

Forschungsvorhaben 2808HS007

„Entomologische Untersuchungen zur Bekämpfung der Blauzungenerkrankheit“

Abschlußbericht für die Differenzierung der Arten (Feinbestimmung) und die Einzelgnitzen-Bestimmung im Virusnachweis des entomologischen Monitorings

einschließlich der Darlegung zum Stand der molekularbiologischen Arbeiten

Dr. Doreen Werner

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

Senckenberg Deutsches Entomologisches Institut)

Der vorliegende Bericht für die Feinbestimmung im o.g. Forschungsprojekt basiert auf
Untersuchungsergebnissen mit Stand 20.06.2010

Inhalt

1	Personal, Vorbereitung und Durchführung des Monitorings	4
1.1	Zusammensetzung der AG Feinbestimmung	4
1.2	Direkte Kooperationspartner der AG Feinbestimmung im Gesamtprojekt des Forschungsvorhabens „Entomologische Untersuchungen zur Bekämpfung der Blauzungenkrankheit“ - national.....	5
1.3	Direkte Kooperationspartner der AG Feinbestimmung im Gesamtprojekt des Forschungsvorhabens „Entomologische Untersuchungen zur Bekämpfung der Blauzungenkrankheit“ - international	5
1.4	Schulungen der anderen Projektteilnehmer im Forschungsprojekt zur Absicherung der Grobbestimmung	6
1.5	Teilnahme an Weiterbildungsveranstaltungen/ Nationalen und Internationalen fachlichen Austauschen/ Ergebnisdarlegungen	6
1.6	Teilnahme an den Arbeitstreffen mit anderen Projektteilnehmern	7
2	Allgemeine Betrachtung zur Familie Ceratopogonidae	8
2.1	Systematische Stellung.....	8
2.1.1	Gattungsübersicht der in Deutschland bisher nachgewiesenen Ceratopogonidae.....	9
2.2	Morphologie und allgemeine Familiencharakteristik	10
2.2.1	Taxonomische Merkmale zur Familiendiagnose	10
2.3	Entwicklungszyklus	12
2.4	Lebensraum und Vorkommen.....	13
2.5	Ceratopogonidae als Vektoren	15
2.5.1	Viren.....	15
2.5.2	Nematoden	16
2.5.3	Protozoen.....	16
2.6	Wirte parasitischer Ceratopogonidae	18
2.7	Schadwirkung beim Menschen	19
2.8	Schadwirkung beim Weidetier	20
2.9	BTV Serotype 8 Epidemiologie 2006 ff. in Europa.....	20
3	Entomologisches Monitoring	22
3.1	Durchführung des Entomologischen Monitorings	22
3.2	Teilnehmende Betriebe und Fallenstandorte.....	22
3.3	Allgemeine Fangmethodik und Wetterdatensammlung.....	23
3.4	Material	23
4	Methodik	24
4.1	Differenzierung des Materials - Grobbestimmung.....	24
4.1.1	Bestimmungsvorlage zur Grobdifferenzierung in den Arbeitsgruppen	24
4.1.1.2	Flügelmuster <i>C. pulicaris</i> Gruppe.....	24
4.1.1.3	Flügelmuster <i>C. obsoletus</i> Gruppe	24
4.1.1.4	Flügelmuster <i>C. dewulfi</i>	25
4.2	Differenzierung des Materials - Artbestimmung	25
4.2.1	Genitalien (Männchen) der häufigsten <i>Culicoides</i> - Arten	26
4.2.2	Antennenausprägung der häufigsten <i>Culicoides</i> – Arten.....	27
4.2.3	Palpenausbildung der häufigsten <i>Culicoides</i> - Arten	28
4.2.4	Spermathekenausbildung der häufigsten <i>Culicoides</i> - Arten	29
4.3	Herstellung von Dauerpräparaten.....	30
4.4	Molekularbiologische Differenzierung	30
4.4.1	DNA Aufbereitung	31

4.4.2	Grundlagen und Voraussetzungen der COI Nutzung.....	31
4.4.3	Grundlagen und Voraussetzungen der ITS Nutzung.....	32
4.4.4	Multiplex PCR.....	33
4.4.4.1	Material für die Multiplex-Methode	34
4.4.4.2	Primer für COI- und ITS2 Region.....	35
4.5	Virusdiagnostik bei Einzelindividuen	36
4.5.1	Gnitzenlagerung und Gnitzenvereinzelnung	36
4.5.2	Homogenisierung und Nukleinsäureextraktion.....	37
4.5.3	Real-time PCR Assays	37
4.5.4	Genetische Identifikation und Sequenzierung.....	37
4.5.5	Auswahl der zu analysierenden Gnitzenproben	37
5	Ergebnisse	38
5.1	Anmerkungen/ Ergänzungen Probennahme.....	38
5.2	Falldaten/ geografische Koordinaten.....	38
5.3	Probleme in der Taxonomische Terminologie	42
5.3.1	Nomenklatur.....	43
5.3.2	Taxonomische Merkmale.....	44
5.3.3	Internationale Aktivitäten/ Medreonet	45
5.3.3.1	Teilnehmer Medreonet	45
5.3.3.2	Ergebnisse Taxonomie Medreonet.....	46
5.3.4	Übersicht nomenklatorische Termini	46
5.4	Morphologische Daten	50
5.4.1	Gattung <i>Culicoides</i>	50
5.4.1.1	Artenspektrum der Gattung <i>Culicoides</i> in Europa	50
5.4.1.2	Artenspektrum der Gattung <i>Culicoides</i> in Deutschland.....	52
5.4.1.3	Artenspektrum der Gattung <i>Culicoides</i> im Entomologischen Monitoring ...	55
5.4.2	Verteilung der Arten.....	56
5.4.2.1	Verteilung der Arten auf die Bundesländer.....	57
5.4.2.2	Verteilung der Arten auf die Fallen im Entomologischen Monitoring	59
5.4.3	Molekularbiologische Analysen und Virusdiagnostik	64
5.5	Molekularbiologische Bestimmung	64
5.5.1	Entwicklung von Primern der COI Region	65
5.5.2	Sequenzierung der PCR Produkte	66
5.5.3	Molekularbiologische Differenzierung - Arbeitsstand.....	67
5.5.4	Entwicklung der speziesspezifischen Primer	69
5.5.5	Medreonet – molekularbiologische Ringtests	69
5.6	Virusnachweis einheimischer <i>Culicoides</i>	70
5.6.1	Virusnachweis im Entomologischen Monitoring (Pool-Nachweis).....	70
5.6.2	Virusnachweis in Einzelindividuen.....	70
5.6.2.1	Genetische Charakterisierung von BTV-positiven Einzelgnitzen	72
5.6.2.2	Diskussion der Ergebnisse	74
6	Abschlussbetrachtung.....	75
7	Danksagung	76
8	Literatur	77

1 Personal, Vorbereitung und Durchführung des Monitorings

1.1 Zusammensetzung der AG Feinbestimmung

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

Dr. Shahin Navai (Dipl. Biologin),
Humboldt-Universität zu Berlin
Museum für Naturkunde
Abt. Zoologie/ Entomologie
Invalidenstr. 42
10115 Berlin

Marie Landsberg (Studentin)
Leibniz-Zentrum für Agrarlandschaftsforschung (ZALF)
Eberswalder Chaussee 74
15734 Müncheberg

Mathes Landsberg (Student)
Leibniz-Zentrum für Agrarlandschaftsforschung (ZALF)
Eberswalder Chaussee 74
15734 Müncheberg

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

Katja Neven (Studentin)
Leibniz-Zentrum für Agrarlandschaftsforschung (ZALF)
Senckenberg Deutsches Entomologisches Institut
Eberswalder Chaussee 90
15734 Müncheberg

1.2 Direkte Kooperationspartner der AG Feinbestimmung im Gesamtprojekt des Forschungsvorhabens „Entomologische Untersuchungen zur Bekämpfung der Blauzungenkrankheit“ - national

Dr. H.-J. Bätza, BMELV Bonn
Frau S. Zenk, Frau K. Deeg, BLE Bonn

AG Prof. Dr. H. Mehlhorn, H.-Heine-Universität Düsseldorf
AG Prof. Dr. C. Bauer, Justus-Liebig-Universität Giessen
AG Prof. Dr. E. Kiel, Ossietsky-Universität Oldenburg
AG Prof. Dr. G. Schaub, Ruhr Universität Bochum
AG Dr. B. Bauer, Freie Universität Berlin,
AG Dr. M. Geier, Universität Regensburg
AG Dr. G. Liebisch, Burgwedel

Dr. F. Conraths, Inst. f. Epidemiologie, FLI Wusterhausen
Dr. C. Staubach, Frau P. Kranz, Inst. f. Epidemiologie, FLI Wusterhausen
Dr. B. Hoffmann, Dr. M. Beer, Inst. f. Virusdiagnostik; FLI Riems
Dr. H. Kampen, Inst. f. Infektionsmedizin; FLI Riems

1.3 Direkte Kooperationspartner der AG Feinbestimmung im Gesamtprojekt des Forschungsvorhabens „Entomologische Untersuchungen zur Bekämpfung der Blauzungenkrankheit“ - 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. Carpenter, 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

1.4 Schulungen der anderen Projektteilnehmer im Forschungsprojekt zur Absicherung der Grobbestimmung

08.-09.03.2007	Universität Oldenburg (AG Kiel)
15.-16.03.2007	Universität Giessen (AG Bauer)
18.03.2007	Universität Düsseldorf (AG Mehlhorn, AG Liebisch, AG Geier, AG Schaub, AG Berlin)
11.-12.10.2007	Universität Bochum (Projektteilnehmer aller AG's) (Feinbestimmungsfragen im <i>Culicoides</i> Komplex)

1.5 Teilnahme an Weiterbildungsveranstaltungen/ Nationalen und Internationalen fachlichen Austausch/ Ergebnisdarlegungen

29.03.2007	Landwirtschaftskammer NRW, Bonn, Deutschland
07.04.-14.04.2007	Animal Health Institute Pirbright, UK
02.05.2007	Universität Bonn, Deutschland
15.06.-17.06.2007	Tagung AK Diptera, Knüllwald (Hessen), Deutschland
18.01.- 19.01.2008	Universität Bonn, Institut für Parasitologie, Deutschland
10.06.2008	FLI Wusterhausen, Deutschland
20.06.- 22.06.2008	Tagung AK Diptera, Wehlen (Sachsen), Deutschland
09.07.- 11.07.2008	Fachtagung Parasitologie, Celle, Deutschland
01.10.- 04.10.2008	Tropenmedizinisches Institut, Hamburg, Deutschland
12.12.- 14.12.2008	European Mosquito Control Association, Speyer, Deutschland
09.12.- 11.12.2008	Medreonet Meeting, Gulianova, Italien
01.02.- 07.02.2009	FLI Riems, Greifswald, Deutschland
06.04.- 10.04.2009	Universität Giessen, Institut für Parasitologie, Deutschland
09.03.- 14.03.2009	European Mosquito Control Association, Turin, Italien
16.03.- 21.03.2009	Medreonet, Strasbourg, Frankreich
06.04.- 10.04.2009	Universität Giessen, Institut für Parasitologie, Deutschland
19.04.- 26.04.2009	Animal Health Institute Pirbright, UK
12.08.- 22.08.2009	FLI Riems, Greifswald, Deutschland
12.10.- 14.10.2009	Universität Giessen, Institut für Parasitologie, Deutschland
19.10.- 21.10.2009	FLI Riems, Greifswald, Deutschland
12.11.- 15.11.2009	FLI Riems, Greifswald, Deutschland
18.11.- 22.11.2009	Naturhistorisches Museum Wien, Österreich
23.11.- 28.11.2009	FLI Riems, Greifswald, Deutschland
01.12.- 06.12.2009	Medreonet Meeting, Lissabon, Portugal
09.12.- 12.12.2009	FLI Riems, Greifswald, Deutschland
14.12.- 18.12.2009	FLI Riems, Greifswald, Deutschland
28.01.- 30.01.2010	FLI Riems, Greifswald, Deutschland
01.02.- 03.02.2010	FLI Riems, Greifswald, Deutschland
03.05.- 08.05.2010	Medreonet Meeting, Tunis, Tunesien
31.05.2010	FLI Riems, Greifswald, Deutschland

