

Forschungsvorhaben 2809HS010

„Entwicklung von Multiplex- und Real Time-PCR zur Identifizierung einheimischer *Culicoides*-Arten (Diptera: Ceratopogonidae)“

Dr. Doreen Werner

(Leibniz-Zentrum für Agrarlandschaftsforschung (ZALF) e.V.)

Der vorliegende Bericht für die Feinbestimmung und Molekularbiologie im o.g. Forschungsprojekt basiert auf Untersuchungsergebnissen mit Stand 24.06.2011.

Inhalt

1	Personal, Vorbereitung und Durchführung des Vorhabens	4
1.1	Zusammensetzung der AG Molekularbiologie	4
1.2	Direkte Kooperationspartner der AG Molekularbiologie - national	5
1.3	Kooperationspartner der AG Molekularbiologie - international.....	6
2	Einleitung	7
2.1	Allgemeine Einführung	7
2.2	Systematische Stellung.....	9
2.2.1	Gattungsübersicht der in Deutschland bisher nachgewiesenen Ceratopogonidae.....	11
2.3	Entwicklung	11
2.4	Lebensraum und Vorkommen	13
2.5	Ceratopogonidae als Vektoren	14
2.5.1	Viren.....	15
2.5.2	Nematoden	15
2.5.3	Protozoen.....	16
2.6	Wirte parasitischer Ceratopogonidae	18
2.9	BTV Serotype 8 Epidemiologie 2006 ff. in Europa.....	19
3	Entomologisches Monitoring	22
3.1	Durchführung des Entomologischen Monitorings	22
3.2	Teilnehmende Betriebe und Fallenstandorte.....	22
3.3	Allgemeine Fangmethodik und Wetterdatensammlung	22
3.4	Material	23
4	Methodik	23
4.1	Morphologie und Identifizierung – allgemeine Einführung	23
4.2	Morphologische Differenzierung des Materials - Artbestimmung	25
4.2.1	Genitalien (Männchen) der häufigsten Culicoides- Arten	26
4.2.2	Antennenausprägung der häufigsten Culicoides – Arten	27
4.2.3	Palpenausbildung der häufigsten Culicoides - Arten	28
4.2.4	Spermathekenausbildung der häufigsten Culicoides-Arten	29
4.3	Herstellung von Dauerpräparaten.....	30
4.4	Phylogenie	31
5	Artidentifizierung mittels konventioneller PCR	32
5.1	Allgemeine Einführung	32
5.1.1	Cytochromoxidase Untereinheit I und Internal Transcribed Spacer 2	33
5.1.2	Multiplex-PCR Grundlagen	35
5.1.3	Phylogenetische Untersuchung	37
5.1.4	DNA-Extraktion aus Einzel-Gnitzen	38
5.1.5	DNA-Extraktion mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit von Qiagen.....	38
5.1.6	DNA-Extraktion mittels innuPREP DNA Mini Kit von Analytikjena	39
5.2	Konventionelle PCR - Reaktionsansatz	40
5.3	Multiplex-PCR - Reaktionsansatz.....	41
5.4	Gelelektrophorese.....	42
5.4.1	DNA-Aufreinigung	42
5.4.2	DNA-Aufreinigung mittels MinElute Reaction Cleanup Kit von Qiagen ..	43
5.4.3	DNA-Aufreinigung mittels innuPREP PCRpure Kit von Analytikjena	43
5.4.4	Datenauswertung, Primerdesign und phylogentische Analysen	44
6	Artidentifizierung mittels real-time PCR	44
6.1	Einführung.....	44

6.2	Material und Methoden real-time PCR	46
6.2.1	Gnitzen	46
6.2.2	Nukleinsäure-Extraktion	46
6.3	Real-time PCR.....	47
6.4	Genetische Identifizierung und DNA-Sequenzierung.....	47
7	Ergebnisse	48
7.1	Konventionelle PCR.....	48
7.1.1	Culicoides-Proben für Primer-Entwicklung.....	49
7.1.2	Multiplex-PCR für den C. obsoletus-Komplex.....	51
7.1.2.1	Entwicklung Spezies-spezifischer Primer	51
7.1.2.2	Optimierung der Reaktionsbedingungen.....	53
7.1.3	Multiplex-PCR C. pulicaris-Komplex.....	55
7.1.3.1	Spezies-spezifische Primer.....	55
7.1.3.2	Optimierung der Reaktionsbedingungen.....	58
7.2	real-time PCR.....	61
7.2.1	Auswahl von speziesspezifischen real-time PCR-Assays.....	61
7.2.2	Validierung der real-time PCR-Systeme und Sequenzierung.....	64
7.3	Phylogenie	69
7.3.1	Sequenz-Analyse.....	69
7.2.2	Dendrogramme COI.....	72
7.2.3	Dendrogramme ITS2.....	73
8	Diskussion	80
8.1	Multiplex-PCR für den Obsoletus- und den Pulicaris-Komplex	80
8.2	real-time PCR.....	81
8.3	Phylogenie basierend auf COI- und ITS2-Sequenzdaten der Multiplex PCR	84
9	Abschlussbetrachtung.....	85
10	Literatur	87
11	Danksagung.....	105
12	Anhang	106

1 Personal, Vorbereitung und Durchführung des Vorhabens

1.1 Zusammensetzung der AG Molekularbiologie

Dr. Doreen Werner (Dipl. Biologin/ Projektleiterin)
Leibniz-Zentrum für Agrarlandschaftsforschung (ZALF)
Eberswalder Chaussee 90
15734 Müncheberg

Kathrin Lehmann (Dipl. Biologin)
Humboldt-Universität zu Berlin
Institut für Biologie
Zytogenetik
Chausseestr. 117
10115 Berlin

1.2 Direkte Kooperationspartner der AG Molekularbiologie - national

PD Dr. Helge Kampen (Dipl. Biologe)
Friedrich-Loeffler-Institut (FLI)
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Institut für Infektionsmedizin
Insel Riems
Südufer 10
17493 Greifswald-Insel Riems

Frau Brigitte Dannenfeld (TA)
Friedrich-Loeffler-Institut (FLI)
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Institut für Infektionsmedizin
Insel Riems
Südufer 10
17493 Greifswald-Insel Riems

Dr. Bernd Hoffmann (Veterinärmediziner)
Friedrich-Loeffler-Institut (FLI)
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Institut für Virusdiagnostik
Insel Riems
Südufer 10
17493 Greifswald-Insel Riems

Christian Korthase (TA)
Friedrich-Loeffler-Institut (FLI)
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Institut für Virusdiagnostik
Insel Riems
Südufer 10
17493 Greifswald-Insel Riems

1.3 Kooperationspartner der AG Molekularbiologie - international

Prof. M. Baylis, University of Liverpool, UK
Dr. T. Balenghien, Centre de Coopération Internationale, Montpellier, France
Dr. J. Boorman, Institut for Epidemiology, Animal Health Institute Pirbright , UK
Dr. S. Carpenther, Institut for Epidemiology, Animal Health Institute Pirbright , UK
Dr. C. Cêtre-Sossah, Centre de Coopération Internationale, Montpellier, France
Dr. J.-C. Delécolle, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France
E. Danison, Institut for Epidemiology, Animal Health Institute Pirbright , UK
Dr. G. de Deken, Institute of Tropical Medicine, Department of Animal Health, Belgium
Dr. C. Garros, Centre de Coopération Internationale, Montpellier, France
Dr. B. Mathieu, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France
Prof. Dr. P. Mellor, Institut for Epidemiology, Animal Health Institute Pirbright , UK
Dr. M. Miranda, Universidad de las Islas Baleares, Palma de Mallorca, Spain
Dr. R. Meiswinkel, Entomologist at Plantenziektenkundige Dienst, Netherlands
Dr. S. Nielsen, Roskilde University, Dänemark
Dr. N. Pagès, CReSA, Bellaterra (Barcelona), Spain
Dr. F. Schaffner, University of Zurich, Switzerland
P. Sehnal, Naturhistorisches Museum Wien, Österreich
Dr. R. Vénail, Centre de Coopération Internationale, Montpellier, France
Dr. A. Wilson, Institut for Epidemiology, Animal Health Institute Pirbright , UK

2 Einleitung

2.1 Allgemeine Einführung

Seit jeher spielen Tierkrankheiten und Tierseuchen sowie deren ökonomische Auswirkungen eine bedeutende Rolle in der Landwirtschaft. Die Gesundheit von Nutz- und Zuchttieren stellt nicht zuletzt für den Verbraucher, der Lebensmittel aus Tieren konsumiert, ein wichtiges Qualitätsmerkmal dar. Auftretende Seuchen können einen enormen wirtschaftlichen Schaden verursachen, und auch der Aspekt des Tierschutzes sollte beachtet werden, da erkrankte Tiere in der Regel erheblich leiden müssen. In den letzten Jahren hat sich die Ausbreitung von Tierseuchen dramatisch verändert. Während eine Ausbreitung früher langsamer vonstatten ging und natürliche Grenzen ein schwer zu überwindendes Hindernis boten, verbreiten sich Seuchen in den letzten Jahren viel abrupter. Einen Grund dafür stellt die immer weiter zunehmende Globalisierung dar, denn damit steigen auch der Tourismus und der internationale Handel mit Tieren an. Mittlerweile ist es möglich in kurzer Zeit weite Strecken zurückzulegen. Über die gleichen Wege können auch Krankheitserreger sowie bereits infizierte, aber noch asymptomatische Tiere über lange Strecken transportiert werden. Man sollte damit rechnen, dass noch nicht in Europa heimische Erreger auf dem Vormarsch sind und sich ebenfalls hier etablieren könnten. Insbesondere wenn diese Viren, Bakterien oder Parasiten auf einen potentiellen neuen Vektor treffen, kann es dazu kommen, dass sich eine Krankheit in einem neuen Gebiet etabliert. Ein weiterer Faktor, der den Vormarsch exotischer Krankheitserreger nach Europa begünstigt, ist der Klimawandel. Durch veränderte klimatische Verhältnisse können sich unter anderem Insekten in neuen Gebieten ausbreiten, in denen die Existenzbedingungen zuvor nur unzureichend waren. Wenn sich darunter auch Vektoren für zum Beispiel Arboviren (**arthropod borne viruses**) befinden, könnte sich dadurch ein potentielles Krankheitsgebiet verändern.

Bei der Blauzungkrankheit (bluetongue disease – BTD) handelt es sich um eine solche, in Europa neu aufgetretene Tierseuche. BTD ist eine Erkrankung domestizierter und wildlebender Wiederkäuer, die durch das Blauzungenvirus (bluetongue virus - BTV) verursacht wird. Infizierte Tiere zeigen eine Vielzahl von Symptomen, die bis zum Tod führen können. Die Krankheit brach 2006 erstmals in Nordeuropa aus. Sie nahm in Frankreich, Belgien, Holland, Deutschland und

Luxemburg ihren Anfang und breitete sich bis 2009 seuchenartig über viele Länder Mittel- und Nordeuropas aus (Kampen & Werner 2010). Später konnte festgestellt werden, dass es sich bei dem ursächlichen Virus um den BTV Serotyp 8 handelte (Hoffmann et al. 2008).

In Deutschland wurden die ersten BTD-Fälle im Raum Aachen festgestellt (Mehlhorn et al. 2007). Dort waren vorwiegend Kühe betroffen. Zum Ende des Jahres 2006 stoppte das kalte Klima die Virusübertragung, und der letzte Fall einer Infektion in dieser Übertragungsperiode wurde Mitte Januar 2007 nachgewiesen (Losson et al. 2007). Der erneute Nachweis einer Infektion – Ende April 2007 trat die Infektion erneut in einem deutschen Sentinel-Tier auf (Hoffmann et al. 2008) – markierte den Beginn einer massiven geografischen Ausbreitung des Schadgeschehens mit einer deutlichen Zunahme an Fällen. So gehörte bis Ende 2007 das gesamte Bundesgebiet zu einer 150 km-Restriktionszone, nachdem in den folgenden 13 Bundesländern BTD-Fälle festgestellt worden waren: Baden-Württemberg, Bayern, Bremen, Hessen, Mecklenburg-Vorpommern, Niedersachsen, Nordrhein-Westfalen, Rheinland-Pfalz, Saarland, Sachsen, Sachsen-Anhalt, Schleswig-Holstein und Thüringen (Werner & Conraths 2008). Über 30.000 Bauernhöfe in Nordeuropa waren betroffen (Wilson & Mellor 2009). Die damit verbundenen direkten Kosten für die Landwirtschaft wurden auf 150 Millionen € geschätzt (Hoogendam 2007). In Deutschland betragen die durch BTD bei Rindern verursachten Kosten im Jahr 2007 61.969.514 € (FLI 2008). Auch diese Berechnung enthält nur die direkten Kosten. 2008 breitete sich die BTD weiter in Europa aus, doch lag die Anzahl der Fälle, vermutlich aufgrund der inzwischen gestarteten Impfkampagnen (Savini et al. 2008), zahlenmäßig deutlich unter der des Vorjahres. Während in Deutschland im Jahr 2007 insgesamt 20.623 an BTD erkrankte Tiere gemeldet wurden, wurden 2008 5.125 Fälle registriert. 2009 verringerte sich die Zahl weiter auf 142 und 2010 wurden keine neuen Erkrankungen gemeldet (TSN - Tierseuchennachrichtensystem). Dennoch sollte man nicht davon ausgehen, dass die Gefahr vorüber ist. Nicht nur wird das Risiko von Neuausbrüchen von BTV-8 mit dem Wegfall der Impfpflicht als mäßig bis hoch eingeschätzt (FLI 2009), sondern es kursieren noch andere Serotypen in Südeuropa, die auch nach Nordeuropa verschleppt werden könnten.

Ursprünglich war die BTD in erster Linie in wärmeren Ländern südlich des 44. Breitengrades beheimatet. Die Ursache der Expansion der Seuche nach Norden ist unklar (Mintiens et al. 2008), doch kann eine mit der globalen Erwärmung

einhergehende Ausbreitung der Vektoren weitgehend ausgeschlossen werden. Das BTV wird von Blut saugenden Mücken der Gattung *Culicoides* (Fam. Ceratopogonidae) übertragen (Du Toit 1944). Die hämatophagen Weibchen nehmen es während einer Blutmahlzeit auf und können es nach Replikation und Ausstreuung im Inneren des Insekts bei einer weiteren Blutmahlzeit über den Speichel auf einen anderen Säugetierwirt übertragen. Einmal infizierte Gnitzen bleiben lebenslang Virusträger (Mellor 2000) und stellen daher einen effektiven biologischen Vektor dar.

Der 2006 in Europa eingeschleppte BTV-Stamm wurde als Serotyp 8 identifiziert (Mehlhorn et al. 2007) und war am nächsten mit Virusstämmen verwandt, die zuvor in Südafrika und Nigeria nachgewiesen worden waren (Hoffman et al. 2008). Der dortige Vektor *C. imicola* ist allerdings in dem neuen europäischen Verbreitungsgebiet des Virus nicht endemisch. Obwohl diese Art bereits in Südeuropa etabliert ist und sich aufgrund der Klimaerwärmung langsam nach Norden ausbreitet (Purse et al. 2005), wurde sie noch nie nördlich der Alpen nachgewiesen. Dennoch betrug die Ausbreitungsgeschwindigkeit des BTV-8 im Jahr 2006 ca. 15km pro Woche (Meroc et al. 2008). Ganz eindeutig scheint in Mitteleuropa demnach eine (oder mehrere) andere Vektorspezies für die Übertragung des Erregers verantwortlich zu sein (Kampen & Kiel 2008). Obwohl nicht bekannt ist, wie das Virus nach Nordeuropa eingeführt wurde, konnte es doch überleben und sich vorerst etablieren. Eine grundlegende Voraussetzung dafür ist neben den günstigen klimatischen Konditionen zum Zeitpunkt der Einschleppung vor allem die Existenz einer kompetenten lokalen Vektorenpopulation. Welche Arten in Deutschland als Vektoren dienen, ist allerdings noch nicht klar.

2.2 Systematische Stellung

Die Familie der Ceratopogoniden (Gnitzen) zählt zur Klasse der Insecta (Insekten), zur Ordnung der Diptera (Zweiflügler) und zur Unterordnung der Nematocera (Mücken). Die Gnitzen werden auch als Bartmücken und regional als Gnitten bezeichnet. Die lateinische Bezeichnung „Ceratopogon“, aus der sich der Familienname ableitet, wurde von Meigen (1803) geprägt. Ursprünglich wurde sie den Tipuliden und Chironomiden zugeordnet. Die Ceratopogoniden umfassen ungefähr 5500 Arten in fünf Unterfamilien und mehr als 125 Gattungen (Borkent 2006). Mit Ausnahme von Arktis und Antarktis sind sie weltweit vorkommend.

Stamm	Athropoda (Gliederfüßer)
Abteilung	Mandibulata (Mandibelträger)
Unterstamm	Tracheata (Tracheenträger)
Überklasse	Hexapoda (Sechsfüßer)
Klasse	Insecta (Insekten)
Unterklasse	Pterygota (Fluginsekten)
Überordnung	Neoptera (Neuflügler)
Ordnung	Dipera (Zweiflügler)
Unterordnung	Nematocera (Mücken)
Familie	Ceratopogonidae (Gnitzen)

Obwohl die Gnitzen seit ungefähr 200 Jahren in Deutschland Gegenstand systematischer Forschungen und hier auch weit verbreitet sind, gehören sie nach wie vor zu den am wenigsten untersuchten Dipteren-Familien des Landes. Laut der „Checkliste der Dipteren Deutschlands“ wurden 332 Ceratopogoniden-Arten für das Gebiet der Bundesrepublik Deutschland nachgewiesen, was in etwa 7% des gesamten Weltbestandes ausmacht (Havelka & Aguilar 1999). Da aber einige Regionen vernachlässigt wurden, kann davon ausgegangen werden, dass diese Zahl deutlich höher ist und noch zusätzliche Nachweise weiterer Arten hinzukommen werden. Außerdem ist die Ausbildung von Komplex-Arten auch für die Gnitzen (besonders innerhalb der Gattungen *Culicoides* und *Forcipomyia*) charakteristisch, so dass die Gesamtanzahl der Ceratopogoniden noch wesentlich höher liegen dürfte (Werner & Kampen 2007).

Gnitzen sind kleine kompakte Dipteren mit kurzen Beinen. Adulte Tiere sind ca. 0,5 bis 3mm lang und schwarz bis grau gefärbt. Die Brust ist am Rücken aufgewölbt. Die Flügel sind gut ausgebildet, relativ breit, bei vielen Arten behaart und mehr oder weniger gefleckt. Gnitzen haben gegliederte Fühler, die bei den Männchen gefiedert sind. Die Mundwerkzeuge sind stechend-saugend ausgebildet.

Bei den Spezies der Gattungen *Forcipomyia*, *Leptoconops*, *Austroconops* und *Culicoides* kommen hämatophage Weibchen vor. Diese sind zur Eiproduktion auf Wirbeltierblut angewiesen. Zur Gattung *Culicoides* gehören weltweit ungefähr 1300 Arten, von denen 96% obligate Blutsauger an Säugern und Vögeln sind (Meiswinkel & Braack 1994).

2.2.1 Gattungsübersicht der in Deutschland bisher nachgewiesenen Ceratopogonidae

Gattungsübersicht innerhalb der Unterfamilien der Ceratopogonidae für Deutschland (nach Havelka & Aguilar 1999):

Unterfamilie Palpomyiinae

Bezzia Kieffer, 1899
Climohelea Kieffer, 1917
Macropeza Meigen, 1818
Mallochohelea Wirth, 1962
Neurohelea Kieffer, 1925
Nilobezzia Kieffer, 1921
Palpomyia Meigen, 1818
Probezzia Kieffer, 1906
Sphaeromias Curtis, 1829

Unterfamilie Dasyheleinae

Dashyelea Kieffer, 1911

Unterfamilie Forcipomyiinae

Atrichopogon Kieffer, 1906
Forcipomyia Meigen, 1818

Unterfamilie Ceratopogoninae

Alluudomyia Kieffer, 1913
Brachypogon Kieffer, 1899
Ceratoculicoides Wirth & Ratanaworabhan, 1971
Ceratopogon Meigen, 1803
Culicoides Latreille, 1809
Monohelea Kieffer, 1917
Serromyia Meigen, 1818
Stilobezzia Kieffer, 1911

2.3 Entwicklung

Gnitzen sind holometabole Insekten, die während der Entwicklung vom Ei zum adulten Insekt verschiedene Stadien – vier Larvenstadien und ein Puppenstadium – durchlaufen (Abb. 1). Larve, Puppe und Imago weisen keinerlei Ähnlichkeit untereinander auf und haben unterschiedliche Lebensweisen.

Die bis 0,3 mm großen Eier der Gnitzen haben eine ovale bis langgestreckte Form, deren Ausbildung innerhalb der Gattungen variiert. Sie werden an Land, an Gewässerufeln oder im Wasser abgelegt. Bei der Gattung *Culicoides* erfolgt die Eiablage einzeln. Die Larven besitzen eine voll sklerotisierte Kopfkapsel. Drei thorakale und neun abdominale Segmente sind deutlich definiert. Das letzte Larvalstadium erreicht eine Länge von vier bis sieben Millimeter. Die Puppen sind bei allen Gattungen von ähnlicher Gestalt. Sie sind ungefähr zwei bis vier Millimeter lang, kompakt und dunkel gefärbt. Aus ihnen schlüpft die adulte Mücke. Die Puppen der Gnitzen sind bewegungslos und nehmen keine Nahrung auf.

Die Dauer der Larvalentwicklung ist stark abhängig von den lokalen Umweltfaktoren und den ökologischen Ansprüchen der jeweiligen Arten. In gemäßigtem Klima kann die larvale Phase einige Monate dauern, während die Entwicklung zur Imago in heißen Klimaten nur wenige Tage benötigt (Blanton & Wirth 1979). Imagines von *Culicoides* leben je nach Spezies zwischen einem und dreieinhalb Monaten (Mellor et al. 2000)

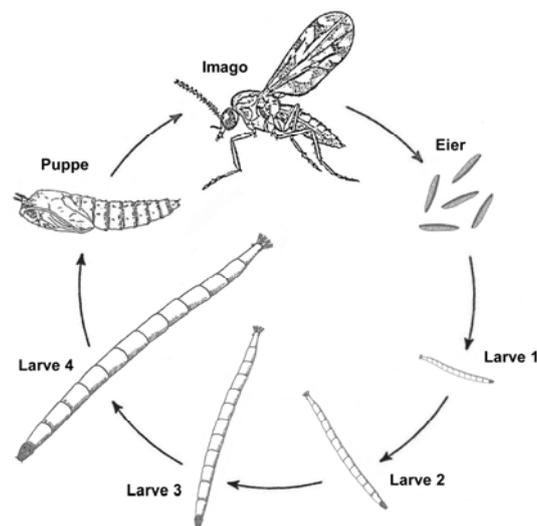


Abb. 1: Entwicklungszyklus der Gattung *Culicoides* (nach Werner & Kampen 2008)

2.4 Lebensraum und Vorkommen

Die Familie Ceratopogonidae umfasst terrestrische, semiterrestrische und aquatisch lebende Arten. Für Deutschland sind drei faunistisch bedeutsame Bereiche zu unterscheiden: das Tiefland, das Mittelgebirge und das Hochgebirge. Diese Bereiche werden von unterschiedlichen Artengemeinschaften besiedelt (Havelka 2003), welche auch morphologische Unterschiede aufweisen (Werner & Kampen 2007).

Kennzeichnend für Gnitzen ist, dass sich die verschiedenen Entwicklungsstadien nur in Feuchtbiotopen oder Gewässern aufhalten. In deren Nähe sind in der Regel auch die adulten Tiere auffindbar. Die meisten Gnitzen-Arten bevorzugen Feuchtwiesen und stark überdüngte Lebensräume. Im Gegensatz zu Stechmücken, welche stehendes Wasser für ihre Entwicklung benötigen, oder Kriebelmücken, welche fließendes Wasser brauchen, können sich Ceratopogoniden in jeglicher Art von feuchtem oder nassem Habitat entwickeln. Die genauen Brutstätten der einzelnen Arten sind kaum bekannt, doch kann man Ceratopogoniden generell in permanenten Gewässern oder temporären Wasseransammlungen, wie zum Beispiel Sümpfen, Mooren und Marschen, sowie in Baumlöchern, rottender Vegetation, Gülle und im Dung finden (Abb. 2-5) (Werner & Conraths 2008). Die Larvenstadien der hämatophagen Arten sind euryök und bewohnen ausschließlich Schlamm und/ oder Brackwasser (Havelka 2003).

Die verschiedenen *Culicoides*-Spezies unterscheiden sich auch hinsichtlich der saisonalen und diurnalen Aktivität der Imagines. Zahlreiche Arten schlüpfen ab April oder Mai. Manche Arten (z. B. *C. obsoletus* s.s., *C. pulicaris* s.s., *C. punctatus*) werden während des gesamten Sommers bis mindestens Oktober beobachtet, andere (z. B. *C. pallidicornis*, *C. nubeculosus*, *C. impunctatus*) bis höchstens September (Havelka 1976; Hövemeyer & Havelka 1996). Auch die Anflugaktivität zur Aufnahme der Blutmahlzeit scheint artspezifisch verschieden zu sein. Dies wurde für Norddeutschland an Rindern untersucht. Dabei wurde zwar die Mehrzahl der Gnitzen-Arten in der ersten Nachthälfte registriert, es gab aber auch Spezies, die in der zweiten Nachthälfte und am Vormittag anflogen. *Culicoides impunctatus* und *C. pulicaris* traten nur zwischen 16 und 23 Uhr auf, während *C. scoticus*, *C. obsoletus* s.s. und *C. dewulfi* die längsten Aktivitätsphasen zeigten und fast ganztägig nachweisbar waren (Olbrich 1987).



Abb. 2: Bruthabitat: Tierdung und Gülle
(Foto: Werner 2006)



Abb. 3: Bruthabitat: Moore und Sümpfe
(Foto: Bellstedt 2004)



Abb. 4: Bruthabitat: Ufer- und Überflutungsbereiche von Flüssen
(Foto: Werner 2006)



Abb. 5: Bruthabitat: Baumstumpf
(Foto: Kampen 2003)

2.5 Ceratopogonidae als Vektoren

Gnitzen stellen nicht nur als saisonal und regional in Massen auftretende Lästlinge ein Problem dar. Verschiedene Gnitzen-Arten dienen als Vektoren und können einen Erreger von einem Wirt auf einen anderen transportieren. Insbesondere in tropischen und subtropischen Regionen der Welt finden sich unter den Gnitzen Überträger von zahlreichen Viren, Protozoen- und Filarien-Arten, die fast ausschließlich von veterinärmedizinischer Bedeutung sind (Kampen & Kiel 2008; Mellor et al. 2000).

Nach aktuellem Kenntnisstand kommen ungefähr 50 Arten der Gattung *Culicoides* als potentielle Überträger von Krankheitserregern bei Mensch und Tier in Frage

(Boorman 1993) (Tab. 1). Die Anzahl der aus Gnitzen isolierten Arten von Arboviren beträgt mindestens 50 (Mellor et al. 2000), und eine Beteiligung an der Übertragung von Orbiviren wurde für 30 *Culicoides*-Arten nachgewiesen (Schwenkenbecher et al. 2009). Von diesen Krankheitserregern ist der Mensch lediglich für das Oropouche- und das Rifttal-Virus empfänglich (Werner & Kampen 2010). Während also die meisten Erreger keine humanpathogenen Eigenschaften besitzen, sind sie imstande großen gesundheitlichen und ökonomischen Schaden in der Tierzucht und der Tierhaltung anzurichten. Neben dem BTV gehören auch das African Horse Sickness Virus (AHSV) (Mellor & Hamblin 2004) und die equinen Enzephalitis-Viren (WEEV, EEEV, VEEV) (Scott & Weaver 1989) zu den von Gnitzen übertragenen Viren. BTV und AHSV sind allerdings die ökonomisch bedeutendsten Vertreter (MacLachlan & Guthrie 2010).

2.5.1 Viren

Das Spektrum der bisher aus *Culicoides* isolierten Viren ist beachtlich. Neben dem Virus der Blauzungenkrankheit wurden z. B. die Erreger der d'Aquilar-Krankheit, der Afrikanischen Pferdesterbe, des bovinen Ephemeralfiebers, die equinen Enzephalitisviren, das Rifttal-Virus sowie diverse Viren aus den Rabies-, Simbu-, Palyam-, Bunya-, Ganjam- und Congo-Gruppen nachgewiesen. Innerhalb der Bunya-Gruppe sind für die Übertragung des Akabane- und Oropouche-Virus die Arten der Gattungen *Culex* und *Aedes* epidemiologisch von Bedeutung. Nur für das Oropouche-Virus wurde bisher eine Übertragung auf den Menschen durch Gnitzen nachgewiesen.

Eine Auswahl der wichtigsten von Ceratopogoniden übertragenen Krankheitserreger gibt Tabelle 3 wieder. Detailliertere Aufstellungen finden sich in Linley et al. (1983), Linley (1985), Hull et al. (1989) und Boorman (1993).

2.5.2 Nematoden

Einige *Culicoides*-Arten besitzen in den tropischen Regionen Afrikas und Zentralamerikas durch die Übertragung von Filarien (Nematoda: Filarioidea) große epidemiologische Bedeutung. *Mansonella perstans* (Yorke & Mapleston 1926) [früher *Dipetalonema*], die beim Menschen aber in der Regel keine Symptomatik

verursacht, wird von den Mücken übertragen. Weiterhin sind sie Zwischenwirte für die *Onchocerca*-Arten: *O. gutturosa* Neumann, 1910, *O. gibsoni* (Cleland & Johnston, 1910), *O. cervicalis* Railliet & Henry, 1910, *O. cebei* Galliard, 1937 (= *O. sweetae*), *O. reticulata* Diesing, 1841. Weiterhin werden wahrscheinlich *O. dukei* Bain, Bussieras & Amegee, 1976 und *O. denkei* Bain, Vassiliades & Delbove, 1982, sowie zwei weitere *Mansonella*-Arten: *Mansonella streptocerca* Macfie & Corson, 1922 und *Mansonella* (früher *Dipetalonema*) *ozzardi* Manson, 1897 übertragen. Sie parasitieren in Vögeln, Affen, Waschbären, Rindern, Pferden und Büffeln (Crosskey 1990, Anderson 2000, Shelley & Coscaron 2001).

Innerhalb der Gattung *Forcipomyia* können Arten der beiden Untergattungen *Lasiohelea* und *Dacnoforcipomyia* ebenfalls *Onchocerca*-Filarien übertragen. Ottley & Moorhouse (1980) wiesen die Übertragung von *O. gibsoni* auf Weidetiere und Pechuman & Wirth (1961) von *Icosiella neglecta* (Diesing, 1851) auf Frösche nach. *O. cervicalis* ist vermutlich ein durch die Gattung *Forcipomyia* übertragener Wurmparasit von Pferden (Ottley et al. 1983).

2.5.3 Protozoen

Auf den Menschen werden durch Ceratopogoniden keine Protozoen übertragen. Vertreter der Gattung *Culicoides* übertragen jedoch verschiedene, einzellige Blutparasiten (z. B. Arten von *Haemoproteus*, *Parahaemoproteus*, *Hepatocystis* und *Nycteria* sowie *Trypanosomen*) auf Vögel (Valkiūnas et al. 2002, Mullens et al. 2006, Garnham et al. 1961, Olsen 1974) und gewinnen dadurch ökonomische Bedeutung. In Japan werden außerdem Protozoen der Gattung *Leucocytozoon* (*L. caulleryi* Mathis & Leger, 1909) (Apicomplexa: Plasmodiidae) von *Culicoides* auf Hausgeflügel übertragen (Akiba 1960, Yu et al. 2000). *Culicoides adersi* Ingram & Macfie, 1923 überträgt *Hepatocystis kochi* (Levaditi & Schoen, 1932) in Ostafrika auf Affen (Garnham et al. 1961).

Krankheitsübertragung durch Ceratopogoniden		
Erreger	Wirt	Geografische Verbreitung
Viren		
Rifttal-Virus	Wiederkäuer, Kamele, Mensch	Afrika und angrenzende Regionen
Oropouche-Virus	Mensch	Südamerika
Blauzungenvirus	Wiederkäuer	Neue Welt, Afrika, Asien, Australien, Süd- und Mitteleuropa
Afrikanische Pferdesterbe-Virus	Equiden	Afrika, Mittelmeerraum
Akabane-Virus	Rind, Schaf, Ziege, Pferd	Afrika, mittl. Osten, Südostasien, Australien
Equine Enzephalitis-Viren (WEEV, EEEV, VEEV)	Pferd	Neue Welt
Epizootisches hämorrhagisches Fieber-Virus	Rind, Wildwiederkäuer	USA, mittlerer Osten, Afrika, Asien
Bovines Ephemeralfieber-Virus	Rind	mittlerer Osten, Afrika, Australasien, Japan
Palyam-Virus Serogruppe	Rind, Schaf	Afrika, Australien, Asien
Protozoen		
<i>Trypanosoma spec.</i>	Vögel	Weltweit
<i>Haemoproteus spec.</i>	Vögel	
<i>Hepatocystis kochi</i>	Affen	Ostafrika
<i>Hepatocystis brayi</i>	Nager	Südostasien
<i>Leukocytozoon caulleryi</i>	Vögel	
Filarien		
<i>Mansonella perstans</i> , <i>M. ozzardi</i> , <i>M. streptocerca</i>	Affen, Mensch	Afrika, Südamerika, Karibik
<i>Onchocerca gutturosa</i> , <i>O. gibsoni</i>	Rind	Afrika, Mitteleuropa
<i>Onchocerca reticulata</i> , <i>O. cervicalis</i>	Equiden	Nordamerika, Australien, Asien

Tab. 1: Wichtige durch Ceratopogoniden aus der Gattung *Culicoides* übertragene Krankheitserreger (Auswahl)

2.6 Wirte parasitischer Ceratopogonidae

Die Wirtsspezies der blutsaugenden Gnitzen sind nicht umfassend bekannt. Nur relativ wenige Ceratopogoniden-Arten sind auf Warmblüter spezialisiert. Hierzu gehören die meisten Arten der Gattung *Culicoides* und einige Arten der Gattung *Forcipomyia*, in manchen zoogeografischen Regionen auch Arten der Gattungen *Lasiohelea* und *Leptoconops*. Die Gnitzen beschränken sich aber nicht nur auf Menschen und Vögel, sondern akzeptieren z. T. auch andere warmblütige Wirbeltiere, zu denen neben Weidetieren, wie Rinder, Pferde, Ziegen und Schafe, auch Antilopenarten, wie z. B. Blässhöcker, Hirsche, Rehe, Waschbären sowie Nager zählen (Glukhova 1989). Über die Pathogenität der von Gnitzen übertragenen Krankheitserreger für diese Wirbeltiere und über deren Rolle als Reservoirwirte für die Erreger ist fast nichts bekannt.

