder T). Grauer Kasten: Überlagerungen von Basensequenzen. .... 87
- Abb. 34* Ergebnis des Sequenzvergleiches in BLAST<sup>®</sup> zur Basensequenz aus Abb. 34. a – Farbschlüssel zur Bestimmung der Zahl übereinstimmender Basen im Vergleich zur Ausgangssequenz; b – schematische Darstellung der Ausgangssequenz (Basensequenz aus der Sequenzierung von Gnitze Nr. 67); c – GenBank-Sequenz mit der höchsten Übereinstimmung, hier *C. obsoletus* s.s., GenBank Accession Nr. AY 861152; d – Auswahl der ermittelten GenBank-Sequenzen mit absteigender Übereinstimmung. .... 88
- Abb. 35* Ausschnitt zum Alignment von *C. obsoletus* s.s. Basensequenzen mit der GenBank-Sequenz AY861152 *C. obsoletus* s.s. erstellt in GenDoc<sup>®</sup> (abgebildet sind die ersten ca. 120 Basen bezogen auf die GenBank-Sequenz). a – GenBank Sequenz AY861152 *C. obsoletus* s.s.; b – Alignment-Sequenzen der Gnitzen Nr. 67 / 68 / 69, jeweils (F) Vorwärtssequenzen (in 5' – 3' Richtung) und (R) Rückwärtssequenzen (in 3'- 5' Richtung). Schwarz unterlegte Basen stimmen bei allen Sequenzen mit der



- entsprechenden Base der GenBank-Sequenz komplett überein. Grau unterlegte Basen stimmen überwiegend überein (dunkelgrau unterlegte Basen bei sechs der sieben untersuchten Sequenzen, hellgrau unterlegte Basen bei immer noch fünf der untersuchten Sequenzen). Striche bezeichnen jeweils fehlende Basen. .... 89
- Abb. 36* Abbildung der Basensequenz von *C. obsoletus* s.s. (GenBank AY861152) mit den Positionen des speziesspezifischen Vorwärtsprimers CulObsF2 (grau unterlegt) und des gattungsspezifischen Rückwärtsprimers PanCulR (schwarz unterlegt)..... 91
- Abb. 37* Abbildung der Basensequenz von *C. dewulfi* (GenBank DQ408545) mit den Positionen des speziesspezifischen Vorwärtsprimers CulDewF (grau unterlegt) und des gattungsspezifischen Rückwärtsprimers PanCulR (schwarz unterlegt)..... 91
- Abb. 38* Abbildung der Basensequenz von *C. chiopterus* (GenBank DQ408543) mit den Positionen des speziesspezifischen Vorwärtsprimers CulChioF (grau unterlegt) und des gattungsspezifischen Rückwärtsprimers PanCulR (schwarz unterlegt)..... 92
- Abb. 39* Abbildung der Basensequenz von *C. punctatus* (GenBank AY861157) mit den Positionen des speziesspezifischen Vorwärtsprimers CulPulF (grau unterlegt) und des gattungsspezifischen Rückwärtsprimers PanCulR (schwarz unterlegt)..... 92
- Abb. 40* Abbildung der Basensequenz von *C. pulicaris* (GenBank AY861156) mit den Positionen des speziesspezifischen Vorwärtsprimers CulPulF (grau unterlegt) und des gattungsspezifischen Rückwärtsprimers PanCulR (schwarz unterlegt)..... 93
- Abb. 41* Alignment der Basensequenzen der ITS1 Region von *C. chiopterus* (GenBank DQ405843) und *C. scoticus* (GenBank AY861160). Die schwarz unterlegten Punkte verdeutlichen übereinstimmende Basen in beiden Gensequenzen, während grau bzw. weiß unterlegte Bereiche Abweichungen darstellen. .... 94
- Abb. 42* Beispiel einer PCR zur Ermittlung der optimalen MgCl<sub>2</sub>-Konzentration von CulChioF (PanCulF/R-Protokoll mit 61°C Annealing-Temperatur) mit DNS der Gnitze Nr. 118 *C. chiopterus* (spezifisches Produkt mit 293bp). M – pUC19-Marker; 1 – Positiv-Probe (Primerpaar PanCulF/R); 2-5 Primerpaar CulChioF/PanCulR: 2 – 1,5µl MgCl<sub>2</sub>, 3 – 2,0µl MgCl<sub>2</sub>, 4 – 2,5µl MgCl<sub>2</sub>, 5 – 3,0µl MgCl<sub>2</sub>, PØ – Amplifikation mit Wasser. .... 95