1.6 Teilnahme an den Arbeitstreffen mit anderen Projektteilnehmern

23.01.2007	Bonn, BMELV, Deutschland
12.02.2007	Berlin, Institut für Parasitologie FU, Deutschland
23.02.2007	Bonn, BMELV, Deutschland
18.03.2007	Düsseldorf, Institut für Zoomorphologie, Zellbiologie und Parasitologie, H. Heine-Universität, Deutschland
03.04.2007	FLI Wusterhausen, Institut für Epidemiologie, Deutschland
06.06.2007	Celle, DVG-Tagung Parasitologie, Deutschland
18.09.2007	Bonn, BMELV, Deutschland
11.10.- 12.10.2007	Bochum, Ruhr-Universität, Deutschland
23.04.- 24.04.2008	FLI Riems, Greifswald, Deutschland
17.07.2008	FLI Riems, Greifswald, Deutschland
23.09.2008	FLI Riems, Greifswald, Deutschland
01.02.- 07.02.2009	FLI Riems, Greifswald, Deutschland
06.04.- 10.04.2009	Universität Giessen, Institut für Parasitologie, Deutschland
10.06.2008	FLI Wusterhausen, Deutschland
12.08.- 22.08.2009	FLI Riems, Greifswald, Deutschland
12.10.- 14.10.2009	Universität Giessen, Institut für Parasitologie, Deutschland
19.10.- 21.10.2009	FLI Riems, Greifswald, Deutschland
12.11.- 15.11.2009	FLI Riems, Greifswald, Deutschland
23.11.- 28.11.2009	FLI Riems, Greifswald, Deutschland
09.12.- 12.12.2009	FLI Riems, Greifswald, Deutschland
14.12.- 18.12.2009	FLI Riems, Greifswald, Deutschland
28.01.- 30.01.2010	FLI Riems, Greifswald, Deutschland
01.02.- 03.02.2010	FLI Riems, Greifswald, Deutschland
31.05.2010	FLI Riems, Greifswald, Deutschland

2 Allgemeine Betrachtung zur Familie Ceratopogonidae (nach Werner & Kampen 2008)

Die Gnitzen (Fam. Ceratopogonidae; englisch: biting midges, amerikanisch: no-see-ums; deutsch regional auch: Gnitten) gehören zu den wissenschaftlich am wenigsten untersuchten Dipterenfamilien Europas, obwohl sie sehr weit verbreitet sind und an vielen Standorten, z. B. in Strandnähe und Mooren, in hoher Dichte auftreten. Ein Massenaufreten der Mücken kann sowohl die Land- und Forstwirtschaft, als auch den Tourismus stark behindern oder sogar zum Erliegen bringen, da der Aufenthalt im Freien in dieser Zeit kaum möglich ist. Bedingt wird ein solcher Zustand durch die extrem starke Entwicklung der präimaginalen Stadien in den entsprechenden Lebensräumen und Bruthabitaten. Die Anzahl der Gnitzen-Larven kann nach Angaben von Boorman (1993) über 10.000 pro Quadratmeter Bodenfläche liegen.

Neben der Belästigung von Mensch und Tier und der daraus resultierenden wirtschaftlichen Bedeutung spielen diverse Arten bzw. Artenkomplexe der Gnitzen eine bedeutende human- und veterinärmedizinische Rolle. Während sich die Männchen ausschließlich von zuckerhaltigen Pflanzensäften ernähren (als bevorzugte Wirtspflanzen gelten Umbelliferen), sind die Weibchen zahlreicher Arten darüber hinaus hämatophag. Sie benötigen vor oder nach der Begattung eine Blutmahlzeit, damit es zur Eireifung kommt. Blutsaugende Arten können gefürchtete Lästlinge und Plageerreger sein, auch wenn die Lebensdauer der adulten Tiere kaum mehr als 2 bis 3 Wochen beträgt und ihr Aktionsradius, von passiver Verdriftung abgesehen, nur eine kurze Distanz umfasst.

In tropischen Regionen kommt einigen Ceratopogoniden-Arten eine umfangreiche ökonomische Bedeutung zu, da sie eine wichtige Rolle bei der Bestäubung von Pflanzen übernehmen.

2.1 Systematische Stellung

Die zweiflügligen Insekten wurden bereits von Aristoteles unter dem Namen Diptera zusammengefasst. Diese Bezeichnung wurde 1758 in das von Linnaeus aufgestellte zoologische System übernommen und kennzeichnet auch noch heute die Insektenordnung der Fliegen und Mücken, zu denen auch die Familie Ceratopogonidae gehört. Die monophyletische Stellung der Dipteren wird durch die Reduktion des zweiten Flügelpaares zu den so genannten Halteren (Schwingkölbchen) begründet.

Von den nahe verwandten Zuckmücken (Fam. Chironomidae) und Dunkelmücken (Fam. Thaumaleidae) unterscheiden sich die Ceratopogoniden durch ihre Lebensweise und ihre Morphologie, vor allem durch das Vorhandensein stechend-saugender Mundwerkzeuge, die Ausprägung der Flügeladerung und der Genitalien sowie die Gestaltung der Beine.

Der lateinische Familienname „Ceratopogonidae“ für Gnitzen oder Bartmücken leitet sich von der lateinischen Bezeichnung „Ceratopogon“ ab, die von Meigen (1803) zur Beschreibung einer ihrer artenreichsten Gattungen benutzt wurde. Bei den Ceratopogoniden handelt es sich um eine kleine, relativ einheitlich gestaltete Familie innerhalb der Dipteren, die weltweit (mit Ausnahme der Arktis und Antarktis) verbreitet ist und ungefähr 5.500 valide Artnamen in 5 Unterfamilien und 125 Gattungen umfasst (Borkent 2006).

Stamm	Arthropoda (Gliederfüßer)
Abteilung	Mandibulata (Mandibelträger)
Unterstamm	Tracheata (Tracheenträger)
Klasse	Insecta (Insekten)
Ordnung	Diptera (Zweiflügler)
Unterordnung	Nematocera (Mücken)
Familie	Ceratopogonidae (Gnitzen)

Die für das Gebiet der Bundesrepublik Deutschland nachgewiesene Anzahl der Ceratopogoniden-Arten beträgt nach Havelka & Aguilar (1999) 332. Es ist jedoch davon auszugehen, dass nach einer flächendeckenden Bearbeitung vernachlässigter Regionen zahlreiche weitere Arten hinzukommen.

2.1.1 Gattungsübersicht der in Deutschland bisher nachgewiesenen Ceratopogonidae

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

Unterfamilie Palpomyiinae
 Bezzia Kieffer, 1899
 Clinohalea Kieffer, 1917
 Macropoza Meigen, 1818
 Mallochohalea Wirth, 1962
 Neurohalea Kieffer, 1925
 Nilobezzia Kieffer, 1921
 Palpomyia Meigen, 1818
 Probezia Kieffer, 1906
 Sphaeromyia Curtis, 1829

Unterfamilie Dasyheleinae
 Dasyhelea Kieffer, 1911

Unterfamilie Forcipomyiinae
 Atrichopogon Kieffer, 1906
 Forcipomyia Meigen, 1818

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

2.2 Morphologie und allgemeine Familiencharakteristik

Gnizen sind kleine, 0,5 bis 3 mm lange, gedrungene Dipteren mit kurzen Beinen (Abb. 1), die oft mit Kriebelmücken (Fam. Simuliidae) oder Zuckmücken (Fam. Chironomidae) verwechselt werden. Die adulten Mücken sind meist in dunklen, schwarzen bis grauen Tönen gefärbt. Die relativ breiten Flügel sind im Gegensatz zu den Simuliiden oder Chironomiden oft behaart oder milchig getrübt und mehr oder weniger gefleckt. Sie werden in Ruhehaltung dachziegelartig übereinander gelegt (Abb. 3). Die Mücken zeichnen sich weiterhin durch das Vorhandensein von 13 bis 15-gliedrigen Fühlern aus, die bei den männlichen Mücken gefiedert sind.



Abb. 1: saugende Weibchen (*C. nubeculosus*) am Menschen (Foto: Werner, Pirbright, UK, Koloniematerial)

2.2.1 Taxonomische Merkmale zur Familiendiagnose

Zur Identifizierung der Familie dienen die im Folgenden gelisteten Charakteristika. Sie werden auch zur morphologischen Einteilung in die drei sehr ähnlichen Unterfamilien Forcipomyiinae, Dasyheleinae und Ceratopogoninae herangezogen.

Familien-Identifizierung adulter Ceratopogonidae

Kopf

Augen

Getrennt oder an Mittellinie zusammenstoßend, gewöhnlich nackt, manchmal mit feiner Bestäubung, Facetten von gleicher Größe, Ozellen auf Erhöhungen in Antennenhöhe möglich.

Antennen

13 bis 15 Glieder, Sexualdimorphismus - Weibchen mit 5 verlängerten Basisgliedern sowie mit verschieden gestalteten distalen Gliedern / Männchen mit stark vergrößertem Pedicellus, der das Johnstonsche Organ trägt, Glieder 1 bis 8 gewöhnlich mit quirlig angeordneten Borsten gefiedert, 3 oder 4 der Basisglieder verlängert.

Mundwerkzeuge

Proboscis ungefähr so lang wie der Kopf, Palpen etwas länger und 5-gliedrig, Glied 1 bis 2 oft schwach ausgebildet, Glied 3 mit sensorischem Organ, Glied 4 und 5 verschmolzen.

Der Saugapparat der hämatophagen Weibchen besteht aus einer steifen Oberlippe (Labrum), sägeartigen Mandibeln, Unterkiefer und Hypopharynx. Der Saugapparat aller Männchen und nicht blutsaugender Weibchen besitzt eine weiche, flexible Oberlippe und reduzierte Mundwerkzeuge.

Thorax

Mesonotum mit einem Paar präscutaler Gruben in der Nähe des Vorderrandes, Färbung manchmal mit Musterung oder Flecken, anepisternische Spalte breit, Postnotum ohne longitudinale Gliederung.

Flügel

Breit, Membrane hyalin, selten rauchfarben, Mikrotrichien häufig, vordere Adern (Costalader, Subcostalader, Radialaderung) kräftig, hintere Adern schwach ausgeprägt, Spitze teils gerundet, Analloben selten vorhanden, Calypter nicht gefranst, bei einigen Gattungen mit charakteristischen Mustern, dunklen oder hellen Flecken oder Schatten; Mikrotrichien manchmal dicht und flächendeckend, gelegentlich fehlend.

Aderung: charakterisiert durch die starke Ausbildung der Radialaderung (R) dicht neben der Costalader (C) und dem Eintreffen in den Flügelrand vor der Flügelspitze, oft in der Nähe oder vor dem Mittelpunkt verschmelzend (Abb. 4), R1 und RS gewöhnlich kurz, RS verzweigt sich in R2+3 und R4+5; R2+3 verläuft vorwärts und verschmilzt wieder mit R1 um die Flügelzelle r1 zu bilden; R4+5 verschmilzt weiter oberhalb mit C und formt dadurch r2+3; beide Flügelzellen können manchmal durch Verschmelzungen der Aderung verloren gehen, Verschmelzungsader r-m vorhanden und stark ausgebildet, hintere Aderung schwach ausgeprägt; falls Medialadern M1 und M2 hinter Verbindungsader r-m verschmolzen, dann Gabelung zwischen M1 und M2 gestielt; falls M1 und M2 vor der Verbindungsader r-m verschmolzen, dann Gabelung zwischen M1 und M2 ungestielt; M2 manchmal nur basal angedeutet oder fehlend, Verbindungsader m-cu fehlend, Cubitalgabelung gut entwickelt, hintere Cubitalader (CuP) und Analader (A) schwach ausgebildet, falsche Ader oft in Flügelzelle m2, manchmal auch in m1.

Beine

Klauen einfach ausgebildet, nicht vergrößert, Empodien gut entwickelt und in der Unterfamilie Forcipomyiinae verzweigt, schmal ausgebildet innerhalb der Dasyheleinae und Ceratopogoninae; bei räuberisch lebenden Arten ein oder mehr Beinpaare als Raubbeine umgebildet, hierbei Femur verdickt und Klauen vergrößert.

Abdomen (ohne Berücksichtigung der Genitalien)

Bestehend aus 10 Segmenten, Segment 2 bis 7 mit Dornen, Segment 1 manchmal reduziert, Tergite 1 und 2 manchmal verschmolzen. Zum Studium der Genitalien ist Spezialliteratur erforderlich.

2.3 Entwicklungszyklus

Wie alle Dipteren durchlaufen die Gnitzen einen holometabolen Entwicklungszyklus (Abb. 2). Die 0,15 bis 0,30 mm großen Eier, die oval bis lang gestreckt sind und in ihrer Ausbildung in den einzelnen Unterfamilien und Gattungen stark variieren, werden artspezifisch teils an Land, teils am Ufer von Gewässern oder im Wasser selbst abgelegt. Die Eiablage kann einzeln erfolgen, wie etwa innerhalb der Gattung *Culicoides*, oder als in Gallerte gehüllte Rosetten, Haufen oder Bänder in kleineren bis umfangreichen Eipaketen mit bis zu 250 Eiern. Forcipomyiinae-Eier sind oft schwarz, glänzend und von einer gallertigen Substanz umgeben. Im Hochsommer sind sie häufig als dunkler bis schwarzer Laich auf Algen oder flottierenden Pflanzen in Fließgewässern zu beobachten. Die Eier der Gattung *Dasyhelea* sind ebenfalls mit einer gallertigen Substanz überzogen, aber hufeisenförmig ausgebildet. Langgestreckte, bananenförmige Eier in lockeren Gruppen mit einer dünnen, aber formenreichen Eischale findet man innerhalb der Ceratopogoninae. Die terrestrisch lebenden Arten dieser Unterfamilie legen ihre Eier auf dem Erdboden, auf Pflanzen oder an bzw. unter Substanzen in Gewässernähe ab. Die Ausbildung von Eischnüren ist möglich (z. B. Gattungen *Probezzia*, *Dicrobezzia*). Bei manchen Arten fliegt das Weibchen zur Eiablage mit der aus dem Hinterleib hängenden Eischnur dicht über die Wasseroberfläche. Kommt die Schnur mit der Oberfläche in Berührung, reißt sie ab und taucht in das Wasser ein. Dort haften die Eier an submersen Strukturen fest. Bei anderen Arten werden die Eischnüre in der Luft abgestoßen und schweben zur Wasseroberfläche.