Die Weibchen der meisten parasitischen Gnitzen-Arten saugen jedoch an Kaltblütern, z. B. Fröschen oder Regenwürmern. Manche Gnitzen-Arten sind aufgrund ihrer Körpergestalt und geringen Größe sogar dazu befähigt, sich an andere Insekten anzuklammern und an diesen als stationäre Ektoparasiten zu leben. Bisher wurden Vertreter z. B. an lebenden Zuckmücken (Fam. Chironomidae), Eintagsfliegen (Ord. Ephemeroptera), Netzflüglern (Ord. Neuroptera), Schmetterlingen (Ord. Lepidoptera) und Libellen (Ord. Odonata) sowie an verschiedenen toten Arthropoden-Arten beobachtet (Wirth 1956; Downes & Wirth 1981). *Forcipomyia*-Arten saugen außerdem die Hämolymphe von Arten der Gattung *Chrysopa* (Florfliege Fam. Chrysopidae) und *Atrichopogon* (Ölkäfer Fam. Meloidae). Von Ölkäfern werden Ceratopogoniden durch den verströmten Cantharidin-Duft angelockt (Frenzel 1993). Einige weitere Gnitzen-Arten haben sich auf Stechmücken (Fam. Culicidae) spezialisiert, denen sie das von Vertebraten aufgenommene Blut aus dem Verdauungstrakt entnehmen (Delécolle 1985).

Die Wirtswahl mit nachfolgender Blutaufnahme wird artspezifisch durch biotische Faktoren sowie durch eine Reihe weiterer, abiotischer Faktoren beeinflusst. Die Wirtsfindung erfolgt hauptsächlich auf olfaktorischem Weg. Indizien für die Anlockung über Duftstoffe sind das massenhafte Auftreten von *Culicoides*-Weibchen auf Arum-Blüten (Drummond et al. 1991, Drummond et al. 2003). Das verdickte Ende der

Keule strömt einen nach Harn riechenden „Duft“ aus, den viele kleine nachtaktive Insekten, vor allem Ceratopogoniden, betörend finden. Das helle Hochblatt, welches in der Dämmerung und Dunkelheit recht auffällig ist, trägt ebenfalls zur Anlockung bei. Schließlich führt die Verbrennung von Stärke in der Keule der Blüte zu einer beträchtlichen Produktion von Wärme, was auf die Gnitzen anlockend wirkt (Frenzel 1993). Duftstoffe, wie Octinol, Phenole, Amine und Cantharidine, scheinen als Attraktantien bei der Nahrungssuche, bei der Schwarmbildung der Männchen und beim Kopulationsverhalten eine wesentliche Rolle zu spielen (Frenzel & Dettner 1994).

Wie bei den Kriebelmücken (Fam. Simuliidae) wird bei den Gnitzen auch eine optische Orientierung für die Wirtsfindung diskutiert. Diverse Untersuchungen (z. B. Olbrich 1987) weisen darauf hin, dass große und dunkle Weidetiere bzw. Attrappen bevorzugt angefliegen werden. Einen nachweislichen Einfluss auf die Wirtsfindung haben auch bestimmte Habitateigenschaften wie z. B. Form, Geruch, Witterungsbedingungen sowie Wirtscharakteristika wie die physiologischen Eigenschaften der Mücken selbst. Hierbei sind das Alter der Mücke, der Ernährungszustand, Parasitenbefall und die Paarungsbereitschaft ausschlaggebend.

2.9 BTV Serotype 8 Epidemiologie 2006 ff. in Europa

BTV ist in vielen tropischen und subtropischen Ländern endemisch. In Europa blieben Ausbrüche der Krankheit bis vor wenigen Jahren sporadisch und selten. Fälle von BTD traten allerdings bereits seit 1924 auf Zypern regelmäßig auf (Gambles 1949). Davon abgesehen gab es in Europa vor 1998 nur zwei bedeutsame Ausbrüche: auf der Iberischen Halbinsel kam es zwischen 1956 und 1960 zu einem großen Ausbruch mit BTV-10, dem ungefähr 180.000 Wiederkäuer innerhalb von vier Monaten zum Opfer fielen (Manso-Ribeiro et al. 1957). Eine weitere, kleinere Epidemie mit BTV-4 ereignete sich um 1980 auf einigen griechischen Inseln (Vasalos 1980).

Letztendlich war aber eine grundlegende Änderung in der BTD-Epidemiologie in Europa zum Ende des letzten Jahrhunderts festzustellen: seit 1998 wurde das BTV wiederholt in den europäischen Mittelmeerraum eingetragen (Mellor & Wittmann

2002, Purse et al. 2005, Wilson & Mellor 2008). Es begann mit BTV-9, das 1998 auf verschiedenen griechischen Inseln nahe der türkischen Küste auftrat. Das Virus breitete sich von dort im Laufe der nächsten drei Jahre weiter nach Norden und Westen aus und erreichte das griechische Festland, Bulgarien und Italien. In Griechenland wurden im Jahr 1999 auch noch die Serotypen BTV-4 und BTV-16 nachgewiesen (Wilson & Mellor 2008). Der BTV-4 Stamm konnte als ein naher Verwandter der Stämme identifiziert werden, die in den 1960er und 1970er Jahren in der Türkei und auf Zypern nachgewiesen worden waren. Man vermutete, dass das Virus bereits seit vielen Jahren in diesen Regionen kursiert haben könnte (Breard et al. 2007). Ebenfalls 1999 traten Fälle von BTV-4 in Bulgarien auf. *Culicoides imicola* konnte zu dem Zeitpunkt weder in den Epidemiegebieten Nordgriechenlands noch in Bulgarien nachgewiesen werden (Mellor & Wittmann 2002). 2001 kam in Griechenland noch ein BTV-1 Stamm hinzu, dessen Ursprung dem Nahen Osten zugeordnet werden konnte (Mertens et al. 2007).

Anfang 2000 meldete Nordtunesien erstmals Fälle von BTV-2, wobei die Einschleppung wahrscheinlich bereits im Dezember 1999 erfolgte. Der Stamm breitete sich bis Juli nach Algerien aus und erreichte im August 2000 mit Sardinien erstmals italienisches Gebiet (Mellor & Wittmann 2002). Dort fielen der Seuche 90.000 Schafe direkt oder mittels Notschlachtungen zum Opfer. Bis Oktober breitete sich BTV-2 bis nach Sizilien und auf das südliche Festland aus. Zeitgleich erreichte das Virus außerdem Frankreich (Korsika) und Spanien (Menorca und Mallorca). Die Ausbrüche in Italien und auf den Balearen dauerten bis Dezember 2000 an. Neue Fälle traten 2001 in Korsika und Sardinien (erneut BTV-2) und in Kalabrien (erstmalig BTV-9, eventuell aus Griechenland eingeführt) auf (Mellor & Wittmann 2002). Allem Anschein nach hatte das Virus in diesen Gebieten keinerlei Schwierigkeiten zu überwintern. Im selben Jahr wurden BTD-Fälle aus Serbien, Montenegro, Kosovo, Mazedonien und Bulgarien gemeldet (Mellor & Wittmann 2002). Ein weiterer BTV-4 Stamm aus Nordafrika erreichte 2003 Menorca und führte darüber hinaus zu Ausbrüchen in Marokko (2004), auf der iberischen Halbinsel und Korsika (2004-2005) (Breard et al. 2007).

Bis 2005 kursierten also nach und nach sechs der 24 Serotypen (BTV-1, -2, -4, -8, -9 und -16) in Europa. Zwischen 1998 und 2002 starben hier 250.000 Schafe an den

Folgen einer BTV-Infektion (Baylis 2002). Daran zeigt sich, dass BTD durchaus bereits seit 1998 nicht unerhebliche landwirtschaftliche Verluste zur Folge hatte. Die BTD konnte also durchaus schon zu diesem Zeitpunkt und nicht erst mit den BTV-8 Ausbrüchen 2006 als Problem in Europa angesehen werden (Wilson & Mellor 2008).

Nach der verheerenden BTV-8 Epidemie in Europa, die 2006 ihren Anfang nahm, kamen noch weitere BTV Serotypen näher an Deutschland heran. Im Oktober 2008 trat in Holland und Deutschland erstmals der Serotyp 6 auf (Eschbaumer et al. 2010). Aus der Grafschaft Bentheim in Niedersachsen wurden 45 Fälle gemeldet. Die Quelle dieses Ausbruchs konnte nicht gefunden werden, wird aber in importiertem Vieh vermutet, welches zuvor mit diesem Stamm geimpft worden war (Eschbaumer et al. 2010). 2008 wurde eine Kuh ohne klinische Symptome in Belgien positiv auf BTV getestet. Nähere Untersuchungen ergaben, dass es sich um den Serotyp 11 handelte (De Clercq et al. 2009). Auch hier blieben die Infektionsquelle und der Weg der Einschleppung unklar (De Clercq et al. 2009).

Beunruhigend ist auch die Ausbreitung des 2001 vom Nahen Osten nach Griechenland eingewanderten BTV-1 Stammes. Dieser erreichte schließlich im Jahr 2006 Sardinien und Spanien (Mertens et al. 2007). 2007 kam es zu Ausbrüchen in Portugal, Spanien und später in dem Jahr auch in Südfrankreich (Kampen & Werner 2010). Im darauffolgenden Jahr traten wiederum Fälle von BTV-1 in Nordspanien und Frankreich auf. Massive Impfungen reduzierten die gemeldeten Ausbrüche in 2009 auf ein Minimum, trotzdem ist eine beunruhigende Wanderung dieses Stammes nach Norden zu beobachten.

3 Entomologisches Monitoring

3.1 Durchführung des Entomologischen Monitorings

Die Durchführung des Entomologischen Monitorings in Deutschland erfolgte gemäß dem vereinbarten Studienprotokoll vom 23.04.2007 im Zeitraum vom 31.03.2007 bis 31.05.2008. Detaillierte Angaben zum Ablauf sowie der Ergebnisse liegen im Abschlußbericht zum Projekt 08HS044 „Entomologische Untersuchungen zur Bekämpfung der Blauzungenkrankheit“ vor.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zur Molekularbiologie des Gnizenmaterials basieren hauptsächlich auf den im Monitoring gewonnenen Daten. Zusätzliche Fänge wurden in den Bundesländern Brandenburg, Hessen, Mecklenburg-Vorpommern, Nordrhein-Westfalen, Sachsen sowie Thüringen realisiert.

3.2 Teilnehmende Betriebe und Fallenstandorte

Detaillierte Angaben zum Ablauf sowie der Ergebnisse liegen im Abschlußbericht zum Projekt 08HS044 „Entomologische Untersuchungen zur Bekämpfung der Blauzungenkrankheit“ vor.

3.3 Allgemeine Fangmethodik und Wetterdatensammlung

Alle teilnehmenden Landwirte wurden vor Projektbeginn von den jeweils betreuenden Arbeitsgruppen aufgesucht und im persönlichen Gespräch in die Benutzung der Fallen und die Handhabung der Fänge eingewiesen. Sie erhielten das notwendige Equipment (Alkohol, Versandgefäße, Versandtaschen etc.), eine bebilderte Anweisung zum Betrieb der Fallen und zur weiteren Probenbehandlung sowie die Kopie des Fallenhandbuches der Firma BIOGENTS.

Als Fixationsmedium für gefangene Gnizen wurde mit Petrolether vergällter 70-75 %iger Alkohol (Ethanol 642 MEK) oder Isopropanol verwendet. Diese beeinflussen nach einem Vorversuch die Stabilität der Culicoides-RNA/-DNA nicht negativ (Bericht Dr. B. Hoffmann, FLI Riems vom 6.5.2007). Als Fixationsmedium bzw.

Aufbewahrungsmedium für gefangene Gnitzen wurde mit Methylethylketon vergällter 70–75 %iger Alkohol (Ethanol 642 MEK) oder Isopropanol verwendet.

Jede Lichtfalle wurde von den AG am Anfang jeden Monats meist für 7 Nächte (1./2. – 7./8. Tag) aktiviert. Wenn eine Lichtfalle in der einen oder anderen Nacht versagte, wurde die Nacht an die jeweilige Fangperiode angehängt, um einen siebentägigen Fangzeitraum zu gewährleisten. Die Lichtfallen wurden in der ersten Fangperiode (30.3.-7.4.2007) nur an deren Ende einmal („Wochenfangprobe“), mit Beginn der zweiten Fangperiode (Mai 2007) bis zum Studierende aber während der Fangperioden täglich („Tagesfangproben“) geleert.

3.4 Material

Im Rahmen des Entomologischen Monitorings sowie in der Beprobung der zusätzlicher Standorte in dem restlichen Gebiet Deutschlands wurden Mücken der Gattung *Culicoides* gewonnen und auf Arten-Komplex Ebene vorsortiert. Dabei wurden für die Grobsortierung folgende Zuordnungen berücksichtigt:

Culicoides pulicaris Gruppe

Culicoides obsoletus Gruppe

Gattung *Culicoides* „Rest“

Die so vorsortierten Mücken wurden einer morphologischen Feinbestimmung unterzogen. Zur Artbestimmung wurden neben den Weibchen auch die Männchen berücksichtigt. Um eine später eventuell nötige Überprüfung der morphologischen Vorbestimmung möglich zu machen, wurden vor der molekularbiologischen Aufarbeitung Kopf, Flügel und bei männlichen Exemplaren die Genitalien abpräpariert und in 75% Ethanol aufbewahrt.

4 Methodik

4.1 Morphologie und Identifizierung – allgemeine Einführung

Klassischerweise erfolgt die Artbestimmung einzelner *Culicoides*-Exemplare anhand morphologischer Merkmale. Zur Grobdifferenzierung dienen in erster Linie die charakteristischen Muster auf den Flügeln der Imagines (Rawlings 1996, Goffredo &

Meiswinkel 2004). Für eine weitere morphologische Identifizierung bieten sich die Genitalien an, die aber präpariert werden müssen. Männchen können dadurch zwar eindeutig angesprochen werden, sind aber in Freilandfängen selten vorhanden. Außerdem sind sie nicht hämatophag und spielen daher auch als Vektoren keine Rolle, so dass ihre Artzugehörigkeit nicht mit eventuellen Virusnachweisen korreliert werden könnte.

Eine eindeutige Bestimmung der Spezies mit rein morphologischen Mitteln ist bei nah verwandten Arten oder Zwillingarten oft schwer bis unmöglich. Um z. B. zwischen *C. obsoletus* s.s. und *C. scoticus* zu unterscheiden, benötigt man entweder Männchen zur Präparation der Genitalien, oder man muss bei den Weibchen die Breite zwischen den die Genital-Öffnung umgebenden Chitin-Platten, die Länge und Breite der Spermathecae 1 sowie die Länge der Spermathecae 2 bestimmen (Augot et al. 2010). Auf diese Weise gestaltet sich die Identifizierung der einzelnen *Culicoides*-Exemplare aus Freilandfängen zeitaufwändig und oft außerordentlich schwierig.

Daher versuchen seit Einschleppung der BTM nach Europa einige Arbeitsgruppen eine zuverlässige Identifizierung der Gattung *Culicoides* auf molekularbiologischer Ebene zu etablieren und die Methoden zur Identifizierung der europäischen Gnizen-Arten zu verbessern. Es sind bereits einige, auf einer Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction – PCR) basierende Ansätze entwickelt worden. Linton et al. (2002) und Dallas et al. (2003) konzentrierten sich auf *C. imicola*, die in Deutschland nicht vorkommt. Pagès et al. (2005) beschreiben die Differenzierung von zwei Arten des *C. obsoletus*-Komplexes. Die gleiche Arbeitsgruppe beschäftigte sich einige Jahre später zusätzlich mit der Unterscheidung kryptischer Spezies bei *C. pulicaris*, *C. newsteadi* und *C. fagineus* (Pagès et al. 2009). Die britische Arbeitsgruppe um Nolan et al. (2007) entwickelten PCR-Identifizierungstests für jeweils mehrere Mitglieder der *C. obsoletus*- und *C. pulicaris*-Komplexe. Schwenkenbecher et al. veröffentlichten 2009 eine Multiplex-PCR zur Unterscheidung von *Culicoides* Larven. Dabei konzentrierten sie sich ebenfalls auf verschiedene Arten der beiden Komplexe.

Eine weiteres Verfahren zur Identifizierung von Gnitzen-Spezies wird aktuell mittels MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry) entwickelt. Diese Methode vereint die Matrix-unterstützte Desorption/Ionisation und die Flugzeitanalyse und diente ursprünglich zur Massenanalyse von chemischen Verbindungen. Fenselau und Demirev (2001) nutzten diese Möglichkeit erstmals zur Charakterisierung von Bakterien. Die Protokolle wurden weiterentwickelt, etabliert und letztendlich auch für Insekten (Campbell 2005, Perera et al. 2005) und Fische (Mazzeo et al. 2008) genutzt. Kaufmann et al. (2011) benutzten dieses System um im Labor gezüchtete *C. nubeculosus* zu identifizieren. Das erhaltene Profil von *C. nubeculosus* unterschied sich vom Vergleichsmaterial *Forcipomyia* sp. und *Aedes japonicus japonicus*. Allerdings führte in den hämatophagen Gnitzen-Weibchen enthaltenes Blut zu einer Intensitätsreduktion des Signalmusters, so dass die Abdomen solcher Tiere vor der Analyse entfernt werden sollten.

4.2 Morphologische Differenzierung des Materials - Artbestimmung

Für das entomologische Monitoring war die Bearbeitung der Rückstellproben der Gnitzen eine wesentliche Voraussetzung, um konkrete Aussagen zur Vektorrolle der in Frage kommenden Arten und aussagekräftige Rückschlüsse auf Artniveau auf BTV positive Mücken zu treffen.

Für die klassische taxonomische Bearbeitung war es notwendig, die Mücken ca. 24h zu mazerieren, um Muskelanteile und Fettgewebe zu eliminieren. Dieser Arbeitsschritt beinhaltet, dass jede einzelne Mücke im Labor unter dem Binokular den Probenröhrchen entnommen, in separate, etikettierte Gefäße überführt und für 24 h in Phenolalkohol gelagert werden musste. Die so aufbereiteten Mücken wurden präpariert d.h. die zur Bestimmung morphologisch relevanten Strukturen (Genitalien, Palpen, Beinreihen, Antennen, Flügel) wurden vom Habitus der Mücke getrennt und auf einem Objektträger in Phenolkanadabalsam eingebettet. Diese Präparation ist besonders zeitaufwändig, da sich die für die Bestimmung wichtigen Merkmale an verschiedenen Körperteilen befinden (z.T. Thorax mit Flügeln, Abdomen, Kopf) und nicht aus jeder Perspektive und nur bei stärkerer Vergrößerung zu erkennen sind.

Von jeder Mücke mussten die für die Bestimmung relevanten Körperteile einzeln in bestimmter Position und in definierten Bereichen des Objektträgers in bestimmten Positionen ausgerichtet werden. Dieses Vorgehen ist die Voraussetzung dafür, dass die Merkmale bei starker Vergrößerung erkannt und verglichen werden können. Die einheitliche Handhabung sichert bei der Bearbeitung umfangreicherer Mengen die Vergleichbarkeit aus der gleichen Perspektive. Die Ausrichtung der in Kanadabalsam unter dem Binokular eingebetteten Körperteile der Mücken auf dem Objektträger muss i.d.R. unter dem Mikroskop kontrolliert werden.

Für die dauerhafte Aufbewahrung ist die Trocknung der Präparate in einem Trockenschrank in Abhängigkeit der Temperatur und Luftfeuchtigkeit über 1-2 Tage notwendig. Die kontinuierliche Austrocknung bedingt den blasenfreien Einbettungs- und Härteprozess.

4.2.1 Genitalien (Männchen) der häufigsten *Culicoides*- Arten

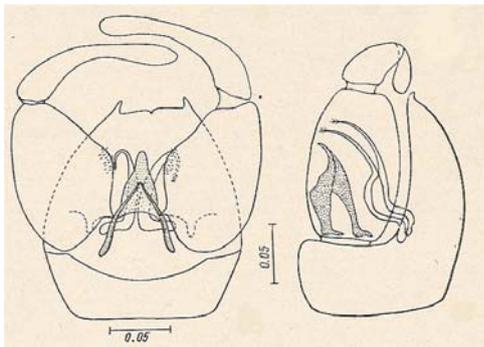


Abb. 6: Genital Männchen
C. pulicaris

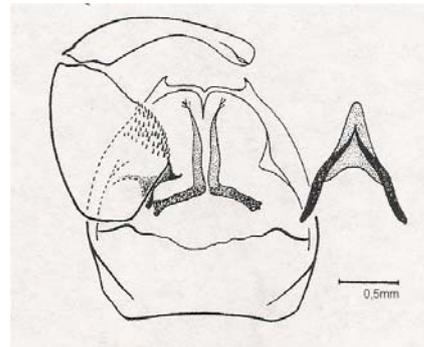


Abb. 7: Genital Männchen
C. punctatus

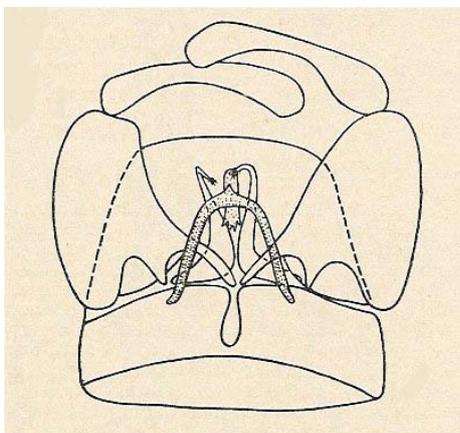


Abb. 8: Genital Männchen
C. obsoletus

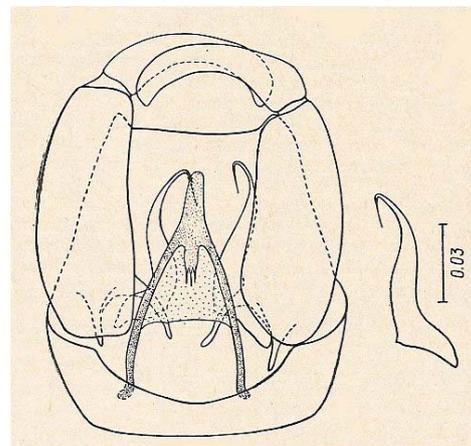


Abb. 9: Genital Männchen
C. chiopterus

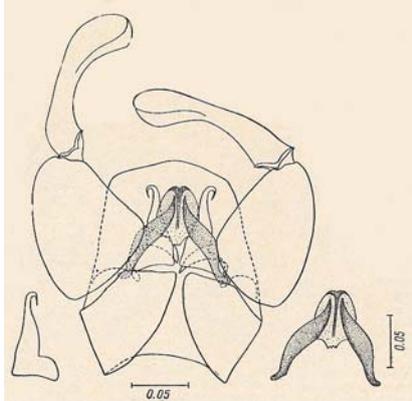


Abb. 10: Genital Männchen
C. scoticus

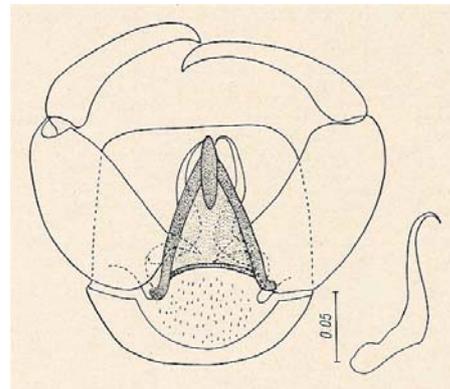


Abb. 11: Genital Männchen
C. dewulfi

4.2.2 Antennenausprägung der häufigsten *Culicoides* – Arten



Abb. 12:
Antenne
C. pulicaris

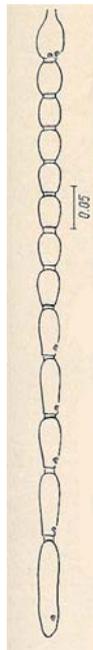


Abb. 13:
Antenne
C. punctatus

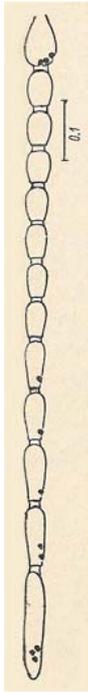


Abb.14:
Antenne
C. obsoletus

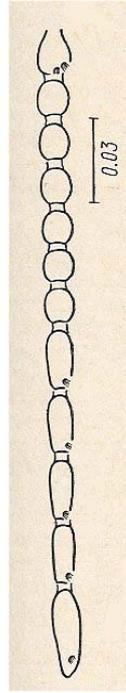


Abb. 15:
Antenne
C. chiopterus

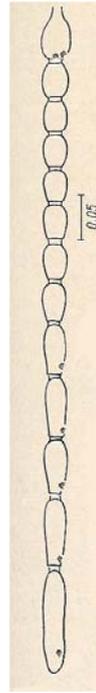


Abb. 16:
Antenne
C. scoticus

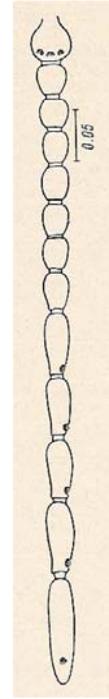


Abb. 17:
Antenne
C. dewulfi

4.2.3 Palpenausbildung der häufigsten *Culicoides* - Arten

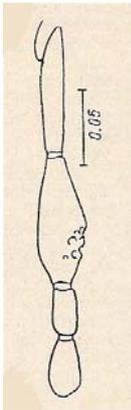


Abb. 18:
Palpen
C. pulicaris

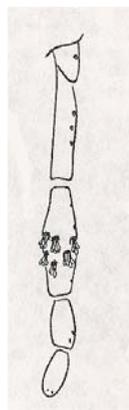


Abb. 19:
Palpen
C. punctatus

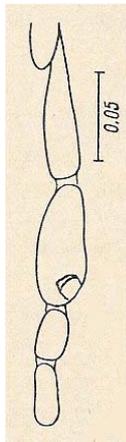


Abb. 20:
Palpen
C. obsoletus

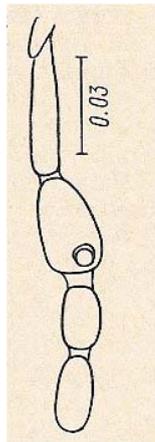


Abb. 21:
Palpen
C. chiopterus

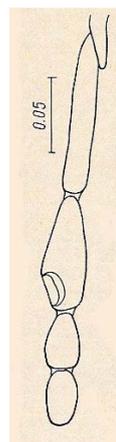


Abb. 22:
Palpen
C. scoticus

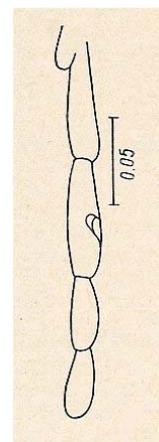


Abb. 23:
Palpen
C. dewulfi

4.2.4 Spermathekenausbildung der häufigsten *Culicoides*-Arten

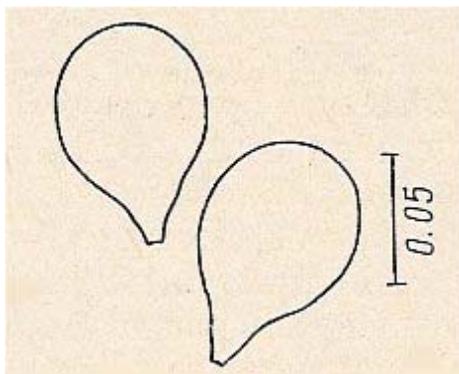


Abb. 24: Spermathek *C. pulicaris*

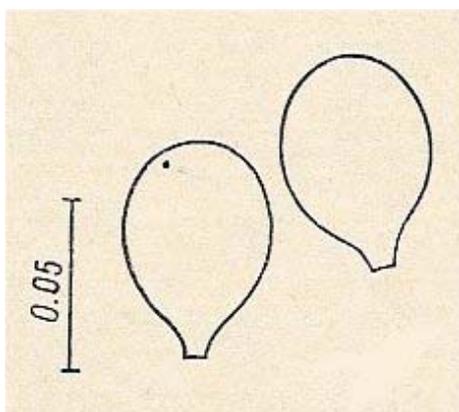


Abb. 25: Spermathek
C. obsoletus

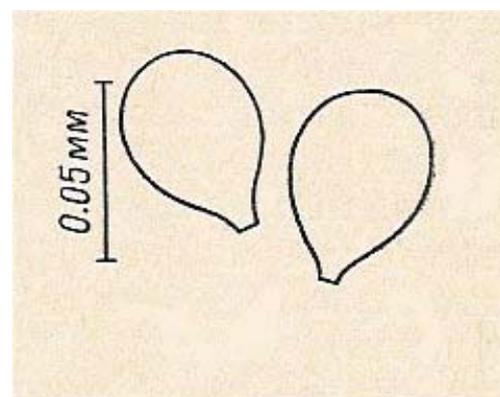


Abb. 26: Spermathek
C. chiopterus

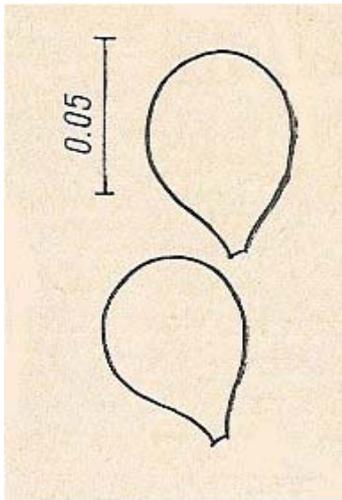


Abb. 27: Spermathek
C. scoticus

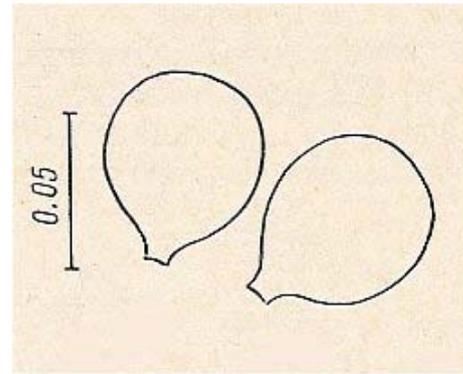


Abb. 28: Spermathek
C. dewulfi

4.3 Herstellung von Dauerpräparaten

Für die taxonomische Bearbeitung ist es notwendig, die Mücken in Dauerpräparaten für eine Feindiagnose aufzubereiten. Hierfür werden die Tiere ca. 24h mazeriert, um Muskelanteile und Fettgewebe zu eliminieren.

Die so aufgehellten Mücken werden präpariert, d.h. die zur Bestimmung morphologisch relevanten Strukturen vom Habitus der Mücke getrennt und dann jeweils auf Objektträgern in Phenol-Kanadabalsam eingebettet. Unerlässlich sind hierbei die Feinpräparation einer Beinreihe, der Antennen, Palpen, Flügel und Genitalien der Tiere, wo die für die Artidentifizierung wichtigen Merkmale zu finden sind.

Der Arbeitsschritt der Präparation umfasst zunächst die Umbettung jedes einzelnen Tieres in ein Präparationsgefäß oder auf einen für die Präparation geeigneten Objektträger. Jede einzelne Mücke muss dabei unter dem Binokular in normierter Form präpariert werden. Diese Präparation ist besonders zeitaufwändig, da sich die an verschiedenen Körperteilen befinden (z.T. Thorax mit Flügeln, Abdomen, Kopf) und nicht aus jeder Perspektive und nur bei starker Vergrößerung zu erkennen sind.

Von jeder Mücke müssen deshalb die für die Bestimmung relevanten Körperteile einzeln in bestimmter Position ausgerichtet werden. Dieses Vorgehen ist die Voraussetzung dafür, dass die Merkmale bei starker Vergrößerung erkannt und

verglichen werden können. Die einheitliche Positionierung sichert bei der Bearbeitung umfangreicherer Mengen die Vergleichbarkeit aus der gleichen Perspektive. Die Ausrichtung der in Kanadabalsam unter dem Binokular eingebetteten Körperteile der Mücken auf dem Objektträger muss i.d.R. unter dem Mikroskop kontrolliert werden.

Für die dauerhafte Aufbewahrung ist die Trocknung der Präparate in einem Trockenschrank in Abhängigkeit der Temperatur und Luftfeuchtigkeit über 1-2 Tage notwendig. Die kontinuierliche Austrocknung bedingt den blasenfreien Einbettungs- und Härteprozess.

4.4 Phylogenie

Bei *C. imicola*, *C. obsoletus* und *C. pulicaris* handelt es sich um Artenkomplexe, die aus mehreren nah verwandten Spezies (Zwillingsarten) bestehen. Man geht davon aus, dass Zugehörige eines solchen Komplexes und morphologisch sehr ähnliche Spezies, Nachkommen von Populationen sind, die vormals einer einzigen Art angehörten. Diese drifteten auseinander und wurden über einen längeren Zeitraum durch verschiedene Mechanismen, die den Gen-Fluss begrenzten, reproduktiv isoliert. Auf diese Weise separiert sie sich im Hinblick auf die meisten Merkmale voneinander (Tabachnik & Black 1995).

Aufgrund der morphologischen Merkmale kann man davon ausgehen, dass der *C. imicola*-Komplex in Südafrika aus mindestens 10 Spezies besteht (Meiswinkel 1989, 1991, 1992, 1995; Meiswinkel & Braack 1994). Untersuchungen in Italien ergaben, dass sich der *C. obsoletus*-Komplex aus mindestens sechs und der *C. pulicaris*-Komplex aus mindestens zwölf Arten zusammensetzen scheint (Goffredo & Meiswinkel 2004). Laut der Auffassung von Campbell und Pelham-Clinton (1960) umfasste der *C. obsoletus*-Komplex ursprünglich auch die morphologisch ähnliche Art *C. dewulfi*. Schwenkenbecher et al. kamen 2008 nach der Analyse von Sequenzdaten drei unterschiedlicher Genomregionen jedoch zu dem Schluss, dass *C. dewulfi* eine klare phylogenetische Klade zwischen dem *C. obsoletus*-Komplex und *C. imicola* bildet.

Pagès et al. (2009) untersuchten den Subgenus *Culicoides* in Katalonien genauer und entdeckten dabei verschiedene Kryptospezies. Dabei handelt es sich um Arten, die morphologisch nicht unterscheidbar, aber reproduktiv isoliert sind. Die Arbeitsgruppe fand neue, nicht-beschriebene Arten, welche sich in drei Komplexe morphologisch gleicher Spezies eingliederten. Sie beschrieben jeweils zwei Kryptospezies bei *C. fagineus* und *C. pulicaris*, welche nah verwandt sind, und drei Kryptospezies bei *C. newsteadi*, deren Verwandtschaft mehr auseinander liegt.

5 Artidentifizierung mittels konventioneller PCR

5.1 Allgemeine Einführung

Obwohl durch die Impfkampagne die Zahl der neuen BTD-Fälle erheblich reduziert werden konnte und Wirbeltierwirte, die eine Infektion überstanden haben, ein natürliche Immunität gegen das Virus entwickeln (FLI 2011), ist die Gefahr dieser Krankheit noch lange nicht gebannt. Es ist damit zu rechnen, dass mit dem Wegfall der Impfpflicht die Impfabdeckung sinken wird. Betrachtet man die durchschnittliche Haltungsdauer, dann werden pro Jahr 20 bis 25% der Rinder und 16 bis 20% der Schafe ausgetauscht. Würde gar nicht mehr geimpft werden, ergäbe sich nach vier bis fünf Jahren eine neue, nichtimmunisierte Population ergeben (FLI 2008). Das Risiko eines erneuten BTV-8 Ausbruches ist nach wie vor hoch, und andere Serotypen (wie zum Beispiel BTV-6) sind weiter auf dem Vormarsch Richtung Deutschland. Es ist wichtig für den Fall eines erneuten Auftretens der Krankheit, besser vorbereitet zu sein und schnell und effektiv mit gezielten Gegenmaßnahmen zu reagieren oder sogar im Vorfeld durch Vektorkontrolle einem Ausbruch vorzubeugen.