- Abb. 43* touchdown- PCR-Ergebnis für CulObsF2 mit dem touchdown-PCR-Protokoll aus Tab. 8. M – pUC19-Marker; 1 – positive Probe (spezifisches Produkt bei 132bp), Gnitze Nr. 52 *C. obsoletus*; 2 – Gnitze Nr. 109 *C. chiopterus*; 3 – Gnitze Nr. 108 *C. dewulfi*; 4 – Gnitze Nr. 113 *C. scoticus*; 5 – Gnitze Nr. 6 *C. punctatus*; PØ – Amplifikation mit Wasser. .... 97
- Abb. 44* touchdown- PCR-Ergebnis für CulDewF mit dem touchdown-PCR-Protokoll aus Tab. 9. M – pUC19-Marker; 1 – positive Probe (spezifisches Produkt bei 295bp), Gnitze Nr. 59 *C. dewulfi*; 2 – Gnitze Nr. 112 *C. chiopterus*; 3 – Gnitze Nr. 50 *C. obsoletus*; 4 – Gnitze Nr. 58 *C. scoticus*; 5 – Gnitze Nr. 122 *C. punctatus*; PØ – Amplifikation mit Wasser. .... 97
- Abb. 45* PCR-Ergebnis für CulChioF mit dem PCR-Protokoll aus Tab. 10. M – 100bp-Marker; 1 – positive Probe (spezifisches Produkt bei 293bp), Gnitze Nr. 112 *C. chiopterus*; 2 – Gnitze Nr. 118 *C. chiopterus*; 3 – Gnitze Nr. 107 *C. dewulfi*; 4 – Gnitze Nr. 51 *C. obsoletus*; 5 – Gnitze Nr. 113 *C. scoticus*; 6 – Gnitze Nr. 6 *C. punctatus*; PØ – Amplifikation mit Wasser. .... 98
- Abb. 46* PCR-Ergebnis für CulPunctF mit dem PCR-Protokoll aus Tab. 11. M – 100bp-Marker; 1 – positive Probe (spezifisches Produkt bei 343bp), Gnitze Nr. 93 *C. punctatus*; 2 – Gnitze Nr. 10 *C. pulicaris*; 3 – Gnitze Nr. 1 *C. riethi*; 4 – Gnitze Nr. 43 *C. nubeculosus*; 5 – Gnitze Nr. 109 *C. dewulfi*; PØ – Amplifikation mit Wasser. .... 99
- Abb. 47* PCR-Ergebnis für CulPulF mit dem PCR-Protokoll aus Tab. 12. M – pUC19-Marker; 1 – positive Probe (spezifisches Produkt bei 288bp), Gnitze Nr. 187 *C. pulicaris*; 2 – Gnitze Nr. 126 *C. punctatus*; 3 – Gnitze Nr. 28 *C. riethi*; 4 – Gnitze Nr. 4 *C. scoticus*; PØ – Amplifikation mit Wasser; \* - unspezifisches Produkt bei ca. 400bp. .... 100
- Abb. 48* PCR-Ergebnis für den Kreuztest von CulObsF2. M – pUC19-Marker; 1 – 3: positive Proben (spezifisches Produkt bei 288bp), Gnitzen Nr. 50 / 51 / 52 *C. obsoletus* s.s.; 4 – 6: Gnitzen Nr. 109 / 116 / 119 *C. dewulfi*; 7 – 9: Gnitzen Nr. 108 / 112 / 118 *C. chiopterus*; 10 – 12: Gnitzen Nr. 113 / 114 / 115 *C. scoticus*; 13 – 14: Gnitzen Nr. 6 / 122 *C. punctatus*; PØ – Amplifikation mit Wasser. .... 101
- Abb. 49* PCR-Ergebnis für den Kreuztest von CulDewF. M – pUC19-Marker; 1 – 3: positive Proben (spezifisches Produkt bei 295bp), Gnitzen Nr. 109 / 116 / 119 *C. dewulfi*; 4 – 6:

- Gnitzen Nr. 50 / 51 / 52 *C. obsoletus* s.s.; 7 – 9: Gnitzen Nr. 108 / 112 / 118 *C. chiopterus*; 10 – 12: Gnitzen Nr. 113 / 114 / 115 *C. scoticus*; 13 – 14: Gnitzen Nr. 6 / 122 *C. punctatus*; PØ – Amplifikation mit Wasser. .... 101
- Abb. 50* PCR-Ergebnis für den Kreuztest von CulChioF. M – 100bp-Marker; 1 – positive Probe (spezifisches Produkt bei 293bp), Gnitze Nr. 112 *C. chiopterus*; 2 – Gnitze Nr. 118 *C. chiopterus*; 3 – Gnitze Nr. 107 *C. dewulfi*; 4 – Gnitze Nr. 51 *C. obsoletus*; 5 – Gnitze Nr. 113 *C. scoticus*; 6 – Gnitze Nr. 6 *C. punctatus*; PØ – Amplifikation mit Wasser. .... 101
- Abb. 51* PCR-Ergebnis für den Kreuztest von CulPunctF. M – 100bp-Marker; 1 – positive Probe (spezifisches Produkt bei 343bp), Gnitze Nr. 93 *C. punctatus*; 2 – Gnitze Nr. 10 *C. pulicaris*; 3 – Gnitze Nr. 1 *C. riethi*; 4 – Gnitze Nr. 43 *C. nubeculosus*; 5 – Gnitze Nr. 109 *C. dewulfi*; PØ – Amplifikation mit Wasser. .... 102
- Abb. 52* PCR-Ergebnis für den Kreuztest von CulPulF. M – pUC19-Marker; 1 – positive Probe (spezifisches Produkt bei 288bp), Gnitze Nr. 187 *C. pulicaris*; 2 – Gnitze Nr. 126 *C. punctatus*; 3 – Gnitze Nr. 28 *C. riethi*; 4 – Gnitze Nr. 4 *C. scoticus*; PØ – Amplifikation mit Wasser; \* - unspezifisches Produkt bei ca. 400bp. .... 102
- Abb. 53* PCR-Ergebnis für den Versuch von Einzelbestimmungen mit sechs bekannten DNS-Proben in unbekannter Probenreihenfolge, Waschung erfolgte für die Dauer von einer Stunde mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A) spezifische PCR mit Primer CulObsF2; B) spezifische PCR mit Primer CulDewF. Vier Testgnitzen (Banden 2, 3, 5, 7 resp. 9, 10, 12, 14) waren positiv in PCR A und negativ in PCR B und wurden somit als *C. obsoletus* s.s. identifiziert, zwei Testgnitzen (Banden 4, 6 resp. 11, 13) waren negativ in PCR A und positiv in PCR B und wurden somit als *C. dewulfi* identifiziert. M1 – 100bp-Marker; M2 – pUC19-Marker; 1 – positive Probe (spezifisches Produkt bei 132bp) Gnitze Nr. 51 *C. obsoletus* s.s.; 8 – positive Probe (spezifisches Produkt bei 295bp) Gnitze Nr. 119 *C. dewulfi*; 2-7 bzw. 9-14 – Testgnitzen; PØ – Amplifikation mit Wasser. .... 105
- Abb. 54* PCR-Ergebnis für den Versuch von Einzelbestimmungen mit sechs bekannten DNS-Proben in unbekannter Probenreihenfolge, Waschung erfolgte für die Dauer von sechs Stunden mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A) spezifische PCR mit Primer CulObsF2; B) spezifische PCR mit Primer CulDewF. Vier Testgnitzen (Banden 3, 5, 6, 7 resp. 10, 12, 13, 14) waren positiv

in PCR A und negativ in PCR B und wurden somit als *C. obsoletus* s.s. identifiziert, zwei Testgnitzen (Banden 3, 4 resp. 9, 11) waren negativ in PCR A und positiv in PCR B und wurden somit als *C. dewulfi* identifiziert. M1 – 100bp-Marker; M2 – pUC19-Marker; 1 – positive Probe (spezifisches Produkt bei 132bp) Gnitze Nr. 51 *C. obsoletus* s.s.; 8 – positive Probe (spezifisches Produkt bei 295bp) Gnitze Nr. 119 *C. dewulfi*; 2-7 bzw. 9-14 – Testgnitzen; PØ – Amplifikation mit Wasser. .... 106