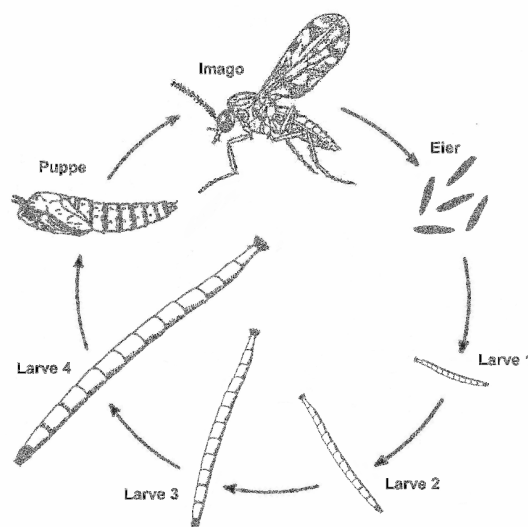


Abb. 2: Entwicklungszyklus der Gattung *Culicoides* (nach Werner & Kampen 2008)

Wie bei Simuliiden konnte auch für Gnitzen eine Eiablage unter Wasser festgestellt werden. Dazu kriechen die Gnitzen-Weibchen an einem Pflanzenstengel bis etwa 1 cm unter den Wasserspiegel. Mit Hilfe des Auftriebs einer Luftblase, die sich unter den Flügeln befindet, gelangen die Tiere wieder an die Wasseroberfläche.

Bereits die schlüpfenden Erstlarven haben eine voll sklerotisierte Kopfkapsel mit stark ausgebildeten Mandibeln, die am distalen Ende gezahnt sind. Zwischen Kopf und Thorax befindet sich ein kurzer Kragen. Drei thorakale und neun abdominale Segmente sind klar definiert. Der Kopf kann hypognath bis prognath ausgebildet sein. Prothorakale, thorakale oder hintere Fortsätze können vorhanden sein und erinnern, je nach Anordnung und Ausbildung, an die Larven von *Phlebotomus Rondani* (Fam. Psychodidae) oder *Chironomus* Meigen (Fam. Chironomidae). Die Mücken durchlaufen weitere drei Larvenstadien, die schließlich, in Abhängigkeit von Art und Nahrungsangebot, eine Länge von ca. 4 bis 6 mm erreichen. Die Überwinterung der meisten Arten findet, wie bei vielen anderen Insektenfamilien auch, im vierten Larvenstadium statt, da in diesem Stadium die Fress- und Wachstumsphase leicht verkürzt oder verlängert werden kann.

Die 2 bis 4 mm langen Puppen sind in allen Gattungen der Familie ähnlich ausgebildet. Sie weisen einen kompakten Bau auf, sind gelb-braun bis schwarz gefärbt und mit kurzen prothorakalen Hörnchen am Kopfende versehen. Puppen aquatischer Formen flottieren im Ruhezustand oft in Ansammlungen an der Wasseroberfläche. Verpuppungsbereite Larven terrestrischer Formen wandern in trockenere Bereiche, um sich dort zu verpuppen. Sie befinden sich dann einzeln in der Nähe der Entwicklungshabitate der Larven in vor Austrocknung geschützten Bereichen.

Die adulten Mücken halten sich nach dem Schlupf ebenfalls in der Nähe der larvalen Entwicklungshabitate auf. An definierten Landmarkierungen, wie Bäumen, Büschen und exponierter Ufervegetation, sind die Männchen vieler Arten in Schwärmen zu finden. Zur Partnerfindung senden die Weibchen Pheromone aus, die besonders bei jungfräulichen Weibchen anziehend und paarungsinduzierend auf die Männchen wirken. Die Kopulation findet im Flug statt. Sie kann ein- oder mehrmalig vollzogen werden (Linley & Adams 1972).

Weibchen verschiedener Arten innerhalb der Gattungen *Culicoides* und *Leptoconops* sind autogen und produzieren die ersten Eipakete ohne vorherige Blutmahlzeit. Für das Einleiten jedes weiteren Eireifungszyklus ist jedoch die Aufnahme von Blut erforderlich. Diese Strategie spielt bei der Erhaltung der Population eine entscheidende Rolle, wenn keine potentiellen Wirte zur Blutaufnahme zur Verfügung stehen.

2.4 Lebensraum und Vorkommen

Charakteristisch für die Gnitzen ist der ausschließliche Aufenthalt ihrer Entwicklungsstadien in Gewässern oder feuchten Biotopen, von denen sich auch die adulten Mücken nach dem Schlupf selten weit entfernen. Die Entwicklung ist stark abhängig von den lokalen Umweltfaktoren und den Ansprüchen der jeweiligen Arten. Bevorzugte larvale Entwicklungshabitate mancher Arten sind Meeressäume,

Salzquellen und stark überdüngte Lebensräume. Andere Arten vollziehen ihre Entwicklung in diversen feuchten Biotopen, insbesondere in Schlamm, feuchterrottender Vegetation, moderndem Laub und Holz, faulenden Früchten, Pilzen, Tierdung und Gülle (Abb. 3), Kompost, Humus und Moosen. Aquatische Biotope, wie Moore und Sümpfe (Abb. 4), Ufer- und Überflutungsbereiche von Flüssen (Abb. 5), Gräben, Bäche, Seen sowie kleinere Wasseransammlungen unterschiedlichster Art, wie z. B. Baumhöhlen (Abb. 6), Krabbenlöcher und Pfützen, sind weitere wichtige Brutplätze. Huminstoffreiche, saure Wasser von Hochmooren (Kampen et al. 2007; Werner unveröffentlicht), salzreiche Brackwasser von tidenbeeinflussten Flüsse und die Gezeitenzone (Havelka 1976, 1978) komplettieren die Liste der Brutplätze.



Abb. 3: Bruthabitat: Tierdung und Gülle
(Foto: Werner 2006)



Abb. 4: Bruthabitat: Moore und Sümpfe
(Foto: Bellstedt 2004)



Abb. 5: Bruthabitat: Ufer- und Überflutungsbereiche von Flüssen
(Foto: Werner 2006)



Abb. 6: Bruthabitat: Baumstumpf
(Foto: Kampen 2003)

Die Entwicklungshabitate der in Deutschland nachgewiesenen mammalophilen Gnitzen sind bisher nicht umfassend erforscht. Temporäre Schadherde einzelner Regionen sollten unter Berücksichtigung der natürlichen Gegebenheiten kritisch erfasst werden, um die Ausbildung von permanenten Herden oder Massenpopulationen einschätzen zu können. Bestimmte Arten zeigen auch eine ausgeprägte saisonale Abhängigkeit der Generationen im Jahresverlauf. Änderungen im Vorkommen der einzelnen Arten können sich aus der globalen Klimaveränderung mit dem Verschleppen bzw. Einwandern von Arten (Mellor 2004) und/oder der Renaturierung ausgewählter Feuchtgebiete ergeben.

Die Präimaginalstadien der einzelnen Arten sind ebenfalls ungenügend bearbeitet und z. T. sogar unbekannt. Durch die Fähigkeit der Gnitzen, nahezu alle Feuchtbiotope zu besiedeln, ergeben sich erhebliche Schwierigkeiten hinsichtlich einer flächendeckenden Erfassung und wissenschaftlichen Bearbeitung der Entwicklungsstadien. Spezielle methodische Kenntnisse sind für die Aufsammlungen von Larven und Puppen erforderlich.

Nach der larvalen Lebensweise lassen sich grob drei Gruppen von Ceratopogoniden unterteilen, die sich auch morphologisch unterscheiden. In einer Gruppe werden die aquatischen Formen mit den lästigen *Culicoides*-Arten zusammengefasst.

Die langen, schlanken Larven mit dem schmalen Kopfsegment verfügen über eine apneustische Atmung, d. h. Atmungsorgane fehlen und die Atmung erfolgt über die Haut. Sie sind gute Schwimmer, bewegen sich im Wasser schlängelnd vorwärts und ernähren sich räuberisch von kleinen wasserlebenden Wirbellosen, insbesondere den Larven anderer Mückenarten.

2.5 Ceratopogonidae als Vektoren

Ceratopogoniden sind in tropischen und subtropischen Regionen Vektoren für Viren, Protozoen und Filarien. Von ca. 1.300 *Culicoides*-Arten weltweit (Borkent & Wirth 1997) sind ca. 96% obligate Blutsauger an Säugetieren (einschließlich des Menschen) und Vögeln (Meiswinkel et al. 1994). Ungefähr 50 *Culicoides*-Arten sind Überträger von Krankheitserregern. Während der Mensch für die meisten Krankheitserreger nicht empfänglich ist bzw. nicht an den Infektionen erkrankt, stellen die durch Ceratopogoniden übertragenen Erkrankungen in der Tierhaltung und -zucht, vor allem bei Schafen, Rindern und Pferden, ein signifikantes Problem dar, da sie z. T. mit hoher Morbidität und Mortalität einhergehen können. Eine Übersicht ist in Tab. 1 gegeben.

2.5.1 Viren

Das Spektrum der bisher aus *Culicoides* isolierten Viren ist beachtlich. Neben dem Virus der Blauzungkrankheit 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 (Crosskey 1990), 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. Blässböcke, 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.

2.7 Schädigung beim Menschen

Hinsichtlich ihrer medizinischen und veterinärmedizinischen Bedeutung als Lästlinge und Plageerreger stehen Gnitzen den Stechmücken (Fam. Culicidae), den Kriebelmücken (Fam. Simuliidae), den Bremsen (Fam. Tabanidae) sowie den Echten Fliegen (Fam. Muscidae) und den Goldfliegen (Fam. Calliphoridae) nicht nach.

Unter einer Gnitzenplage versteht man den Massenbefall von Menschen und/oder Tieren beim Schwärmen während der Kopulationszeit oder deren gezieltes Aufsuchen zur Aufnahme einer Blutmahlzeit. Der kurze Rüssel der Gnitzenweibchen besitzt kräftige, klingenförmige Stechborsten und ähnelt dem der Simuliiden. Beide Familien gehören zur Gruppe der „pool feeder“ unter den hämatophagen Arthropoden, da sie mit ihren groben Mundwerkzeugen die Haut aufraspeln und Blutgefäße beschädigen, wobei stark blutende Wunden

entstehen können. Die Blutaufnahme dauert meist einige Minuten, wobei die Gnitzen mehrfach einstechen. Oft ist ein austretender Blutstropfen zu beobachten aus dem die Mücken das Blut auflecken. Wird eine Nervenendigung getroffen, kann der Stechakt sehr schmerzhaft sein. In den meisten Fällen führt er zu starken Hautreaktionen an der Einstichstelle mit Knötchenbildung, schmerzhaften Erythemen, Quaddel- und Ödembildung sowie weiteren allergischen Reaktionen. Juckreiz und Quaddelbildung treten fast immer auf. Oftmals bilden sich nach dem Stechakt wenige Millimeter große, mit seröser Flüssigkeit gefüllte Blasen. Da diese Reaktionen auch von Simuliiden durch die Aufnahme der Blutmahlzeit hervorgerufen werden können, kann das in der Stichdiagnostik zu Verwechslung der Ceratopogonidenstiche mit Simuliidenstichen führen. Wie bei anderen Arthropodenstichen auch, können sekundären Reaktionen stark von mechanischen Einwirkungen, wie Kratzen und Reiben an der Einstichstelle, und dem Immunstatus des Betroffenen abhängig sein (Werner, unveröffentlicht). Den Medizinern ist eine konkrete nosologische Zuordnung der Stichreaktionen oft nicht möglich.

Dünnhäutige, kapillarreiche Körperpartien im Bauch- und Kopfbereich, z. B. in der Augenregion, an der Stirn und dem Bereich unterhalb des Haaransatzes, sowie an den Ohren und Halspartien sind präferierte Stichstellen beim Menschen. Weitere Einstichbereiche lassen sich oft an den Extremitäten v. a. am Rand der Bekleidung und am Kragen bzw. Halsausschnitt finden.

Die Stechaktivität der Mücken ist artabhängig und wird durch abiotische Umweltfaktoren beeinflusst. Obwohl viele Gnitzen tag- oder nachtaktiv sind, bevorzugen die meisten Arten die Dämmerungsstunden am Morgen und Abend sowie die ersten Nachtstunden.