Beispielsweise ist ein wesentlicher Punkt der Seuchenbekämpfung die Entwesung, also die Vernichtung der tierischen Schädlinge. Diese Maßnahme dient dazu die Vektorenkette zu unterbrechen (Freise 2011). Dafür sollten die Vektoren zunächst bekannt und auch methodisch schnell identifizierbar sein. Welche Gnizen-Arten das BTV in Deutschland übertragen, ist nach wie vor unklar, aber einige vielversprechende Kandidaten wurden bereits erkannt und werden weiter untersucht. Voraussetzung für weitere Forschungen an der Gnizenfauna Deutschlands ist eine

schnelle und einfache Methode zur Spezies-Identifizierung. In Europa herrscht ein Mangel an Entomologen, die dazu fähig sind, die verschiedenen Gnitzen-Spezies morphologisch fehlerfrei zu identifizieren (Cetre-Sossah et al. 2008). Aus diesem Grund wird bereits an Alternativen zur konventionellen morphologisch-taxonomischen Methodik gearbeitet, um eine schnelle und effektive Unterscheidung von Einzeltieren vornehmen zu können. Allerdings sind die bisher existierenden molekularbiologisch-diagnostischen Methoden noch nicht ausgereift. Insbesondere die korrekte Identifizierung von *C. scoticus* erzeugt Schwierigkeiten. Ebenso können nicht alle PCR-Systeme uneingeschränkt auf die Gnitzenfauna Deutschlands übertragen werden. Daher ist die Verbesserung eines solchen PCR-Systems bzw. eine Neuentwicklung einer PCR, die auch auf die endemischen Gnitzenarten angewendet werden könnte, unbedingt erforderlich.

PCR-Testsysteme zur Differenzierung von nah verwandten, isomorphen Spezies (inkl. Zwillingarten) wurden bereits an anderen Insektengruppen, insbesondere an den Stechmücken (Fam. Culicidae), etabliert (z.B. Scott et al. 1993; Proft et al. 1999; Koekemoor et al. 2002). Als Zielregionen dienen im Allgemeinen nicht-translatierte Regionen (Internal Transcribed Spacer – ITS) der ribosomalen DNA (rDNA) und mitochondriale DNA (mtDNA). Diese Regionen sind interspezifisch relativ variabel in ihrer Nukleotidsequenz, intraspezifisch aber relativ konserviert (Caterino et al. 2000).

5.1.1 Cytochromoxidase Untereinheit I und Internal Transcribed Spacer 2

Die mtDNA bietet den Vorteil, dass sie ausschließlich maternal vererbt wird. Dadurch kann keine Rekombination stattfinden, die unerwartete Sequenzpolymorphismen zur Folge haben könnte. Lediglich kleine Veränderungen der DNA, verursacht durch externe Einflüsse, wie z.B. das Klima oder Replikationsfehler, sind möglich. Das mitochondriale Gen der Cytochromoxidase Untereinheit I (COI) wird häufig für phylogenetisch-taxonomische Untersuchungen und Identifizierungszwecke verwendet. Obwohl es als Bestandteil der Atmungskette eine wichtige Rolle in höheren Organismen einnimmt, verfügt es trotzdem über eine ausreichend hohe interspezifische Nukleotidvariabilität (Lunt et al. 1996). Die COI ist das größte und am meisten konservierte proteinkodierende mitochondriale Gen in Insekten (Dobler & Farrell 1999). Da die Mutationsrate von mtDNA allgemein hoch ist, unterscheidet sich

die mtDNA von Individuen derselben Art wesentlich weniger als die mtDNA von Individuen unterschiedlicher Arten. Aus diesem Grund wird die COI auch für das Barcoding - eine taxonomische Methode der Artbestimmung durch DNA-Sequenzanalyse eines Markergens der mtDNA - verwendet (Steinke & Brede 2006). Trotzdem könnte horizontaler Gentransfer, eine Übertragung von Genen außerhalb der geschlechtlichen Fortpflanzung und über Artgrenzen hinweg, das Ergebnis verfälschen. Damit beschäftigten sich Hurst und Jiggins (2005). Sie untersuchten den Effekt maternal ererbter Symbionten, die bei Arthropoden weit verbreitet sind. Zum Beispiel benötigen viele Aphidenarten das Bakterium *Buchnera* für die Synthese essentieller Aminosäuren. Diese Symbionten können unter Umständen Effekte (wie Reduktion der Diversität oder Veränderungen der Variation) auf die mtDNA ausüben. Hurst und Jiggins (2005) empfehlen daher, mtDNA nicht als einzigen Marker in phylogenetischen Studien zu verwenden.

Maternal vererbte Gene haben auch den Nachteil, dass sie keine Informationen über eine mögliche Hybridisierung oder Introgression (Einführung bestimmter genetischer Eigenschaften aus fremdem Erbgut durch wiederholte Rückkreuzung von Hybriden mit deren Elternarten) tragen. Eine Integration von mtDNA in das nukleäre Genom könnte ebenfalls auftreten (mitochondrial pseudogenes = numts). Diese Pseudogene können bei der Verwendung von konservierten Primern zusammen mit den eigentlichen mitochondrialen Regionen amplifiziert werden (Zhang & Hewitt 1996; Bensasson et al. 2001), was die Analyse verfälschen könnte. In jedem Fall ist es ratsam bei phylogenetischen Untersuchungen noch einen weiteren Marker neben der mtDNA zu betrachten.

Die rDNA in Eukaryonten besteht aus hunderten von tandemartig wiederholten Gengruppen, welche aus nicht-kodierenden sowie den kodierenden Abschnitte 5.8S, 18S und 28S bestehen und durch DNA-Regionen mit höherem GC-Gehalt, den sogenannten Spacern, voneinander getrennt sind. Die Spacer werden nach ihrem Transkriptionsverhalten unterschieden. Die Gene sind in der DNA abwechselnd in vielen Kopien als hintereinanderliegende Blöcke angeordnet. Innerhalb eines solchen Blocks (Repeat) sind die 18S-, 5.8S- und 28SRNA in jeweils gleicher Reihenfolge zu finden. In diesen Tandem-Repeats sind sowohl variable als auch hochkonservierte Regionen enthalten. Die ITS2-Region trennt die 5.8S und die 28S rRNA-Gene einer

Transkriptionseinheit. Wie die COI-Region ist auch die ITS2-Region bereits bei anderen Insektengruppen gut untersucht und im Bereich der Taxonomie und zur Artdifferenzierung genutzt worden (z.B. Depaquit et al. 2000, Thanwisai et al. 2006, Dassanayake et al. 2008). Der rDNA-Gehalt ist für verschiedene Organismen unterschiedlich, z.B. machen beim Menschen etwa 0,4% des Genoms rDNA-Gene aus und bei *Drosophila melanogaster* circa 17%.

Auf DNA-Ebene trennen zwei ITS die einzelnen ribosomalen Untereinheiten im Repeat, welche von einem External Transcribed Spacer (ETS) angeführt werden. Manchmal gibt es am Repeat-Ende auch ein ETS. Die Non-Transcribed Spacer (NTS) trennen die vielen Wiederholungseinheiten, in denen die rRNA-Gene vorliegen (Abb. 29). Die rRNAs machen 90% der Gesamt-RNA der Zelle aus.

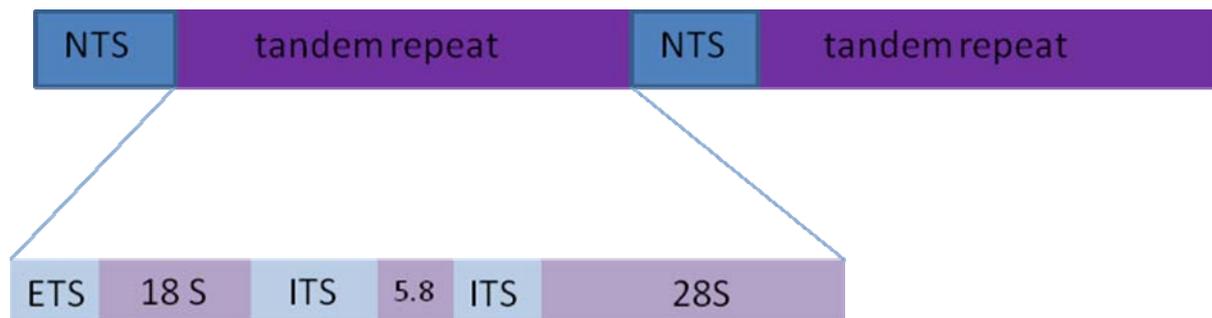


Abb. 29: ITS2: Aufbau der Transkriptionseinheiten und deren tandemartige Anordnung

5.1.2 Multiplex-PCR Grundlagen

Der Grundstein für die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction = PCR) wurde 1986/ 1987 entwickelt. Sie dient der *in vitro* Amplifizierung spezifischer DNA-Fragmente (Mullis et al. 1986, Mullis & Faloona 1987) und ist seitdem zu einer wichtigen Komponente in allen Bereichen von Forschung und Diagnostik geworden.

Im Gegensatz zur konventionellen PCR werden bei einer Multiplex-PCR mehrere Primer in einem Ansatz verwendet, darunter mindestens ein forward und ein reverse Primer, so dass entweder simultan verschiedene Zielregionen oder – bei unbekannter DNA – je nach Primer-Annealing eine bestimmte Region in einer Reaktion amplifiziert werden können (Abb. 30). Die Methode wurde erstmals 1988 von Chamberlain et al. beschrieben wurde. Es lassen sich damit z.B. chromosomale Aberrationen nachweisen oder Deletionen, Insertionen, Punktmutationen innerhalb eines Genoms detektieren (Edwards & Gibbs 1994). Außerdem kann die Methode zur Spezies-Identifizierung bei verschiedenen Organismen genutzt werden (z.B. Geha et al. 1994, Proft et al. 1999, Jannotti-Passos et al. 2006, Vasileiadou et al. 2009, Wicht et al. 2010, Shin et al. 2010).



Abb. 30: Prinzip der Multiplex-PCR

Detaillierte Kenntnisse über die Sequenz der ausgewählten Loci sind dabei entscheidend, da es sonst zu unspezifischen Amplifikationen von anderen Fragmenten gleicher Sequenz kommen kann (Chamberlain et al. 1991). Für die Auswahl der Zielregionen bei der Erstellung speziesspezifischer Primer gibt es zwei grundlegende Prinzipien: Zunächst muss man die DNA-Region im Zielbereich auffindig machen, an der die Primer hybridisieren, aber keine Amplikons mit Nicht-Zielregionen bilden, also keine unspezifische Bindung stattfindet (Jarman et al. 2004). Die Primer-Spezifität wird in erster Linie an den letzten Nukleotiden des 3'-Endes bestimmt, so dass eine einzige Änderung am 3'-Ende des Primers eine Amplifikation verhindern kann. Weitere Unterschiede in der Sequenz von Zielregion und potentiellen Nicht-Zielregionen reduzieren die Wahrscheinlichkeit nicht gewollter Vervielfältigung bzw. eines falsch positiven Ergebnisses (Hare et al. 2000). Des Weiteren müssen die Amplikons so gewählt werden, dass das Produkt genug Informationen bietet, um die Spezies voneinander unterscheiden zu können (Jarman

et al. 2004). Fragmente, die alle eine unterschiedliche Größe aufweisen und im Anschluss mittels herkömmlicher Gelelektrophorese aufgetrennt werden können, erleichtern diese Unterscheidung (Larsen et al. 2005).

Ziel des Forschungsvorhabens war es u.a. Spezies-spezifische Primer zu entwickeln, die zur Identifizierung endemischer Gnizenarten genutzt werden können. Für die Zwillingsarten des *C. obsoletus*-Komplexes (unter Einbeziehung von *C. dewulfi*) und des *C. pulicaris*-Komplexes, die ja als potenzielle Überträger des BTV in Deutschland eine besondere Stellung einnehmen, sollte basierend auf COI-Sequenzen jeweils eine Multiplex-PCR etabliert werden. Die zuvor erfolgte morphologische Feinbestimmung der Gnizen galt als Standard für die Spezifität der zu konstruierenden PCR-Primer. Die PCR-Tests sollten in Blindversuchen an morphologisch vorbestimmtem frischem Freiland-Material evaluiert und optimiert werden.

5.1.3 Phylogenetische Untersuchung

Bislang dienten Sequenzanalysen bei *Culicoides*-Arten oft ausschließlich dem Zweck der Entwicklung einer schnellen Identifizierungsmethode. Es wurde weniger Augenmerk auf die phylogenetischen Beziehungen der Spezies gelegt. Eine gute Kenntnis über die exakte Phylogenie der Spezies *Culicoides* kann aber auch im Zusammenhang mit der BTV-Übertragung von Nutzen sein, da verwandte Arten auch ähnliche Übertragungsmechanismen entwickeln können (Schwenkenbecher et al. 2008). Deshalb sollen die im Zuge dieser Arbeit gewonnenen Sequenzdaten auch zur phylogenetischen Analyse der Gattung *Culicoides* genutzt werden und Verwandtschaftsverhältnisse unter den Arten weiter aufklären. Zusätzlich zu den einheimischen Spezies wurden *C. imicola* und *C. flavipulicaris* aus Spanien ergänzend als Vergleich hinzugezogen.

Morphologische Variationen können grundsätzlich nicht dazu genutzt werden, um eine evolutionäre Distanz abzuschätzen und erlauben somit keine Rückschlüsse auf die phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse einzelner Spezies (Edwards 1939; Downes & Kettle 1952; Khalaf 1954; Fox 1955). Dafür konnten im Bereich molekularer Systematik im letzten Jahrzehnt große Fortschritte gemacht werden, wobei sich die Aufmerksamkeit dabei auf eine kleine Auswahl an Genen richtete –

mtDNA und rRNA Gene (Hillis & Moritz 1990; Miyamoto & Cracraft 1991). In der Insekten-systematik stammen die meistgenutzten Marker ebenfalls aus diesen Regionen. Ribosomale DNA wurde bereits oft und erfolgreich für phylogenetische Untersuchungen sowohl eng als auch entfernt verwandter Organismen verwendet (Coleman 2007). Da die Spacer ITS1 und ITS2 schneller evolvieren als die kodierenden Sequenzen bilden sie einen guten Ausgangspunkt für die Analyse von phylogenetischen Verwandtschaften innerhalb von Arten-Komplexen (Coleman 2007).

Normalerweise zeigt die COI-Region ein gutes phylogenetisches Signal, was bedeutet, dass die Verteilung der Sequenzpolymorphismen ausreicht, um die Mehrzahl der Arten unterscheiden zu können. Wenn die Arten allerdings zu jung sind, kann es passieren, dass sie sich hinsichtlich der COI noch nicht ausreichend unterscheiden (Steinke & Brede 2006). Des Weiteren handelt es sich hier aufgrund der Vererbung um einen Marker historischer Prozesse in Weibchen. Für den Fall, dass sich die Geschichte von Männchen und Weibchen innerhalb einer Spezies unterscheiden würde, könnte der COI-Marker das nicht reflektieren (Hurst & Jiggins 2005). Aus diesem Grund wurde für diese Arbeit hinsichtlich der Phylogenie neben COI noch ein zweiter Marker (ITS2) für die Betrachtung hinzugezogen.

5.1.4 DNA-Extraktion aus Einzel-Gnitzen

Zur Extraktion der DNA wurden zwei Kits unterschiedlicher Firmen verwendet: das DNeasy Blood & Tissue Kit von Qiagen und das innuPREP DNA Mini Kit von Analytikjena. Ein Teil der Proben wurde während eines Volontariats am FLI Riems bearbeitet. Dort wurde für die Extraktion das Viral DNA/RNA Isolation Kit von Macherey-Nagel (NucleoSpin 96 Virus Core Kit 4x96 preps) benutzt.

5.1.5 DNA-Extraktion mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit von Qiagen

Das Insekt wird in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß platziert. Es werden 180 µl PBS (pH 7,2) hinzugefügt, und mittels eines Microtube-Pistills wird die Probe homogenisiert. Anschließend werden 20 µl Proteinase K und 200 µl Puffer AL dazu pipettiert, sofort

gut gemischt (vortexen) und auf einem Heizblock bei 56°C für ca. 10 min inkubiert. Dann werden 200 µl Ethanol (96%) zur Probe gegeben und wieder gut vorgetext. Ein DNeasy Mini Spin Column wird in einem 2 ml Sammelgefäß platziert, die Mischung inklusive jeglichen Präzipitats in das DNeasy Mini Spin Column gefüllt und für 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Das DNeasy Mini Spin Column wird in ein neues Sammelgefäß überführt (das alte samt Eluat verwerfen) und 500 µl Puffer AW1 hinzugefügt. Anschließend bei 8000 rpm für 1 min zentrifugieren und das Sammelgefäß samt Eluat verwerfen. Das DNeasy Mini Spin Column wird in ein neues Sammelgefäß überführt, 500 µl Puffer AW2 hinzugefügt und für 3 min bei 14 000 rpm zentrifugiert um die Membran zu trocknen und jegliche Ethanol-Reste zu entfernen. Danach wird das DNeasy Mini Spin Column in einem 1,5ml Reaktionsgefäß platziert, 200 µl Puffer AE oder steriles Wasser werden direkt auf die Membran pipettiert. Alles wird für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann für 3 min bei 8000 rpm eluiert.

5.1.6 DNA-Extraktion mittels innuPREP DNA Mini Kit von Analytikjena

Die Gnitze wird in 200 µl Lysis Lösung TLS mittels eines sauberen Microtube-Pistills homogenisiert. Es werden weitere 200 µl Lysis Lösung TLS und 25 µl Proteinase K hinzugefügt und sofort gründlich gemischt (vortexen). Die Mischung wird bei 50°C für ca. 20 min inkubiert. Es werden 400 µl Binding Lösung TBS zur lysierten Probe pipettiert und vorsichtig gemixt. Ein Spin Filter wird in ein 2 ml Sammelgefäß gesetzt, die Mischung auf den Filter appliziert und bei 12000 rpm für 2 min zentrifugiert. Das Eluat wird verworfen. Auf den Spin Filter werden 500 µl Waschlösung HS gegeben und bei 12000 rpm für 1 min zentrifugiert. Das Eluat und das Sammelgefäß werden verworfen. Auf den Spin Filter werden nach Überführung in ein neues Sammelgefäß 750 µl Waschlösung MS gegeben und bei 12000 rpm für 1 min zentrifugiert. Das Eluat und der Sammelfilter werden verworfen. Der Spin Filter wird in ein neues Sammelgefäß überführt und zur Entfernung aller Ethanol-Rückstände für 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Das Sammelgefäß wird verworfen. Der Spin Filter wird in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, bis 200 µl Elutionspuffer auf den Filter pipettiert, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann bei 8000 rpm für 3 min zentrifugiert.

5.2 Konventionelle PCR - Reaktionsansatz

Die einzelnen Komponenten wurden auf Eis zusammen pipettiert. Ein typischer Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

Template DNA	1-5 μ l (abhängig vom Puffervolumen, in dem die extrahierte DNA eluiert worden war)
10x Puffer	5 μ l
Primer fwd (10 μ M)	1 μ l
Primer rev (10 μ M)	1 μ l
dNTP Mix (10mM)	1 μ l
MgCl ₂ (25mM)	1 μ l
Polymerase (5U/ μ l)	0,25 μ l
bideist. Wasser	ad 50 μ l

Die PCRs wurden in einem Mastercycler ep von Eppendorf durchgeführt. Die Annealing-Temperaturen wurden den Originalpublikationen entnommen oder mittels NetPrimer (Premier Biosoft International) ermittelt. Sie variierten je nach verwendeten Primern. Es wurden 35-40 Zyklen gefahren.

Das Temperaturprofil für einen solchen Ansatz sah wie folgt aus:

10 min 95°C	initiale Denaturierung	
30 sec 95°C	Denaturierung	} für 40 Zyklen
45 sec X °C	Annealing	
2 min 72°C	Elongation	
5 min 72°C	finale Elongation	
∞	kühlen 10°C	

Nach Ablauf des Programms in der PCR-Maschine wurden 2-5 μ l der DNA auf einem 1,5%igen Argarosegel neben einem Größenstandard aufgetragen, per Gelelektrophorese aufgetrennt und damit das Vorhandensein und die Größe des Fragments getestet. Entsprechend dieser erwarteten Größe konnten die PCR-Produkte bei 4°C gelagert werden.

5.3 Multiplex-PCR - Reaktionsansatz

Für die Multiplex-PCR wurde das Quantitect Multiplex PCR NoROX Kit von Qiagen verwendet. Es enthält einen Mastermix, der bereits HotStarTaq DNA Polymerase, dNTP Mix und einen passenden Puffer enthält. Der forward Primer aus dem Ansatz der konventionellen PCR wurde durch einen äquimolaren Primer-Mix ersetzt. Als reverse Primer diente PanCuli-COX1-727R, der von B. Hoffmann (FLI) neu konstruiert wurde.

Ein Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

2x Quantitect Master Mix	12,5µl
Primer Mix fwd (10µM)	1µl
Primer rev (10µM)	1µl
DNA	1-2µl
bidest. Wasser	ad 20µl

Die PCRs wurden in einem Mastercycler ep von Eppendorf durchgeführt. Die Annealing-Temperatur wurde mit Hilfe von NetPrimer (Premier Biosoft International) ermittelt. Es wurden 40-45 Zyklen gefahren.

Das Temperaturprofil für einen solchen Ansatz sah wie folgt aus:

15 min 95°C	initiale Denaturierung	
30 sec 95°C	Denaturierung	} für 42 Zyklen
45 sec 62-63 °C	Annealing	
45 sec 72°C	Elongation	
5 min 72°C	finale Elongation	
∞	kühlen 10°C	

Im Anschluss an das Programm wurden in das Reaktionsgefäß 5µl 10x Ladepuffer gegeben. 10 - 15µl dieser Mischung wurden auf einem 1,5%igen Agarosegel neben einem Größenstandard aufgetragen, per Gelelektrophorese aufgetrennt und damit das Vorhandensein und die Größe des Fragments getestet. Entsprechend der erwarteten Größe, wurden die PCR-Produkte bei 4°C gelagert.

5.4 Gelelektrophorese

Für ein 1,5%iges Gel wurden 1,5g Agarose abgewogen und mit 1x TAE auf 100g aufgefüllt. Die Mischung wurde aufgekocht und in eine abgedichtete Laufkammer gegossen. Das benötigte Volumen ist dabei abhängig von der Größe der Kammer. Durch das Einstecken eines Kammes in die flüssige Agarose wurden die Taschen zum Auftragen der Proben erzeugt. Die DNA-Probe wurde mit 1/10 Volumen Ladepuffer vermischt und auf das ausgehärtete Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte horizontal in 1x TAE bei 10V/cm. Nach dem Lauf wurden die Gele für 20 min in einem Ethidiumbromid-Bad (10µg/ml) gefärbt und unter UV-Licht ($\lambda = 312\text{nm}$) angesehen und fotografiert.

Lösungen:

50x TAE: 2M Tris (pH7,7); 2M Kaliumacetat; 0,1M EDTA

10x Ladepuffer: 0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylenxyanol; 30% Glycerin

5.4.1 DNA-Aufreinigung

Zu sequenzierende PCR-Produkte wurden zunächst gereinigt. Zeigte die Gelelektrophorese eine saubere Bande, dann erfolgte die Aufreinigung der darin enthaltenen DNA entweder mittels MinElute Reaction Cleanup Kit von Qiagen oder mittels innuPREP PCR pure Kit von Analytikjena. Im späteren Teil der Arbeit wurden auch Direktsequenzierungen aus dem PCR-Ansatz ohne Reinigung der DNA durchgeführt, welche ebenfalls zu zufriedenstellenden Ergebnissen führten.

Ergab die Gelelektrophorese eine diffuse Bande, dann deutete dies auf eine unsaubere Amplifikation hin, welche eine Sequenzierung negativ beeinflussen kann. In diesem Fall wurde die gewünschte DNA-Bande ohne den Schmier ausgeschnitten und aus dem Gel mittels QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen extrahiert.

In jedem Fall sollte nach erfolgter Extraktion erneut eine Gelelektrophorese zur Kontrolle der gereinigten DNA erfolgen.

5.4.2 DNA-Aufreinigung mittels MinElute Reaction Cleanup Kit von Qiagen

Es werden 300 µl Puffer ERC zu 50 µl PCR-Mix gegeben und beides gut vermischt. Sollen weniger als 20 µl PCR-Mix gereinigt werden, dann ist die Menge des ERC Puffers entsprechend anzupassen. Der Puffer ERC enthält einen pH-Indikator. Die Mischung sollte für einen optimalen pH-Wert eine gelbe Färbung haben. Ein MinElute Column wird in einem 2 ml Sammelgefäß platziert und die Probe ins MinElute Column gefüllt. Es erfolgt eine Zentrifugation bei 13000rpm für 1 min. Das Eluat wird verworfen. Zum Waschen werden 750 µl Puffer PE auf das MinElute Column gegeben und bei 13000rpm für 1 min zentrifugiert. Das Eluat wird verworfen und das MinElute Column muss erneut bei maximaler Geschwindigkeit für 5 min zentrifugiert werden, um alle Ethanol-Reste aus dem Filter zu entfernen. Das Sammelgefäß und das restliche Eluat werden verworfen. Das MinElute Column wird in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß platziert. Um die DNA zu eluieren, werden 10 µl Puffer EB oder steriles Wasser vorsichtig in die Mitte der Membran pipettiert, für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei 13000rpm für 1 min zentrifugiert.

5.4.3 DNA-Aufreinigung mittels innuPREP PCRpure Kit von Analytikjena

Ein Spin Filter wird in einem 2ml Sammelgefäß platziert und 500 µl Binding Puffer hinzugegeben. Dazu werden bis zu 50 µl PCR-Mix pipettiert. Puffer und PCR-Mix werden durch vorsichtiges auf- und abpipettieren gut vermischt. Bei 12000 rpm wird das Sammelgefäß für 2 min zentrifugiert. Das Sammelgefäß wird samt dem Eluat entfernt und der Spin Filter in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. 10 µl Elutionspuffer oder steriles Wasser werden direkt auf die Mitte des Filters gegeben, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und die gereinigte DNA durch Zentrifugation bei 8000rpm für 3 min eluiert.

5.4.4 Datenauswertung, Primerdesign und phylogentische Analysen

Die Sequenzierung der Proben erfolgte durch eine Auftragsfirma. Sie wurde mit den gleichen Primern durchgeführt, die zur DNA-Amplifikation benutzt worden waren. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit Sequence Scanner v 1.0 (www.products.appliedbiosystems.com) kontrolliert und gegebenenfalls bearbeitet. Das Alignment der Sequenzen und die Konsensus-Sequenzen wurden mit CLC Sequence Viewer 6 (www.clcbio.com) ermittelt. Zur Ermittlung der Konsensus-Sequenzen wurden die Daten falls nötig mit Sequenzen aus der GenBank ergänzt, um eine signifikante Anzahl an Einzel-Sequenzen je Art zu erhalten. Die Konsensus-Sequenzen wurden mittels Clustal W2 (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2) aligniert. Geeignete Primer-Regionen wurden per Hand ausgewählt. Die phylogenetischen Stammbäume wurden mittels MEGA5 (Tamura et al. 2011; www.megasoftware.net) erstellt. Es wurden zur Rekonstruktion als statistische Methode Neighbor-Joining (Saitou & Nei 1987), als Phylogenie-Test die Bootstrap-Methode (Felsenstein 1985) mit 1000 Replikationen und für die Bestimmung der evolutionären Distanzen die p-distance Methode (Nei & Kumar 2000) ausgewählt. Die Ermittlung der Polymorphismus-Daten erfolgte mittels DnaSP Version 5 (Rozas et al. 2003).

6 Artidentifizierung mittels real-time PCR

6.1 Einführung

Durch den überraschenden Ausbruch der Blauzungenerkrankung (BTD) vom Serotyp 8 in Deutschland im Jahre 2006 und der massiven Ausbreitung der Erkrankung in den Jahren 2007 und 2008 wurde schnell klar, dass neben den Wiederkäuern als potentielle Wirte des Virus der Blauzungenerkrankung (BTV) und dem Erreger selber, der Faktor „Gnitze“ als Hauptkomponente der Virusverbreitung in alle epidemiologischen Betrachtungen mit einfließen muss (Conraths et al., 2009). Leider war zu diesem Zeitpunkt nur ein begrenztes Wissen zum Vorkommen und zur Verbreitung dieser Vektoren bekannt. Im Rahmen eines umfassenden entomologischen Monitorings wurden in den Jahren 2007 und 2008 landesweit Gnitzen gefangen, morphologisch gruppiert, teilweise fein-differenziert und schließlich auf das Vorkommen von BTV-8 molekulargenetisch untersucht.

Hierbei zeigte sich, dass eine Vielzahl von unterschiedlichen Gnitzenarten in Deutschland vorkommt, allerdings nur bei einem sehr kleinen Teil der Population BTV-8-Genom nachgewiesen werden konnte (Mehlhorn et al., 2009; Hoffmann et al., 2009). Der Schwerpunkt der Untersuchungen dieses entomologischen Monitorings lag bei der Analyse von Poolproben. Pools von morphologisch vorsortierten Gnitzen (*Culicoides (C.) obsoletus*-Komplex, *C. pulicaris*-Komplex und sonstige Gnitzen) wurden molekularbiologisch auf das Vorkommen von BTV-8-Genom analysiert. Somit war nur ein Nachweis von BTV-8, bezogen auf den jeweiligen Gnitzen-Komplex, aber i.d.R. nicht auf eine einzelne Art, möglich. Die für die Verbreitung von BTV-8 in Deutschland maßgeblich verantwortlichen Gnitzen sind im *C. obsoletus*-Komplex zu finden, wobei eine genaue Charakterisierung der BTV-8-übertragenden Gnitzenarten bisher nicht erfolgen konnte. Dies liegt vor allem daran, dass molekularbiologische Verfahren zur genetischen Charakterisierung der Gnitzen zum Zeitpunkt des Ausbruchs nur unzureichend vorhanden und mit den Gnitzen in Deutschland nicht validiert waren. Da eine morphologische Voruntersuchung der Gnitzen des *C. obsoletus*-Komplexes im Vorfeld eines molekularbiologischen BTV-8-Genom-Nachweises viel zu aufwendig und damit nicht praktikabel ist, müssen alternative Wege zur Identifikation der Gnitzenarten gefunden werden. Hierbei bietet sich an, neben dem BTV-8-Nachweis auch die Charakterisierung der Gnitzen über molekularbiologische Assays durchzuführen.

Verfahren, die dies ermöglichen wurden mittlerweile von verschiedenen Arbeitsgruppen erarbeitet. Zur genetischen Differenzierung wurden einerseits die ribosomale DNA (Internal Transcribed Spacer-1 und 2) genutzt (Gomulski et al., 2006; Kiehl et al., 2009; Mathieu et al., 2007; Perrin et al., 2006). Andererseits hat sich die Untereinheit I des Cytochromoxidase-Gens (*cytochrome oxidase subunit I* = COI) als geeigneter Marker zur Identifikation von Gnitzenarten herausgestellt (Augot et al., 2010; Balczun et al., 2009; Nolan et al., 2007; Pagès et al., 2005). Nachteil aller solcher bisher publizierter Verfahren ist der hohe Arbeitsaufwand, der mit der notwendigen gelelektrophoretischen Analyse der amplifizierten PCR-Produkte verbunden ist. Dieser Nachteil kann effektiv nur durch den Einsatz der real-time PCR überwunden werden. Hierbei werden Fluoreszenzfarbstoffe genutzt, um eine erfolgreiche Amplifikation von speziesspezifischen PCR-Produkten sichtbar zu machen.

Neben doppelstrangbindenden Farbstoffen wie SybrGreen I haben sich die sogenannten TaqMan-Sonden als zusätzliche Spezifitätskontrolle in der real-time PCR-Technologie bewährt. Durch spezielle real-time PCR-Maschinen ist die Analyse von großen Probenmengen in kürzester Zeit möglich. Da die Amplifikation und die Detektion der PCR-Produkte immer in geschlossenen Reaktionsgefäßen ablaufen, wird eine Kreuzkontamination von nachfolgenden Experimenten mit zuvor generierten PCR-Amplifikaten verhindert. Die real-time PCR ist somit nicht nur sehr sensitiv und spezifisch, sondern die Methode eignet sich aufgrund ihres geschlossenen Amplifikationsverfahrens besonders auch für Routineuntersuchungen im Hochdurchsatz.

Ziel des Projektes war es unter Verwendung der real-time PCR-Technologie die genetische Charakterisierung der Gnitzenarten zu ermöglichen. Hierbei lag die Konzentration der Arbeiten auf den Gnitzen des *C. obsoletus*-Komplexes. Dabei handelt es sich somit um Gnitzen folgender Arten: *C. obsoletus* sensu stricto (s.s.), *C. scoticus*, *C. chiopterus*, *C. dewulfi*. Basierend auf den Ergebnissen des entomologischen Monitorings aus den Jahren 2007 und 2008 ist davon auszugehen, dass besonders Vertreter dieser Gnitzenarten die Vektorkompetenz für die Verbreitung des BTV-8 in Deutschland besitzen und damit die schnelle und sichere genetische Charakterisierung dieser Gnitzenarten eine besondere Bedeutung hat (Hoffmann et al., 2009).

6.2 Material und Methoden real-time PCR

6.2.1 Gnitzen

Für die Etablierung und Validierung der real-time PCR-Assays zur Differenzierung von Gnitzen des *C. obsoletus*-Komplexes wurden Restbestände der Gnitzen aus dem entomologischen Monitoring 2007/2008 verwendet. Diese Gnitzen waren morphologisch vorsortiert.

6.2.2 Nukleinsäure-Extraktion

Die genomische DNA der Gnitzen wurde mittels MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche) isoliert. Einzelne Gnitzen wurde je dreimal mit Tris-HCl-Puffer (pH-Wert 8,0) gewaschen, um Gewebereste anderer Gnitzen desselben Pools zu

entfernen. Danach wurden die Gnitzen einzeln mit 3 Stahlkugeln a 3 mm Durchmesser im Lysepuffer homogenisiert (2 min, 30 Hz im TissueLyser (Qiagen)). Nach Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (3 min, 14 000 rpm) wurde der Überstand in die zu verwendenden Platten des MagnaPure 2.0 Gerätes überführt und die Extraktion entsprechend der Anweisungen des Herstellers vorgenommen. Die Elution der genomischen Nukleinsäure erfolgte in 100 µl Elutions-Puffer.