## 9.2. Tabellenverzeichnis

<i>Tab. 1</i> Übersicht über die Fallenstandorte durch die Arbeitsgruppe Berlin betreuten Entomologischen Monitorings und die Positionierung der Falle am jeweiligen Standort, März 2007-Mai 2008.....	36
<i>Tab. 2</i> Übersicht über die konservativen Primer für <i>Culicoides</i> spp. nach Cêtre-Sossah <i>et al.</i> (2004) .....	55
<i>Tab. 3</i> Rezept für die PCR-Ansätze mit PanCulF/R angelehnt an das Protokoll von Cêtre-Sossah <i>et. al</i> (2004). .....	55
<i>Tab. 4</i> Standard PCR-Protokoll, modifiziertes PCR-Protokoll von Cêtre-Sossah <i>et al.</i> (2004). .....	56
<i>Tab. 5</i> Übersicht über die Länge der PCR-Produkte nach Amplifikation mit den konservativen Primern PanCulR/F (Cêtre-Sossah <i>et. al</i> , 2004).....	57
<i>Tab. 6</i> Auflistung der Genbank Zugriffsnummer für die einzelnen <i>Culicoides</i> -Spezies. ....	60
<i>Tab. 7</i> Gefangene <i>Culicoides</i> -Gnitzen des entomologischen Monitorings (Arbeitsgruppe Berlin) zwischen März 2007 – Mai 2008 aufgeführt nach Falle und Gruppe.....	68
<i>Tab. 8</i> Auflistung der BTV-8-Genom positiven Gnitzenpools und deren Fallenzugehörigkeit (Entomologisches Monitoring März 2007-Mai 2008). .....	82
<i>Tab. 9</i> Aufstellung der Basensequenzen der speziesspezifischen Primer. ....	90
<i>Tab. 10</i> Übersicht über die Menge MgCl <sub>2</sub> , welche die besten PCR-Resultate bei den spezifischen Primern erzeugte.....	95

<i>Tab. 11</i> touchdown-PCR-Protokoll für CulObsF2.....	96
<i>Tab. 12</i> touchdown-PCR-Protokoll für CulDewF.....	97
<i>Tab. 13</i> PCR-Protokoll für CulChioF. ....	98
<i>Tab. 14</i> touchdown-PCR-Protokoll für CulPunctF.....	99
<i>Tab. 15</i> touchdown-PCR-Protokoll für CulPulF.....	100
<i>Tab. 16</i> PCR-Ergebnisse für die Sensitivitätstests der spezifischen Primer (n.a.: diese Sensitivität wurde in der PCR nicht ermittelt).....	103

### 9.3. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AHS	<i>african horse sickness</i> - Afrikanische Pferdepest
BMELV	Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
bp	<i>base pairs</i> - Basenpaare
BTD	<i>bluetongue disease</i> – Blauzungenkrankheit
BTV	<i>bluetongue virus</i> - Virus der Blauzungenkrankheit
COI	<i>cytochrome oxidase subunit 1</i> – Cytochromoxidase Untereinheit 1
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetate</i> – Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> - Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
EU	Europäische Union
FLI	Friedrich-Löffler-Institut
ggü.	gegenüber
ITS	<i>internal transcribed spacer</i>
LAVES	Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz, Ernährung und Lebensmittelsicherheit



- Weithalsflaschen, 250 ml Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- Plastiktrichter Hersteller unbekannt

#### 9.4.2. Materialien für die entomologische Präparation

- diverse Pinzetten Hersteller unbekannt
- Multireaktionsgefäße, 2ml Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- Präpariernadeln Eigenkonstruktion
- Phenol Hersteller unbekannt
- 99,6% Ethanol Carl Roth, Karlsruhe
- Blockschälchen Hersteller unbekannt
- Kanadabalsam Merck KGaA, Darmstadt
- Glaspipetten Hersteller unbekannt
- Schraubgefäß Hersteller unbekannt
- Objektträger Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen
- Deckgläser, rund Ø 10mm Carl Roth, Karlsruhe

#### 9.4.3. Materialien für die gentechnischen Arbeiten

##### *Chemikalien*

- Agarose Invitrogen, Paisley, UK
- MgCl<sub>2</sub> Solution Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- 10x PCR Gold Buffer Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

- Ethidiumbromid Sigma Chemical Company, St. Louis, USA
- Mineralöl Carl Roth, Karlsruhe

### *Enzyme*

- Ampli Taq Gold Polymerase Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

### *Kits*

- innuPREP DNA Mini Kit analytikjena, Jena
- High Pure PCR Product Purification Kit Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