2.8 Schadwirkung beim Weidetier

Bei einem massenhaften Auftreten und Anflug von Gnitzen kommt es zu mehr oder weniger starken Abwehrbewegungen bis hin zu großer Unruhe unter Weidetieren. Dies ist auch der Fall, wenn Gnitzen in Stallungen einfliegen. Dort halten sie sich oft in großer Anzahl im Fensterbereich auf. Bei Weidetieren bevorzugen sie zur Blutaufnahme ausgewählte kapillarreiche Körperregionen am Bauch, Rücken und Kopf (insbesondere Augenregion, Hals und Stirn). Die befallenen Körperregionen der Wirtstiere weisen nadelstichartige Blutungen in der Haut oder im Unterhautbindegewebe auf. Diese Einstiche haben die Form von kleinen, runden, bis ca. 3 mm großen Blutpunkten (Petechien). Charakteristische Einstichstellen sind in den Abbildungen 15 am Euter eines Rindes und in Abb. 16 am Skrotum eines Schafes dargestellt. An der betreffenden Körperstelle tritt wenige Minuten nach dem Stich starker Juckreiz auf und es bildet sich ein Ödem. Subkutane Ödeme sind häufig am Kehlgang, am Triel, in der Bauch-, Euter, Skrotal- oder Vulvaregion zu finden. An den Einstichstellen bilden sich blutverschmierte und verkrustete Hautflächen in unterschiedlicher Größe. Allgemeine Symptome treten meist sofort auf: Nervosität, Mattigkeit, Fressunlust und Gleichgewichtsstörungen. Des Weiteren kann es zu Temperaturerhöhungen, Entzündungen der Einstichstellen, Hautirritationen und starken Einblutungen ins Unterhautbindegewebe kommen.

Die unter der Bezeichnung „Sommerekzem“ (sweet itch, kassen disease) bekannte Dermatitis bei Pferden ist in vielen Regionen der Erde auf eine Überempfindlichkeitsreaktion gegenüber Culicoides-Stichen zurückzuführen. Die durch das toxische Speicheldrüsensekret der Mücken ausgelöst wird (Langner 2005). Allergische Reaktionen in Form einer Dermatitis sind ebenfalls von Schafen und Rindern bekannt. Diese werden nach Boorman (1993) möglicherweise durch Anflüge von Arten des *Culicoides obsoletus*-Komplexes verursacht.

2.9 BTV Serotype 8 Epidemiologie 2006 ff. in Europa

(nach Werner & Kampen 2008; Kampen & Werner 2010)

Die erstmals im August 2006 in Deutschland nachgewiesene Blauzungkrankheit (bluetongue disease, catarrhal fever of sheep, Maulkrankheit) ist eine nicht kontagiöse Viruserkrankung domestizierter und wild lebender Wiederkäuer, die nach dem bisherigen Kenntnisstand akut, seuchenhaft und saisongebunden verläuft. Unter natürlichen Bedingungen erfolgt die Übertragung des Virus durch Gnitzen der Gattung *Culicoides*. Die in Endemiegebieten im Mittelmeerraum für die Virusverbreitung verantwortlich gemachte Spezies *Culicoides imicola* Kieffer, 1913 wurde nördlich der Alpen bisher nicht nachgewiesen. Diese Art ist der weltweit wichtigste Vektor der Blauzungkrankheit (BTD) und der Afrikanischen Pferdepest. Es handelt sich um eine Wärme liebende Gnitzen-Art, die ursprünglich in Afrika und Südostasien beheimatet war. In Europa wurde sie erstmals 1982 in Südspanien nachgewiesen (Mellor et al. 1983). Ihr Verbreitungsgebiet umfasst heute weite Teile des Mittelmeerraumes (Ourse et al. 2005). *Culicoides imicola* scheint sehr anpassungsfähig zu sein, benötigt aber definierte klimatische Minimalbedingungen, um sich in einer Region etablieren zu können. So kann sie den Winter offenbar nur überleben, wenn die durchschnittlichen Tageshöchsttemperaturen in den kältesten

Monaten mindestens 12,5 °C erreichen (Sellers & Mellor 1993). Da die entsprechende Isotherme während der letzten vollständigen Klimanormalperiode (1961 bis 1990) Deutschland von West nach Ost etwa in Höhe von Hannover und Berlin querte (Hendrickx et al. 1998), wird eine voranschreitende Ausbreitung von *C. imicola* nach Norden befürchtet.

Die ersten Ausbrüche der BTV Serotyp 8 Epidemiologie in Europa wurden in Belgien, Holland, Deutschland, Frankreich registriert, etwas später folgte Luxemburg. Ende 2006 waren bereits über 2000 Weidetier-Betriebe betroffen (Tab. 2). In Tabelle 4 sind die registrierten Ausbrüche in Europa von 2006 bis 2009 im Zusammenhang zur Transmissionsperiode des Virus gegenübergestellt. Die Gegenüberstellung zeigt deutlich, dass die BTD Epidemie explodierte in der zweiten Übertragungsperiode, was in der Anzahl der Ausbrüche und der geografischen Ausbreitung deutlich wird. Als Reaktion auf diese alarmierende Situation, arbeiteten verschiedene pharmazeutische Firmen mit Hochdruck an der Bereitstellung des Impfstoffes gegen BTV-8. Im Mai 2008 startete die Impfkampagne in Deutschland mit dem getesteten Impfstoff (EMA 2009, Gethmann et al. 2009, Bruckner et al. 2009). Während das Immunisierungsprogramm im Vergleich zu den Ausbrüche der vorangegangenen Periode (Mai 2008-April 2009) eine generelle Reduktion der Ausbrüche hervorrief, mussten einige Länder wie z.B. Frankreich, die keine umfassende Impfkampagne gestartet hatten, ein kontinuierliches Ansteigen der BTD Ausbrüche verzeichnen. Der endgültige Einfluss des Immunisierungsprogramms war 2009 spürbar. Nur noch wenige Ausbrüche wurden in sechs Ländern registriert.

Land	Mai 2006 – April 2007	Mai 2007 – April 2008	Mai 2008 – April 2009	Mai 2009 – April 2010
Belgien	695	6,870	47	0
Dänemark	0	0	15	0
Germany	1,077	22,650	3,216	9
Griechenland	0	0	3	0
England (UK)	0	124	11	0
Frankreich	21	20,930	28,832	46
Italien	0	4	61	10
Luxembourg	8	1,312	21	0
Niederlande	474	5,779	78	0
Norwegen	0	0	3	0
Österreich	0	0	21	2
Spanien	0	12	23	0
Sweden	0	0	30	0
Schweiz	0	7	70	7
Tschechische Republik	0	1	10	2
Total	2,275	57,662	32,441	76

Tab.2: BTV-8 Ausbrüche in Europa; Quelle: EC-ADNS, <http://eubtnet.izs.it/btnet/reports/EpidemiologicalSituation.html>

Für den Ausbruch 2006 in Mitteleuropa (Belgien, Holland, Deutschland, Frankreich, Luxemburg) und das weitere Schadgeschehen 2007 (Belgien, Holland, Deutschland, Frankreich, Luxemburg, Großbritannien, Dänemark, Schweiz) werden vor allem die Arten des *C. obsoletus*-Gruppe sowie möglicherweise die des *C. pulicaris*-Gruppe als Vektoren vermutet. Die tatsächliche Vektorkompetenz dieser Arten für das Blauzungenvirus (BTV) war bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht belegt. Der vollständige Übertragungszyklus konnte bisher noch nicht im Labor nachgewiesen werden, jedoch tragen die vorliegenden Projektergebnisse der Isolation des BTV aus Freilandfängen der Gnitzen wesentlich zur Klärung der Virusübertragung und der Vektorkompetenz einzelner Arten bei.

Vertreter der *C. obsoletus*-Gruppe sowie des *C. pulicaris*-Gruppe zeigten sie sich in Infektionsversuchen empfänglich (Goffredo et al. 2004, Carpenter et al. 2006).

Für das Schadgeschehen in Deutschland verweisen Mehlhorn et al. (2007) auf *C. obsoletus* und *C. pulicaris*, jedoch müssen diese Ergebnisse mit Vorbehalt interpretiert werden (vgl. 4.3.1 Nomenklatur). Für die Übertragung in den Niederlanden wird auch *C. dewulfi* in Betracht gezogen (Meiswinkel et al. 2007). Als weitere mögliche Vektoren für die Blauzungenerkrankung werden unter weitere Arten der Gattung *Culicoides* verdächtigt (MacLachlan et al. 2004, Mellor et al. 1980, Nolan et al. 2004, Samal et al. 1987, Tanya et al. 1992, Wilson et al. 2005).

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 Blauzungenerkrankung“ vor.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zur Feinbestimmung des Gnitzenmaterials 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

Vor Projektbeginn wurden die Restriktions- und Beobachtungszone in Deutschlands in 90 geographische Einheiten eingeteilt (Studienprotokoll vom 28.03.2007), die jeweils einen Landkreis oder mehrere Landkreise umfassten und eine Größe von ca. 1.300 – 2.800 km² abdeckten. In jedem dieser geographischen Einheiten wurde auf freiwilliger Basis der Betriebsinhaber ein Rinder haltender Betrieb für das Monitoring ausgewählt. Alle Betriebe waren bis zum Projektbeginn am 31.03.2007 frei von BTV. Die geographischen Daten sind unter 4.2. in den Tab. 3 und 4 gelistet. Auf jedem Betrieb wurden eine BG-Sentinel-UV-Lichtfalle (Fa. Biogents GmbH, Regensburg) sowie eine Wetterstation (Hobo Pro TH/Temp, Typ H08-032-08, Fa. Prosoorb, Gottenheim) gemäß Vorhabe des Studienprotokolls in der Nähe des Stallgebäudes installiert.

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 Gnitzen 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

Nach Absprache und Einweisung der einzelnen AGs wurden aus den jeweiligen Lichtfallenfängen des Entomologischen Monitorings sowie zusätzlicher Standorte in dem restlichen Gebiet Deutschlands die Mücken innerhalb der Gattung *Culicoides* 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 gingen durch den festgelegten Untersuchungsschwerpunkt des Virusnachweises in den Gnitzen direkt ans FLI. 10% des Materials wurde zur Feinbestimmung an das Deutsche Entomologische Institut gesandt. Hier wurden die einzelnen Mücken der Feinbestimmung, d.h. der Zuordnung auf Artniveau unterzogen. Zur Artbestimmung wurden neben den Weibchen auch die Männchen berücksichtigt.

4 Methodik

4.1 Differenzierung des Materials - Grobbestimmung

4.1.1 Bestimmungsvorlage zur Grobdifferenzierung in den Arbeitsgruppen

Zu Beginn des Entomologischen Monitorings wurden den einzelnen Arbeitsgruppen eine taxonomische Einweisung und Bestimmungsliteratur zur Verfügung gestellt. Aufgrund der mangelnden Bestimmungsliteratur in dieser Gruppe wurde ein Skript angefertigt, welches mit Hilfe von Datenmaterial aus dem Institute of Animal Health in Pirbright erstellt wurde. Die Grundlage zur morphologischen Bearbeitung bildete vorrangig die Literatur von Kremer, Delecolle und Havelka sowie umfangreichen russischen Sekundärliteratur u.a. von Glukhova und Remm. Die Grobbestimmung erfolgte hauptsächlich auf Grundlage der Flügelmuster.

4.1.1.2 Flügelmuster *C. pulicaris* Gruppe

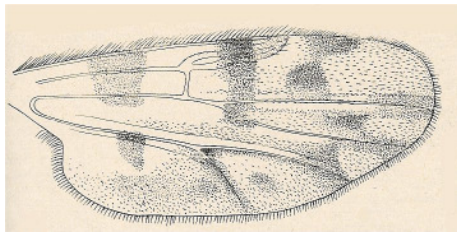


Abb. 7: Flügelmuster *C. pulicaris*

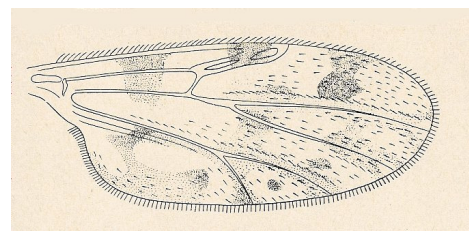


Abb. 8: Flügelmuster *C. punctatus*

4.1.1.3 Flügelmuster *C. obsoletus* Gruppe

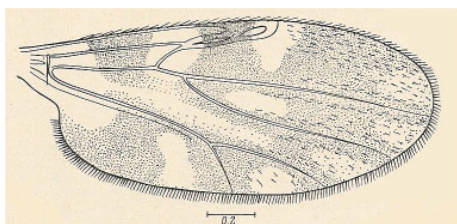


Abb. 9: Flügelmuster *C. obsoletus*

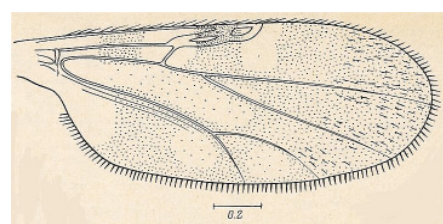


Abb. 10: Flügelmuster *C. chiopterus*

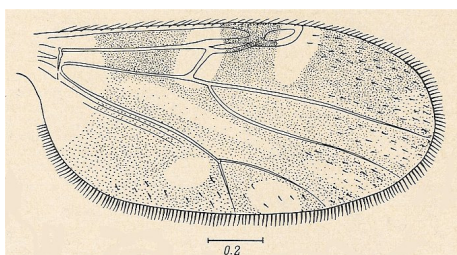


Abb. 11: Flügelmuster *C. scoticus*

4.1.1.4 Flügelmuster *C. dewulfi* (zu *C. obsoletus* Gruppe)

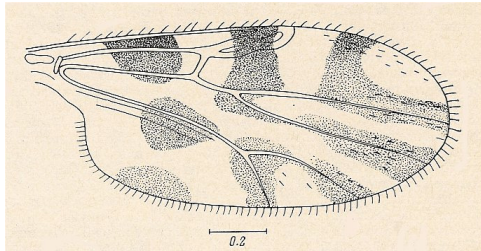


Abb. 12: Flügelmuster *C. dewulfi*

4.2 Differenzierung des Materials - Artbestimmung

Für das entomologische Monitoring war die Bearbeitung der Rückstellproben der Gritzen 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