6.3 Real-time PCR

Alle real-time PCR-Analysen wurden mit dem QuantiTect Multiplex PCR-Kit (Qiagen) in einem Gesamtvolumen von 25 µl durchgeführt. Hierzu wurde ein Mastermix von 20 µl hergestellt und 5 µl Template-DNA zugesetzt. Die 20µl Mastermix setzten sich aus 12,5 µl des 2x QuantiTect Multiplex PCR Master Mix, 2 µl des Primer-Sonden-Mixes und 5,5 µl RNase freiem Wasser zusammen. Die 2µl Primer-Sonden-Mix enthielten 20 pmol des Forward-Primers, 20 pmol des Reverse-Primers und 5 pmol der jeweiligen Sonde. Alle Analysen wurden am CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) durchgeführt. Das Temperaturprofil aller durchgeführten Experimente war: 15 min 95°C, gefolgt von 42 Zyklen 30 sec bei 95°C, 30 sec bei 55°C und 30 sec bei 72°C.

6.4 Genetische Identifizierung und DNA-Sequenzierung

Die genetische Identifikation der Einzelgnitzen erfolgte über die Sequenzierung der für die Genotypisierung favorisierten Sequenzregionen ITS1+ITS2 bzw. COI. Dazu wurden die entsprechenden Fragmente in einem 2%igem Agarose-Gel getrennt und mittels Gel Extraction Kit (Qiagen) aufgereinigt. Das Fragment wurde dann in einer Sequenzierungsreaktion (BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems) als Template eingesetzt und mittels Spin Post-reaction clean-up columns (Sigma) aufgereinigt. Die Generierung der Sequenzdaten erfolgte am Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems). Zur Editierung der Sequenzdaten wurde die Sequence Scanner V1.0 Software (Applied Biosystems) verwendet. Die erhaltenen optimierten FASTA-Sequenz-Daten wurden für den Sequenzabgleich im BLASTn-Programm eingesetzt.

7 Ergebnisse

7.1 Konventionelle PCR

Um genügend Daten für die Etablierung von Multiplex-PCRs für die *C. obsoletus* und *C. pulicaris*-Artenkomplexe sowie die phylogenetischen Untersuchungen zu erhalten, mussten zunächst konventionelle PCRs mit aus einzelnen Gnitzen extrahierter DNA durchgeführt werden. Mittels der bereits bekannten, konservierten Primer von Dallas et al. (2003) und Gomulski et al. (2006) erfolgten Amplifikationen der COI- und ITS2-Fragmente von verschiedenen *Culicoides*-Arten.

Dallas et al. (2003):

C1-J-1718 : 5'-GGAGGATTTGGAAATTGATTAGT-3'

C1-N-2191: 5'-CAGGTAAAATTAAAATATAAACTTCTGG-3'

Gomulski et al. (2006):

5.8SF : 5'-GATGAAGACCGCAGCAAAC-3'

28SR : 5'-ATTTGGGGGTAGTCACACAT-3'

Da die Primer für die COI-Region nicht bei allen Arten gute Ergebnisse brachten, wurden sie von B. Hoffmann (FLI) modifiziert und mittels Verwendung von „wobble“-Nukleotiden verbessert.

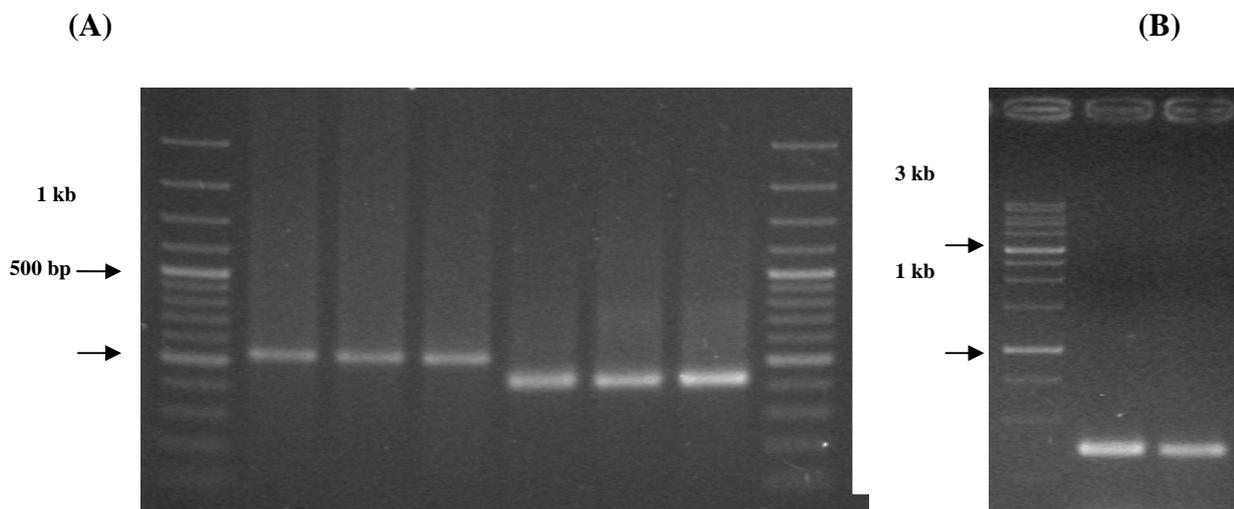


Abb. 31: Konventionelle PCR: (A) Amplifikate der PCR nach Dallas et al. 2003 (COI) und Gomulski et al. 2006 (ITS2): Spur 1+8: 100bp DNA-Marker; Spur 2: *C. obsoletus* COI; Spur 3: *C. pulicaris* COI; Spur 4: *C. punctatus* COI; Spur 5: *C. obsoletus* ITS2; Spur 6: *C. pulicaris* ITS2; Spur 7: *C. punctatus* ITS2 (B) Amplifikate der COI-PCR mit modifizierten Primern: Spur 1: 1kb DNA-Marker; Spur 2: *C. newsteadi* N1; Spur 3: *C. pulicaris*

Die Länge der erhaltenen Amplifikate betrug für die COI-Region 523bp (Dallas et al. 2003) bzw. 511bp (mit den nach Hoffmann modifizierten Primern). Für die ITS2-Region variierte die Amplifikat-Länge je nach Spezies zwischen ca. 390 bis ca. 440bp (Gomulski et al. 2006).

7.1.1 Culicoides-Proben für Primer-Entwicklung

Insgesamt wurden 29 unterschiedlichen *Culicoides*-Arten bearbeitet (Tab. 2). Vergleiche mit in GenBank vorhandenen Sequenzen zeigten, dass die Proben von *C. newsteadi* drei Kryptospezies N1, N2 und N3 (Pagès et al. 2009) enthielten. Die Individuen von *C. flavipulicaris* und *C. imicola* wurden nicht in Deutschland gefangen, sondern freundlicherweise von einer spanischen Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt (N. Pagès, Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA)). Sie flossen lediglich in die phylogenetische Untersuchung als Vergleich mit ein.

<i>Culicoides</i> -Art	COI	ITS2
<i>C. achrayi</i>	5	5
<i>C. albicans</i>	10	10
<i>C. chiopterus</i>	16	16
<i>C. circumscriptus</i>	11	12
<i>C. dewulfi</i>	6	8
<i>C. fasciipennis</i>	1	2
<i>C. fagineus s.s.</i>	3	2
<i>C. festivipennis</i>	21	16
<i>C. flavipulicaris</i>	5	6
<i>C. fuscillatus</i>	1	1
<i>C. griseidorsum</i>	5	6
<i>C. griseus</i>	5	5
<i>C. imicola</i>	5	5
<i>C. impunctatus</i>	11	6
<i>C. lupicaris</i>	4	-
<i>C. minutissima</i>	1	-
<i>C. newsteadi</i> N1	8	8
<i>C. newsteadi</i> N2	1	-
<i>C. newsteadi</i> N3	1	-
<i>C. nubeculosus</i>	1	4
<i>C. obsoletus s.s.</i>	17	43
<i>C. pictipennis</i>	2	4
<i>C. pulicaris</i>	15	13
<i>C. punctatus</i>	23	31
<i>C. puncticollis</i>	10	7
<i>C. riethi</i>	2	-
<i>C. salinarius</i>	1	-
<i>C. scoticus</i>	8	8
<i>C. simulator</i>	5	6
<i>C. stigma</i>	1	1
<i>C. vexans</i>	2	2

Tab. 2: Anzahl der sequenzierten Individuen je *Culicoides*-Art und Fragment: Die Arten, welche in die Multiplex PCR des *C. obsoletus*-Komplexes einfließen sind blau, die des *C. pulicaris*-Komplexes rot markiert.

Für die COI-Region wurden insgesamt 206 Sequenzen von Einzel-Gnitzen aller 29 Arten. Darunter waren 71 Tiere aus dem *C. pulicaris*-Komplex und 44 aus dem *C. obsoletus*-Komplex. Basierend auf deren Daten erfolgte die Entwicklung der Multiplex-PCR. Für die ITS2-Region ergaben sich 227 Sequenzen einzelner Gnitzen von insgesamt 23 unterschiedlichen *Culicoides*-Arten. Darunter waren 65 Tiere aus dem *C. pulicaris*-Komplex und 75 aus dem *C. obsoletus*-Komplex. Ein Teil dieser Daten wurde später auch für die phylogenetischen Untersuchungen genutzt.

7.1.2 Multiplex-PCR für den *C. obsoletus*-Komplex

7.1.2.1 Entwicklung Spezies-spezifischer Primer

Zunächst musste aus den Nukleotidsequenzen der Einzel-Gnitzen eine Konsensus-Sequenz für jede Gnitzen-Spezies ermittelt werden. Basierend auf einem Alignment der Konsensus-Sequenzen von *C. chiopterus*, *C. dewulfi*, *C. obsoletus* s.s. und *C. scoticus* konnten im Anschluss konservierte und nicht-konservierte Bereiche identifiziert werden. Die interspezifisch variablen Regionen wurden zur Konstruktion Spezies-spezifische Primer ausgewählt (Tab 3). Besonderes Augenmerk wurde darauf gelegt, dass die zu erwartenden Amplifikate der einzelnen Arten einen signifikanten Längenunterschied aufweisen würden. Um die Effizienz der Primer zu testen, wurden zunächst einfache PCRs mit einem Spezies-spezifischen Primer und homologer DNA dieser Art in Kombination mit dem universellen Primer PanCuli-COX1-727R durchgeführt (Abb. 32 A). Auch wurden die Primer mittels dieses Verfahrens auf eventuelle Kreuzhybridisierungen mit homologer DNA der anderen Arten des Komplexes getestet (Abb. 32 B + C).

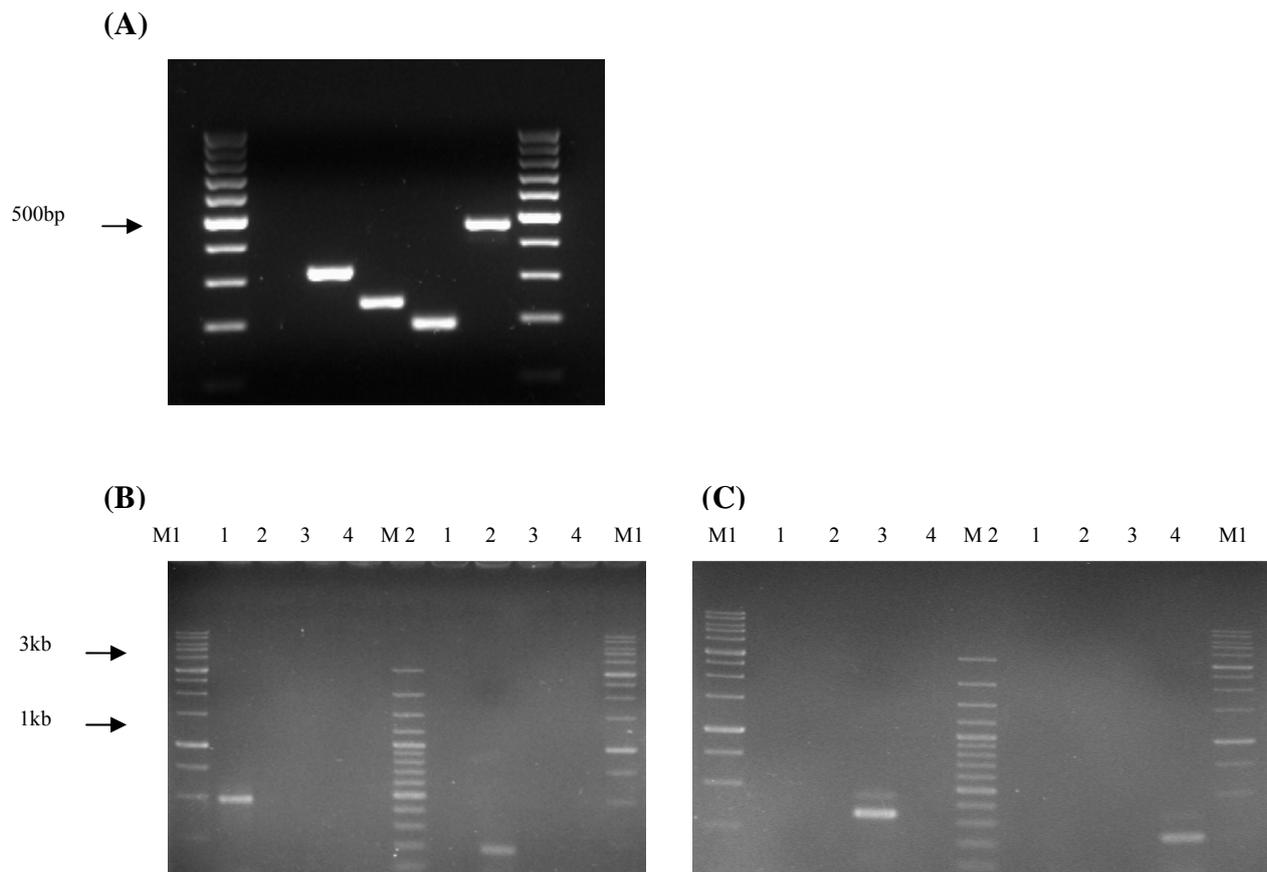


Abb. 32: Einzel-Tests der Primer für den *C. obsoletus*-Komplex: (A) konventionelle PCR mit Einzel-Primern, PanCuli-COX1-727R und homologer DNA. v.l.n.r.: Spuren 1+7: 100bp DNA-Marker; Spur 2: Negativ-Kontrolle mit Wasser statt DNA; Spur 3: *C. obsoletus* DNA + obs-COI-fwd; Spur 4: *C. scoticus* DNA + obs-COI-fwd; Spur 5: *C. chiopterus* DNA + chio-COI-fwd; Spur 6: *C. dewulfi* DNA + dew-COI-fwd (B) + (C) Test auf Kreuzhybridisierung der vier Spezies-spezifischen Primer mit homologer DNA der *C. obsoletus*-Komplex-Arten M1: 1kb DNA-Marker; M2: 100bp DNA-Marker; 1: *C. dewulfi* DNA; 2: *C. chiopterus* DNA; 3: *C. obsoletus* DNA; 4: *C. scoticus* DNA; Primer auf (B) links dew-COI-fwd und rechts chio-COI-fwd und auf (C) links obs-COI-fwd und rechts sco-COI-fwd

Die Agarose-Gel-Analyse zeigte eine Amplifikation der gewünschten Zielregion für jeden der vier Spezies-spezifischen Primer, und es konnte keine unspezifische Interaktion der Spezies-spezifischen Primer mit heterologer DNA festgestellt werden. Bei dieser hohen Spezifität der einzelnen Primer konnte eine Multiplex-PCR versucht werden. Es wurden vorbestimmte DNAs von Einzel-Gniten des *C. obsoletus*-Komplexes in Kombination mit einem äquimolarem Mix der vier Spezies-spezifischen Primer und des universellen Primers benutzt (Abb. 33).

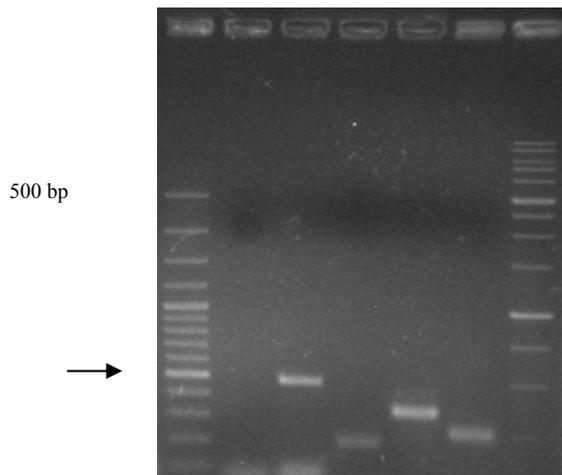


Abb. 33: Multiplex-PCR *C. obsoletus*-Komplex. v.l.n.r.: Spur 1: 100bp DNA-Marker; Spur 2: Negativ-Probe; Spur 3: *C. dewulfi* DNA; Spur 4: *C. chiopterus* DNA; Spur 5: *C. obsoletus* DNA; Spur 6: *C. scoticus* DNA; Spur 7: 1kb DNA-Marker

7.1.2.2 Optimierung der Reaktionsbedingungen

Die optimale Annealing-Temperatur wurde mittels einer PCR mit Temperatur-Gradient (ausgehend von der Schmelztemperatur T_M der Primer) überprüft (Abb. 7). Sie beträgt 63°C. Es wurden auch verschiedene Konzentrationen der einzelnen Primer im Primer-Mix getestet. Dabei lieferte der äquimolare Ansatz die besten Resultate.

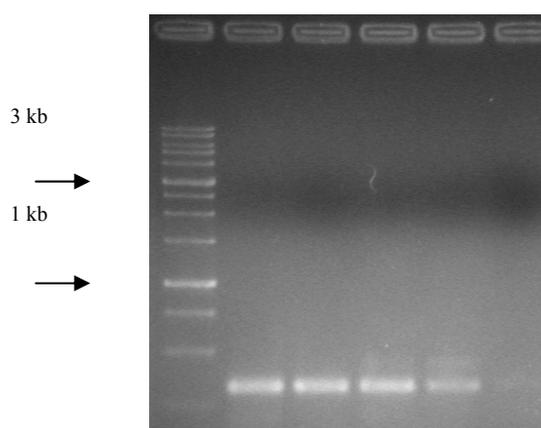


Abb. 34: Multiplex-PCR *C. obsoletus* mit Temperatur-Gradient. v.l.n.r.: Spur 1: 1 kb DNA-Marker; Spur 2: 59,1°C; Spur 2: 60,8°C; Spur 3: 63,5°C; Spur 4: 66,4°C; Spur 5: 70°C

(A)

```

chiopterus_COI_Consensus      ATCATAATTGGTGGGTTTGGAAATTGA CTTGTACCCCTCATACTAGGGGC 50
obsoletus_ss_COI_Consensus    ATCATAATTGGTGGGTTTGGWAATTGACTCGTACCCCTTAATACTAGGGGC 50
scoticus_COI_Consensus        ATCATAATTGGTGGGTTTGGAAATTGATTAGTACCTTTAATACTAGGTGC 50
dewulfi_COI_Consensus         ATCATAATTGGTGGGTTTGGAAATTGATTAGTACCTTTAATACTAGGAGC 50
*****

chiopterus_COI_Consensus      CCCTGATATAGCTTTTCCACGAATAAATAATATAAGTTTTTGAATACTAC 100
obsoletus_ss_COI_Consensus    CCCCGATATAGCCTTTCCCGAATAAATAATATAAGTTTTTGAATACTCC 100
scoticus_COI_Consensus        CCCAGATATAGCTTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGTTTTTGAATGCTCC 100
dewulfi_COI_Consensus         CCCCGACATAGCATTCCCTCGAATAAATAACATAAGATTCTGAATACTCC 100
*****

chiopterus_COI_Consensus      CGCCCTCTATCACCTACTATTAGTAAGTAGCTTAGTAGAAAATGGAGCA 150
obsoletus_ss_COI_Consensus    CACCTTCAATTACTTTATTATTAATAATAGAAGCTTAGTAGAAAAYGGAGCA 150
scoticus_COI_Consensus        CYCCTTCAATCACCTTTATTATTAATAATAGAAGTTTAGTTGAAAATGGAGCC 150
dewulfi_COI_Consensus         CCCCTTCAATTACTTTACTTTTAGTAAGAGGATTAGTAGAAAATGGGGCC 150
*****

chiopterus_COI_Consensus      GGAAGTGGATGAACTGTTTACCCCTCTTTTCAGCTAATGTTTCTCATGC 200
obsoletus_ss_COI_Consensus    GGAACCGGTGAACTGTTTAYCCCCCTTTTCATCTAATATCTCTCATGC 200
scoticus_COI_Consensus        GGAAGTGGCTGAACTGTTTACCCCTCACTTTTCAGCAATGTTCTCCATGC 200
dewulfi_COI_Consensus         GGAACAGGTTGAACTGTTTACCCCTCTGTCAGCAATATCTCTCATGC 200
*****

chiopterus_COI_Consensus      TGGTGCATCAGTAGATTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCAGGTATTA 250
obsoletus_ss_COI_Consensus    AGGAGCTTCTGTAGATTGGCTATTTTCTTTACATTTAGCTGGTATTA 250
scoticus_COI_Consensus        AGGAGCCTCAGTTGACTTAGCAATTTTCTCTACATTTAGCAGGTATTA 250
dewulfi_COI_Consensus         CGGAGCCTCGGTAGACTGGCAATTTTCTCCTGCATTTGCAGGAAATTA 250
*****

chiopterus_COI_Consensus      GTTCTATTTTAGGGCTGTAAATTTTATTACCACTATTATTAATATACGT 300
obsoletus_ss_COI_Consensus    GTTCTATTTTAGGAGCCGTAAATTTTATTACTACTATTATTAATATACGA 300
scoticus_COI_Consensus        GCTCTATTTTAGGRGCAGTAAATTTTATTAACACAATTTAATATGCGA 300
dewulfi_COI_Consensus         GCTCAATCCTAGGAGCAGTAAATTTTATCACAACAATCATTAAATATACGA 300
*****

chiopterus_COI_Consensus      TCTAATGGAATAACTTTTGACCGAATACTTTATTTGTTGRTCTGTTCT 350
obsoletus_ss_COI_Consensus    TCTTACGGDATAACTTTTGACCGAATACTTTATTTGTATGATCAGTATT 350
scoticus_COI_Consensus        TCTTACGGCATAACTTTTGATCGAATACTCTATTGTTGATCGGTATT 350
dewulfi_COI_Consensus         CCAAATAGAATATTATTGACCAATACTCTTTGTTGATCAGTATT 350
*****

chiopterus_COI_Consensus      TCTMACTGCAATTTTACTCTTTTATCATTACCGGTATTAGCAGGAGCTA 400
obsoletus_ss_COI_Consensus    AATTACAGCTATTTACTTCTTTTATCTTTTACCTGTTTATGACGAGGCTA 400
scoticus_COI_Consensus        AATTACCGCTATTTACTTCTTTTATCCCTACCAGTATTAGCAGGRGCTA 400
dewulfi_COI_Consensus         AATCACAGCTATTCTTTACTTCTGTCACTTCCAGTTTATGACGAGGCTA 400
*****

chiopterus_COI_Consensus      TTACGATACTTTTAAACAGATCGAAATATTAACACTTCATTTTGGACCCA 450
obsoletus_ss_COI_Consensus    TCACCATRCTCTTAAAYCGACCGAAATATCAATACTTCATTTTGGACCT 450
scoticus_COI_Consensus        TTACCATACTTTTAAACAGATCGAAATATTAATACTTCATTTTGGACCG 450
dewulfi_COI_Consensus         TTACTATACTTCTTACTGATCGAAATATCAATACCTTCATTTTGGACCT 450
*****

chiopterus_COI_Consensus      GCAGGTGGAGGAGACCCTATTCTTTACCAACATTTATTTGATTTTGG 500
obsoletus_ss_COI_Consensus    GCAGGAGGGGAGACCCAATCTTTACCAACATTTATTTGATTTTGG 500
scoticus_COI_Consensus        GCAGGTGGAGGTGACCCMATCTTTACCAACATTTATTTGATTTTGG 500
dewulfi_COI_Consensus         GCCGGRGGAGGTGACCCAATCTTATACCAACATTTATTTGATTTTGG 500
*****

chiopterus_COI_Consensus      CCACCCCGAAGTTTATA 517
obsoletus_ss_COI_Consensus    CCACCCCGAAGTTTATA 517
scoticus_COI_Consensus        MCAYCCCGAAGTTTATA 517
dewulfi_COI_Consensus         TCACCCAGAAGTTTATA 517
*****

```

(B)

<i>Culicoides</i> -Art	N Individuen	Primer- Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Amplifikat- Länge (bp)
<i>C. obsoletus</i>	17	obs-COI- fwd	CAGGAGCTTCTGTAGATT GGCT	312
<i>C. chiopterus</i>	16	chio-COI- fwd	CCTTTATTTGTTTGGTCTGT TCTTC	185
<i>C. scoticus</i>	8	sco-COI-fwd	CCACAATTATTAATATGCG ATCTACC	231
<i>C. dewulfi</i>	6	dew-COI- fwd	CGCCCGACATAGCATTCCC T	462

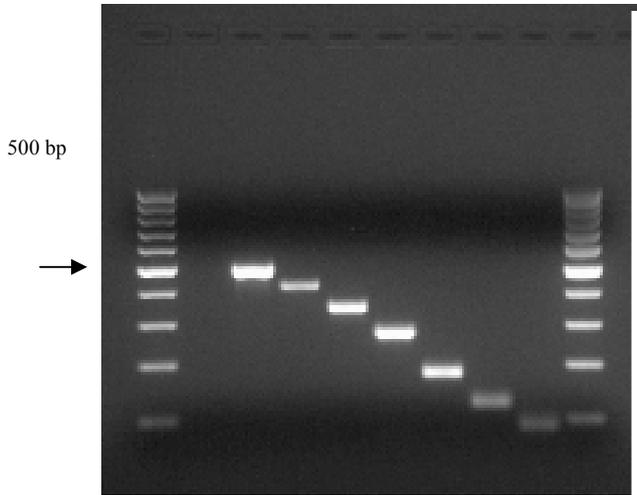
Tab. 3: (A) Alignment der COI-Konsensus-Sequenzen der Arten des *C. obsoletus*-Komplexes: gelbe Markierung = Sequenzier-Primer, blaue Markierung = Positionen der Spezies-spezifischen Primer. (B) Spezies-spezifische Primer *C. obsoletus*-Komplex. N_{Individuen} = Anzahl der Individuen

7.1.3 Multiplex-PCR *C. pulicaris*-Komplex

7.1.3.1 Spezies-spezifische Primer

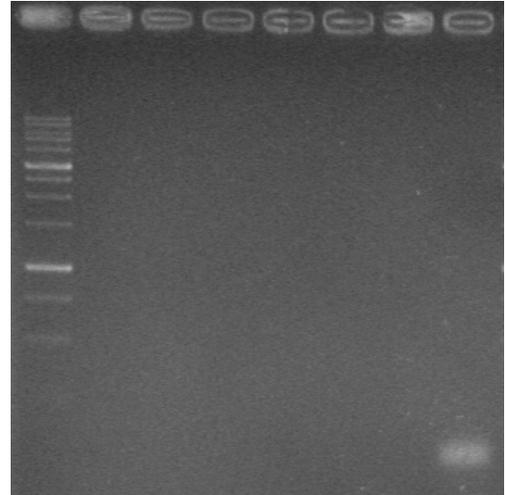
Die Entwicklung der Spezies-spezifischen Primer für den *C. pulicaris*-Komplex erfolgte nach der gleichen Prozedur wie für den *C. obsoletus*-Komplex. Mit einem Alignment der Konsensus-Sequenzen der Arten *C. fagineus*, *C. grisescens*, *C. impunctatus*, *C. lupicaris*, *C. newsteadi* N1, *C. pulicaris* und *C. punctatus* konnten geeignete Primer-Regionen identifiziert werden. Auch hier wurde versucht auf einen ausreichenden Längenunterschied der einzelnen Amplifikate zu achten. Der Spezifitätstest erfolgte durch einfache PCRs mit einem Spezies-spezifischen Primer und homologer DNA dieser Spezies in Kombination mit dem universellen Primer PanCuli-COX1-727R gemacht. Danach erfolgte der Test auf Kreuzhybridisierung der Primer mit heterologer DNA (Abb. 35).

(A)



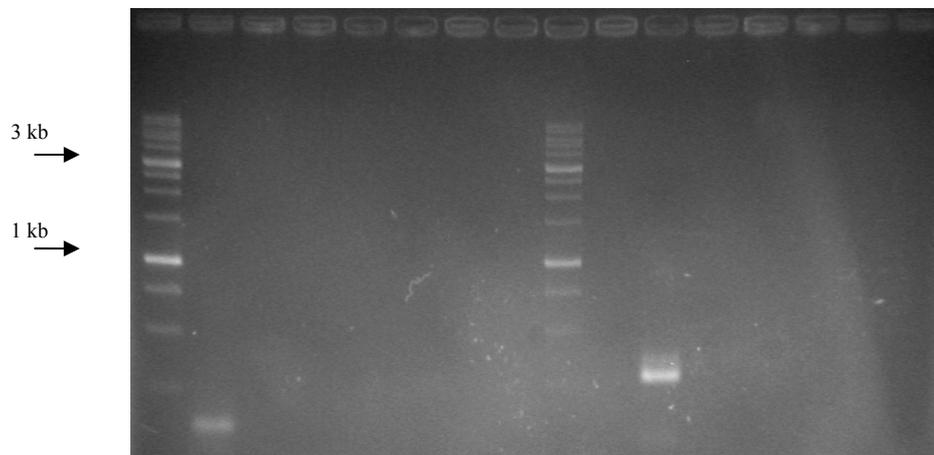
(B)

M 1 2 3 4 5 6 7



(C)

M 1 2 3 4 5 6 7 M 1 2 3 4 5 6 7



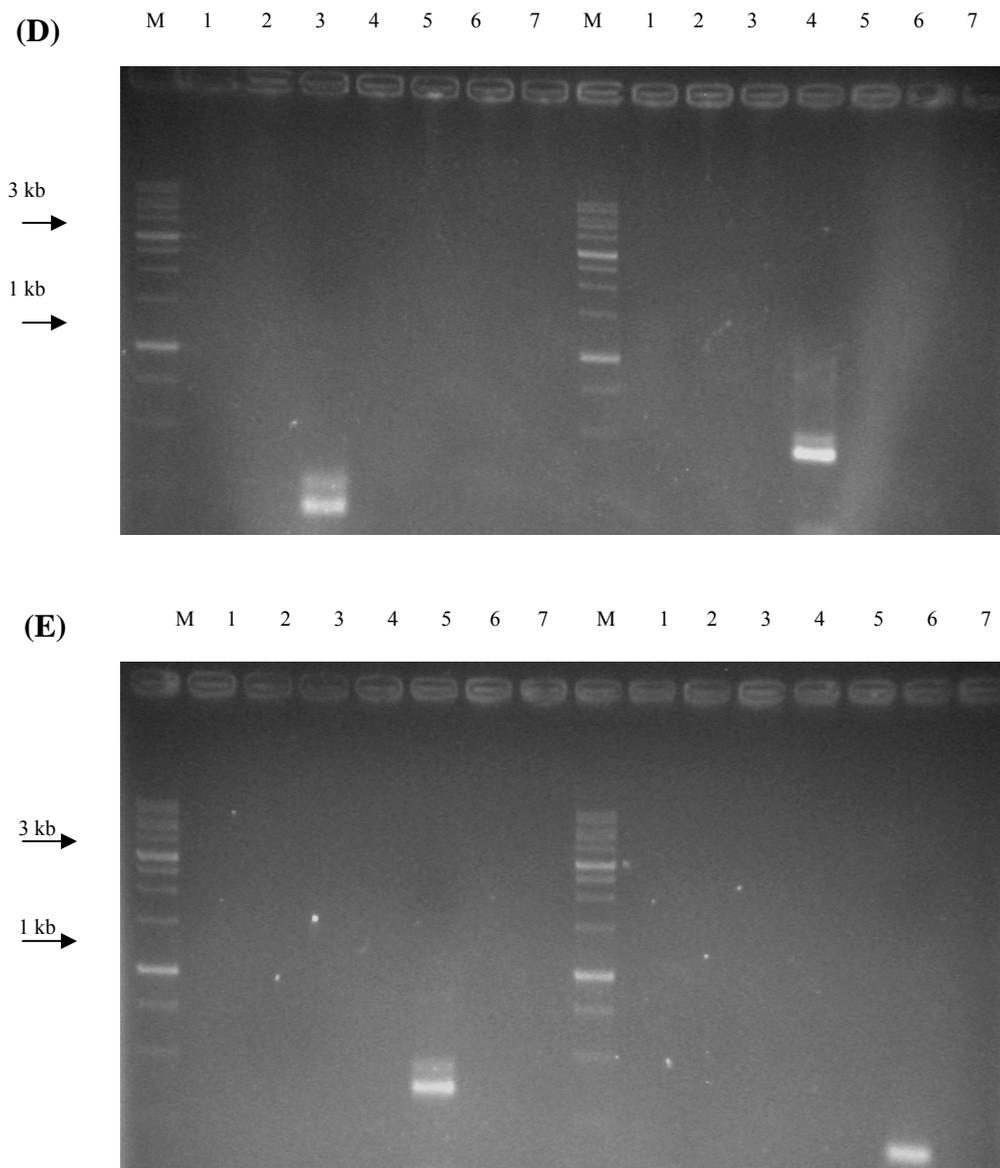


Abb. 35: Einzel-Tests der Primer für den *C. pulicaris*-Komplex: (A) konventionelle PCR mit Einzel-Primern, PanCuli-COX1-727R und homologer DNA. v.l.n.r.: Spuren 1+10: 100bp DNA-Marker; Spur 2: Negativ-Kontrolle mit Wasser statt DNA; Spur 3: *C. pulicaris* DNA + pul-COI-fwd; Spur 4: *C. lupicaris* DNA + lup-COI-fwd; Spur 5: *C. newsteadi* N1 DNA + new1-COI-fwd; Spur 6: *C. griseus* DNA + gris-COI-fwd; Spur 7: *C. impunctatus* DNA + impct-COI-fwd; Spur 8: *C. fagineus* DNA + fag-COI-fwd, Spur 9: *C. punctatus* DNA + pct-COI-fwd (B)-(E): Test auf Kreuzhybridisierung der vier Spezies-spezifischen Primer mit homologer DNA der *C. pulicaris*-Komplex-Arten M: 1kb DNA-Marker; 1: *C. fagineus* DNA; 2: *C. griseus* DNA; 3: *C. impunctatus* DNA; 4: *C. lupicaris* DNA; 5: *C. newsteadi* N1 DNA; 6: *C. pulicaris* DNA; 7: *C. punctatus* DNA Primer auf (B) links pct-COI-fwd (C) links fag-COI-fwd und rechts gris-COI-fwd (D) links impct-COI-fwd und rechts lup-COI-fwd (E) links new1-COI-fwd und rechts pul-COI-fwd

Auch hier war eine hohe Spezifität der Primer gegeben, so dass eine Multiplex-PCR mit einem äquimolarem Mix der sieben Spezies-spezifischen Primer und des universellen Primers gefahren werden konnte. Dazu wurden vorbestimmte Proben von Gnitzen des *C. pulicaris*-Komplexes genutzt.