### *DNS, Primer und DNTPs*

- DNS Die DNS für die Entwicklung der speziesspezifischen Primer wurde aus Gnitzen isoliert, die aus dem Monitoring 2007/2008 stammen
- Primer TIB MOLBIOL, Berlin
- DNTPs (dATP, dCTP, dGTP, DTTP) Invitrogen, Paisley, UK
- 100bp DNA Ladder Invitrogen, Paisley, UK
- pUC19 / Msp1 Ladder Carl Roth GmbH&Co., Karlsruhe

#### **9.4.4. Rezepturen Lösungen, Puffer und Gele**

- PBS-Puffer
  - 1,78 g Na
  - 2HPO 4x 2 H<sub>2</sub>O
  - 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - 8 g NaCl<sub>2</sub>
  - mit 0,2 g KCl auf pH 7,2 - 7,4 eingestellt



- 10x PCR-Puffer (pH 8,3) zur Gelherstellung und Elektrophorese:
  - 100 mM Tris            1,211 g
  - 500 mM KCL            3,728 g
  - 1 % Triton X-100    1 ml
  - DNAase u. RNAase freies Aqua dest. ad 100 ml
  
- 10x Elektrophorese-Puffer
  - 43,6 g TRIS
  - 41,4 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(xH<sub>2</sub>O)
  - 3,72 g EDTA
  - auf pH 8 eingestellt, autoklaviert und bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt
  
- 1x Elektrophorese-Puffer
  - 10x Elektrophorese-Puffer 1:10 mit Aqua dest. verdünnt
  
- Agarosegel
  - 200 ml 1x Elektrophorese-Puffer
  - 4 g Agarose
  
- 10x TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer) zur Herstellung von Probenpuffer
  - TRIS 121,1g
  - Borsäure 61,8 g
  - EDTA 7,44 g
  - MgCl<sub>2</sub> 2 x 6 H<sub>2</sub>O 10,165 g
  
- Probenpuffer für die Gelelektrophorese
  - 4x TBE-Puffer 10 ml
  - Ficoll-400 10%(w/v)

- SDS 4%(w/v)
- Bromphenolblau 8mg
- DNS-Marker
  - 100bp DNS-Marker            50µl
  - Probenpuffer                    300µl
  - DNA/RNAse freies H<sub>2</sub>O    650µl

#### 9.4.5. Einwegartikel

- Safe Seal-Tips professional                    BIOzym diagnostic, Hessisch Oldendorf  
10µl, 100µl, 1000µl
- Biosphere Filter Tips, 10µl, 100µl            SARSTEDT AG&Co., Nümbrecht
- Safe-Lock Tubes, 0,5ml                        Eppendorf AG, Hamburg
- Multiply-Pro Biosphere 0,2ml                SARSTEDT AG&Co., Nümbrecht
- Mikro-Röhren mit Verschluss, 0,5ml        SARSTEDT AG&Co., Nümbrecht
- Mikro-Schraubröhren, 1,5ml                 SARSTEDT AG&Co., Nümbrecht
- Safe-seal Reagiergefäße, 2ml                SARSTEDT AG&Co., Nümbrecht
- UVette    Eppendorf AG, Hamburg

#### 9.4.6. Mehrwegartikel

- Erlenmeyerkolben 100ml                      Schott, Mainz
- Becherglas 50ml                                Schott, Mainz
- Schraubglas 250ml                             Schott, Mainz

#### 9.4.7. Geräte

- Stereomikroskop Carl Zeiss, Jena
- Mikroskop Carl Zeiss, Jena
- eppendorf research Pipetten  
10µl, 100µl, 1000µl Eppendorf AG, Hamburg
- Biofuge 13 Heraeus Sepatech GmbH, Osterode
- Biofuge pico Heraeus Sepatech GmbH, Osterode
- Thermomixer comfort Eppendorf AG, Hamburg
- Disruptor Genie Scientific Industries, Bohemia, USA
- SpeedMill P12 Analytik Jena, Jena
- Biometra Trio-Thermoblock biomed. Analytik GmbH, Göttingen
- iCycler Bio-rad Laboratories GmbH, München
- Elektrische Präzisionswaage Sartorius, Göttingen
- Biometra Agagel Mini / Maxi biomed. Analytik GmbH, Göttingen
- Biometra Power Pack P25T biomed. Analytik GmbH, Göttingen
- Mikrowelle Sanyo, München
- MiniCentrifuge neolab, Heidelberg
- Concentrator5301, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Biometra UVstar biomed. Analytik GmbH, Göttingen
- Nikon D300 Nikon GmbH, Düsseldorf
- BioPhotometer plus Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland



## 10. Publikationen

Teile dieser Dissertationsarbeit wurden bereits veröffentlicht:

- Bartsch, S., Stephan, A., Hoffmann-Köhler, P., Bauer, B., Schein, E., Clausen, P.-H., Liebisch, G., Liebisch, A., Kiel, A., Werner, D., Bauer, C., Geier, M., u.a. Entomologische Untersuchungen zur Bekämpfung der Blauzungenkrankeheit. Tagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft; Fachgruppe Parasitologie und parasitäre Krankheiten, Schwerpunkt „Diagnostik, Epidemiologie und Bekämpfung von Parasitosen bei Nutz-, Haus- und Heimtieren“. Poster abstract, p. 70 Celle, 4.-6.6.2007
- Stephan, A., Clausen, P.-H., Bauer, B., Wiemann, A., Schein, E., Nawai, S., Steuber, S. Zur Identifizierung von autochthonen *Culicoides* spp. - potenzielle Vektoren der Blauzungenkrankeheit, Vet Med Report Sonderausgabe V3 zur Tagung der DVG – Fachgruppe Parasitologie und parasitäre Krankheiten, 32. Jahrgang, 2008, p. 12
- Stephan, A., Nawai, S., Wiemann, A., Bauer, B., Clausen, P.-H., Steuber, S. Morphological and molecular-genetic identification of domestic *Culicoides* spp. in northern Germany. 23. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie. Hamburg, 5.-7.3.2008
- Stephan, A., Clausen, P.-H., Bauer, B., Wiemann, A., Schein, E., Nawai, S., Steuber, S. Identifizierung heimischer *Culicoides* spp. in Norddeutschland mittels morphologischer und molekular-genetischer Methoden. Doktoranden-Symposium des Fachbereichs Veterinärmedizin der FU Berlin, 27.6.2008
- Stephan, A., Clausen, P.-H., Bauer, B., Wiemann, A., Schein, E., Nawai, S., Steuber, S. Phäno- und genotypische Charakterisierung autochthoner *Culicoides* spp. - potenzielle Vektoren der Blauzungenkrankeheit. Tagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft; Fachgruppe Parasitologie und parasitäre Krankheiten Diagnostik, Schwerpunkt „Epidemiologie und Bekämpfung von Parasitosen bei Nutz-, Haus- und Heimtieren“. Vortrag abstract p. 65 Celle, 9.-11.7.2008
- Stephan, A., Clausen, P.-H., Bauer, B., Steuber, S., 2009. PCR identification of *Culicoides dewulfi* midges (Diptera: Ceratopogonidae), potential vectors of bluetongue in Germany. Parasitology Research 105, 367-371

## 11. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. P.-H. Clausen für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die mir jederzeit gewährte Unterstützung und fachliche Beratung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Besondere fachliche Unterstützung bei molekulargenetischen Fragestellungen erhielt ich durch Dr. S. Steuber. Frau Dr. S. Nawai vom Museum für Naturkunde Berlin danke ich für die Einführung in die morphologische Differenzierung der Gnitze.

Des Weiteren möchte mich besonders bei Frau Angelika Wiemann für die unermüdliche Hilfe im Labor und bei Herrn Prof. Dr. D. Mehlitz für den gedanklichen Austausch bedanken.

Ferner danke ich Herrn Dr. B. Bauer für die Unterstützung während der Arbeiten zum entomologischen Monitoring. Herrn Prof. Dr. E. Schein und allen Mitarbeitern des Instituts für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin verdanke ich die freundliche Aufnahme im Institut.

Ein ganz großer Dank gilt meinen Mitdotorandinnen und Freunden Anabell Jandowsky, Inga Lösing, Karen Rohrman, Nicol Gehricke und Stefanie Bartsch, die mir durch ihre tatkräftige Hilfe während des Monitorings und seelische Unterstützung bei den Arbeiten im Labor über stundenlanges Gnitzenzählen und nicht gelungene PCRs hinweggeholfen und entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein größter Dank gilt meiner Familie für ihre liebevolle Unterstützung und ihr Interesse an meiner Arbeit, sowie meinem Freund Jan Christoph für seine unendliche Geduld. Meiner Freundin Katja Kostelnik danke ich für zahlreiche motivierende fachliche und private Gespräche. Ohne euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

## **12. Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe.

Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Nordgeorgsfehn, den 04.07.2012

Anja Stephan