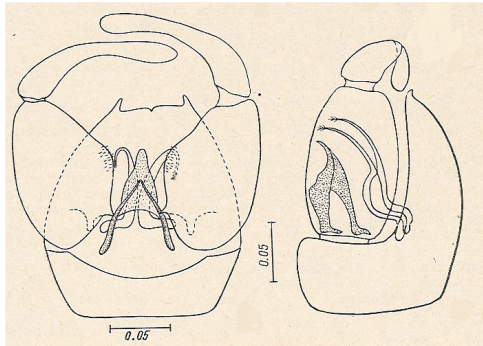


Abb. 13: Genital Männchen
C. pulicaris

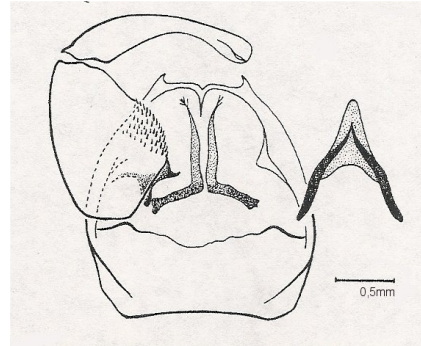


Abb. 14: Genital Männchen
C. punctatus

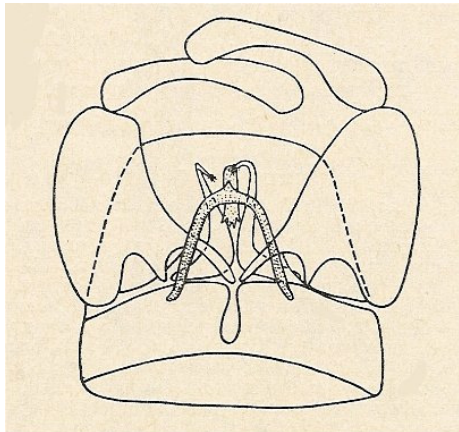


Abb. 15: Genital Männchen
C. obsoletus

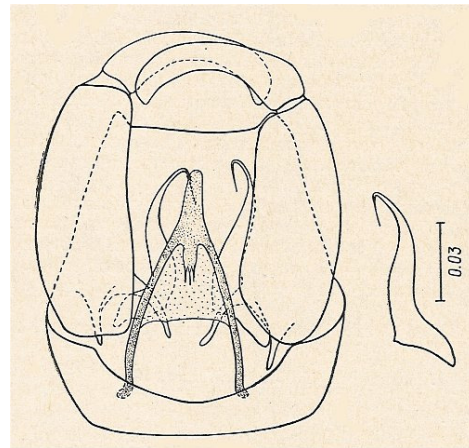


Abb. 16: Genital Männchen
C. chiopterus

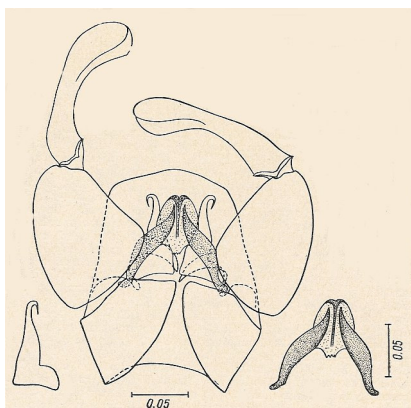


Abb. 17: Genital Männchen
C. scoticus

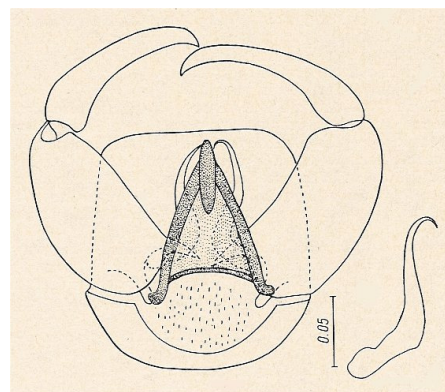


Abb. 18: Genital Männchen
C. dewulfi

4.2.2 Antennenausprägung der häufigsten *Culicoides* – Arten



Abb. 19:
Antenne
C. pulicaris

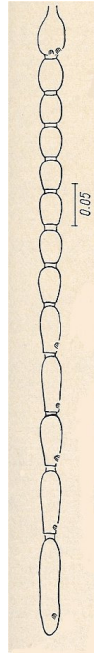


Abb. 20:
Antenne
C. punctatus

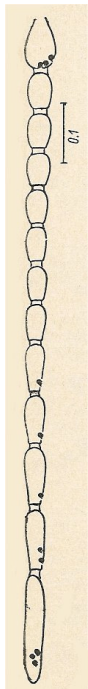


Abb. 21:
Antenne
C. obsoletus

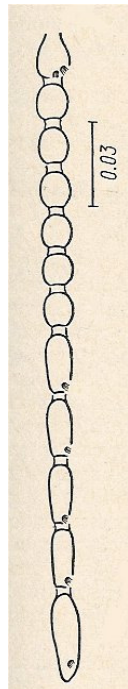


Abb. 22:
Antenne
C. chiopterus

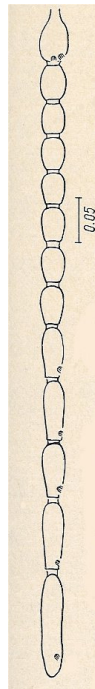


Abb. 23:
Antenne
C. scoticus

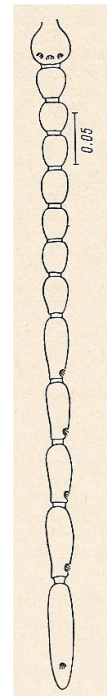


Abb. 24:
Antenne
C. dewulfi

4.2.3 Palpenausbildung der häufigsten *Culicoides* - Arten

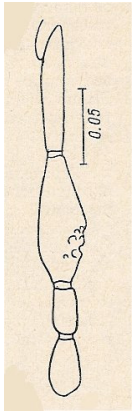


Abb. 25:
Palpen
C. pulicaris

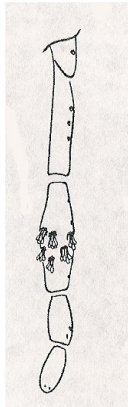


Abb. 26:
Palpen
C. punctatus

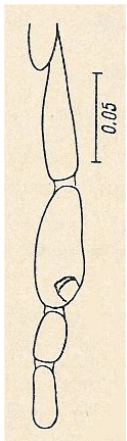


Abb. 27:
Palpen
C. obsoletus

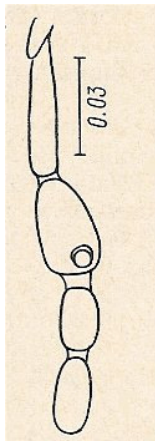


Abb. 28:
Palpen
C. chiopterus

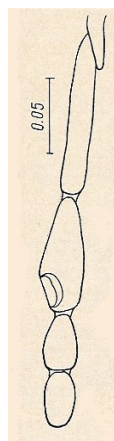


Abb. 29:
Palpen
C. scoticus

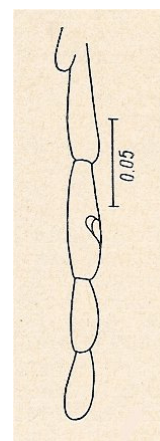


Abb. 30:
Palpen
C. dewulfi

4.2.4 Spermathekenausbildung der häufigsten *Culicoides*-Arten

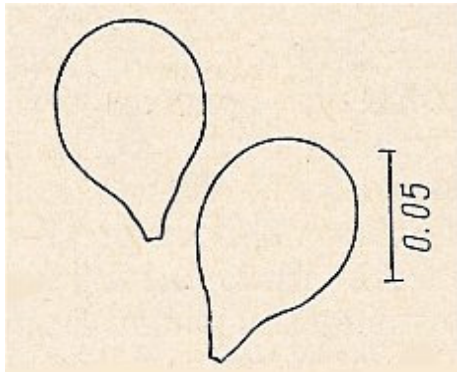


Abb. 31: Spermathek *C. pulicaris*

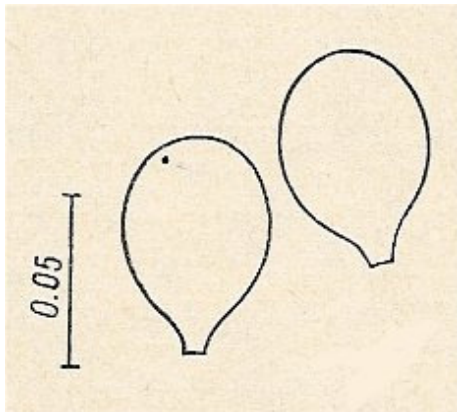


Abb. 32: Spermathek
C. obsoletus

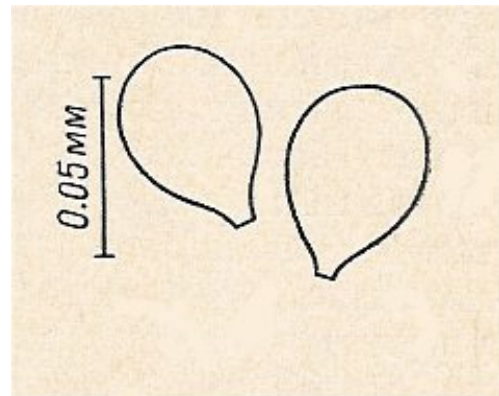


Abb. 33: Spermathek
C. chiopterus

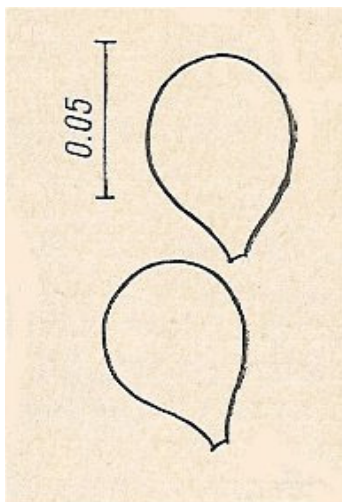


Abb. 34: Spermathek
C. scoticus

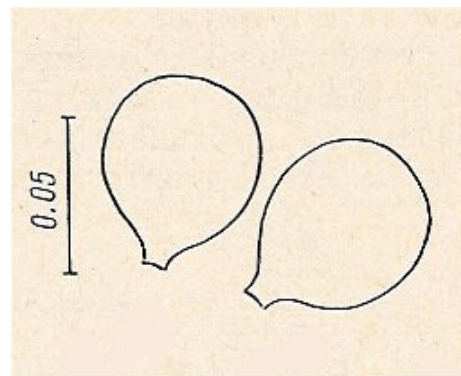


Abb. 35: Spermathek
C. dewulfi

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 Molekularbiologische Differenzierung

Um eine sichere und effektive Unterscheidung von *Culicoides*-Arten zu gewährleisten, ist neben der konventionellen morphologischen, aber manchmal subjektiven Untersuchung eine alternative objektivere Methode notwendig. Aus diesem Grund ist die Entwicklung einer PCR-basierenden Methode wünschenswert, mit der *Culicoides*-Arten mit hoher Spezifität und geringem Zeitaufwand identifiziert werden können. An anderen Insektengruppen (insbesondere Stechmücken – Fam. Culicidae) wurden solche PCR-Testsysteme zur Artidentifizierung bereits frühzeitig und erfolgreich etabliert (z.B. Scott et al. 1993, Proft et al. 1999, Koekemoor et al. 2002).

4.4.1 DNA Aufbereitung

Die DNA-Isolation erfolgte nach einem Standard-Protokoll, wobei die Mücken einzeln in Lysispuffer eingefroren, homogenisiert und nach nochmaliger Zugabe von Lysispuffer zur Auflösung der Zellmembran inkubiert wurden. Durch die Zugabe von Kaliumacetat wurden die störenden Proteine ausgefällt und durch mehrfaches Zentrifugieren entfernt. Die erhaltene DNA wurde mit Natriumchlorid und Isopropanol gefällt, nochmals gewaschen, sedimentiert und getrocknet. Das Sediment wurde in Tris-EDTA resuspendiert und ein Aliquot der gewonnenen Lösung elektrophoretisch aufgetrennt, um Quantität und Qualität der DNA für weitere Schritte zu prüfen.

Die gewonnene DNA wurde per PCR selektiv vervielfältigt. Nach Abschluss der Reaktion wurde die amplifizierte DNA wiederum zur Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen. Erfolgreich amplifizierte DNA wurde vor der weiteren Verwendung mittels eines kommerziell erhältlichen Kits aufgereinigt.