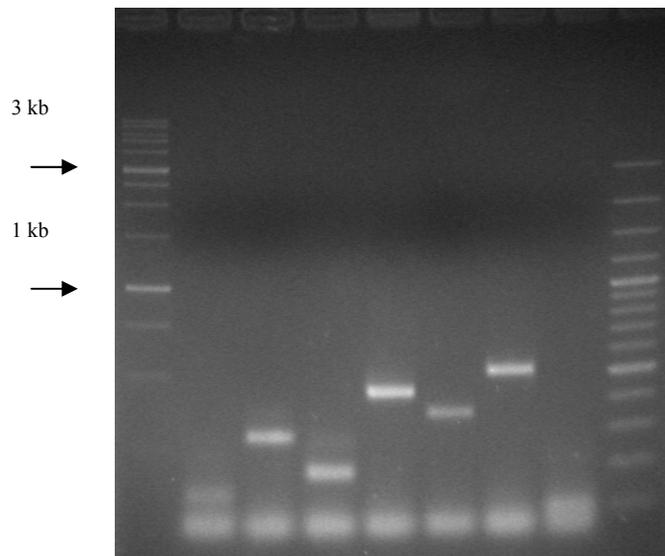


Abb. 36: Multiplex-PCR *C. pulicaris*-Komplex: v.l.n.r.: Spur 1: 1kb DNA-Marker; Spur 2: *C. fagineus*; Spur 3: *C. grisescens*; Spur 4: *C. impunctatus*; Spur 5: *C. lupicaris*; Spur 6: *C. newsteadi* N1; Spur 7: *C. pulicaris*; Spur 8: *C. punctatus*; Spur 9: 100bp DNA_Marker

7.1.3.2 Optimierung der Reaktionsbedingungen

Die optimale Annealing-Temperatur wurde mittels einer PCR mit Temperatur-Gradient (ausgehend von der Schmelztemperatur T_M der Primer) ermittelt. Sie beträgt 62°C, da das Optimum zwischen 60,8°C und 63,5°C liegt. Es wurden auch verschiedene Konzentrationen der einzelnen Primer im Gesamt-Mix getestet. Dabei lieferte der äquimolare Ansatz die besten Resultate.

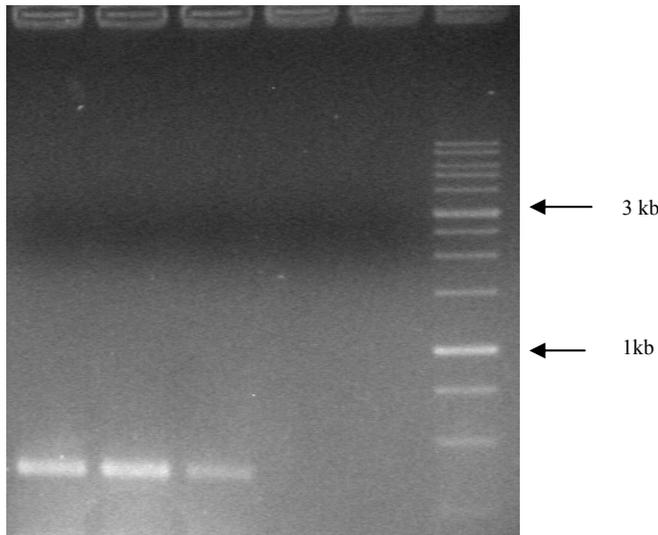


Abb. 37: Multiplex-PCR *C. newsteadi* N1 mit Temperatur-Gradient. v.l.n.r.: Spur 1: 59,1°C; Spur 2: 60,8°C; Spur 3: 63,5°C; Spur 4: 66,4°C; Spur 5: 70°C; Spur 6: 1 kb DNA-Marker

(A)

```

lupicaris_COI_Consensus      ATCATAAATGGTGGGTTGGWAATTGAYTAGTYCCCCTAATATTAGGAGC 50
pulicaris_COI_Consensus      ATCATAAATGGTGGGTTGGWAATTGATTAGTCCACTTATACTAGGGGC 50
impunctatus_COI_Consensus    ATCATAAATGGTGGGTTGGWAATTGATTGGTCCATTAACTCGGAGC 50
punctatus_COI_Consensus      ATCATAAATGGTGGGTTGGWAATTGACTAGTACCTTTAATATTAGGGGC 50
newsteadiN1_COI_Consensus    ATCATAAATGGTGGGTTGGWAATTGATTAGTACCCTGATATTAGGGGC 50
fagineus_ss_COI_Consensus    ATCATAAATGGTGGGTTGGWAATTGACTTGCCATTAAATATTAGGAGC 50
grisescens_COI_Consensus     ATCATAAATGGAGGATTTGGAATTGATTAGTCCATTAAATATTGGGGC 50

lupicaris_COI_Consensus      CCCCGATATAGCCTTCCCTCGTATAAAATAATATAAGATTTGAACTACTCC 100
pulicaris_COI_Consensus      CCCGACATGGCTTTCCCGTATAAAATAACATAAGATTTGAATACTCC 100
impunctatus_COI_Consensus    CCCGGATATAGCATTCCCGAATAAAATAATATAAGATTTGAATACTTC 100
punctatus_COI_Consensus      CCCGACATAGCTTTCCACGTATAAAATAATATAAGATTTGAATACTCC 100
newsteadiN1_COI_Consensus    CCCGGATATAGCCTTCCCTCGAATAAAATAACATAAGATTTGAATACTCC 100
fagineus_ss_COI_Consensus    CCCTGATATAGCTTTCCACGTATAAAATAATATAAGATTTGAATACTAC 100
grisescens_COI_Consensus     TCCGGATATAGCTTTCCACGATGAATAATATAAGATTTGAATACTCC 100
* * * * *

lupicaris_COI_Consensus      CCCCCTCTTAAACACTACTTTTATTAAGAAGACTGGTAGAAAATGGCGCG 150
pulicaris_COI_Consensus      CCCCTTCTTAAACATTACTCTTATTAAGAAGTTAGTAGAAAACGGGAGCA 150
impunctatus_COI_Consensus    CCCCTTCTTAAACATTACTTTTATTAAGCAGACTAGTTGAAAATGGGGCT 150
punctatus_COI_Consensus      CTCCTTCTTAAACATTATTTACTAAGTAGCTTAGTGAAAATGGGGCC 150
newsteadiN1_COI_Consensus    CCCCTCTCTTACTTTACTCTTATTAAGCAGCTTAGTAGAAAACGGGGCA 150
fagineus_ss_COI_Consensus    CCCCATCCCTTTCTTTATTAATTAAGCAGCCTAGTAGAAAATGGGGCA 150
grisescens_COI_Consensus     CCCCTTCTCTTCTTTATTTATTAAGTAGAAGTAGCTAGTAGAAAATGGGGCT 150
* * * * *

lupicaris_COI_Consensus      GGGACTGGTTGAACAGTTTACCCCCACTTTCTGCTAATATCTCTCATGC 200
pulicaris_COI_Consensus      GGGACTGGCTGAACAGTTTACCCCCCTCTTTCTGCAATATTCTCATGC 200
impunctatus_COI_Consensus    GGGACTGGTTGAACAGTCTACCCCCCTCTTTCAGCTAATATCTCCCATGC 200
punctatus_COI_Consensus      GGAACCGGATGAACAGTGTCTATCCACCTCTTTCGGCCAATGTATCCCATGC 200
newsteadiN1_COI_Consensus    GGAACAGGATGAACCGTATATCCCGCCTCTTCAAGAAATATCTCCCATGC 200
fagineus_ss_COI_Consensus    GGAACGGATGAACGGTATATCCTCCTCTTTCAGCAAAATATTCTCATGC 200
grisescens_COI_Consensus     GGGACAGGTTGAACAGTATACCTCCTCTTTCTGCTAATATCTCCCATGC 200
* * * * *
    
```

```

lupicaris_COI_Consensus      CGGAGCATCAGTTGACTTAGCAATTTTTCTTTACATTTAGCAGGAATTT 250
pulicaris_COI_Consensus      CGGRGCATCCGTAGACTTGCCATTTTTTCATTACATCTGGCAGGGATTT 250
impunctatus_COI_Consensus    AGGAGCATCAGTCGACTTAGCAATTTTTCTTTACATCTGGCAGGTATCT 250
punctatus_COI_Consensus      TGGCGCATCAGTAGATTTAGCTATTTTTCTTTACATCTTGCTGGAATTT 250
newsteadiN1_COI_Consensus    TGGTGCATCTGTTGACTTAGCCATTTTTCTTTACACTTAGCGGGAATCT 250
fagineus_ss_COI_Consensus    TGGAGCTTCAGTTGACTTAGCAATTTTTCTTTACACTTAGCTGGAATTT 250
grisescens_COI_Consensus     AGGRCCTCAGTTGATTTAGCAATTTTTCTTTACATCTTGCAGGTATTT 250
                               * * * * *
lupicaris_COI_Consensus      CTTCTATTCTAGGAGCTGTGAATTTTATCACAACATATTATCAATATGCGA 300
pulicaris_COI_Consensus      CTTCAATTCTAGGGGCGTAAATTTTATTACTACAATCATTAAATATACGT 300
impunctatus_COI_Consensus    CCTCTATCCTAGGGGCGTAAATTTTATTACAAACATTTAATATATACGA 300
punctatus_COI_Consensus      CCTCTATTCTAGGGGCGTAAATTTTATTACAAACATTTAATATATGCGA 300
newsteadiN1_COI_Consensus    CATCAATCTTAGGGGCGTAAATTTTATTACTACAATTTAATATATACGA 300
fagineus_ss_COI_Consensus    CTTCTATTCTAGGGGCGTAAATTTTATTACTACTATTATTAAATATACGA 300
grisescens_COI_Consensus     CTTCAATTTAGGAGCTGTAATTTTATTACTACAATTTAATATATACGA 300
                               * * * * *
lupicaris_COI_Consensus      TCTAATGGAATTTTCATTGACCGGTATACCCCTTATTGTGTGATCAGTCTT 350
pulicaris_COI_Consensus      TCTAACGGAATCTCATTGACCGGTATGCCTTATTGTGTTGATCAGTCTT 350
impunctatus_COI_Consensus    TCCAGAGGAATTTTCATTGATCGTATACCCCTTATTGIGTGATCTGTCCT 350
punctatus_COI_Consensus      TCAAACGGGATTTTCATTGATCGAATGCCATTTATTGTATGATCAGTTTT 350
newsteadiN1_COI_Consensus    TCAAATGGGATTTTCATTGATCGAATACCTTTATTGCGTTGATCAGTTTT 350
fagineus_ss_COI_Consensus    TCTAAAGGTATTACATTGATCGAATACCTTTATTGTGTGATCTGTCTC 350
grisescens_COI_Consensus     TCAAATGGAATTTACATTGATCGAATACCTTTATTGTCTGATCAGTTTT 350
                               * * * * *
lupicaris_COI_Consensus      AATTACTGCAATTTTATTATTACTTTCTTTACCAGTTTTGGCAGGAGCAA 400
pulicaris_COI_Consensus      AATCACTGCAATTTTACTGTTACTCTCTCTTCCCGTATTAGCCGGAGCAA 400
impunctatus_COI_Consensus    AATTACTGCTATCCTACTTTACTATCTTTACCAGTTTTAGCCGGAGCAA 400
punctatus_COI_Consensus      AATCACCGCTATTTTACTACTTTTATCTTTACCAGTTCTAGCCGGGGCAA 400
newsteadiN1_COI_Consensus    AATCACTGCAATTTTACTTCTATTATCTTTACCAGTTTTAGCCGGAGCAA 400
fagineus_ss_COI_Consensus    AATTACTGCTATTTTATTGCTTCTTTCCCTCCCTGTATTAGCAGGAGCTA 400
grisescens_COI_Consensus     AATTACAGTATTCTTTTACTTTTATCTCTCCAGTCTTAGCAGGAGCCA 400
                               * * * * *
lupicaris_COI_Consensus      TTACAATATTATTAACCGATCGAAACATCAATACTTCATTTTTTGACCCT 450
pulicaris_COI_Consensus      TCACGATACTTTTAACTGATCGAAACATTAATACATCATTTTTTGACCCT 450
impunctatus_COI_Consensus    TCACATACTTCTGACCGATCGAAATATTAATACTTCTTTTTTTGACCC 450
punctatus_COI_Consensus      TTACAATATTATTAACAGACCGAAATATCAATACTTCATTTTTTGACCCA 450
newsteadiN1_COI_Consensus    TTACAATACTATTAACAGACCGAAATATTAATACTTCTTTTGGACCC 450
fagineus_ss_COI_Consensus    TTACTATACTTCTTACTGATCGGAATATTAATACTTCTTTTTTTGACCCT 450
grisescens_COI_Consensus     TTACTATACTTCTTACAGACCGAAATATTAACACTTCATTCTTTGACCC 450
                               * * * * *
lupicaris_COI_Consensus      GCTGGAGGAGGGGACCCTATTTTATACCAACATTTATTTGATTCCTTGG 500
pulicaris_COI_Consensus      GCTGGAGGAGGAGACCCTATTTTATACCAACATTTATTTGATTCCTTGG 500
impunctatus_COI_Consensus    GCCGGAGGAGGAGATCCCATTTTATACCAACACTTATTTGATTCCTTGG 500
punctatus_COI_Consensus      GCCGGGGGGGGGAGACCCTATTTTATACCAACATCTATTTGATTCCTTGG 500
newsteadiN1_COI_Consensus    GCAGGAGGAGGCGACCCCATTTTATACCAACACTTATTTGATTTTTCGG 500
fagineus_ss_COI_Consensus    GCTGGAGGAGGAGACCCTATTTTATCAACATTTATTTGATTCCTTGG 500
grisescens_COI_Consensus     GCCGGGGGAGGAGACCCTATTTTATCAACATCTATTCTGATTTTGG 500
                               * * * * *
lupicaris_COI_Consensus      GCATCCAGAAGTTTATA 517
pulicaris_COI_Consensus      SCACCCGAAGTTTATA 517
impunctatus_COI_Consensus    ACACCCGAAGTTTATA 517
punctatus_COI_Consensus      CCACCCGAAGTTTATA 517
newsteadiN1_COI_Consensus    ACACCCGAAGTTTATA 517
fagineus_ss_COI_Consensus    CCACCCGAAGTTTATA 517
grisescens_COI_Consensus     YCACCCGAAGTTTATA 517
    
```

(B)

<i>Culicoides</i> - Art	N Individuen	Primer- Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Amplifikat- Länge (bp)
<i>C. pulicaris</i>	15	pul-COI- fwd	GGTTTGGAAATTGATTAGTTCCA CTTATAC	498
<i>C. punctatus</i>	23	punct- COI-fwd	CAATACTTCATTTTTTGACCCAGCC	87
<i>C. fagineus</i>	3	fag-COI- fwd	GGAGCTATTACTATACTTCTTACTGATCGG	122
<i>C. grisescens</i>	5	gris-COI- fwd	TGCAGGTATTTCTTCAATTTTAGGAGCT	272
<i>C. impunctatus</i>	11	impct- COI-fwd	GTGTGATCTGTCCTAATTACTGCTATCC	177
<i>C. lupicaris</i>	4	lup-COI- fwd	TACTCCCCCCTCTTTAACAC	417
<i>C. newsteadi</i> N1	10	new1- COI-fwd	ATATCCGCCTCTTTCAAGAAATATCTCC	344

Tab. 4: (A) Alignment der COI-Konsensus-Sequenzen der Arten des *C. pulicaris*-Komplexes: gelbe Markierung = Sequenzier-Primer(, blaue Markierung = Positionen der Spezies-spezifischen Primer (B) Spezies-spezifische Primer *C. pulicaris*-Komplex. N_{Individuen} = Anzahl der Individuen

7.2 real-time PCR

7.2.1 Auswahl von speziesspezifischen real-time PCR-Assays

Für die Generierung von speziesspezifischen real-time PCR Assays wurden die zur Verfügung stehenden Sequenzen der COI-Region genutzt. Basierend auf eigenen Sequenzierarbeiten hat sich herausgestellt, dass die ITS1+ITS2-Region deutlich schwieriger zu sequenzieren ist als die COI-Region. Warum dies so ist, konnte bisher nicht geklärt werden. Da auch eine repräsentative Anzahl von COI-Sequenzen der einzelnen Gnizenarten des *C. obsoletus*-Komplexes in der Datenbank vorliegt, wurde entschieden, die speziesspezifischen real-time PCR-Systeme zur Differenzierung der Gnizen auf Basis der COI-Region zu entwickeln.

Ausgangspunkt der Auswahl geeigneter Primer und Sonden für den speziesspezifischen Nachweis der Gnizen war ein Alignment aller verfügbaren COI-Sequenzen. Bei *C. obsoletus* s.s. wurden 94 Sequenzen in das Alignment aufgenommen. Bei *C. scoticus* waren es 50, bei *C. dewulfi* waren es 42 und bei *C. chiopterus* konnten 5 COI-Sequenzen für das Generieren einer speziesspezifischen Konsensus-Sequenz herangezogen werden. Die vier speziesspezifischen

Konsensussequenzen wurden danach miteinander verglichen und geeignete Regionen für die Auswahl von Primern und Sonden definiert. In der Abb. 38 ist der Abgleich der speziesspezifischen Konsensus-Sequenzen dargestellt.

Basierend auf den vorliegenden Konsensus-Sequenzen wurden für jede Gnitzenart zwei Sequenz-unabhängige real-time PCR-Systeme herausgesucht. Die gewählten Systeme überlappen in ihren Sequenzen nicht. Dabei besteht jedes der Systeme aus einer TaqMan-Sonde und ein bis zwei Forward- und Reverse-Primern. Bei verschiedenen Forward- und Reverse-Primern ist die Möglichkeit gegeben, alle Primer-Kombinationen hinsichtlich Sensitivität und Spezifität zu testen. So können bei zwei Forward- und zwei Reverse-Primern vier Primerkombinationen analysiert werden. Die verwendeten Primer- und Sonden sind in der Tabelle 1 zusammengefasst.

In ersten Versuchen wurde analysiert, welche Primer in Kombination mit den entsprechenden Sonden die beste Sensitivität aufweisen. Basierend auf diesen Untersuchungen wurden dann für jede Gnitzenart zwei unabhängige Primer-Sonden-Systeme für die weiteren Validierungen ausgewählt.

Grafik 1: Konsensussequenzen der COI-Region der Gnitzen des *C. obsoletus*-Komplex (*C. obsoletus s.s.*, *C. scoticus*, *C. chiopterus*, *C. dewulfi*)

	5	15	25	35	45	55
C. chiop-Cons	ACCCTCATA	CTAGGGGCC	CTGATATAGC	TTTTCCACGA	ATAAATAATA	TAAGTTTTTG
C. dew-Cons10	ACCTTTAATA	CTAGGRGCGC	CCGACATAGC	ATTCCTCGA	ATAAATAACA	TAAGATTCTG
C. obs-Cons10	ACCYTTAATA	CTAGGGGCC	CCGATATAGC	YTTTCCCCGA	ATAAATWATA	TAAGATTTTG
C. scot-Cons1	ACCTTTAATA	CTAGGTGCC	CAGATATAGC	TTTTCCYCGA	ATAAAYAATA	TAAGATTTTG

	65	75	85	95	105	115
C. chiop-Cons	AATACTACCG	CCCTCTATCA	CCCTACTATT	AGTAAGTAGC	TTAGTAGAAA	ATGGAGCAGG
C. dew-Cons10	AATACTCCCC	CCTTCAATTA	CTTTACTTTT	AGTAAGAGGA	TTAGTARAAA	ATGGGGCCGG
C. obs-Cons10	AATRCTCCCM	CCTTCAATTA	CTTTATTATT	AATTAGAAGC	TTAGTAGAAA	AYGGRGCMGG
C. scot-Cons1	AATGCTCCCY	CCTTCAATCA	CTTTATTATT	AATTAGAAGT	TTAGTTGAAA	ATGGAGCCGG

	125	135	145	155	165	175
C. chiop-Cons	AACTGGATGA	ACTGTTTACC	CCCCTCTTTC	AGCTAATGTT	TCTCATGCTG	GTGCATCAGT
C. dew-Cons10	AACAGGTTGA	ACAGTTTACC	CCCCCCTGTC	AGCCAATATC	TCTCATGCCG	GAGCCTCGGT
C. obs-Cons10	AACCGGCTGA	ACTGTTTAYC	CCCCYCTTTC	RTCTAATATC	TCTCAYRCAG	GRGCYTCWGT
C. scot-Cons1	AACTGGCTGA	ACTGTTTACC	CYCCACTTTC	AGCAAATGTC	TCCCATGCAG	GARCCTCAGT

	185	195	205	215	225	235
C. chiop-Cons	AGATTTAGCA	ATTTTTTCTT	TACATTTAGC	RGGTATTAGY	TCTATTTTAG	GGGCTGTAAA
C. dew-Cons10	AGACCTGGCA	ATTTTTTCCC	TGCATTTGGC	AGGAATTAGC	TCAATCCTAG	GAGCAGTAAA
C. obs-Cons10	AGATTTGGYT	ATTTTTTCYT	TACATTTAGC	TGGTATTAGY	TCTATTTTAG	GRGCCGTAAA
C. scot-Cons1	TGAYTTAGCA	ATTTTTTCTC	TACATTTAGC	AGGWATTAGC	TCTATTTTAG	GRGCAGTAAA

	245	255	265	275	285	295
C. chiop-Cons	TTTCATTACC	ACTATTATTA	ATATACGTTT	TAATGGAATA	ACTTTTGACC	GAATACCTTT
C. dew-Cons10	TTTTATCACA	ACAATCATT	ATATACGACC	AAATAGAATA	TTATTTGAAC	AAATACCCCT
C. obs-Cons10	TTTTATTACT	ACTATTATTW	ATATACGATC	TTAYGGDATA	ACTTTTGACC	GWATACCYTT
C. scot-Cons1	TTTTATTACC	ACAATTATTA	ATATGCGATC	TACCGGCATA	ACTTTTGATC	GAATACCTCT

	305	315	325	335	345	355
C. chiop-Cons	ATTTGTTTGR	TCTGTTCTTC	TMACTGCAAT	TTACTCCTT	TTATCATTAC	CGGTATTAGC
C. dew-Cons10	CTTTGTTTGA	TCAGTATTAA	TCACAGCTAT	TCTTTTACTT	CTGTCACTTC	CAGTTTTTAGC
C. obs-Cons10	ATTTGTRTGA	TCMGTATTAA	TTACAGCTAT	TTACTTCTT	TTATCTTTRC	CTGTTTTTAGC
C. scot-Cons1	ATTTGTTTGA	TCCGTATTAA	TTACCGCTAT	TTACTTCTT	TTATCCCCTAC	CAGTATTAGC

	365	375	385	395	405	415
C. chiop-Cons	AGGAGCTATT	ACGATACTTT	TAACAGATCG	AAATATTAAC	ACTTCATTTT	TTGACCCAGC
C. dew-Cons10	AGGAGYTATT	ACTATACTTC	TTAYTGATCG	AAATATCAAT	ACCTCATTTT	TTGACCCYGC
C. obs-Cons10	AGGRGCTATY	ACYATRCTYT	TAACYGACCG	AAATATYAAT	ACTTCATTTT	TTGACCCCTGC
C. scot-Cons1	AGGRGCTATT	ACCATACTTT	TAACAGAYCG	AAATATWAAT	ACTTCATTTT	TTGACCCSGC

	425	435	445	455	465	475
C. chiop-Cons	AGGTGGRGGR	GACCCATATC	TTTACCAACA	TTTATTTTGA	TTTTTTGGCC	AC...
C. dew-Cons10	CGGRGGRGGT	GACCCAATCT	TATACCAMCA	TTTATTTTGA	TTTTTTGGWC	AY...
C. obs-Cons10	RGGRGGRGGA	GACCCAATTY	TTTACCAMCA	TTTATTTTGA	TTTTTTGGMC	AYCCT
C. scot-Cons1	WGGTGGAGGT	GACCCMATTC	TTTACCAACA	TTTATTTTGA	TTTTTTGGMC	AYCCC

Abb. 38: Konsensussequenzen der COI-Region des *Obsoletus*-Komplexes

7.2.2 Validierung der real-time PCR-Systeme und Sequenzierung

Mit den 8 Primer-Sonden-Systemen (je 2 für jede der 4 Gnitzenarten) wurden weitere Gnitzen des entomologischen Monitorings analysiert (Tab. 5). Insgesamt wurden 160 Einzelgnitzen in die Analyse mit einbezogen. Hierbei stellte sich heraus, dass in den meisten Fällen die Charakterisierung der Gnitzenart eindeutig war. Von den 160 Proben konnten 51 Gnitzen eindeutig der Spezies *C. obsoletus* s.s. zugeordnet werden. 92 Gnitzen wurden an Hand der real-time PCR als *C. scoticus* definiert. In nur einem Fall konnte, basierend auf den Ct-Werten aller vier eingesetzten real-time PCR-Systeme, keine eindeutige Zuordnung zur Spezies *C. scoticus* bzw. *C. obsoletus* s.s. getroffen werden (Gnitze KH). Hier wird die Sequenzierung der real-time PCR-Produkte zeigen, ob es sich um eine kontaminierte Mischprobe handelt oder das COI-Genom dieser Gnitze doch durch alle 4 *C. scoticus*- und *C. obsoletus* s.s.-real-time PCR-Systeme vergleichbar amplifiziert wird. Bisher wurden für 12 Gnitzen, für die in der real-time PCR-Analyse eine eindeutige Spezieszugehörigkeit definiert werden konnte, die COI-Sequenzierung durchgeführt. In allen Fällen (5x *C. obsoletus* s.s., 6x *C. scoticus* und 1x *C. chiopterus*) bestätigte die Sequenzierung die zuvor mittels real-time PCR ermittelte Spezieszugehörigkeit.

Bei der Untersuchung von 3 Gnitzen (FL, FY und HT) zeigte sich, dass neben den zwei eindeutig positiven Ergebnissen der *C. obsoletus* s.s.-real-time PCR-Systeme auch immer ein System von *C. scoticus* vergleichbar mit reagierte. Hier konnte durch Sequenzierung der COI-Region gezeigt werden, dass die beiden gleichwertig Ergebnisse der *C. obsoletus* s.s.-Assays die richtige Aussage hinsichtlich der Spezies getroffen hatten. Somit sind diese drei deutlich positiven Ergebnisse eines *C. scoticus*-Assays als Unspezifität zu werten.

Eine vergleichbare Beobachtung wurde für die Gnitze FC gemacht. Allerdings reagierten hier beide *C. scoticus*-Assays positiv, und nur ein *C. obsoletus* s.s.-Assay zeigte einen annähernd vergleichbaren Ct-Wert. Die Sequenzierung für diese Probe wird noch durchgeführt. Es ist aber zu erwarten, dass auch hier das doppelt-positive *C. scoticus*-Ergebnis bestätigt wird und dass das eine positive *C. obsoletus* s.s.-Resultat als Unspezifität zu werten ist.

Bei den Gnitzen FB, FL, FN, FX, GI, GP, GX, GY, HU, IZ und KA wurden zudem unspezifische Reaktionen einer PCR mit Ct-Werten nahe dem Detektionslimit

beobachtet. Da gleichzeitig immer zwei real-time Systeme einer Spezies klare Ergebnisse lieferten, können diesen fraglichen Reaktionen klar als Unspezifität definiert werden.

Die Gnitze HZ konnte mittels der beiden *C. chiopterus*-real-time PCR-Assays eindeutig als *C. chiopterus* definiert werden. Dieses Resultat konnte durch die Sequenzierung der COI-Region bestätigt werden. Der *C. chiopterus*-Assay 11 reagierte nur in einem Fall unspezifisch (Gnitze IS). Auch für diese Gnitze IS produzierten die beiden *C. obsoletus* s.s.-Assays eindeutige Resultate, so dass dieses schwache *C. chiopterus*-Ergebnis als Unspezifität anzusprechen ist.

Keine der 160 getesteten Gnitzen konnte als *C. dewulfi* identifiziert werden. Da in Vorversuchen die grundsätzliche Funktionalität der Assays für die Erkennung von *C. dewulfi* gezeigt werden konnte und auch die positiven Kontrollen erwartungsgemäß reagierten, ist davon auszugehen, dass unter den 160 analysierten Proben in der Tat keine *C. dewulfi* zu finden war (Abb. 39). Die beiden verwendeten Assays zeigten zudem auch keinerlei Unspezifität mit den anderen Gnitzenarten.

Bei 12 der 160 getesteten Gnitzen reagierte keine der entwickelten real-time PCR Systeme. Da durch die Sequenzierung der Proben gezeigt werden konnte, dass Gnitzen-DNA in den Proben enthalten war, stellt sich die Frage nach der Art dieser Proben. Die Sequenzierung der COI-Region und der nachfolgende Abgleich mit den Sequenzen der GenBank zeigten keinerlei signifikante Homologien zu einer der vier Arten der *C. obsoletus*-Komplexes. Somit ist die Artbestimmung dieser 12 bisher nicht reagierenden Gnitzen weiterhin unbekannt. Durch Sequenzierung der ITS1+ITS2-Region wird aktuell versucht, die Gnitzenart zu definieren. Sollte sich herausstellen, dass es sich bei diesen 12 Gnitzen um andere Arten handelt, ist die Spezifität der entwickelten real-time PCR-Systeme gezeigt. Sollte es sich andererseits bei den 12 unbekannten Gnitzen um Unterarten der vier Vertreter des *C. obsoletus*-Komplexes handeln, so ist von einer nicht unerheblichen Sequenzvariabilität, zumindest im COI-Gen, auszugehen. Aus den bisher vorliegenden Daten ist nicht davon auszugehen, dass die verwendeten acht real-time PCR-Systeme eine mangelnde diagnostische Sensitivität besitzen, also *Obsoletus*-Gnitzen, welche die Assays eigentlich erkennen sollten, nicht detektieren können.

Tabelle 1: Primer und Sonden-Sequenzen

Primer/Sonden-Name	Sequence 5`-3`
Cscot-COI-74F	TCA ATC ACT TTA TTA TTA ATT AGA AGT
Cscot-COI-79F	CAC TTT ATT ATT AAT TAG AAG TTT AGT T
Cscot-COI-180R	ACT GAG GYT CCT GCA TGG
Cscot-COI-205R	ATG TAG AGA AAA AAT TGC TAA RTC A
Cscot-COI-137FAM	FAM-TAC CCY CCA CTT TCA GCA AAT GTC TC-BHQ1
Cscot-COI-214F	WAT TAG CTC TAT TTT AGG RGC A
Cscot-COI-229F	AGG RGC AGT AAA TTT TAT TAC C
Cscot-COI-310R	TCA AAC AAA TAG AGG TAT TCG A
Cscot-COI-346R	GGA TAA AAG AAG TAA AAT AGC G
Cscot-COI-261FAM	FAM-ATA TGC GAT CTA CCG GCA TAA CTT TTG-BHQ1
Cobs-COI-105F	TAG AAA ATG GRG CMG GAA CC
Cobs-COI-187R	CAA ATC TAC AGA RGC YCC TG
Cobs-COI-215R	ATA CCA GCT AAA TGT AAR GAA AAA ATA
Cobs-COI-140FAM	FAM-CCC CCY CTT TCR TCT AAT ATC TCT CA-BHQ1
Cobs-COI-247F	TAC TAC TAT TAT TWA TAT ACG ATC TT
Cobs-COI-365R	CTC CTG CTA AAA CAG GYA AA
Cobs-COI-311FAM	FAM-TCM GTA TTA ATT ACA GCT ATT TTA CTT CTT TTA T-BHQ1
Cdew-COI-267F	GAC CAA ATA GAA TAT TAT TTG AAC A
Cdew-COI-277F	AAT ATT ATT TGA ACA AAT ACC CCT C
Cdew-COI-369R	ATA RCT CCT GCT AAA ACT GGA
Cdew-COI-402R	GTA TTG ATA TTT CGA TCA RTA AG
Cdew-COI-310FAM	FAM-TCA CAG CTA TTC TTT TAC TTC TGT CAC-BHQ1
Cdew-COI-17F	GCG CCC GAC ATA GCA TTC
Cdew-COI-113R	CAT TTT YTA CTA ATC CTC TTA CTA AA
Cdew-COI-48FAM	FAM-ACA TAA GAT TCT GAA TAC TCC CCC CTT CA-BHQ1
Cchi-COI-18F	CCC CTG ATA TAG CTT TTC CA
Cchi-COI-104R	CTA AGC TAC TTA CTA ATA GTA GG
Cchi-COI-51FAM	FAM-TAA GTT TTT GAA TAC TAC CGC CCT CTA TCA-BHQ1
Cchi-COI-108F	AAA ATG GAG CAG GAA CTG GA
Cchi-COI-261R	TTA ATA ATA GTG GTA ATG AAA TTT ACA
Cchi-COI-153FAM	FAM-CTA ATG TTT CTC ATG CTG GTG CAT CAG T-BHQ1

Tab. 5: Primer- und Sonden-Sequenzen

Tabelle 2: Ergebnisse der real-time PCR und der Sequenzierung

NRL-Mummer	Template	C.scot. Mix1	C.scot. Mix 2	C.obs. s.s Mix 3	C.obs. s.s Mix 5	C.dew. Mix6	C.dew. Mix10	C.chiop. Mix 11	C.chiop. Mix 12	Spezieszuordnung nach COI-Sequenzierung
BH97-07	EQ	N/A	N/A	27,63	29,04	N/A	N/A	N/A	N/A	Culicoides obsoletus
BH97-07	ER	N/A	N/A	30,68	32,27	N/A	N/A	N/A	N/A	Culicoides obsoletus
BH97-07	ES	26,08	26,03	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Culicoides scoticus
BH97-07	ET	25,75	25,91	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Culicoides scoticus
BH97-07	EU	N/A	N/A	27,03	29,03	N/A	N/A	N/A	N/A	Culicoides obsoletus
BH97-07	EV	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	kein genaues Ergebnis
BH97-07	EW	25,68	26,08	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Culicoides scoticus
BH97-07	EX	28,19	28,98	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Culicoides scoticus
BH97-07	EY	25,25	25,78	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Culicoides scoticus
BH97-07	EZ	25,46	26,09	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Culicoides scoticus
BH97-07	FA	N/A	N/A	25,08	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Culicoides obsoletus
BH97-07	FB	27,18	27	N/A	39,46	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	FC	25,01	25,53	N/A	28,53	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	FD	27,25	27,51	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	FE	26,07	26,35	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	FF	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	kein genaues Ergebnis
BH97-07	FG	24,95	25,08	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	FH	26,22	26,42	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	FI	25,02	25,33	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	FJ	25,27	25,63	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	FK	24,86	25,41	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	FL	39,68	25,48	25,77	30,44	N/A	N/A	N/A	N/A	Culicoides obsoletus
BH97-07	FM	28,38	28,56	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	FN	38,99	N/A	24,75	26,17	N/A	N/A	N/A	N/A	Culicoides obsoletus
BH97-07	FO	N/A	N/A	25,75	27,11	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	FP	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	kein genaues Ergebnis
BH97-07	FQ	25,27	25,96	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	FR	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	kein genaues Ergebnis
BH97-07	FS	25,43	25,47	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	FT	27,24	27,04	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	FU	26,16	26,85	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	FV	26,64	26,27	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	FW	29,44	29,84	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	FX	39,71	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	FY	27,3	N/A	27,31	29,41	N/A	N/A	N/A	N/A	Culicoides obsoletus
BH97-07	FZ	27,12	27,31	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	GA	N/A	N/A	28,58	29,57	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	GB	27,38	27,29	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	GC	28,22	28,6	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	GD	28,15	28,3	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	GE	27,01	27	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	GF	29,09	29,18	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	GG	27,01	27,34	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	GH	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	kein genaues Ergebnis
BH97-07	GI	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	kein genaues Ergebnis
BH97-07	GJ	27,24	28,01	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	GK	N/A	26,9	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	GL	38,92	N/A	27,64	28,8	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	GM	26,6	26,91	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	GN	24,38	24,8	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	GO	25,08	25,4	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	GP	41,86	N/A	26,11	27,67	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	GQ	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	kein genaues Ergebnis
BH97-07	GR	N/A	N/A	24,99	26,84	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	GS	25,16	25,55	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	GT	25,02	25,35	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	GU	27,37	27,44	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	GV	25,72	26,31	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	GW	N/A	N/A	27,31	28,55	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	GX	40,24	N/A	25,4	27,11	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	GY	39,48	N/A	27,48	28,55	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	GZ	N/A	N/A	28,87	30,46	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	HA	26,19	26,64	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	HB	N/A	N/A	27,22	28,57	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	HC	25,58	25,89	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	HD	N/A	N/A	26,23	28,02	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	HE	27,39	27,88	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	HF	26,55	26,62	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	HG	26,38	26,59	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	HH	24,73	25,16	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	HI	27,29	27,66	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	HJ	N/A	N/A	27,43	28,87	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	HK	N/A	N/A	23,94	25,67	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	HL	25,1	25,43	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	HM	25,62	26,38	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	HN	25,62	26,21	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	HO	25,85	26,29	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	HP	N/A	N/A	26,29	27,89	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	HQ	26,4	26,79	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	HR	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	kein genaues Ergebnis