4.4.2 Grundlagen und Voraussetzungen der COI Nutzung

Interspezifische Polymorphismen in bestimmten DNA-Bereichen der einheimischen Gnuten sollen zur Artidentifizierung genutzt werden. Als Zielregion wurde daher mit der mitochondrialen Cytochrom Oxidase Untereinheit I (COI) eine Sequenz im Genom der Gnuten ausgewählt, die schon bei anderen Insektengruppen gute Ergebnisse lieferte. Sie ist interspezifisch relativ variabel, intraspezifisch aber relativ konserviert (Caterino et al. 2000). Die mitochondriale DNA (mtDNA) wird maternal vererbt und somit ausschließlich von der Mutter an die Nachkommen weitergegeben. Da keine Rekombination mit väterlicher Erbsubstanz stattfindet, treten auch keine unerwarteten Sequenzpolymorphismen auf. Lediglich kleine Veränderungen der DNA, verursacht durch externe Einflüsse, wie z.B. Replikationsfehler, können passieren.

Die COI nimmt als Molekül der Atmungskette zwar eine wichtige Rolle im Organismus ein, verfügt aber aufgrund einer relativ hohen Mutationsrate trotzdem über eine ausreichende interspezifische Nukleotidvariabilität, um Artdifferenzierungen vornehmen zu können (Lunt et al. 1996). Die mtDNA von zwei Individuen derselben Art unterscheidet sich wesentlich weniger als die mtDNA von Individuen unterschiedlicher Arten. Aus diesem Grund wird die COI u.a. auch für taxonomische Untersuchungen durch Barcoding verwendet. Horizontaler Gentransfer, eine Übertragung von Genen außerhalb der geschlechtlichen Fortpflanzung und über Artgrenzen hinweg, kann allerdings das Ergebnis verfälschen (Hurst & Jiggins 2005).

COI ist ein sehr nützlicher Marker, aber nicht unfehlbar. Zum Beispiel liefern maternal vererbte Gene keine Information über eine mögliche Hybridisierung oder Intragression (= Einführung bestimmter genetischer Eigenschaften aus fremdem Erbgut durch wiederholte Rückkreuzung von Hybriden mit deren Elternarten), was bei evolutiv jüngeren Arten problematisch sein kann, sofern sie sich hinsichtlich ihrer Nukleotidsequenz noch nicht ausreichend unterscheiden.

Eine Integration von mtDNA in das nukleäre Genom kann ebenfalls vorkommen („mitochondriale Pseudogene“) und die Interpretation von Ergebnissen beeinflussen, da solche integrierten mtDNA-Regionen bei der Verwendung konservierter Primern nichtsdestoweniger zusammen mit den eigentlichen mitochondrialen Regionen amplifiziert werden können.

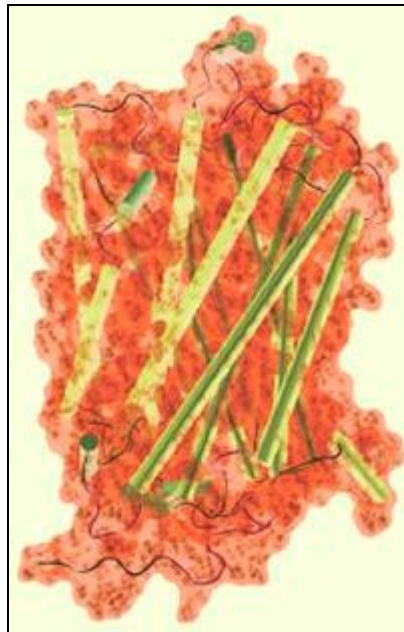


Abb. 36: Cytochromoxidase Untereinheit I (aus Steinke & Brede 2006)

4.4.3 Grundlagen und Voraussetzungen der ITS Nutzung

Aufgrund der Unsicherheiten bei der Nutzung der COI-Region soll für die geplante taxonomische Aufarbeitung der einheimischen *Culicoides*-Arten der Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) der ribosomalen DNA (rDNA) als weitere Sequenz analysiert werden.

In Eukaryonten besteht die rDNA aus hunderten von sich tandemartig wiederholenden Gengruppen (Repeats), welche sich aus kodierenden (5,8S, 18S und 28S-rDNA) und nicht-kodierenden Abschnitten zusammensetzen (Abb. 37). Die nicht-kodierenden, die so genannten Spacer, trennen die Repeats voneinander und die innerhalb eines Repeat in jeweils gleicher Reihenfolge zu finden Gene für die 18S-, 5,8S- und 28S rRNA. So finden sich zwei relativ variable ITS zwischen den konservierten Genabschnitten für die ribosomalen Untereinheiten, darunter die ITS2-Region, die die 5.8S und die 28S rDNA einer Transkriptionseinheit trennt.

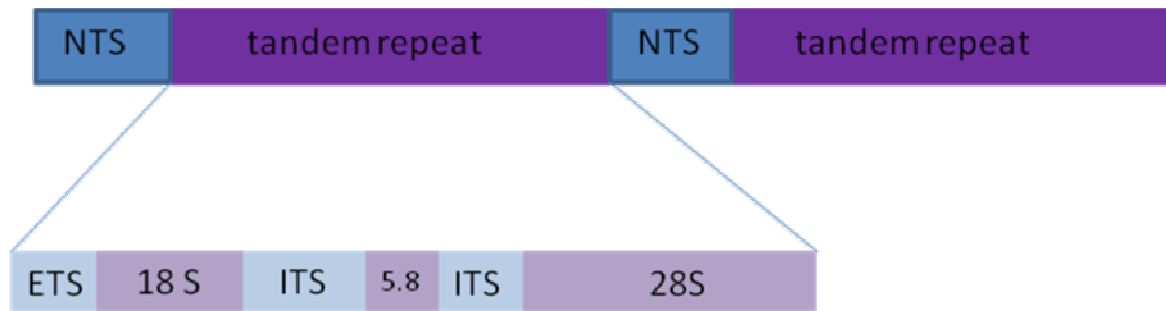


Abb. 37: Aufbau der Transkriptionseinheiten und deren tandemartige Anordnung

Wie die COI-Region ist auch die ITS2-Region bereits bei anderen Insektengruppen gut untersucht und wird im Bereich der Taxonomie und der Artdifferenzierung häufig genutzt (z.B. Depaquit et al. 2000, Thanwisai et al. 2006, Dassanayake et al. 2008).

4.4.4 Multiplex PCR

Für die Trennung der Zwillingarten des *C. obsoletus*-Komplexes (trotz aktueller Ergebnisse zur Phylogenie (Schwenkenbecher et al. 2008) unter Einbeziehung von *C. dewulfi*) und des *C. pulicaris*-Komplexes ist die Entwicklung einer konventionellen Multiplex-PCR geplant. In der in Abb. 38 dargestellten Möglichkeit handelt es sich eine Variante, in der einer von mehreren speziespezifischen Forward-Primern mit einem universellen Reverse-Primer kombiniert zur DNA-Amplifikation führt.

Bei der Multiplex-PCR sollten die spezifischen Amplifikate der einzelnen Arten unterschiedliche Längen aufweisen, um die visuelle Artdifferenzierung nach Auftrennung der PCR-Produkte mittels Elektrophorese zu erleichtern. Die Spezies können an der Lauflänge, die sich aus der Länge der Amplifikate ergibt, unterschieden werden. Da noch unklar ist, ob diese Herangehensweise für beide Komplexe in einem gemeinsamen Ansatz realisierbar ist, wird zunächst von einer Multiplex-PCR pro Komplex ausgegangen.



Abb. 38: Modelldarstellung einer Multiplex-PCR

Die speziespezifischen Primer müssen auf ihre Spezifität getestet werden. Sie dürfen nur mit homologer, nicht aber mit heterologer DNA hybridisieren.

Ebensowenig darf es zu intermolekularen Hybridisierungen (Primer-Dimer-Bildung) oder zu intramolekularen Hybridisierung (Loop-Bildung) kommen. Die entwickelten Primer und PCR-Tests sollen deshalb in Blindversuchen an morphologisch vorbestimmtem frischem Freilandmaterial evaluiert und optimiert werden.

Für die nicht zu den *C. obsoletus*- und *C. pulicaris*-Komplexen gehörenden *Culicoides*-Arten sollen ebenfalls speziesspezifische Primer konstruiert werden, die (zusammen mit den Primern der Komplexarten) in einer Real-Time Multiplex-PCR zur Artidentifizierung Anwendung finden können. Mit einer Real-Time-PCR kann die Quantität der amplifizierten Matrize direkt abgelesen werden (Freeman et al. 1999). Zu diesem Zweck werden Fluorophore (fluoreszierende Moleküle), welche endständig an sequenzspezifische Oligonukleotide gekoppelt sind, als Detektionshilfsmittel für die Amplifikationsmenge eingesetzt. Die Fluoreszenz wird während des PCR-Zyklus gemessen. Sie nimmt proportional zur Menge der PCR-Produkte zu. Mit einer solchen Kopplung von qualitativer und quantitativer Erfassung der Proben könnte eine morphologische Vorbestimmung des Materials entfallen. Für beide PCR-Verfahren wird getestet, ob eine herkömmliche DNA-Extraktion zur Amplifikation der speziesspezifischen DNA-Fragmente erforderlich ist oder ob ein zeit- und arbeitssparendes grobes Zerkleinern der Gnitzen mit anschließendem kurzem Aufkochen, möglicherweise einer zusätzlichen Inkubation mit Proteinase, ausreicht.

Die im Rahmen der Entwicklung der PCR-Tests gewonnenen COI- und ITS2-Sequenzdaten sollen außerdem für phylogenetische Untersuchungen innerhalb der Gattung *Culicoides* genutzt werden. Die Verwandtschaftsverhältnisse sollen analysiert und auf der Grundlage der DNA-Sequenzen phylogenetische Stammbäume erstellt werden. Die phylogenetische Analyse wird mit Hilfe spezieller Computerprogramme (z.B. CodonCodeAligner, SeqScanner etc.) erfolgen. Die morphologische Bestimmung dient als Standard für die Spezifität der zu konstruierenden Primer.

4.4.4.1 Material für die Multiplex-Methode

Von den im Zuge des entomologischen Monitorings gesammelten und bis zum Artniveau bestimmten Gnitzen wurden bisher folgende 31 *Culicoides*-Spezies molekularbiologisch bearbeitet:

<i>C. chiopterus</i>	}	<i>C. obsoletus</i> Gruppe
<i>C. obsoletus</i> s.s.		
<i>C. scoticus</i>		

C. dewulfi

<i>C. fagineus</i>	}	<i>C. pulicaris</i> Gruppe
<i>C. grisescens</i>		
<i>C. impunctatus</i>		
<i>C. lupicaris (=delta)</i>		
<i>C. newsteadi</i>		
<i>C. pulicaris</i> s.s.		
<i>C. punctatus</i>		

C. achrayi
C. albicans
C. brunnicans
C. circumscriptus
C. clastrieri
C. fasciipennis
C. festivipennis
C. fuscillatus
C. griseidorsum
C. halophilus
C. maritimus
C. pictipennis
C. puncticollis
C. poperinghensis
C. riethi
C. salinarius
C. simulator
C. stigma
C. truncorum
C. vexans

Aus den einzelnen Individuen jeder Art wurde die DNA entweder mittels des DNeasy Blood & Tissue Kits von Qiagen (Supplementary Protocol: Purification of total DNA from insects using disposable microtube pestles) oder des innuPREP DNA Mini Kits von Analytik Jena (Protocol 1: DNA isolation from tissue samples) extrahiert. Vor der Homogenisierung der Gnitzen wurden Kopf und Flügel sowie bei Männchen die Genitalien zur Aufbewahrung abpräpariert, um eine später eventuell notwendige morphologische Überprüfung zu ermöglichen.

4.4.4.2 Primer für COI- und ITS2 Region

Für die Amplifikation der COI- bzw. ITS2-Region wurden zunächst folgende konservierte Primer benutzt:

COI-Region (nach Dallas et al. 2003):

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

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

(Amplifikatlänge ca. 523 bp)

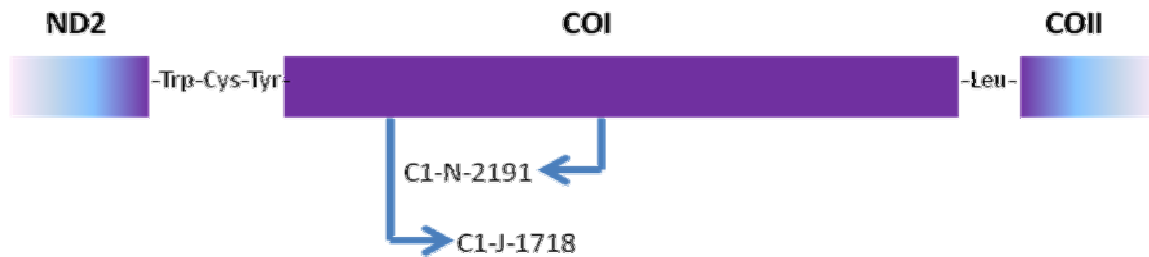


Abb. 39: Position der Dallas-Primer in der COI-Region

ITS2-Region (nach Gomulski et al. 2006):

5,8SF: 5'-GATGAAGACCGCAGCAAAC-3'

28SR: 5'-ATTTGGGGGTAGTCACACAT-3'

(Amplifikatlänge je nach Spezies zwischen ca. 390 und 440 bp)

Ein Reaktionsansatz setzte sich in der Regel folgendermaßen zusammen:

Template DNA	1-5µl (abhängig vom Elutionsvolumen der extrahierten DNA)
10x Puffer	5µl
Forward-Primer (10µM)	2µl
Reverse-Primer (10µM)	2µl
dNTP Mix (10mM)	1µl
MgCl ₂ (25mM)	1µl
Taq-Polymerase (5U/µl)	0,25µl
Aqua bidest. ad	50µl

4.5 Virusdiagnostik bei Einzelindividuen

4.5.1 Gnitzenlagerung und Gnitzenvereinzelnung

Von allen Gnitzen die im Rahmen des entomologischen Monitorings 2007/2008 zur Untersuchung auf BTV-Genom an das NRL-BT verbracht wurden, wurden Rückstellproben aufbewahrt. Diese Restproben machen etwa 2-3 % der eingesandten Gesamtgnitzen aus. Die Lagerung dieser Gnitzen erfolgte in 70%igen Ethanol bei 4 °C.

Für die Untersuchung von Einzelgnitzen wurden diese in 2ml Eppendorfgefäße separiert und bis zur weiteren Bearbeitung in 70%igen Ethanol gelagert.

4.5.2 Homogenisierung und Nukleinsäureextraktion

Nach Entfernen des Ethanols wurde zu jeder Gnitze im 2 ml Eppendorf-Gefäß Lysispuffer sowie 3 Stahlkugeln (Durchmesser 3mm) gegeben. Die Homogenisierung der Gnitzen erfolgte am TissueLyser (Qiagen) bei 30 Hz für 2 Minuten. Nach kurzen Abzentrifugieren erfolgte die weitere Nukleinsäureextraktion mittels Virus 96 Kit (Macherey-Nagel) auf einer automatisierten Plattform (Hamilton Starlet) oder durch gleichwertige Verfahren.

4.5.3 Real-time PCR Assays

Zum Nachweis des BTV-Genoms in den Einzelgnitzen wurde eine etablierte Pan-BTV-real-time RT-PCR verwendet (Toussiant et al., 2007), die auch durch das CRL-BT empfohlen wird. Zum Nachweis der erfolgreichen Extraktion und Amplifikation wurde eine interne Kontrolle (IC) im Duplex-Assay co-amplifiziert. Bei dieser Pan-Culicoides-IC handelt es sich um ein Fragment der ITS1 und ITS2 –Region (rDNA internal transcribed spacer 1 and 2). Nähere Informationen zu dieser duplex real-time RT-PCR finden sich bei Hoffmann et al. (2009).

4.5.4 Genetische Identifikation und Sequenzierung

Die genetische Identifikation der Einzelgnitzen erfolgte über die Sequenzierung des Pan-Culicoides-IC-Fragments. Dazu wurde das Fragment 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) als Template eingesetzt und mittels SigmaSpin Post-reaction clean-up columns 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.

4.5.5 Auswahl der zu analysierenden Gnitzenproben

Auffallend bei der Analyse von Poolproben im Rahmen des entomologischen Monitorings 2007/2008 (Hoffmann et al., 2009) waren die doch teilweise deutlichen Unterschiede in der BTV-Genom-Prävalenz in Abhängigkeit von dem Zeitpunkt des Gnitzenfanges und der Lokalisation der verwendeten Fallen. In Fallen, die in östlichen und nördlichen Gebieten der Bundesrepublik platziert wurden, konnte nur sehr selten ein positiver BTV-Nachweis geführt werden. Gleiches galt für die Fänge im Frühjahr/Sommer und ab Dezember 2007 (vgl. Abb. 40). Die meisten positiven BTV-Nachweise konnten in einer Einsendung von Gnitzen aus Rheinland-Pfalz im Oktober 2007 festgestellt werden (BH306/07). Hier waren fast 18% aller untersuchten Gnitzen-Pools BTV-8 positiv. Darüber hinaus konnten in dieser Einsendung auch viele BTV-positiven Pools identifiziert werden, welche eine deutliche BT-Virusgenomlast aufwiesen (vgl. Abb. 41).

Von 45 Gnitzenpools die einen CT-Wert kleiner als 30 aufwiesen (hohe bis mittlere Virusgenomlast), waren 24 Gnitzenpools der Einsendung BH306/07 zu zuordnen. Gleichzeitig kann festgestellt werden, dass dieser Gnitzen-Fang zu einem Zeitpunkt und in einer Region durchgeführt wurde, in dem die Blauzungenkrankheit massiv aufgetreten ist und sich ausgebreitet hat. Somit decken sich klinische und epidemiologische Daten des BTV-Ausbruches in diesem Gebiet mit den Ergebnissen der BTV-PCR-Untersuchungen der gesammelten Gnitzen. Basierend auf diesen Daten wurde entschieden, für die Untersuchung von Einzelgnitzen die Restbestände der Einsendung BH306/07 zu verwenden. Die Einsendung zur Virusdiagnostik umfasste ca. 80 000 Gnitzen, von denen ca. 97-98% im Rahmen der Studien des entomologischen Monitorings 2007/2008 auf BTV mittels Pool-PCR untersucht wurden. Die restlichen ca. 2500 Gnitzen dienten als Rückhalte und wurden einzeln analysiert.

5 Ergebnisse

5.1 Anmerkungen/ Ergänzungen Probennahme

Die Bearbeitung der Probenfläche in NRW konnte nur in sehr begrenztem Umfang durchgeführt werden. Zur Absicherung und weiteren Probengewinnung wurden daher in NRW zwei zusätzliche Fallen des Typs BG-Sentinel-UV-Lichtfalle (Fa. Biogents GmbH, Regensburg) aufgestellt, die bei der vorliegenden Auswertung Berücksichtigung finden. Die Fallenleerung erfolgte täglich über den gesamten Beprobungszeitraum des Entomologischen Monitorings.

- NRW: Schafherde, Inh. Sabine Menzer, Büchel 3, 53797 Lohmar.
- NRW: Kuhherde, Inh. Peter Bonn, Bachstr. 136, 52355 Birgel/ Düren.

Ergänzende Daten wurden während des Entomologischen Monitorings und während der Projektlaufzeit des vorliegenden Forschungsvorhabens in den restlichen Bundesländern wie folgt erhoben:

- TH: NSG Vessertal, Museum Gotha
- TH: Kuhherde, Ilmtal, Museum Gotha
- BRB: Kuhherde, Fam. Abromeit, Kiehnwerder, 15324 Letschin
- BRB: Kuhherde, Fam. Schulz, Güstebieser Loose, 16259 Neulewin
- BRB: Kuhherde, Fam. Hendrichs, 14641 Paulinenaue
- Sachsen: Schafherde, Fam. Weisbach, 01445 Radebeul
- Sachsen: Kuhherde, Fam. Weisbach, 01877 Rammenau
- MV: Kuhherde, Fam Kröher, Am Sandberg 24, 18519 Sundhagen-Horst

5.2 Fallendaten/ geografische Koordinaten

In den Tabelle 3 und 4 sind die Koordinaten der Fallenstandorte aus dem Entomologischen Monitoring und aus den zusätzlichen Erfassungsgebieten gelistet. Sie stellen nach abschließender Bearbeitung aller Proben die Grundlage für die Erstellung der Verbreitungskarten in der hierfür geplanten Publikation.

GRUPPE	TRAP_CODE	Gaus-Krüger 3.Streifen		Dezimalkoordinaten		Grad Minuten Sekunden	
		Rechtswert	Hochwert	X_Wert	Y_Wert	Länge/Longitude	Breite/Latitude
1	NRW KLE	3317040	5733615	6,3519444	51,7069444	06° 21' 07" E	51° 42' 25" N
1	NRW ME	3352230	5679980	6,8830556	51,2355556	06° 52' 59" E	51° 14' 08" N
1	NRW VIE	3312231	5691807	6,3047222	51,3300000	06° 18' 17" E	51° 19' 48" N
1	NRW WES	3343159	5725652	6,7330556	51,6433333	06° 43' 59" E	51° 38' 36" N
1	NRW AC	3300857	5630264	6,1755556	50,7736111	06° 10' 32" E	50° 46' 25" N
1	NRW BM	3325021	5653492	6,5066667	50,9900000	06° 30' 24" E	50° 59' 24" N
1	NRW HS	3304250	5653091	6,2113889	50,9797222	06° 12' 41" E	50° 58' 47" N
1	NRW GL	3362154	5664212	7,0311111	51,0963889	07° 01' 52" E	51° 05' 47" N
1	NRW SU	3367767	5609803	7,1308333	50,6088889	07° 07' 51" E	50° 36' 32" N
1	NRW BOR	3341680	5744102	6,7033333	51,8086111	06° 42' 12" E	51° 48' 31" N
1	NRW COE	3369899	5749322	7,1102778	51,8627778	07° 06' 37" E	51° 51' 46" N
1	NRW ST	3414081	5777307	7,7444444	52,1227778	07° 44' 40" E	52° 07' 22" N
1	NRW WAF	3431790	5753168	8,0077778	51,9083333	08° 00' 28" E	51° 54' 30" N
1	NRW HX	3501952	5736014	9,0272222	51,7583333	09° 01' 38" E	51° 45' 30" N
1	NRW MI	3495374	5798110	8,9311111	52,3163889	08° 55' 52" E	52° 18' 59" N
1	NRW HSK	3478744	5694583	8,6936111	51,3855556	08° 41' 37" E	51° 23' 08" N
1	NRW MK	3395534	5668775	7,5061111	51,1444444	07° 30' 22" E	51° 08' 40" N
1	NRW SI	3447613	5653116	8,2525000	51,0108333	08° 15' 09" E	51° 00' 39" N
2	ST WB	3757167	5749904	12,7295000	51,8240000	12° 43' 46" E	51° 49' 26" N
2	ST BTF	3743556	5725470	12,5154000	51,6109000	12° 30' 55" E	51° 36' 39" N
2	NI OHA	3612830	5720867	10,6278000	51,6109000	10° 37' 40" E	51° 36' 39" N
2	NI NI	3517285	5813384	9,2532000	52,4534000	09° 15' 12" E	52° 27' 12" N
2	NI SFA	3527091	5845967	9,4001000	52,7458000	09° 24' 00" E	52° 44' 45" N
2	NI ROW	3505287	5899679	9,0781000	53,2291000	09° 04' 41" E	53° 13' 45" N
2	NI PE	3585482	5805538	10,2542000	52,3765000	10° 15' 15" E	52° 22' 35" N
2	NI WOB	3617261	5805323	10,7206000	52,3687000	10° 43' 14" E	52° 22' 07" N
2	ST OK	3639368	5814072	11,0486000	52,4421000	11° 02' 55" E	52° 26' 32" N
2	NI UE	3615199	5857832	10,7086000	52,8408000	10° 42' 31" E	52° 50' 27" N
2	ST SDLA	3688456	5868608	11,8009000	52,9169000	11° 48' 03" E	52° 55' 01" N
2	ST SDLB	3686618	5869996	11,7744000	52,9300000	11° 46' 28" E	52° 55' 48" N
2	BB PR	3662165	5888917	11,4206000	53,1078000	11° 25' 14" E	53° 06' 28" N
2	NI LG	3642029	5896731	11,1236000	53,1837000	11° 07' 25" E	53° 11' 01" N
2	MV LWL	3662066	5917218	11,4335000	53,3619000	11° 26' 01" E	53° 21' 43" N
3	NI HI	3556363	5790546	9,8241667	52,2455556	09° 49' 27" E	52° 14' 44" N
3	NI H	3552816	5786952	9,7716667	52,2136111	09° 46' 18" E	52° 12' 49" N
3	NI CE	3571559	5824625	10,0538889	52,5500000	10° 03' 14" E	52° 32' 60" N
3	NI SHG	3503769	5793844	9,0541667	52,2780556	09° 03' 15" E	52° 16' 41" N
4	HE KB	3501991	5699230	9,0275861	51,4277139	09° 01' 39" E	51° 25' 39" N
4	HE KS	3526078	5694016	9,3735167	51,3802528	09° 22' 24" E	51° 22' 48" N
4	HE HR	3550629	5667209	9,7223306	51,1376611	09° 43' 20" E	51° 08' 15" N
4	HE FD	3544368	5601236	9,6249139	50,5451806	09° 37' 29" E	50° 32' 42" N
4	HE LM	3455241	5584917	8,3694472	50,3984472	08° 22' 10" E	50° 23' 54" N
4	HE GI	3491888	5599694	8,8845444	50,5329417	08° 53' 04" E	50° 31' 58" N
4	HE RÜD	3427546	5564942	7,9838222	50,2161444	07° 59' 01" E	50° 12' 58" N
4	HE DA	3471008	5516599	8,5963861	49,7852556	08° 35' 46" E	49° 47' 06" N
4	HE ERB	3502828	5501291	9,0381250	49,6483139	09° 02' 17" E	49° 38' 53" N
4	HE FB	3482385	5562067	8,7522750	50,1944722	08° 45' 08" E	50° 11' 40" N
5	NI AUR	3383864	5921047	7,2524920	53,4083490	07° 15' 09" E	53° 24' 30" N
5	NI WST	3426983	5888043	7,9083220	53,1195740	07° 54' 30" E	53° 07' 10" N
		Gaus-Krüger 3.Streifen		Dezimalkoordinaten		Grad Minuten Sekunden	