NRL-Mummer	Template	C.scot. Mix1	C.scot. Mix 2	C.obs. s.s Mix 3	C.obs. s.s Mix 5	C.dew. Mix6	C.dew. Mix10	C.chiop. Mix 11	C.chiop. Mix 12	Spezieszuordnung nach COI-Sequenzierung
BH97-07	HS	N/A	N/A	26,63	28,04	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	HT	25,61	N/A	25,59	26,83	N/A	N/A	N/A	N/A	Culicoides obsoletus
BH97-07	HU	37,99	N/A	26,51	27,89	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	HV	25,34	26,02	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	HW	N/A	N/A	26,37	27,82	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	HX	27,67	28,27	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	HY	N/A	N/A	26,56	27,71	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	HZ	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	26,2	25,87	Culicoides chiopterus
BH97-07	IA	25,86	26,4	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	IB	N/A	N/A	27,22	28,96	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	IC	26,09	26,66	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	ID	26,9	27,15	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	IE	24,43	25,05	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	IF	25,96	26,41	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	IG	26,6	27,22	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	IH	24,44	25,52	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	II	25,24	26,06	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	IJ	N/A	N/A	25,83	27,74	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	IK	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	kein genaues Ergebnis
BH97-07	IL	26,56	27,02	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	IM	25,82	26,44	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	IN	N/A	N/A	26,42	27,82	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	IO	26,58	27,07	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	IP	27,28	27,25	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	IQ	N/A	N/A	25,32	26,95	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	IR	28,17	28,88	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	IS	N/A	N/A	27,33	28,89	N/A	N/A	38,96	N/A	
BH97-07	IT	N/A	N/A	28,68	30,56	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	IU	N/A	N/A	24,86	26,54	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	IV	24,44	25,88	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	IW	25,15	25,8	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	IX	N/A	N/A	28,06	29,48	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	IY	25,89	26,41	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	IZ	40,25	N/A	24,98	26,55	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	JA	N/A	N/A	25,58	27,1	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	JB	25,52	26,15	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	JC	N/A	N/A	25,85	27,55	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	JD	N/A	N/A	26,4	27,97	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	JE	26,19	26,23	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	JF	24,53	24,96	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	JG	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	kein genaues Ergebnis
BH97-07	JH	25,77	26,16	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	JI	N/A	N/A	26,95	28,38	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	JJ	N/A	N/A	27,77	29,62	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	JK	25,72	26,1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	JL	27,15	27,17	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	JM	25,16	25,57	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	JN	27,35	27,96	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	JO	24,79	25,44	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	JP	27,17	27,89	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	JQ	26,91	27,51	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	JR	N/A	N/A	25,34	26,85	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	JS	24,68	25,46	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	JT	N/A	N/A	25,35	26,89	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	JU	23,92	24,68	N/A	39,6	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	JV	N/A	N/A	25,6	27,11	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	JW	25,82	26,41	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	JX	N/A	N/A	26,45	28,08	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	JY	25,03	25,37	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	JZ	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	kein genaues Ergebnis
BH97-07	KA	40,44	N/A	26,68	28,05	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	KB	30,52	31,56	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	KC	N/A	N/A	25,89	27,54	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	KD	N/A	N/A	25,08	26,62	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	KE	25,74	26,33	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	KF	N/A	N/A	24,34	25,86	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	KG	26,14	26,7	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	KH	31,08	32,19	31,39	33,41	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	KI	N/A	N/A	25,78	28,12	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	KJ	26,21	26,63	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	KK	N/A	N/A	25,85	27,44	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	KL	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	KM	N/A	N/A	25,29	26,74	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	KN	26,45	27,17	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	KO	25,43	25,91	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	KP	26,38	27,05	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	KQ	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	KR	26,6	27,42	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BH97-07	KS	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	kein genaues Ergebnis
BH97-07	KT	27	27,8	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	

COI-Mix 1 : Cscot-COI-79F + Cscot-COI-180R + Cscot-COI-137FAM
 COI-Mix 2 : Cscot-COI-214F + Cscot-COI-346R + Cscot-COI-261FAM
 COI-Mix 3 : Cobs-COI-105F + Cobs-COI-187R + Cobs-COI-140FAM
 COI-Mix 5 : Cobs-COI-247F + Cobs-COI-365R + Cobs-COI-311FAM

COI-Mix 6 : Cdew-COI-267F + Cdew-COI-369R + Cdew-COI-310FAM
 COI-Mix 10 : Cdew-COI-17F + Cdew-COI-113R + Cdew-COI-48FAM
 COI-Mix 11 : Cchi-COI-18F + Cchi-COI-104R + Cchi-COI-51FAM
 COI-Mix 12 : Cchi-COI-108F + Cchi-COI-261R + Cchi-COI-153FAM

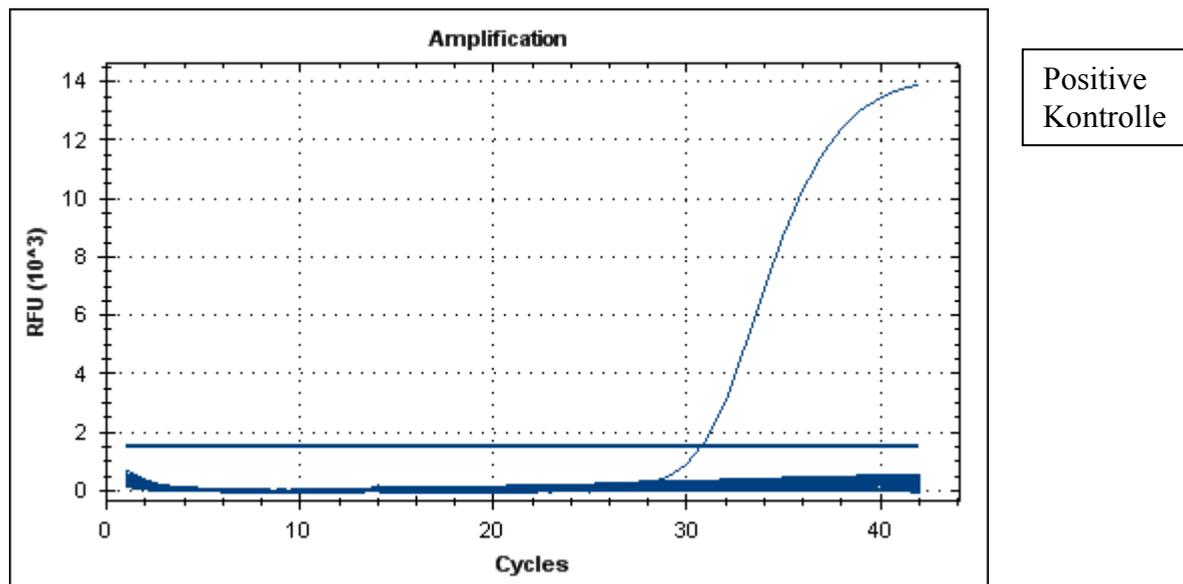


Abb. 39: Analyse des Gnitzen-Panels mit der *C. dewulfi*-spezifische real-time PCR (Assay 6)

7.3 Phylogenie

7.3.1 Sequenz-Analyse

Zur Sequenz-Analyse und für die Erstellung der phylogenetischen Stammbäume wurden nur vollständige Sequenzen von einzelnen Individuen verwendet.

Die COI-Sequenzen zeigen die typische Variabilität mitochondrial kodierender Gene - das Codon an der dritten Position weist die höchste Variabilität auf. Die Nukleotid-Sequenzen wurden mittels des mitochondrialen Codes von Invertebraten in Aminosäure-Sequenzen übersetzt. Sie enthalten kein Stop-Codon, und die Struktur ist somit typisch für mitochondriale Gene von Insekten (Lunt et al. 1996). Der COI-Datensatz besteht aus 102 verschiedenen Haplotypen. Die Haplotyp-Diversität reicht von 0,000 für die Arten, die einen einheitlichen Haplotyp für alle Individuen aufweisen bis $1,000 \pm 0,500$ für die Arten, bei denen jedes Individuum im untersuchten Datensatz einen anderen Haplotyp zeigt. Die Nukleotid-Diversität Π als ein Maß für die genetische Variation wurde für alle Arten ermittelt, bei der zwei oder mehr Sequenzen zur Verfügung standen. Die höchsten Werte zeigen *C. fagineus* s.s. (0,01512) und *C. circumscriptus* (0,01296), die niedrigsten Werte weisen *C. imicola*, *C. pictipennis*, *C. simulator* und *C. vexans* (jeweils 0,0000) auf. Der durchschnittliche G+C-Gehalt beträgt 0,359. Das zeigt, dass die DNA aller untersuchten Arten AT-

reich ist, was für mitochondrial kodierende Gene in Insekten typisch ist (Croizer & Croizer 1993).

Die ITS2-Sequenzen weisen sowohl stark konservierte als auch hochvariable Bereiche auf. Der Datensatz zeigt 71 verschiedene Haplotypen. Die Haplotypen-Diversität reicht auch hier von 0,000 bis $1,000 \pm 0,500$. Die Nukleotid-Diversität Π wurde für alle Arten ermittelt. *Culicoides pulicaris* (0,06301) und *C. dewulfi* (0,05556) weisen die höchsten, *C. fagineus*, *C. fasciipennis*, *C. griseidorsum* und *C. puncticollis* (jeweils 0,0000) die niedrigsten Werte auf. Der durchschnittliche GC-Gehalt beträgt 0,316. Damit ist ITS2 etwas AT-reicher als COI.

<i>Culicoides</i> -Art	N _{Sequenz}	N _{Haplotyp}	H ± SD	Π±SD	G+C Gehalt
<i>C. achrayi</i>	2	2	1,000±0,500	0,00432±0,00216	0,385
<i>C. albicans</i>	9	6	0,889±0,091	0,00696±0,00298	0,391
<i>C. chiopterus</i>	12	7	0,879±0,075	0,00684±0,00218	0,354
<i>C. circumscriptus</i>	9	6	0,833±0,127	0,01224±0,00265	0,395
<i>C. dewulfi</i>	2	2	1,000±0,500	0,00216±0,00108	0,388
<i>C. fagineus s.s.</i>	2	2	1,000±0,500	0,01512±0,00756	0,347
<i>C. fasciipennis</i>	1	1	-	-	0,345
<i>C. festivipennis</i>	20	14	0,953±0,033	0,00780±0,00106	0,360
<i>C. flavipulicaris</i>	4	4	1,000±0,177	0,00516±0,00168	0,344
<i>C. fuscillatus</i>	1	1	-	-	0,381
<i>C. griseidorsum</i>	5	4	0,900±0,161	0,01296±0,00594	0,369
<i>C. grisescens</i>	2	2	1,000±0,500	0,00216±0,00108	0,362
<i>C. imicola</i>	4	1	0	0	0,314
<i>C. impunctatus</i>	8	5	0,857±0,108	0,00255±0,00055	0,383
<i>C. lupicaris</i>	2	2	1,000±0,500	0,00432±0,00216	0,365
<i>C. minutissima</i>	1	1	-	-	0,331
<i>C. newsteadi N1</i>	7	2	0,286±0,196	0,00062±0,00042	0,378
<i>C. newsteadi N2</i>	1	1	-	-	0,365
<i>C. newsteadi N3</i>	1	1	-	-	0,362
<i>C. nubeculosus</i>	1	1	-	-	0,340
<i>C. obsoletus s.s.</i>	11	4	0,691±0,128	0,00511±0,00120	0,353
<i>C. pictipennis</i>	2	1	0	0	0,363
<i>C. pulicaris</i>	9	5	0,861±0,087	0,01164±0,00500	0,380
<i>C. punctatus</i>	18	14	0,935±0,052	0,00617±0,00099	0,368
<i>C. puncticollis</i>	6	3	0,733±0,155	0,00203±0,00072	0,327
<i>C. riethi</i>	2	2	1,000±0,500	0,00387±0,00193	0,352
<i>C. salinarius</i>	1	1	-	-	0,398
<i>C. scoticus</i>	8	4	0,643±0,184	0,00281±0,00100	0,306
<i>C. simulator</i>	5	1	0	0	0,363
<i>C. stigma</i>	1	1	-	-	0,335
<i>C. vexans</i>	2	1	0	0	0,361

Tab. 7: Polymorphismen der analysierten *Culicoides*-Arten für das COI-Fragment: N_{Sequenz} = Anzahl an Sequenzen, N_{Haplotyp} = Anzahl an Haplotypen, H = Haplotyp-Diversität ± Standardabweichung, Π = Nukelotid-Diversität ± Standardabweichung

Culicoides-Art	N _{Sequenz}	N _{Haplotyp}	H ± SD	Π±SD	G+C Gehalt
<i>C. achrayi</i>	3	3	1,000±0,272	0,02585±0,01135	0,334
<i>C. albicans</i>	7	3	0,524±0,209	0,03428±0,02116	0,319
<i>C. chiopterus</i>	9	7	0,944±0,070	0,02144±0,00692	0,320
<i>C. circumscriptus</i>	12	4	0,561±0,154	0,00277±0,00095	0,294
<i>C. dewulfi</i>	2	2	1,000±0,500	0,05556±0,02778	0,306
<i>C. fagineus s.s.</i>	2	1	0	0	0,318
<i>C. fasciipennis</i>	2	1	0	0	0,305
<i>C. festivipennis</i>	11	9	0,945±0,066	0,05155±0,01891	0,294
<i>C. flavipulicaris</i>	4	3	0,833±0,222	0,02717±0,00738	0,306
<i>C. fuscillatus</i>	1	1	-	-	0,317
<i>C. griseidorsum</i>	6	1	0	0	0,310
<i>C. grisescens</i>	4	2	0,500±0,265	0,00140±0,00074	0,320
<i>C. imicola</i>	4	3	0,833±0,222	0,05814±0,01642	0,313
<i>C. impunctatus</i>	4	3	0,833±0,222	0,02617±0,01303	0,305
<i>C. newsteadi NI</i>	6	3	0,600±0,215	0,06686±0,02301	0,308
<i>C. nubeculosus</i>	2	1	0	0	0,350
<i>C. obsoletus s.s.</i>	20	2	0,100±0,088	0,00084±0,00071	0,327
<i>C. pictipennis</i>	4	4	1,000±0,177	0,04179±0,00885	0,309
<i>C. pulicaris</i>	6	5	0,933±0,122	0,06301±0,01292	0,331
<i>C. punctatus</i>	20	4	0,674±0,076	0,01981±0,00601	0,315
<i>C. puncticollis</i>	3	1	0	0	0,345
<i>C. scoticus</i>	4	2	0,500±0,265	0,00139±0,00074	0,343
<i>C. simulator</i>	4	4	1,000±0,177	0,02379±0,00650	0,318
<i>C. stigma</i>	1	1	-	-	0,320
<i>C. vexans</i>	1	1	-	-	0,271

Tab. 8: Polymorphismen der analysierten *Culicoides*-Arten für das ITS2-Fragment: N_{Sequenz} = Anzahl an Sequenzen, N_{Haplotyp} = Anzahl an Haplotypen, H = Haplotyp-Diversität ± Standardabweichung, Π = Nukelotid-Diversität ± Standardabweichung

7.2.2 Dendrogramme COI

Das aus 160 COI-Sequenzen von 31 *Culicoides*-Arten erstellte Dendrogramm (Abb. 13) zeigt deutlich verschiedene, separierte OTUs (operational taxonomic units). Jede dieser Einheiten setzt sich aus den Individuen einer einzelnen Art zusammen. Die Mitglieder des *C. pulicaris*-Komplexes bilden je zwei große Cluster: *C. punctatus*, *C. newsteadi*, *C. grisescens* und *C. flavipulicaris* sowie *C. pulicaris*, *C. lupicaris* und *C. impunctatus*. Diese Cluster-Bildung wird mit einem Bootstrap-Wert von lediglich 48% unterstützt. Die drei Subspezies von *C. newsteadi* (Pagès et al. 2009) sind über

beide Cluster verteilt, wobei aber die *C. newsteadi* N1-Individuen zusammen gruppiert sind. Die Mitglieder des *C. obsoletus*-Komplexes bilden ebenfalls einen Cluster aus *C. chiopterus*, *C. scoticus* und *C. obsoletus*. *Culicoides dewulfi* steht deutlich außerhalb dieser Gruppierung.

Weiterhin wurden zwei weitere phylogenetische Stammbäume, jeweils nur mit den Sequenz-Daten der einzelnen Arten des *C. pulicaris*- und des *C. obsoletus*-Komplexes, erstellt. Das Dendrogramm des *C. pulicaris*-Komplexes (Abb. 14) basiert auf 53 COI-Sequenzen von acht verschiedenen Arten. Es zeigt deutlich, dass *C. fagineus* und *C. flavipulicaris* nah verwandt zu sein scheinen (Bootstrap-Wert 72%). Das Dendrogramm des *C. obsoletus*-Komplexes (Abb. 13) basiert auf 32 Sequenzen von vier verschiedenen Spezies. Es verdeutlicht einmal mehr, dass *C. dewulfi* nicht in demselben phyletischen Cluster angesiedelt ist wie die anderen drei untersuchten Arten dieses Komplexes.

7.2.3 Dendrogramme ITS2

Das Dendrogramm (Abb. 40) basiert auf 142 Nukleotid-Sequenzen aus der ITS2-Region von 25 unterschiedlichen *Culicoides*-Spezies. Es zeigt ebenfalls verschieden separierte OTUs, die sich aus den Individuen der einzelnen Arten zusammensetzen. Die *C. obsoletus*-Komplexarten *C. obsoletus*, *C. scoticus* und *C. chiopterus* bilden eine deutliche Klade, wobei auch hier *C. dewulfi* außerhalb angesiedelt ist (Bootstrap-Wert 66%) und nah mit der spanischen Vergleichsart *C. imicola* verwandt zu sein scheint (Bootstrap-Wert 87%). Die Arten des *C. pulicaris*-Komplexes *C. pulicaris*, *C. punctatus*, *C. impunctatus* und *C. newsteadi* bilden ein deutliches Cluster. *Culicoides fagineus* zeigt auch hier eine deutliche Verwandtschaft mit der spanischen Vergleichsart *C. flavipulicaris* (Bootstrap-Wert 65%).

Auch für die ITS2-Region wurden zwei weitere phylogenetische Stammbäume, einer für den *C. pulicaris*- und einer für den *C. obsoletus*-Komplex, erstellt. Das Dendrogramm des *C. obsoletus*-Komplexes (Abb. 40/ 41) aus 35 Sequenzen von verschiedenen Arten und das des *C. pulicaris*-Komplexes (Abb. 42/ 43) resultierte aus 46 Sequenzen von verschiedenen Arten. Beide bestätigen und verdeutlichen die oben genannten Ergebnisse des Dendrogrammes für alle *Culicoides*-Spezies.

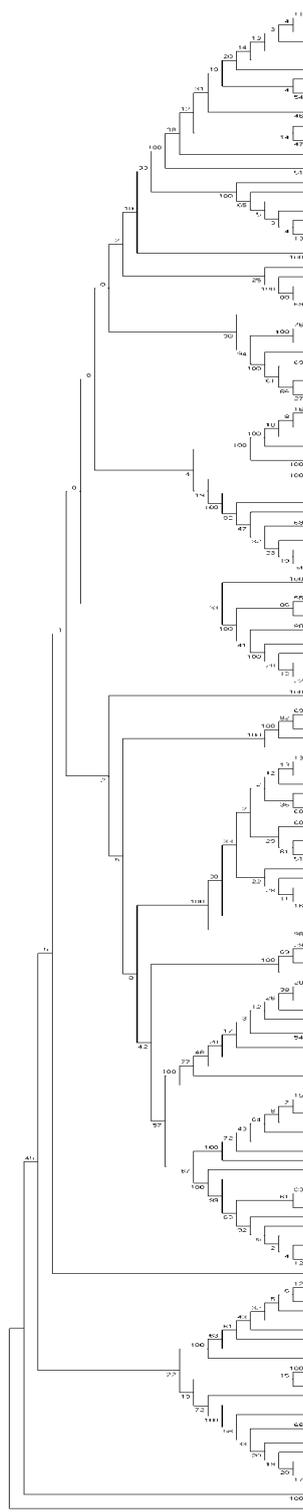


Abb.40: Phylogenetischer Stammbaum für *Culicoides*, ermittelt auf Grundlage von 160 COI Sequenzen. Die Zahl an jeder Verzweigung entspricht der Prozentzahl, mit welcher die assoziierten Taxa im Bootstrap-Test (1000 Replikationen) ein Cluster bildeten.

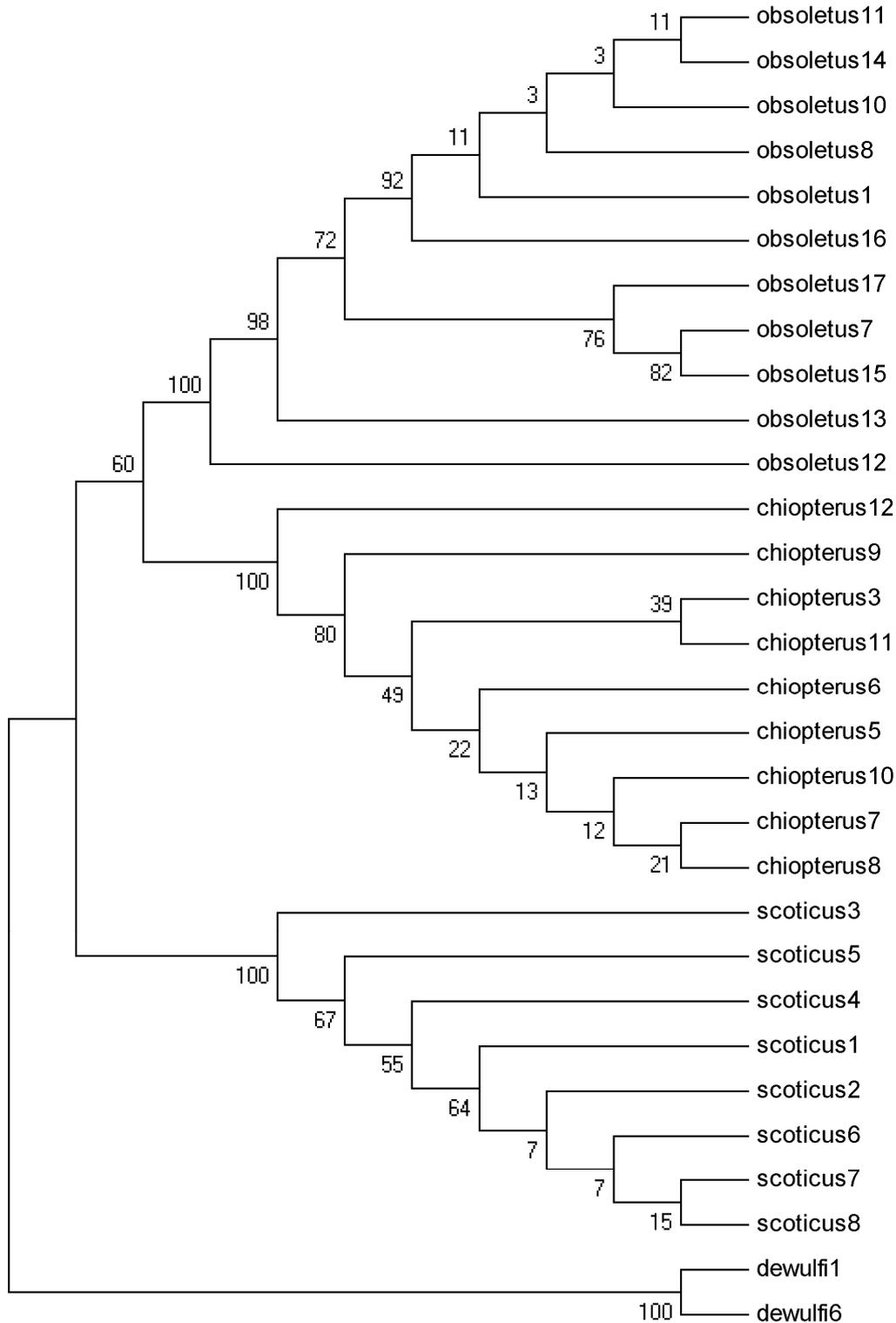


Abb. 41: Phylogenetischer Stammbaum für den *C. obsoletus*-Komplex ermittelt auf der Grundlage von 32 COI-Sequenzen. Die Zahl an jeder Verzweigung entspricht der Prozentzahl, mit welcher die assoziierten Taxa im Bootstrap-Test (1000 Replikationen) ein Cluster bildeten.

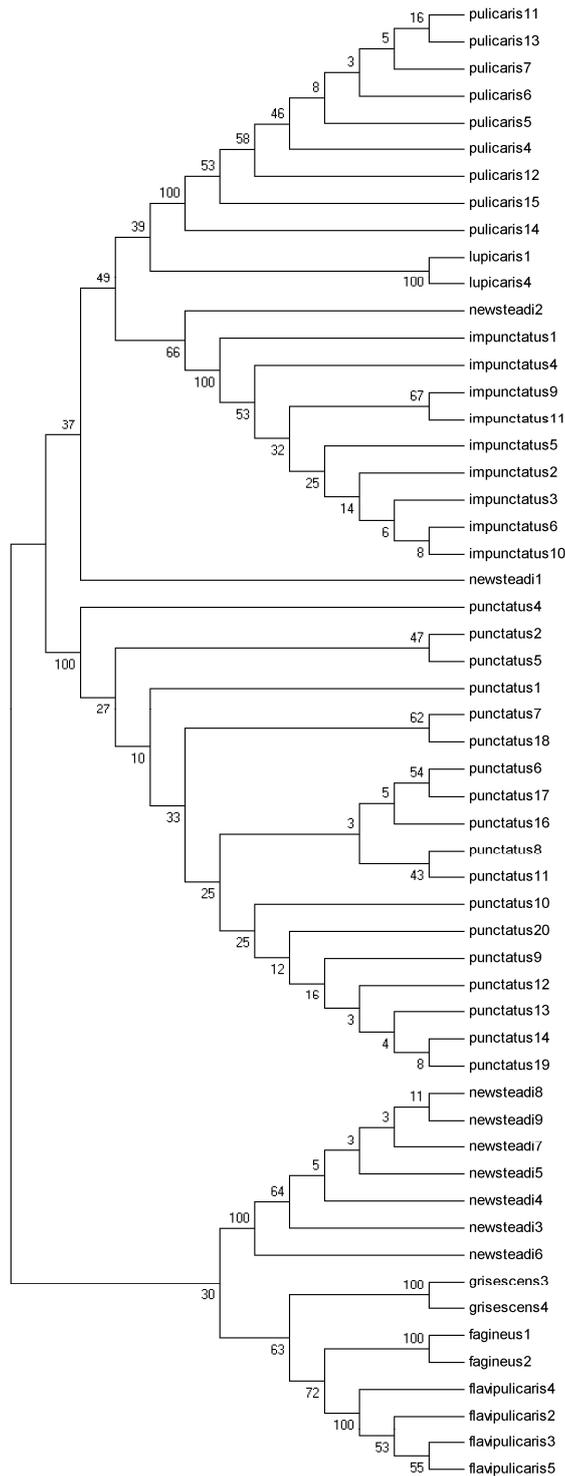


Abb. 42: Phylogenetischer Stammbaum für den *C. pulicaris*-Komplex, ermittelt auf Grundlage von 53 COI-Sequenzen. Die Zahl an jeder Verzweigung entspricht der Prozentzahl, mit welcher die assoziierten Taxa im Bootstrap-Test (1000 Replikationen) ein Cluster bildeten.

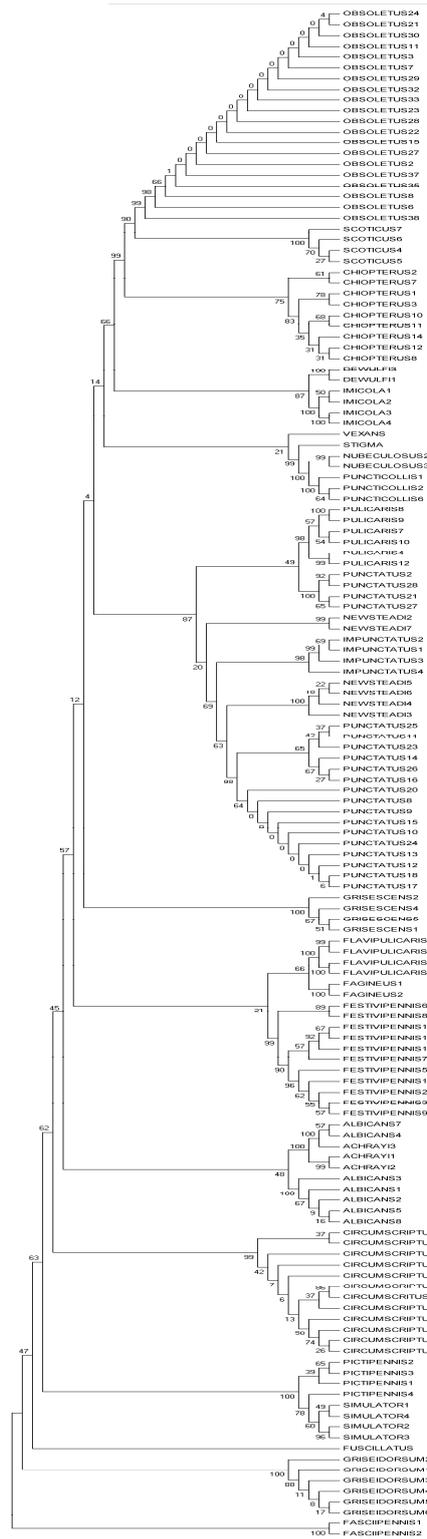


Abb. 43: Phylogenetischer Stammbaum für *Culicoides* ermittelt auf Grundlage von 142 ITS2 Sequenzen. Die Zahl an jeder Verzweigung entspricht der Prozentzahl, mit welcher die assoziierten Taxa im Bootstrap-Test (1000 Replikationen) ein Cluster bildeten.

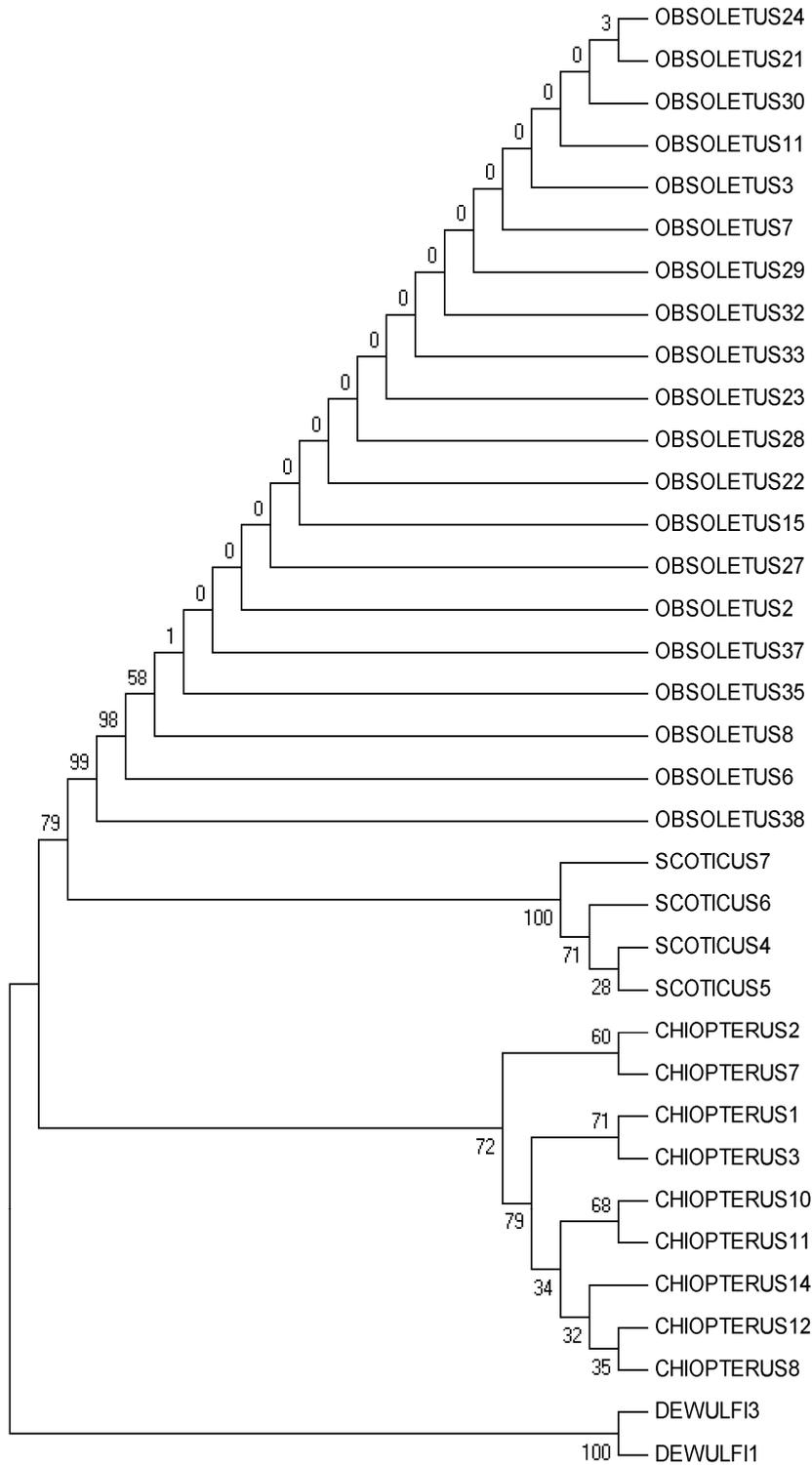


Abb. 44: Phylogenetischer Stammbaum für den *C. obsoletus*-Komplex, ermittelt auf Grundlage von 35 ITS2-Sequenzen. Die Zahl an jeder Verzweigung entspricht der Prozentzahl, mit welcher die assoziierten Taxa im Bootstrap-Test (1000 Replikationen) ein Cluster bildeten.

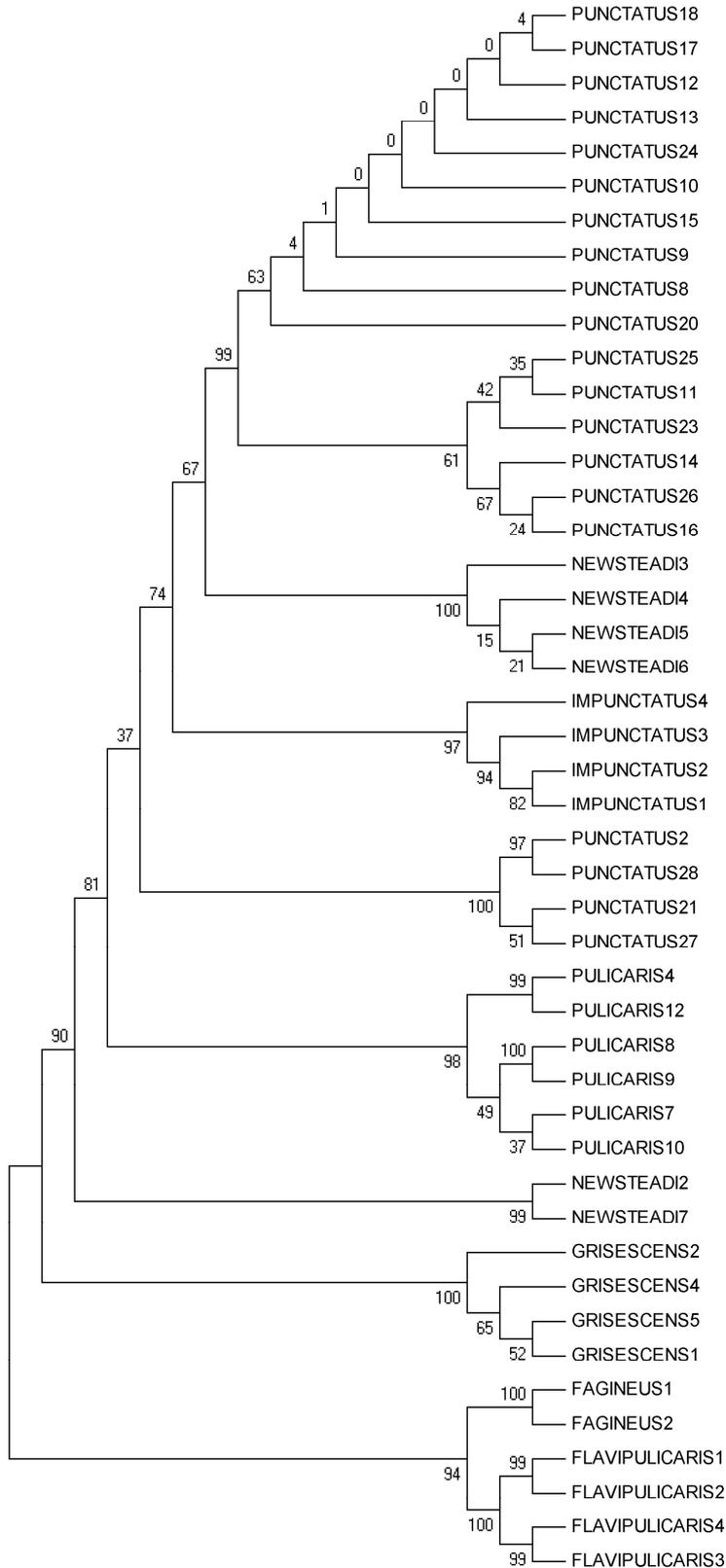


Abb. 45: Phylogenetischer Stammbaum für den *C. pulicaris*-Komplex, ermittelt auf Grundlage von 46 ITS2-Sequenzen. Die Zahl an jeder Verzweigung entspricht der Prozentzahl mit welcher die assoziierten Taxa im Bootstrap-Test (1000 Replikationen) ein Cluster bildeten.

8 Diskussion

8.1 Multiplex-PCR für den *Obsoletus*- und den *Pulicaris*-Komplex

Die aufgeführten Ergebnisse bestätigen, dass die COI-Region eine gute Basis für die Identifizierung von Gnitzen der beiden Artenkomplexe *C. obsoletus* und *C. pulicaris* darstellt. Mittels der neu entwickelten Primer können vier Arten des *C. obsoletus*-Komplexes und sieben Arten des *C. pulicaris*-Komplexes sicher und mit wenig Aufwand unterschieden und bestimmt werden. Testreihen, die mit vorbestimmtem DNA-Material beider Artenkomplexe durchgeführt wurden, bestätigten dies. Beide Komplexe mit einer einzelnen Multiplex-PCR abzudecken war nicht realisierbar, da sich die Amplifikate zum Teil in ihrer Größe zu sehr ähneln würden, um eine sofort erkennbare Unterscheidung der Arten zu gewährleisten. Aus diesem Grund wurde für jeden der beiden *Culicoides*-Artenkomplexe jeweils ein Satz Spezies-spezifischer Primer entwickelt. Die Zuordnung einer einzelnen Gnitze zum *C. pulicaris*- oder *C. obsoletus*-Komplex ist aufgrund der morphologischen Unterschiede aber vorab schnell möglich und auch für ungeschulte Personen praktikabel, so dass umgehend entschieden werden kann, welche der beiden Primer-Sets in einer Identifizierungs-PCR einzusetzen sind. Es wurde sich auf die in den Freilandfängen am häufigsten vorkommenden Arten beschränkt. Da von den kryptischen Arten *C. newsteadi* N1, N2 und N3 (Pagès et al. 2009) nur N1 häufig auftaucht, sind für die beiden anderen Varianten keine spezifischen Primer entwickelt worden. Mit beiden Primer-Sätzen sind alle als mögliche Vektoren in Nord-Europa im Verdacht stehenden *Culicoides*-Arten abgedeckt.

Die bisher existierenden molekularbiologisch-diagnostischen PCR-Verfahren konnten aufgrund des z.T. unterschiedlichen Artenvorkommens nicht uneingeschränkt auf die in Deutschland endemische Gnitzen-Fauna übertragen werden. Außerdem gab es Schwierigkeiten bezüglich ihrer Spezifität. Insbesondere bei der Bestimmung von *C. scoticus* traten Unstimmigkeiten auf. Eine Neuentwicklung eines PCR-Systems, das nun auch auf die einheimischen *Culicoides*-Arten angewendet werden kann, ist erfolgt. Auch die Identifizierung von Gnitzen der Art *C. scoticus* funktionierte problemlos. Wie die Sequenzdaten zeigten, scheint diese Art allerdings eine hohe intraspezifische Variabilität aufzuweisen und wäre noch weitere Analysen wert.

Die Abbildungen der PCR-Produkte zeigen eine starke Bildung von Primer-Dimeren in der *C. pulicaris*-Komplex-PCR, deren Größe ein wenig mit dem 78bp-Amplifikat von *C. punctatus* korreliert. Trotzdem ist immer noch eine einwandfreie Identifizierung dieser Art möglich, da sich die Gestalt der Bande deutlich von dem reinen Primer-Dimer unterscheidet. Die Bande des *C. punctatus*-Amplifikates ist deutlich breiter als Primer-Dimer. Auf dem Gel selbst kann man unter dem UV-Licht anhand eines Zwischenraumes erkennen, dass es sich um zwei Banden handelt. Wichtig ist, dass die Amplifikate lange genug per Gelelektrophorese aufgetrennt werden um diesen Zwischenraum sichtbar zu machen.

Es ist davon auszugehen, dass die neu entwickelten Primer nicht nur zur Identifizierung von adulten Gnitzen, sondern auch von *Culicoides*-Larven geeignet sind. Auf diese Weise wäre eine ganzjährige Untersuchung der Arten möglich. Weitere Analysen bezüglich Bruthabitaten, Lebensräumen usw. der einzelnen *Culicoides*-Arten sind dringend notwendig, und deren Durchführung könnte mittels der hier vorgestellten Primer schneller und effizienter erfolgen. Basierend auf diesem überarbeiteten Test-System für in Deutschland endemische Gnitzen-Arten wäre es nun möglich, weitere essentielle Daten über diese Dipteren-Gruppe zu sammeln um zum Beispiel für einen eventuellen neuen BTV-Ausbruch besser vorbereitet zu sein.

8.2 real-time PCR

Die sensitive und spezifische Differenzierung von Gnitzenarten des *C. obsoletus*-Komplexes kommt bei der epidemiologischen Betrachtung der in Deutschland stattgefundenen BTV-Ausbrüche eine besondere Bedeutung zu. Durch umfangreiche entomologische Untersuchungen (Mehlhorn et al., 2009; Hoffmann et al., 2009) konnte gezeigt werden, dass gerade diese Gruppe von Gnitzen bei der Verbreitung der Blauzungenkrankheit in Deutschland eine herausragende Bedeutung zu besitzen scheint. Auch von anderen Arbeitsgruppen in Europa wurden Vertreter des *C. obsoletus*-Komplexes als Vektoren der Blauzungenkrankheit vom Serotyp 8 definiert (Vilar et al., 2011; Vanbinst et al., 2009; Carpenter et al., 2008).

Ziel des Projektes war es, eine Methode zur einfachen und hochdurchsatzfähigen Charakterisierung von Gnitzen des *C. obsoletus*-Komplexes zu entwickeln und zu validieren. Dazu wurden, basierend auf speziesspezifischen Alignments der COI-Region, real-time PCR-Systeme entwickelt. Die real-time PCR-Technologie hat

umfassende Vorteile bei der Analyse von diagnostischen Proben. Neben der hohen analytischen Sensitivität aufgrund der sehr kleinen Amplifikate wird durch den Einsatz von Fluoreszenz-markierten Sonden eine zusätzliche Spezifitätssteigerung der Detektion ermöglicht. Die Methode ist sehr schnell, da die Amplifikation und Detektion in Echtzeit erfolgen. Neben der verminderten Gefahr von Kreuzkontaminationen, welche durch die dauerhaft geschlossenen Reaktionsgefäße erreicht wird, hat die Methode ein herausragendes Potential für die Hochdurchsatz-Analyse. Die real-time PCR hat sich aufgrund der vielen Vorteile in den letzten Jahren zum Standard im diagnostischen Labor entwickelt (Hoffmann et al., 2009a). Klassische PCR-Verfahren, welche die Charakterisierung von Gnitzenarten ermöglichen, wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen erarbeitet. Zur genetischen Differenzierung wurden einerseits die ribosomalen ITS 1- und ITS 2-Regionen genutzt (Gomulski et al., 2006; Kiehl et al., 2009; Matthieu et al., 2007; Perrin et al., 2006). Andererseits hat sich die mitochondriale COI als geeigneter Marker zur Identifikation von Gnitzenarten herausgestellt (Augot et al., 2010; Balczun et al., 2009; Nolan et al., 2007; Pagès et al., 2005). Nachteil aller dieser bisher publizierten Verfahren ist der hohe Arbeitsaufwand, basierend auf der gelelektrophoretischen Analyse der amplifizierten PCR-Produkte, und das damit einhergehende Kontaminationsrisiko.

Im Zusammenhang mit der Charakterisierung und Identifikation von spezifischen Gnitzenarten wurde die real-time PCR bisher nicht eingesetzt. Dies liegt vor allem daran, dass eine enorme Variabilität in den Sequenzen von Gnitzen einer Art zu existieren scheint. Somit ist die Wahrscheinlichkeit, dass man bei Verwendung einer Sonden-basierten real-time PCR einen Vertreter der Art nicht detektiert, recht hoch. Um das Problem zu umgehen, wurden im Projekt für die einzelnen Gnitzenarten jeweils zwei unabhängige real-time PCR-Systeme mit verschiedenen Primern und Sonden ausgewählt. Basierend auf diesem Ansatz kann aus der Summe der Resultate erwartet werden, eindeutige Ergebnisse für die Gnitzenidentifikation zu erhalten. Diese Erwartung wurde durch die erzielten Ergebnisse im großen Umfang bestätigt. Bei den meisten Gnitzen konnte durch die verwendete Kombination aus zwei real-time PCR-Systemen je Gnitzenart ein eindeutiges Ergebnis erzielt werden. Von insgesamt 148 Proben, bei denen mindestens eine speziesspezifische real-time PCR deutlich positiv reagierte, konnte die Gnitzenart in 143 Fällen eindeutig definiert werden. Aber auch von den 5 Proben, bei denen neben den real-time PCR-

Systemen einer Gnitzenart auch noch eine weitere alternative speziesspezifische PCR deutlich mit reagiert hat, konnten 3 Gnitzenarten exakt definiert werden. In all diesen Fällen entsprach das ermittelte Sequenzierungsergebnis immer der Gnitzenart, von dem beide real-time PCR-Systeme reagiert hatten. Bei einem weiteren vergleichbaren Fall (Gnitze FC) steht die Sequenzierung nach aus. Es ist aber zu erwarten, dass auch in diesem Fall die vergleichbar reagierenden real-time PCR-Systeme für *C. scoticus* die korrekte Gnitzenidentifikation anzeigen und die deutliche Reaktion der einen *C. obsoletus* s.s.-PCR als Unspezifität zu werten ist. Nimmt man diese Ergebnisse noch in die finale Auswertung hinein, so zeigt sich, dass nur in einer von 148 Proben eine Zuordnung der Gnitzenart, basierend auf den entwickelten real-time PCR-Systemen, nicht möglich war. Die ermittelte Sensitivität und Spezifität des Verfahrens ist somit mit größer als 99 % anzunehmen.

Bei weiteren 12 Gnitzen, bei denen keine der 8 verwendeten real-time PCR-Systeme ein Resultat lieferten, wurden Sequenzierungen der COI-Region durchgeführt. Die hier ermittelten Sequenzen konnten keinen in der Datenbank vertretenen Gnitzensequenzen zugeordnet werden. Hier werden weitere Sequenzierungen der ITS1+ITS2-Region hoffentlich eine eindeutige genetische Zuordnung der Gnitzen erlauben, so dass die dann in die GenBank zu transferierenden Sequenzen der COI-Region die Ersten ihrer Art darstellen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das Ziel der Entwicklung, Etablierung und Validierung von speziesspezifischen real-time PCR-Verfahren der Gnitzen des *C. obsoletus*-Komplexes weitgehend erreicht wurde. Es bleibt abzuwarten, ob es sich bei der Analyse der bisher nicht detektierbaren Gnitzen um genetisch abweichende Vertreter des *C. obsoletus*-Komplexes handelt oder ob bei der morphologischen Vorsortierung der Gnitzen fälschlicherweise Vertreter anderer Gnitzengruppen dem *C. obsoletus*-Komplex zusortiert wurden. Durch die im Weiteren angestrebte Kombination der einzelnen real-time PCR-Verfahren in multiplex Assays kann eine weitere Minimierung der Kosten erzielt werden und die Charakterisierung der Gnitzen des *C. obsoletus*-Komplexes mit deutlich reduziertem Arbeitsaufwand erfolgen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das Ziel der Entwicklung, Etablierung und Validierung von speziesspezifischen real-time PCR-Verfahren der Gnitzen des *C. obsoletus*-Komplexes weitgehend erreicht wurde. Es bleibt

abzuwarten, ob es sich bei der Analyse der bisher nicht detektierbaren Gnitzen um genetisch abweichende Vertreter des *C. obsoletus*-Komplexes handelt oder ob bei der morphologischen Vorsortierung der Gnitzen fälschlicherweise Vertreter anderer Gnitzengruppen dem *C. obsoletus*-Komplex zusortiert wurden. Durch die im Weiteren angestrebte Kombination der einzelnen real-time PCR-Verfahren in multiplex Assays kann eine weitere Minimierung der Kosten erzielt werden und die Charakterisierung der Gnitzen des *C. obsoletus*-Komplexes mit deutlich reduziertem Arbeitsaufwand erfolgen.

8.3 Phylogenie basierend auf COI- und ITS2-Sequenzdaten der Multiplex PCR

Die phylogenetischen Untersuchungen bestätigen die vorherrschende Meinung, dass die Untergattung *Culicoides* polyphyletisch ist. Die auf den ITS2- und COI-Sequenzdaten basierenden Dendrogramme zeigen nahezu identische Ergebnisse. Lediglich in der Aufspaltung des *C. pulicaris*-Komplexes in zwei Cluster unterscheidet sich das COI-Dendrogramm vom Ergebnis des ITS2-Dendrogrammes. Kleinere Abweichungen sind darauf zurückzuführen, dass für die Erstellung beider phylogenetischer Stammbäume unterschiedliche Datensätze benutzt wurden, da die Amplifikation und Sequenzierung nicht bei allen Proben gleich gute Ergebnisse für beide DNA-Regionen produzierte.

Die mittels der ITS2-Sequenzdaten erstellten Dendrogramme unterstützen die bereits veröffentlichten Daten verschiedener Arbeitsgruppen hinsichtlich der Gruppierungen der verschiedenen Arten (Gomulski et al. 2006, Nolan et al. 2007, Pagès et al. 2009). Die Ergebnisse beider Datensätze bestätigen die enge Verwandtschaft von *C. fagineus* und *C. flavipulicaris* (Gomulski et al. 2006, Pagès et al. 2009). Auch die Ausgruppierung von *C. dewulfi* aus dem *C. obsoletus*-Komplex (vgl. Schwenkenbecher et al. 2008) kann anhand der hier präsentierten Dendrogramme nachvollzogen werden. Die ITS2-Daten bestätigen die Verwandtschaft von *C. dewulfi* mit *C. imicola* und legen nahe, dass man diese Art hinsichtlich ihrer Vektorkompetenz näher betrachten sollte (Schwenkenbecher et al. 2008). Kryptische Spezies tauchten lediglich in den COI-Datensätzen und nur bei *C. newsteadi* auf. Hier gab es jeweils eine Probe, die den von Pagès et al. (2009) veröffentlichten Sequenzen von *C. newsteadi* N2 und *C. newsteadi* N3 entsprach. Der Rest der Proben konnte *C. newsteadi* N1 zugeordnet werden. Das spiegelt sich

auch in dem entsprechenden Dendrogramm wieder, da sich zwei der *C. newsteadii*-Proben (newsteadii1 und newsteadii2) außerhalb der restlichen Proben gruppieren. Andere kryptische Arten, die sich z.B. hinter *C. fagineus* und *C. pulicaris* verstecken, waren in den Proben aus den Freilandfängen nicht vorhanden und scheinen in Deutschland nicht oder nicht häufig vorzukommen.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass in einer sehr umfangreichen Analyse von Einzelgnitzen aus einem BTV-Ausbruchsgebiet sehr erfolgreich BTV-8-positive Gnitzen identifiziert und genetisch charakterisiert wurden. Es konnten verschieden Gnitzenarten als mögliche kompetente Vektoren identifiziert werden, z.B. *C. achrayi*, die bisher nicht als potentieller Vektor galt. Im Rahmen der genetischen Charakterisierung wurden verstärkt Sequenzen von *C. scoticus* im Rahmen der nachgewiesen, was auf eine dominante Rolle der Art im Übertragungsgeschehen hinweisen könnte. Weitere Analysen sind notwendig um das Ergebnis zu bestätigen und die Bedeutung einschätzen zu können.

9 Abschlussbetrachtung

(nach Kampen & Werner 2010)

Mit wenigen Ausnahmen fanden Vektor-assoziierte Erkrankungen in Mittel- und Nordeuropa lange Zeit wenig Beachtung. Seit den Ausbrüchen der Blauzungenerkrankung (BTD) 2006 im westlichen Mitteleuropa und des Chikungunya-Fiebers 2007 in Italien hat sich diese Einstellung geändert. Eher als Folge der fortschreitenden Globalisierung als aufgrund von Klimaveränderungen ist mittlerweile auch Mittel- und Nordeuropa dem Risiko der Einschleppung und Etablierung von neuartigen Krankheitserregern und -überträgern ausgesetzt. Die BTD trat als erste 'exotische' Krankheit auf: sie breitete sich nicht langsam von Endemiegebieten her aus, sondern kam plötzlich über eine unbekannte Eintrittspforte. Obwohl einheimische Gnitzenarten schon zuvor in Südeuropa als Vektoren des Blauzungenvirus (BTV) verdächtigt wurden, hatte in Europa niemand ernsthaft mit einem Ausbruch der BTD nördlich der Verbreitungsgrenze von *C. imicola* gerechnet. Als die Seuche ausbrach, waren die zuständigen Behörden völlig unvorbereitet, zumal weder Daten über die mutmaßlichen Vektoren, noch Gnitzenspezialisten verfügbar waren. Nachdem im primären Ausbruchsgebiet am Ende des Jahres 2006 ca. 2000 Viehhaltungsbetriebe befallen waren, gelang es dem Virus offenbar zu

überwintern und sich 2007 in alle Richtungen auszubreiten, was bis Frühjahr 2008 zu fast 60000 Ausbrüchen in zehn europäischen Staaten führte.

Die dann beginnenden Impfkampagnen gegen den Virusserotyp 8 führten in der dritten Übertragungsperiode (Mai 2008 bis April 2009) zu einem signifikanten Rückgang in der Anzahl der betroffenen Bauernhöfe. Ab Mai 2009 wurden nur noch vergleichsweise wenige BTV-8-Fälle aus insgesamt sechs europäischen Ländern gemeldet. Während das weitere Schicksal von BTV-8 in Europa abzuwarten bleibt, scheint der Serotyp 1 nach Norden zu wandern. Im Jahr 2008 wurden Infektionen in etwa 4900 Betrieben Frankreichs festgestellt. Aus verschiedenen entomologischen Monitoring-Programmen inzwischen vorliegende Daten deuten auf Arten der *C. obsoletus*- und *C. pulicaris*-Komplexe sowie einige andere Ceratopogoniden-Arten als wahrscheinliche Vektoren des BTV in Mitteleuropa hin.

Die aus der BTD-Epidemie zu ziehende Lehre ist einmal mehr, dass prophylaktische Maßnahmen langfristig besser sind als reine Reaktion, da jene die Reaktion beträchtlich unterstützen und erleichtern können: für einen Schutz vor neu auftretenden Vektor-assoziierten Krankheiten bzw. den adäquaten Umgang mit ihnen sind die Überwachung der einheimischen Fauna hämatophager Arthropoden, die Identifizierung potenzieller Vektoren und Kenntnisse zu ihrer Biologie, die Ausbildung von medizinischen Entomologen und Vektorbiologen sowie eine bessere Kontrolle importierter Güter und Tiere auf Krankheitserreger und Überträgerarthropoden essenzielle Voraussetzungen.

Gerade anthropogen bedingte Umweltveränderungen beeinflussen zunehmend die natürlichen ökologischen Gleichgewichte und schränken die Biodiversität ein. Neben dem Verlust der Artenvielfalt sind neu eingeschleppte Arten (einschließlich potenzielle Vektoren) sowie verbesserte Ausbreitungsbedingungen für indigene Spezies bzw. Vektoren immer wieder zu erwarten. Klimafaktoren spielen hierbei eine Schlüsselrolle. Im Fall von BTD sind jedoch die Vektoren der einheimischen Arten, von denen Basisdaten weitgehend fehlen, ein typisches Beispiel für den Einfluss auf die Entwicklung eines Krankheitsgeschehens. Die Unvorhersagbarkeit von Krankheitsausbrüchen und Epidemien wird durch unser mangelndes Wissen auf diesem Gebiet nicht gestützt.

10 Literatur

Acevedo P., Ruiz-Fons F., Vicente J., Reyes-Garcia A.R., Alzaga V., Gortazar C. (2008): Estimating red deer abundance in a wide range of management situations in Mediterranean habitats. *J Zool.* 276: 37-47.

Akiba K. (1960): Studies on the Leucocytozoon found in the chicken in Japan. On the transmission of *L. caulleryi* by *Culicoides arakawae*. *Jap J Vet Sci* 22: 309-317.

Anderson R.C. (2000): Nematode parasites of vertebrates. Their Development and Transmission. – CABI Publishing, 2. Auflage, 664 SS.

Ansari M.A., Pope E.C., Carpenter S., Scholte E.-J., Butt T.M. (2011): Entomopathogenic fungus as a biological control for an important vector of livestock disease: the *Culicoides* biting midge. *PLoS One* 6: 1-8

Ansari M.A., Carpenter S., Butt T.M. (2011): Susceptibility of *Culicoides* biting midges larvae to the entomopathogenic fungus, *Metharizium anisopliae*: prospects for Bluetongue vector control. *Acta Trop.* 113: 1-6

Augot D., Sauvage F., Jouet D., Simphal E., Veuille M., Couloux A., Kaltenbach M.L., Depaquit J. (2010): Discrimination of *Culicoides obsoletus* and *Culicoides scoticus*, potential bluetongue vectors, by morphometrical and mitochondrial cytochrome oxidase subunit I analysis. *Infect Genet Evol* 10: 629-637

Balczun C., Vorsprach B., Meiser C.K., Schaub G.A. (2009): Changes of the abundance of *Culicoides obsoletus* s.s. and *Culicoides scoticus* in Southwest Germany identified by a PCR-based differentiation. *Parasitol Res* 105: 345-349

Baldet T., Delécolle J.C., Cetre-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. *Prev Vet Med* 87: 84-97

Bass C., Williamson M.S., Field L.M. (2008): Development of a multiplex real-time PCR assay for identification of members of the *Anopheles gambiae* species complex. *Acta Trop* 107: 50-53

Batten C.A., Bachanek-Bankowska K., Bin-Tarif A., Kgosana L., Swain A.J., Corteyn M., Darpel K., Mellor P.S., Elliot H.G., Oura C.A.L. (2008): Bluetongue virus: European Community inter-laboratory comparison tests to evaluate ELISA and RT-PCR detection methods. *Vet Microbiol* 129: 80-88

Bauer B., Jandowsky A., Schein E., Mehlitz D., Clausen P.H. (2009): An appraisal of current and new techniques intended to protect bulls against *Culicoides* and other haematophagous nematocera: the case of Schmergow, Brandenburg, Germany. *Parasitol Res* 105: 359-365

- Baumgartner W. (2006): Informationen für Studierende. Blauzungenkrankheit.
<http://wdk.vu-wien.ac.at>
- Baylis M. (2002): The re-emergence of bluetongue. *Vet J* 164: 5-6
- Bensasson D., Zhang D.-X., Hartl D.L., Hewitt G.M. (2001): Mitochondrial pseudogenes: Evolution's misplaced witnesses. *Trends Ecol Evol* 16: 314-321
- Blanton F.S., Wirth W.W. (1979): The sandflies (Culicoides) of Florida (Diptera: Ceratopogonidae)
Arthropods of Florida and Neighboring Land Areas 10: 1-204
- Boorman J. (1993): Biting midges (Ceratopogonidae). In: Lane R. P. & Crosskey R. W. (eds.): *Medical Insects and Arachnids*. Chapman & Hall, London: 288-309
- Borkent A. (2006): World Species of Biting Midges (Diptera: Ceratopogonidae). *Bull Am Mus Nat Hist* 233: 1-257
- Breard E., Sailleau C., Nomikou K., Hamblin C., Mertens P.P.C., Mellor P.S., El Harrak M., Zientara S. (2007): Molecular epidemiology of bluetongue virus serotype 4 isolated in the Mediterranean Basin between 1979 and 2004. *Virus Res* 125: 191-197
- Calistri P., Goffredo M., Caporale V., Meiswinkel R. (2003): The distribution of *Culicoides imicola*. Italy: application and evaluation of current Mediterranean models based on climate. *J Vet Med Ser B* 50: 132-138
- Campbell P.M. (2005): Species differentiation of insects and other multicellular organisms using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry protein profiling. *Syst Entomol* 30: 186–190
- Caracappa S., Torina A., Guerico 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. *Vet Rec* 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. *J Med Entomol* 43: 73-78
- Carpenter S., McArthur C., Selby R., Ward R., Nolan D.V., 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. *Vet Rec* 163: 589-592
- Caterino M.S., Cho S., Sperling F.A.H. (2000): The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. *Annu Rev Entomol* 45: 1-54
- Cêtre-Sossah C., Mathieu B., Setier-Rio M.L., Grillet C., Baldet T., Delécolle J.C., Albina E. (2008): Development and evaluation of a real-time quantitative PCR assay for *Culicoides imicola*, one of the main vectors of bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) in Africa and Europe. *Res Vet Sci* 85: 372-382

- Chen Z.J., Pikaard C.S. (1997): Transcriptional analysis of nucleolar dominance in polyploid plants: biased expression/silencing of progenitor rRNA genes is developmentally regulated in Brassica. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3442–3447
- Chien A., Edgar D. B., Trela J.M. (1976): Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* 127: 1550-1557
- Coleman A.W. (2007): Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure. *Nucl Acids Res* 35: 3322-3329
- Coleman A.W. (2003): ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends Genet* 19: 370-375
- Conraths F.J., Gethmann J.M., Staubach C., Mettenleiter T.C., Beer M., Hoffmann B. (2009): Epidemiology of bluetongue virus serotype 8, Germany. *Emerg Infect Dis* 15: 433-435
- Conraths F.J., Kramer M., Freuling C., Hoffmann B., Staubach C., Gethmann J., Teifke J., Beer M. (2007): Blauzungenkrankheit in Deutschland: Klinik, Diagnostik und Epidemiologie. *Prakt Tierarzt* 88: 9-15
- Cornell A.J., Porter C.H., Collins F.H. (1996): Polymerase chain reaction species diagnostic assay for *Anopheles quadrimaculatus* cryptic species (Diptera: Culicidae) based on ribosomal DNA ITS2 sequences. *J Med Entomol* 33: 109-116
- Crozier R.H., Crozier Y.C. (1993): The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics* 133: 97-117
- Dallas J.F., Cruickshank R.H., Linton Y.M., Nolan D.V., Patakakis M., Braverman Y., Capela R., Capela M., Pena, I., Meiswinkel R., Ortega M.D., Baylis M., Mellor P.S., Mordue A.J. (2003): Phylogenetic status and matrilineal structure of the biting midge, *Culicoides imicola*, in Portugal, Rhodes and Israel. *Med Vet Entomol* 17: 379-387
- Darpel K.E., Batten C.A., Veronesi E., Williamson S., Anderson P., Dennison M., Clifford S., Smith C., Philips L., Bidewell C., Bachanek-Bankowska K., Sanders A., Bin-Tarif A., Wilson A.J., Gubbins S., Mertens P.P.C., Oura C.A., Mellor P.S. (2009): Transplacental transmission of bluetongue virus 8 in Cattle, UK. *Emerg Infect Dis* 15: 2025-2028
- Dassanayake R.S., Gunawardene Y.I.N.S., Nissanka B.D.D., De Silva K. (2008): ITS-2 secondary structures and phylogeny of *Anopheles culicifacies* species. *Bioinformatics* 2: 456-460
- De Clercq K., Mertens P., De Leeuw I., Oura C., Houdart P., Potgieter A.C., Maan S., Hooyberghs J., Batten C., Vandemeulebroucke E., Wright I.M., Maan N., Riocreux F., Sanders A., Vanderstede Y., Nomikou K., Raemaekers M., Bin-Tarif A., Shaw A., Henstock M., Bréard E., Dubois E., Gastaldi-Thiéry C., Zientara S., Verheyden B., Vandebussche F. (2009): Emergence of bluetongue serotypes in Europe, part 2: the occurrence of a BTV-11 strain in Belgium. *Transbound Emerg Dis* 56: 355-361

- De Clerq K., De Leeuw I., Verheyden B., Vendemeulebroucke E., Vanbist T., Herr C., Meroc E., Bertels G., Steurbaut N., Miry C., De Bleecker K., Maquet G., Bughin J., Saulmont M., Lebrun M., Sustronck B., De Deken R., Hooyberghs J., Houdart P., Raemaekers M., Mintiens K., Kerhofs P., Goris N., Vandebussche F. (2008): Transplacental infection and apparently immunotolerance induced by a wild-type Bluetongue virus serotype 8 natural infection. *Transbound Emerg Dis* 55: 352-359
- 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. Dissertation, Universität Strasbourg, 238 SS.
- Depaquit J., Ferté H., Léger N., Killick-Kendrick R., Rioux J.A., Killick-Kendrick M., Hanafi H.A., Gobert S. (2000): Molecular systematics of the phlebotomine sandflies of the subgenus *Paraphlebotomus* (Diptera, Psychodidae, Phlebotomus) based on ITS2 rDNA sequences. Hypotheses of dispersion and speciation. *Insect Mol Biol* 9: 293-300
- Di Emidio B., Nicolussi P., Patta C., Ronchi G.F., Monaco F., Savini G. (2004): Efficacy and safety studies on an inactivated vaccine against bluetongue virus serotyp 2. *Vet Ital* 40: 640-644
- Dijkstra E., van der Ven I.J., Meiswinkel R., Hölzel D.R., Van Rijn P.A., Meiswinkel R. (2008): *Culicoides chiopterus* as a potential vector of bluetongue virus in Europe. *Vet Rec* 162: 422
- Dobler S., Farrell B.D. (1999): Host use evolution in *Chrysochus* milkweed beetles: Evidence from behaviour, population genetics and phylogeny. *Mol Ecol* 8: 1297-1307
- Downes J.A., Kettle D.S. (1952): Description of three species of *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) new to science, together with notes on, and revised key to the British species of the pulicaris and obsoletus groups. *Proc R Entomol Soc Lond* 21: 61-78
- Downes J.A., Wirth W.W. (1981): Ceratopogonidae. In: McAlpine et al. (eds.): *Manual of Nearctic Diptera*. Vol. 1. Research Branch Agriculture Canada, Monograph 27: 393-421.
- Drummond D.C., Boormann J. (2003): Further records of some *Aurum* species and their insect visitors. *Entomol Monthly Mag* 139: 163-166.
- Drummond D.C., Hammond P.M. (1991): Insects visiting *Aurum dioscoridis* Sm. and *A. orientale* M. Bieb. *Entomol Monthly Mag* 127: 151-156
- Du Toit R.M. (1944): The transmission of bluetongue and horsesickness by *Culicoides*. *Onderstepoort J Vet Sci Anim Ind* 19: 7-16
- Edwards M.C., Gibbs R.A. (1994): Multiplex PCR: advantages, development and applications. *Genome Res* 3: S65-S75

- Edwards F.W. (1939): Genitalia of British Culicoides with notes on synonymy. In: Edwards F.W., Oldroyd H., Smart J. (eds.), British Bloodsucking Flies. British Museum (Natural History), London, UK: 129-148
- Erasmus B.J. (1975): Bluetongue in sheep and goats. *Austr Vet J* 51: 165-170
- 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. *Vet Microbiol* 143: 189-195
- Falconi C., Lopez-Olvera J.-R., Gortazar C. (2011): BTV infection in wild ruminants, with emphasis on red deer: A review. *Vet Microbiol* doi: 10.1016/j.vetmic.2011.02.011
- Fenselau C., Demirev P.A. (2001): Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrometry Rev* 20: 157-171
- Felsenstein J. (1985): Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791
- FLI (2009): Qualitative Risikobewertung zur Aufhebung der Impfpflicht gegen die Blauzungenkrankheit, Serotyp 8, im Jahr 2010. http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/tierseuchen/Risikobewertung_Impfung_BTV-8_091007.pdf
- Foster N.M., Jones R.H., Luedke A.J. (1968): Transmission of attenuated and virulent bluetongue virus with *Culicoides variipennis* infected orally via sheep. *Am J Vet Res* 29: 275-279
- Fox I. (1955): A catalogue of the bloodsucking midges of the Americas (*Culicoides*, *Leptoconops*, and *Lasiohelea*) with keys to the subgenera and Nearctic species, a geographic index, and bibliography. *J Agricult Univ Puerto Rico* 39: 214-285
- Freise J., Brüning O., Diekmann J.B. (2011): Vektorassoziierte Tierseuchen in der staatlichen Tierseuchenbekämpfung in Niedersachsen. *Mitt Dtsch Ges Allg Angew Entomol* 18, im Druck
- Frenzel M. (1993): Gnitzen (Diptera: Ceratopogonidae) und Cantharidin. Die Eier nach einem außergewöhnlichen Naturstoff; Phänomen und experimentelle Ansätze zur Klärung der Ursachen der Canthariphilie. Dissertation Universität Bayreuth, 168 SS.
- Frenzel M., Dettner K. (1994): Quantification of cantharidin in canthariphilous Ceratopogonidae (Diptera), Anthomyiidae (Diptera) and cantharidin-producing Oedemeridae (Coleoptera). *J Chem Ecol* 20: 1795-1812.
- Gambles R. (1949): Bluetongue of sheep in Cyprus. *J Comp Pathol* 59: 176-190

Garnham P.C.C., Heisch R.B., Minter D.M., Phipps, J.D., Ikata M. (1961): *Culicoides adersi* Ingram and Macfie, 1923, a Presumed Vector of Hepatocystis (= Plasmodium) kochi (Laveran, 1899). *Nature* 190: 739-741.

Geha D.J., Uhl J.R., Gustafarro C.A., Persing D.H. (1994): Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 32: 1768-1772

Gerry A.C., Mullens B.A. (2000): Seasonal abundance and survivorship of *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) at a southern California dairy, with reference to potential bluetongue virus transmission and persistence. *J Med Entomol* 37: 675-688

Gibbs E.P.F., Greiner E.C. (1994): The epidemiology of bluetongue. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 17: 207-220

Glukhova V.M. (1989): Blood-sucking Midges of the Genera *Culicoides* and *Forcipomyia* (Ceratopogonidae). *Fauna USSR* 139, 3 (5a): 1-408. (in Russisch)

Görnitz K. (1937): Cantharidin als Gift und Anlockungsmittel für Insekten. *Arb Phys Angew Ent Berlin-Dahlem* 4: 116-157

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. (2006): Phylogeny of the subgenus *Culicoides* and related species in Italy, inferred from internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences. *Med Vet Entomol* 20: 229-238

Greiner E.C., Barber T.L., Pearson J.E., Kramer W.L., Gibbs E.P.J. (1985): Orbiviruses from *Culicoides* in Florida. In: Barber T.L., Jochim M.M., Osburn B.I. (eds), *Bluetongue and Related Orbiviruses*. Alan R. Liss, Inc., New York, *Progress in Clinical and Biological Research* 178: 195-200

Hare M.P., Palumbi S.R., Butman C.A. (2000): Single-step species identification of bivalve larvae using multiplex polymerase chain reaction. *Marine Biol* 137: 953-961

Havelka P. (2003): Rote Liste gefährdeter Gnitzen (Diptera: Ceratopogonidae) Bayerns. *Bayer Landesamt Umwelt* 166: 269-272

Havelka P. (1976): Limnologische und systematische Studien an Ceratopogoniden (Diptera: Nematocera). *Beitr Entomol Berlin* 26: 211-305

Havelka P., Aguilar M. (1999): Ceratopogonidae. In: Schumann H., Bährmann R., Stark, A. (eds), *Checkliste der Dipteren Deutschlands – Entomofauna Germanica 2*. *Studia Dipterologica Suppl* 2: 33-38

Hillis D.M., Moritz C., Porter C.A., Baker R.J. (1991): Evidence for biased gene conversion in concerted evolution of ribosomal DNA. *Science* 251:308-310

Hillis D.M., Moritz C. (1990): *Molecular systematics*. Sinauer, Sunderland, MA

Hövemeyer K., Havelka P. (1996): Emergence trap studies on biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in four terrestrial habitats in Southern Lower Saxony. *Dtsch Entomol Z* 43: 265-274

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., Conraths F.J. (2009): Monitoring of putative vectors of bluetongue virus serotype 8, Germany. *Emerg Infect Dis* 15: 1481-1484.

Hoffmann B., Beer M., Reid S.M., Mertens P., Oura C.A., van Rijn P.A., Slomka M.J., Banks J., Brown I.H., Alexander D.J., King D.P. (2009): A review of RT-PCR technologies used in veterinary virology and disease control: sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organisation for Animal Health. *Vet Microbiol* 139: 1-23

Hoffmann B., Saßerath M., Thalheim S., Bunzenthal C., Strebelow G., Beer M. (2008): Bluetongue virus serotype 8 reemergence in Germany, 2007 and 2008. *Emerg Infect Dis* 14: 1421-1423

Hofmann M.A., Renzullo S., Mader M., Chaignat V., Worwa G., Thuer B. (2008): Genetic characterization of Toggenburg orbivirus, a new Bluetongue virus, from goats, Switzerland. *Emerg Infect Dis* 14: 1855-1861

Hoogendam K. (2007): International study on the economic consequences of outbreaks of bluetongue serotype 8 in north-western Europe. Van Hall Institute, Leeuwarden, NL

Howell P.G. (1963): Bluetongue. *Emerg Dis Anim* 61: 111-153

Hübschle O.J.B. (1979): Exotische Viruseuchen der Wiederkäuer. *Tierärztl Umschau* 34: 243-253

Hurst G.D., Jiggins F.M. (2005): Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proc Biol Soc* 272: 1525-1534

Hutcheon D. (1881): Fever of epizootic catarrh. *Rep College Vet Surg* 1880: 12-15

Hourigan J.L., Klingsporn A.L. (1975): Bluetongue: the disease in cattle. *Austr Vet J* 51: 170-174

Iben B. (2006): Nicht länger mehr nur exotische Erkrankung: Blauzungkrankheit jetzt auch in Deutschland. *Großtierpraxis* 7: 418-427

- Jannotti-Passos L.K., Magalhães K.G., Carvalho O.S., Vidigal T.H. (2006): Multiplex PCR for both identification of Brazilian Biomphalaria species (Gastropoda: Planorbidae) and diagnosis of infection by Schistosoma mansoni (Trematoda: Schistosomatidae). *J Parasitol* 92: 401-403
- Jarman S.N., Deagle B.E., Gales N.J. (2004): Group-specific polymerase chain reaction for DNA-based analysis of species diversity and identity in dietary samples. *Mol Ecol* 13: 1313-1322
- Kampen H., Werner D. (2010): Three years of bluetongue disease in central Europe with special reference to Germany: what lessons can be learned? *Wien Klin Wochenschr* 122: 31-39
- Kampen H., Kiel E. (2008): Gnitzen (Ceratopogonidae) als Überträger von sich ausbreitenden Infektionserkrankungen bei Tieren – Biologie und Ökologie einer Blut saugenden Insektengruppe in Bezug zu Klima- und Umweltfaktoren. In: Lozan, J.L. (ed), Warnsignal Klima: Gesundheitsrisiken. GEO/Wissenschaftliche Auswertungen, Hamburg: 233-238
- Kaufmann C., Ziegler D., Schaffner F., Carpenter S., Pflüger V., Mathis A. (2011): Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry for characterization of *Culicoides nubeculosus* biting midges. *Med Vet Entomol* 25: 32-38
- Khalaf K.T. (1954): The speciation of the genus *Culicoides* (Diptera, Heleidae). *Ann Entomol Soc Am* 47: 34-51
- Kettle D.S. (1962): The bionomics and control of *Culicoides* and *Leptoconops* (Diptera, Ceratopogonidae = Heleidae). *Annu Rev Entomol* 162: 143-161
- 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? *Parasitol Res* 105: 331-336.
- Koekemoer L.L., Kamau L., Hunt R.H., Coetzee M. (2002): A cocktail polymerase chain reaction assay to identify members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group. *Am J Trop Med Hyg* 66: 804-811
- Larsen J.B., Frischer M.E., Rasmussen L.J., Hansen B.W. (2005): Singlestep nested multiplex PCR to differentiate between various bivalve larvae. *Marine Biol* 146: 1119-1129
- Liebisch A., Liebisch G. (2007): Biologie und Bekämpfung von *Culicoides*-Mücken als Vektoren der Bluetongue bei Rindern in Deutschland. *Prakt Tierarzt* 88: 440-449
- Linley J.R. (1985): Biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) as vectors of nonviral animal pathogens. *J Med Entomol* 22: 589-599.

- Linley J.R., Hoch A.L., Pinheiro F.P. (1983): Biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) and human health. *J Med Entomol* 20: 347-364.
- 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. *Med Vet Entomol* 16: 139-146
- Lopez-Olvera J.R., Falconi C., Fernandez-Pacheco P., Fernandez-Pinero J., Sanchez M.A., Palma A., Herruzo I., Vicente J., Jimenez-Clavero M.A., Arias M., Sanchez-Vizcaino J.M., Gortazar C. (2010): Experimental infection of European red deer (*Cervus elaphus*) with bluetonguevirus serotypes 1 and 8. *Vet Microbiol* 145: 148-152
- Losson B., Mignon B., Paternostre J., Madder M., De Deken R., De Deken G., Deblauwe I., Fassotte C., Cors R., Defrance T., Delecolle J.-C., Baldet T., Haubruge E., Frederic F., Bortels J., Simonon G. (2007): Biting midges overwintering in Belgium. *Vet Rec* 160: 451-452
- Luedke A.J., Jochim M.M., Bowne J.G. (1965): Preliminary bluetongue transmission with the sheep ket *Melophagus Ovinus* (L.). *Can J Comp Med Vet Sci* 29: 229-231
- Luedke A.J., Bowne J.G., Jochim M.M., Doyle C. (1964): Clinical and pathologic features of bluetongue in sheep. *Am J Vet Res* 25: 963-970
- Lunt D.H., Zhang D.X., Szymura J.M., Hewitt G.M. (1965): The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Mol Biol* 5: 153-165
- Maan S., Maan N.S., van Rijn P.A., van Gennip R.G., Sanders A., Wright I.M., Batten C., Hoffmann B., Eschbaumer M., Oura C.A., Potgieter A.C., Nomikou K., Mertens P.P. (2010): Full genome characterization of bluetongue virus serotype 6 from the Netherlands 2008 and comparison to other field and vaccine strains. *PLoS One* 5: 1-17
- MacLachlan N.J., Guthrie A.J. (2010): Re-emergence of bluetongue, African horse sickness, and other Orbivirus diseases. *Vet Res* 41: 35
- MacLachlan N.J., Crafford J.E., Vernau W., Gardner I.A., Goddard A., Guthrie A.J., Venter E.H. (2008): Experimental reproduction of severe bluetongue in sheep. *Vet Pathol* 45: 310-315
- MacLachlan N.J. (1994): The pathogenesis and immunology of bluetongue virus infection of ruminants. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 17: 197-206
- Manso-Ribeiro J., Rosa-Azevedo J., Noronha F., Braco-Forte-Junior M., Grave-Periera C., Vasco-Fernandes M. (1957): Fievre catarrhale dumouton (blue-tongue). *Bull Off Int Epiz* 48: 350-367

- Mathieu B., Perrin A., Baldet T., Delécolle J.C., Albina E., Cêtre-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. *J Med Entomol* 44: 1019-1025.
- Mayr A. (1984): *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, 5. Aufl., Enke Verlag, Stuttgart
- Mazzeo M.F., Giulio B.D., Guerriero G., Ciarcia G., Malorni A., Russo G.L., Siciliano R.A. (2008): Fish authentication by MALDI-TOF mass spectrometry. *J Agricult Food Chem* 56: 11071–11076
- McKercher D.G., McGowan B., Howarth J.A., Saito J.K. (1953): A preliminary report on the isolation and identification of bluetongue virus from sheep in California. *J Am Vet Med Assoc* 122: 300-301
- Mehlhorn H., Schmahl G., D'Haese J., Schumacher B. (2008): Butox 7.5 pour on: a delmethrin treatment of sheep and cattle: pilot study of killing effects on *Culicoides* species (Ceratopogonidae). *Parasitol Res* 102: 515-518
- 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. *Parasitol Res* 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.J., Hoffmann B., Beer M. (2009): Bluetongue disease in Germany (2007-2008): monitoring of entomological aspects. *Parasitol Res* 105: 313-319
- Meiswinkel R., van Rijn P., Leijts P., Goffredo M. (2007): Potential new *Culicoides* vector of bluetongue virus in northern Europe. *Vet Rec* 161: 564-565
- Meiswinkel R. (1995): Afrotropical *Culicoides*: biosystematics of the *Imicola* group, subgenus *Avaritia* (Diptera: Ceratopogonidae), with special reference to the epidemiology of African horse sickness. M.Sc. Thesis, University of Pretoria, South Africa
- Meiswinkel R., Braack L.E. (1994): African horsesickness epidemiology: five species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) collected live behind the ears and at the dung of the African elephant in the Kruger National Park, South Africa. *Onderstepoort J Vet Res* 61: 155-170
- Meiswinkel R. (1992): Afrotropical *Culicoides*: *C. (Avaritia) loxodontis* sp. nov., a new member of the *Imicola* group (Diptera: Ceratopogonidae) associated with the African elephant in the Kruger National Park, South Africa. *Onderstepoort J Vet Res* 59: 145-160

- Meiswinkel R. (1991): Afrotropical Culicoides: *C. (Avaritia) miombo* sp. nov., a widespread species closely allied to *C. (A.) imicola* Kieffer, 1913 (Diptera: Ceratopogonidae). Onderstepoort J Vet Res 58: 155-170
- Meiswinkel R. (1989): Afrotropical Culicoides: a redescription of *C. (Avaritia) imicola* Kieffer, 1913 (Diptera: Ceratopogonidae) with description of the closely allied *C. (A.) bolitinos* sp. nov. reared from the dung of the African buffalo, blue wildebeest and cattle in South Africa. Onderstepoort J Vet Res 56: 23-39
- Mellor P.S. (1992): Culicoides as potential Orbivirus vectors in Europe. In: Walton T.E., Osburn, B.I. (eds), Proceedings of the Second International Symposium on Bluetongue, African Horse Sickness & Related Orbiviruses. CRC Press, Boca Raton, FL: 278-283
- Mellor P.S. (2000): Replication of arboviruses in insect vectors. J Comp Pathol 123: 231-247
- Mellor P.S. (1990): The replication of bluetongue virus in Culicoides vectors. Curr Top Microbiol Immunol 162: 143-161
- Mellor P.S., Boorman J. (1980): Multiplication of bluetongue virus in Culicoides nubeculosus (Meigen) simultaneously infected with the virus and the microfilariae of Onchocerca cervicalis (Raillet and Henry). Ann Trop Med Parasitol 74: 463-469
- Mellor P.S., Boormann J. (1995): The transmission and geographical spread of African Horse Sickness and bluetongue viruses. Ann Trop Med Parasitol 89: 1-15
- Mellor P.S., Boormann J., Baylis M. (2000): Culicoides biting midges: their role as arbovirus vectors. Annu Rev Entomol 45: 40
- Mellor, P. S., Boorman, J. P. T., Wilkinson, P. J. & Martínez-Gómez, F. (1983): Potential vectors of bluetongue and African horse sickness in Spain. – Veterinary Record 112: 229–230.
- Mellor P.S., Jennings D.M. (1986): British vectors of bluetongue virus, Orbiviruses and Birnaviruses. In: Roy P., Osburn B. (eds), Proceedings of the Double-Stranded RNA Virus Symposium, NERC Institute, Oxford, UK: 12-21
- Mellor P.S., Hamblin C. (2004): African horse sickness. Vet Res 35: 445-466
- Mellor P.S., Wittmann E.J. (2002): Bluetongue virus in the Mediterranean Basin 1998-2001. Vet J 164: 20-37
- Meroc E., Faes C., Herr C., Staubach C., Verheyden B., Vanbinst T., Vandebussche F., Hooyberghs J., Aerts M., De Clercq K., Mintiens K. (2008): Establishing the spread of bluetongue virus at the end of the 2006 epidemic in Belgium. Vet Microbiol 131: 133-144

- Mertens P.P.C., Maan N.S., Prasad G., Samuel A.R., Shaw A.E., Potgieter A.C., Anthony S.J., Maan S. (2007): Design of primers and use of RT-PCR assays for typing European bluetongue virus isolates: differentiation of field and vaccine strains. *J Genl Virol* 88: 2811-2823
- Mertens P.P.C. (1999): Orbiviruses and Coltiviruses. In: Garnoff A., Webster R.G. (eds), *Encyclopaedia of Virology*, 2nd Edition. Academic Press, London, UK: 1043-1061
- Miyamoto M.M., Cracraft J. (1991): *Phylogenetic analysis of DNA sequences*. Oxford University Press, UK
- Mintiens K., Meroc E., Mellor P.S., Staubach C., Gerbier G., Elbers A.R.W., Hendrickx G., De Clercq K. (2008): Possible routes of introduction of bluetongue virus serotype 8 into the epicentre of the 2006 epidemic in north-west Europe. *Prev Vet Med* 87: 131-144
- Moulton J.E. (1961): Pathology of bluetongue in sheep in California. *J Am Vet Med Assoc* 138: 293-498
- Mullens B.A., Cardona C.J.; McClellan L.M., Szijj C.E., Owen J.P. (2006): *Culicoides bottimeri* as a vector of *Haemoproteus lophortyx* to quail in California, USA. *Vet Parasitol* 140: 35-43.
- Mullens B.A., Gerry A.C., Velten R.K. (2001): Failure of a permethrin treatment regime to protect cattle against bluetongue virus. *J Med Entomol* 39: 760-762
- Mullens B.A., Holbrook F.R. (1991): Temperature effects on the gonotrophic cycle of *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae). *Arch Ges Virusforsch* 46: 105-110
- Muller M.J., Standfast H.A., St. George T.D., Cybinski D.H. (1982): *Culicoides brevitarsis* (Diptera: Ceratopogonidae) as a vector of arboviruses in Australia, *Arbovirus Research in Australia*. In: St. George T.D., Kay B.H. (eds), *Proceedings of the Third Symposium (The Commonwealth and Industrial Research Organization and Queensland Institute of Medical Research, Brisbane, Australia)*: 232-234
- Mullis K.B., Faloona F.A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth Enzymol* 155: 335-350
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 51: 263-273
- Nei M., Kumar S. (2000): *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York
- Nolan D.V., Carpenter S., Barber J., Mellor P.S., Dallas J.F., Mordue Luntz A.J., Piertney 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. *Vet Microbiol* 124: 82-94

- Olbrich, S (1987): Untersuchungen zur Biologie von Gnitzen der Gattung *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) an Weiderindern in Norddeutschland. Ergebnisse aus dem Freiland und dem Laboratorium. Diss. Tierärztl. Hochschule Hannover, 159 SS.
- Olsen O.W. (1974): *Animal Parasites, their Life Cycles and Ecology*, 3rd Ed. University Park Press, Baltimore, MD, 562 SS.
- Osburn B.I. (1994): The impact of bluetongue virus on reproduction. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 17: 189-196
- Osmani A., Murati B., Kabashi Q., Goga I., Berisha B., Wilsmore A.J., Hamblin C. (2006): Evidence for the presence of bluetongue virus in Kosovo between 2001 and 2004. *Vet Rec* 158: 393-396
- Ottley M.L., Dallemagne C., Moorhouse D.E. (1983): Equine onchocerciasis in Queensland and the Northern territory of Australia. *Austr Vet J* 60: 200-203
- Pagès N., Sarto I Montey's V. (2005): Differentiation of *Culicoides* *obsoletus* and *Culicoides* *scoticus* (Diptera: Ceratopogonidae) based on mitochondrial cytochrome oxidase subunit I. *J Med Entomol* 42: 1026-1034
- Parsonson I.M. (1990): Pathology and pathogenesis of bluetongue infections. *Curr Top Microbiol Immunol* 162: 119-141
- Perera M.R., Flores Vargas R.D., Jones M.G.K. (2005): Identification of aphid species using protein profiling and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Entomol Exp Appl* 117: 243–247
- 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. *Med Vet Entomol* 20: 219-228
- Planzer J., Kaufmann C., Worwa G., Gavier-Widén D., Hofmann M.A., Chaignat V., Thür B. (2011): In vivo and in vitro propagation and transmission of Toggenburg orbivirus. *Res Vet Sci*, doi:10.1016/j.rvsc.2011.03.007
- Proft J., Maier W.A., Kampen H. (1999): Identification of six sibling species of the *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) by a polymerase chain reaction assay. *Parasitol Res* 85: 837-843
- ProMED-mail (2010): Bluetongue - Europe (05): declining. ProMED-mail 2010; 3 Nov: 20101103.3987. <http://www.promedmail.org>.
- Purse B.V., Mellor P.S., Rogers D.J., Samuel A.R., Mertens P.P., Baylis M. (2005): Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nature Rev Microbiol* 3: 171-181

Rawlings P. (1997): A key based on wing patterns of biting midges (genus *Culicoides* Latreille - Diptera: Ceratopogonidae) in the Iberian Peninsula, for use in epidemiological studies. *Graellsia* 52: 57-71

Roy P., Boyce M., Noad R. (2009): Prospects for improved bluetongue vaccines. *Nature* 7: 120-128

Roy P. (2007): Orbiviruses. In: Knipe D.M., Howley P.M. (eds), *Fields' Virology*, Vol. 1, 5th Ed. Lippincott Williams & Wilkins, New York: 1975-1997

Rozas J., Sanchez-Del Barrio J.C., Messeguer X., Rozas R. (2003): DnaSP, DNA polymorphism analysis by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497

Saegerman C., Berkvens D., Mellor P.S. (2008): Bluetongue epidemiology in the European Union. *Emerg Infect Dis* 14: 539-544

Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491

Saitou N., Nei M. (1987): The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425

Samal S.K., El Hussein A., Holbrook F.R., Beaty B.J., Ramig R.F. (1987): Mixed infection of *Culicoides variipennis* with bluetongue virus serotypes 10 and 17: evidence for high frequency of reassortment in the vector. *J Gen Virol* 68: 2319-2329

Sanogo Y.O., Kim C.-H., Lampman R., Novak R.J. (2007): A real-time TaqMan polymerase chain reaction for the identification of *Culex* vectors of West Nile and Saint Louis Encephalitis viruses in North America. *Am J Trop Med Hyg* 77: 58-66

Savini G., Cannas A., Casaccia C., Di Gialleonardo L., Leone A., Patta C., Nicolussi P. (2010): Risk factors associated with the occurrence of undesired effects in sheep and goats after field vaccination with modified-live vaccine against bluetongue virus serotypes 2, 4 and 16. *Vet Microbiol* 146: 44-50

Savini G., MacLachlan N.J., Sanchez-Vizcaino J.-M., Zientara S. (2008): Vaccines against bluetongue in Europe. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 126: 91-100

Savini G., Goffredo M., Monaco F., Di Gennaro A., Cafiero M.A., Baldi L., de Santis P., Meiswinkel R., Caporale V. (2005): Bluetongue virus isolations from midges belonging to the *obsolitus* complex (*Culicoides*, Diptera: Ceratopogonidae) in Italy. *Vet Rec* 157: 133-139

Severini C., Silvestrini F., Mancini P., La Rosa G., Marinucci M. (1996): Sequence and secondary structure of the rDNA second internal transcribed spacer in the sibling species *Culex pipiens* L. and *Cx. quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Insect Mol Biol* 5: 181-186

Scharf S.J., Horn G.T., Erlich H.A. (1986): Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science* 233: 1076-1078

Schwartz-Cornil I., Mertens P.P.C., Contreras V., Hemati B., Pascale F., Bréard E., Mellor P.S., MacLachlan N.J., Zientara S. (2008): Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. *Vet Res* 39: 46

Schwenkenbecher J.M., Mordue (Luntz) A.J., Switek K., Piertney S.B. (2009): Discrimination of *Culicoides* midges larvae using multiplex polymerase chain reaction assays based on DNA sequence variation at the mitochondrial Cytochrome C Oxidase I gene. *J Med Entomol* 46: 610-614

Schwenkenbecher J.M., Mordue Luntz A.J., Piertney S.B. (2008): Phylogenetic analysis indicates that *Culicoides dewulfi* should not be considered part of the *Culicoides obsoletus* complex. *Bull Entomol Res* 99: 371-375

Scott J.A., Brogdon W.G., Collins F.H. (1993): Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 49: 520-529

Scott T.W., Weaver S.C. (1989): Eastern equine encephalomyelitis virus: epidemiology and evolution of mosquito transmission. *Adv Virus Res* 37: 277-328

Shelley A.J., Coscaron S. (2001): Simuliid blackflies (Diptera: Simuliidae) and ceratopogonid midges (Diptera: Ceratopogonidae) as vectors of *Mansonella ozzardi* (Nematoda: Onchocercidae) in northern Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 451-458

Shin S.J., Lee B.S., Koh W.J., Manning E.J., Anklam K., Sreevatsan S., Lambrecht R.S., Collins M.T. (2010): Efficient differentiation of *Mycobacterium avium* complex species and subspecies using a five-target multiplex polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 48: 4057-4062

Singer R.S., MacLachlan N.J., Carpenter T.E. (2001): Maximal predicted duration of viraemia in bluetongue virus-infected cattle. *J Vet Diagn Invest* 13: 43-49

Spreull J. (1905): Malarial catarrhal fever (bluetongue) of sheep in South Africa. *J Comp Pathol Ther* 18: 321-337

Spreull J. (1902): Report from Veterinary Surgeon Spreull on the result of his experiments with malarial catharrhal fever of sheep. *Agricult J, Cape of Good Hope* 20: 469-477

Standfast H.A., Dyce A. L., Muller M.J. (1985): Vectors of bluetongue virus in Australia. In: Barber T.L., Jochim M.M., Osburn B.I. (eds), *Bluetongue and Related Orbiviruses*. Alan R. Liss Inc., New York, *Progress in Clinical and Biological Research* 178: 177-186

- Steinke D., Brede N. (2006): Taxonomie des 21. Jahrhunderts – DNA-Barcoding. *BiuZ* 1: 40-46
- Stott J.L., Barber T.L., Osburn B.I. (1985a): Immunologic response of sheep to inactivated and virulent bluetongue virus. *Am J Vet Res* 46: 1043-1049
- Stott J.L., Osburn B.I., Alexander L. (1985b): *Ornithodoros coriaceus* (Pajaroello tick) as a vector of bluetongue virus. *Am J Vet Res* 46: 1197-1199
- Sugiyama K., Bishop D.H., Roy P. (1982): Analysis of the genomes of bluetongue viruses recovered from different states of the United States and at different times. *Am J Epidemiol* 115: 332-347
- Svehag S.-E., Leendertsen L., Gorham J.R. (1966): Sensitivity of bluetongue virus to lipid solvents, trypsin and pH changes and its serological relationship to arboviruses. *J Hyg* 64: 339-355
- Sweeney W. (1985): The potential of the fungus *Culicinomyces clavisporus* as a biological control agent for medically important Diptera. In: Laird M., Miles J. (eds), *Integrated Mosquito Control Methodologies*. Academic Press, London, UK: 269-284
- Tabachnik W.J., Black IV W.C. (1995): Making a case for molecular population genetic studies of arthropod vectors. *Parasitol Today* 11: 27-30
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. (2011): MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*, doi: 10.1093/molbev/msr121
- Taylor W.P., Mellor P.S. (1994): Distribution of bluetongue virus in Turkey, 1978-81. *Epidemiol Infect* 112: 623-633
- Taylor W.P., Seller R.F., Gumm I.D., Herniman K.A.J., Owen L. (1985): Bluetongue epidemiology in the Middle East. In: Barber T.L., Jochim M.M. (eds), *Bluetongue and Related Orbiviruses*. Alan R. Liss Inc., New York: 527-530
- Thanwisai A., Kuvangkadilok C., Baimai V. (2006): Molecular phylogeny of black flies (Diptera: Simuliidae) from Thailand, using ITS2 rDNA. *Genetica* 128: 177-204
- Thomas A.D., Neitz W.O. (1947): Further observations on the pathology of bluetongue in sheep. *Onderstepoort J Vet Sci Anim Ind* 22: 27-40
- Torina A., Caracappa S., Mellor P.S., Baylis M., Purse B.V. (2004): Spatial distribution of bluetongue virus and its *Culicoides* vectors in Sicily. *Med Vet Entomol* 18: 81-89
- Toussaint J.F., Vandenbussche F., Mast J., De Meester L., Goris N., Van Dessel W., Vanopdenbosche E., Kerkhofs P., De Clercq, K. Zientara S., Sailleau C., Czaplicki G., Depoorter G., Dochy J.M. (2006): Bluetongue in northern Europe. *Vet Rec* 159: 327

- Uncles S.E., Marriott C., Kinghorn J.R., Panter C., Blackwell A. (2004): Efficacy of the entomopathogenic fungus, *Culicinomyces clavisporus* against larvae of the biting midges, *Culicoides nubeculosus* (Diptera: Ceratopogonidae). *Biocontr Sci Technol* 14: 397-401
- Valkiūnas G., Liutkevicius G., Iezhova T.A. (2002): Complete development of three species of *Haemoproteus* (Haemosporida, Haemoproteidae) in the biting midge *Culicoides impunctatus* (Diptera, Ceratopogonidae). *J Parasitol* 88: 864-868
- Vanbinst T., Vandebussche F., Vandemeulebroucke E., De Leeuw I., Deblauwe I., De Deken G., Madder M., Haubruge E., Losson B., De Clercq K. (2009): Bluetongue virus detection by real-time RT-PCR in *Culicoides* captured during the 2006 epizootic in Belgium and development of an internal control. *Transbound Emerg Dis* 56: 170-177
- Vandebussche F., Vanbinst T., Verheyden B., Van Dessel W., Demeestere L., Houdart P., Bertels G., Praet, N., Bervens D., Mintiens K., Gloris N., De Clercq K. (2008): Evaluation of antibody-ELISA and real-time RT-PCR for the diagnosis and profiling of bluetongue virus serotype 8 during the epidemic in Belgium in 2006. *Vet Microbiol* 129: 15-27
- Vasalos M. (1980): Cas de fièvre catarrhale du mouton dans l'île Lesbos (Greece). *Bull Off Int Epiz* 92: 547
- Vasileiadou K., Papakostas S., Triantafyllidis A., Kappas I., Abatzopoulos T.J. (2008): A multiplex PCR method for rapid identification of *Brachionus rotifers*. *Mar Biotechnol* 11: 1436-2228
- Vilar M.J., Guis H., Krzywinski J., Sanderson S., Baylis M. (2011): *Culicoides* vectors of bluetongue virus in Chester Zoo. *Vet Rec* 168: 242
- Wäckerlin R., Eschbaumer M., König P., Hoffmann B., Beer M. (2010): Evaluation of humoral response and protective efficacy of three inactivated vaccines against bluetongue virus serotype 8 one year after vaccination of sheep and cattle. *Vaccine* 28: 4348-4355
- Werner D., Conraths F.J. (2008): Kleine Mücke, große Wirkung. Die Blauzungenkrankheit: eine neue Tierseuche in Mitteleuropa. *BMELV Forschungsreport* 2
- 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 C.W., Blair C.D., Beaty B.J. (2005): Studies on overwintering of bluetongue viruses in insects. *J Gen Virol* 86: 453-462

- Wicht B., Yanagida T., Scholz T., Ito A., Jiménez J.A., Brabec J. (2010): Multiplex PCR for differential identification of broad tapeworms (Cestoda: Diphylobothrium) infecting humans. *J Clin Microbiol* 48: 3111-3116
- Wilson A., Mellor P. (2009): Bluetongue in Europe: vectors, epidemiology and climate change. *Parasitol Res* 103: 69-77
- Wilson A., Darpel K., Mellor P.S. (2008): Where does bluetongue virus sleep in the winter? *PLoS Biology* 6: 1612-1617
- Wilson A., Carpenter S., Gloster J., Mellor P. (2007): Re-emergence of bluetongue in northern Europe in 2007. *Vet Rec* 161: 487-489
- Wirth W.W. (1956): New species and records of biting midges ectoparasitic on insects (Diptera; Heleidae). *Ann Entomol Soc Am* 49: 356-364
- Wittmann E.J., Mellor P.S., Baylis M. (2002): Effect of temperature on the transmission of orbiviruses by the biting midge, *Culicoides sonorensis*. *Med Vet Entomol* 16: 147-156
- Yu C.-Y., Wang J.-S., Yeh C.C. (2000): *Culicoides arakawae* (Diptera: Ceratopogonidae) population succession in relation to leucocytozoonosis prevalence on a chicken farm in Taiwan. *Vet Parasitol* 93: 113-120
- Zhang D.-X., Hewitt G.M. (1996): Nuclear integrations: challenge for mitochondrial DNA markers *Trends Ecol Evol* 11: 247-251

11 Danksagung

Allen beteiligten Kooperationspartnern und Institutionen sei an dieser Stelle mein Dank für die gute Kooperation und Diskussionsbereitschaft, für das erwiesene Engagement und den Enthusiasmus ausgesprochen.

Müncheberg, 24.06.2011

Dr. Doreen Werner

12 Anhang

Alignments für die Multiplex-PCR

- *C. achrayi* CO1/ ITS2
- *C. albicans* CO1/ ITS2
- *C. chiopterus* CO1/ ITS2
- *C. circumscriptus* CO1/ ITS2
- *C. dewulfi* CO1/ ITS2
- *C. fagineus* CO1/ ITS2
- *C. fasciipennis* ITS2
- *C. festivipennis* CO1/ ITS2
- *C. flavipulicaris* CO1/ ITS2
- *C. griseidorsum* CO1/ ITS2
- *C. grisescens* CO1/ ITS2
- *C. imicola* CO1/ ITS2
- *C. impunctatus* CO1/ ITS2
- *C. lupicaris* CO1
- *C. newsteadi* CO1/ ITS2
- *C. nubeculosus* ITS2
- *C. obsoletus* CO1/ ITS2
- *C. pictipennis* CO1/ ITS2
- *C. pulicaris* CO1/ ITS2
- *C. punctatus* CO1/ ITS2
- *C. puncticollis* CO1/ ITS2
- *C. rhieti* CO1
- *C. scoticus* CO1/ ITS2
- *C. simulator* CO1/ ITS2
- *C. vexans* CO1/ ITS2