GRUPPE	TRAP_CODE	Rechtswert	Hochwert	X_Wert	Y_Wert	Länge/Longitude	Breite/Latitude
5	NI BRA	3467640	5892057	8,5151490	53,1596570	08° 30' 55" E	53° 09' 35" N
5	NI NOH	3382553	5796195	7,2777550	52,2866500	07° 16' 40" E	52° 17' 12" N
5	NI CLP	3418741	5840697	7,7970800	52,6930260	07° 47' 49" E	52° 41' 35" N
5	NI DH	3490698	5838129	8,8614150	52,6759650	08° 51' 41" E	52° 40' 33" N
5	NI VEC	3451603	5827687	8,2849760	52,5800550	08° 17' 06" E	52° 34' 48" N
5	NI OS	3442708	5771713	8,1633060	52,0762140	08° 09' 48" E	52° 04' 34" N
5	NI OHZ	3492335	5902109	8,8840980	53,2509080	08° 53' 03" E	53° 15' 03" N
5	NI CUX	3472384	5957838	8,5802910	53,7509620	08° 34' 49" E	53° 45' 03" N
5	NI STD	3522899	5951627	9,3456040	53,6953890	09° 20' 44" E	53° 41' 43" N
5	NI EL	3381766	5882821	7,2351360	53,0645690	07° 14' 06" E	53° 03' 52" N
5	HB HB	3466878	5898711	8,5030670	53,2193980	08° 30' 11" E	53° 13' 10" N
5	HH HH	3581526	5924320	10,2259120	53,4442400	10° 13' 33" E	53° 26' 39" N
5	SH OD	3591168	5949120	10,3782060	53,6654270	10° 22' 42" E	53° 39' 56" N
5	SH IZ	3540376	5962922	9,6116540	53,7958090	09° 36' 42" E	53° 47' 45" N
6	BW HD	3472512	5488827	8,6192167	49,5356333	08° 37' 09" E	49° 32' 08" N
6	BW OG	3426025	5393015	7,9946000	48,6703500	07° 59' 40" E	48° 40' 13" N
6	BW WN	3546071	5424058	9,6280000	48,9521667	09° 37' 40" E	48° 57' 07" N
6	BW LB	3505519	5412905	9,0741833	48,8535667	09° 04' 27" E	48° 51' 12" N
6	BW BL	3498563	5359570	8,9795833	48,3739667	08° 58' 46" E	48° 22' 26" N
6	BY AB	3506460	5531966	9,0889333	49,9240833	09° 05' 20" E	49° 55' 26" N
6	BY WÜ	3554283	5508929	9,7516500	49,7145500	09° 45' 05" E	49° 42' 52" N
6	BY NES	3604764	5573864	10,4691333	50,2915000	10° 28' 08" E	50° 17' 29" N
6	BY SW	3588636	5532917	10,2333667	49,9261000	10° 14' 00" E	49° 55' 33" N
7	RPDÜW	3434638	5486669	8,0963889	49,5133333	08° 05' 47" E	49° 30' 48" N
7	RPTR	3330022	5498544	6,6475000	49,5997222	06° 38' 51" E	49° 35' 59" N
7	RPAK	3403325	5621268	7,6300000	50,7188889	07° 37' 48" E	50° 43' 08" N
7	RPKUS	3395770	5497441	7,5569444	49,6047222	07° 33' 25" E	49° 36' 17" N
7	RPGER	3450127	5441985	8,3158333	49,1130556	08° 18' 57" E	49° 06' 47" N
7	RPDAUN	3327880	5569859	6,5861111	50,2397222	06° 35' 10" E	50° 14' 23" N
7	RPRHK	3403582	5541089	7,6541667	49,9983333	07° 39' 15" E	49° 59' 54" N
7	RPMYK	3385901	5573180	7,3980556	50,2836111	07° 23' 53" E	50° 17' 01" N
7	RPAW	3357467	5603611	6,9877778	50,5508333	06° 59' 16" E	50° 33' 03" N
7	RPAZ	3457457	5515517	8,4083333	49,7747222	08° 24' 30" E	49° 46' 29" N
7	SLMW	3332980	5487537	6,6930556	49,5016667	06° 41' 35" E	49° 30' 06" N
7	SLWEN	3356842	5498389	7,0183333	49,6052778	07° 01' 06" E	49° 36' 19" N
8	TH EIF	3583174	5695421	10,1938000	51,3874000	10° 11' 38" E	51° 23' 15" N
8	TH UHK	3602577	5677489	10,4673000	51,2231000	10° 28' 02" E	51° 13' 23" N
8	TH WBK	3584315	5611908	10,1908000	50,6367000	10° 11' 27" E	50° 38' 12" N
8	TH KHK	3614910	5687233	10,6469000	51,3083000	10° 38' 49" E	51° 18' 30" N
8	TH SD	3650572	5665291	11,1488000	51,1029000	11° 08' 56" E	51° 06' 10" N

Tabelle 3: Koordinaten der Fallen des Entomologischen Monitorings (BRB – Brandenburg, BW – Bayern, BW – Baden-Württemberg, MV – Mecklenburg-Vorpommern, HH – Hansestadt Hamburg, HB – Hansestadt Bremen, HE – Hessen, RP – Rheinland-Pfalz, SH – Schleswig Holstein, ST – Sachsen-Anhalt)

GRUPPE	Falle	Gaus-Krüger 3.Streifen		Dezimalkoordinaten		Grad Minuten Sekunden	
		Rechtswert	Hochwert	X_Wert	Y_Wert	Länge/Longitude	Breite/Latitude
A	NRW I	3379457	5639587	7,2869444	50,8802778	07° 17' 13" E	50° 52' 49" N
B	NRW II	3319389	5628121	6,4397222	50,7616667	06° 26' 23" E	50° 45' 42" N
C	Thüringen I	3627775	5608643	10,8050540	50,6006730	10° 48' 18" E	50° 36' 02" N
D	Thüringen II	3644081	5625847	11,0419460	50,7514450	11° 02' 31" E	50° 45' 05" N
E	BRB I KW	3858727	5846158	14,3007660	52,6309790	14° 18' 03" E	52° 37' 52" N
F	BRB II GB	3857897	5860559	14,3041990	52,7603990	14° 18' 15" E	52° 45' 37" N
G	BRB III PA	3750263	5844066	12,7008820	52,6730510	12° 42' 03" E	52° 40' 23" N
H	Sachsen I RB	3825425	5672847	13,6474230	51,0994260	13° 38' 51" E	51° 05' 58" N
I	Sachsen II RA	3859133	5681347	14,1352840	51,1554470	14° 08' 07" E	51° 09' 20" N
K	MV I	3774507	6007473	13,2004810	54,1259340	13° 12' 02" E	54° 07' 33" N

Tabelle 4: Koordinaten der Fallen der zusätzlichen Beprobungsgebiete

5.3 Probleme in der Taxonomische Terminologie

Die Charakterisierung der Arten oder die Vielfalt der Arten (Biodiversität) innerhalb eines Prozesses, Lebensraumes oder geographischen Gebietes scheint unabdingbar. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind über eine Million Insekten formell beschrieben, die mehr oder weniger gut in einem taxonomischen Kontext und phylogenetischem System angeordnet sind. Die Variabilität innerhalb der Morphologie und der Verhaltensbiologie ist besonders bei blutsaugenden Insekten als Schwierigkeit erkannt worden und die Handhabung dieses Phänomens konfrontiert Taxonomen verschiedenster Gruppen mit unterschiedlichsten Problemen. Für die Kommunikation auf angewandter Ebene ist es daher von enormer Bedeutung aus jedem Ordnungssystem die gegebene Informationen zurück zu gewinnen und nachvollziehen zu können. Aus diesem Grund werden bestimmte Zielorganismen oftmals gruppiert.

Die Taxonomie ist eine Theorie, eine Methode oder ein Messinstrument, um Objekte eines gewissen Bereichs zu bestimmten oder nach ausgewählten Kriterien zu klassifizieren, d.h. sie in bestimmte Kategorien oder Klassen (Taxa) einzuordnen. In der Zoologie wird die Taxonomie im Allgemeinen für die Beschreibung, die Namensvergabe und Klassifikation von Organismen in der hierarchische Klassifikation verwendet.

Im vorliegenden Abschlußbericht zum durchgeführten Projekt kann nicht die umfassende taxonomische Theorie für eine Einarbeitung die momentan gültige Klassifikation der Gnitzen wiedergegeben werden, jedoch sollen kurz die wichtigsten Punkte dargelegt werden, die besonders in Europa Schwierigkeiten in der Bearbeitung verursachen.

Das Wissen um die taxonomischen und morphologischen Zusammenhänge ist u.a. von der allgemeinen Kenntnis über das biologische und ökologische Wissen der Ceratopogonidae abhängig. Aufgrund ihrer human-, veterinärmedizinischen und ökonomischen Bedeutung wurden weltweit intensive Studien an dieser Familie durchgeführt, so dass man auf ein gutes Grundlagenwissen jedoch auch z.B. aufgrund der Schwierigkeiten in der Bestimmbarkeit über eine ungeheure Menge an Veröffentlichungen verfügt, die einer gründlichen Prüfung bedürfen. In der von Borkent (2009) veröffentlichten Übersicht der Ceratopogoniden der Welt sind mehr als 5800 Arten gelistet, von denen zahlreiche Arten in ihrer Identität und Synonymie noch zu prüfen sind. Die bisherige Differenzierung der Arten geht fast ausschließlich auf die Methoden der klassischen Taxonomie zurück, die strukturelle d.h. morphologische Besonderheiten zur Abgrenzung der Arten benutzt.

Vertreter der Gattung *Culicoides* innerhalb der Gnitzen (Diptera: Ceratopogonidae) sind Vektoren bedeutender Krankheiten, die Wild- und Haustiere betreffen. Die Arbeit mit Vektoren setzt eine klare Identifizierung auf Artniveau voraus.

5.3.1 Nomenklatur

Die Nomenklatur ist die Komponente in der Taxonomie, die nicht wissenschaftlich ist, jedoch eine wesentliche Grundlage für die Arbeit mit den Vektoren mit wissenschaftlichen Namen und deren Vergleichbarkeit.

Die Klassifizierung der Arten der Gattung *Culicoides* ist problematisch. Die Zuordnung der Arten und Untergattungen ist unzufriedenstellend, da vor allem zahlreiche Arten inkorrekt platziert sind. Die jüngste Diskussion in dieser Hinsicht ist bspw. die Einordnung von *C. dewulfi* (Meiswinkel 2004). Als Resultat dieses Zustandes bevorzugen zahlreiche Autoren die Bezeichnung von Artengruppen in ihrem Wissenschaftsgebiet.

Die Arten der Untergattung *Avaritia* Fox, für die *C. obsoletus* (Meigen) als Untergenotype, and die der Untergattung *Culicoides* Latreille, für die *C. pulicaris* (Linnaeus) als Untergenotyp designiert wurde, variieren stark und sind ausschließlich aufgrund ihrer morphologischen Ähnlichkeiten gruppiert worden. Die Interpretation der Verwandtschaftsverhältnisse ist umstritten. Das generelle Problem dieser Gruppierungen ist bekannt, die Benutzung von Untergattungen fraglich und eine Lösung nicht absehbar. Trotzdem muss eine Plattform geschaffen werden, mit deren Hilfe eine Kommunikation zwischen den Wissenschaftsbereichen möglich ist. Die Tendenz, Artengruppen oder Untergruppen oder Artenkomplexen zu benennen, erfolgt oftmals ohne einen Bezug zur Untergattung und verstärkt dadurch die Verwirrung innerhalb der Taxonomie der Gattung *Culicoides* (Campbell & Pelhem-Clinton 1960, Glick 1990, Itoua & Cornet 1986, Jamnback & Wirth 1963, Khamala & Kettle 1971; Mellor 2004, Meiswinkel 2004).

Bedauerlicherweise werden taxonomische Gesichtspunkte bezüglich der Gattung in Routineuntersuchungen nicht berücksichtigt. Für die Bestimmung des Material wird aus Zeitgründen auf die Präparation der Mücken im Dauerpräparat verzichtet und nur eine grobe Zuordnung des Materials anhand der Flügelmuster vorgenommen. Die meisten Europäischen Arbeitsgruppen benutzen den Terminus *Culicoides obsoletus* Gruppe und *C. pulicaris* Gruppe und setzen diese fälschlicherweise der Untergattung *Avaritia* und *Culicoides* gleich. Natürlich ist diese Herangehensweise aus taxonomischer Sicht nicht korrekt, auch wenn die Untergattung *Culicoides* eine eindeutige paraphyletische Untergattung darstellt (Perrin et al. 2006), die einige Artenkomplexe beherrbergt. Die taxonomische Bearbeitung der Untergattungen *Avaritia*, *Monoculicoides* und *Silvaticulicoides* wird durch sehr limitierte Studien representiert, jedoch scheinen diese Gruppen monophyletisch zu sein (Perrin et al. 2006).

Ebenso findet man in der Literatur beschriebene Arten der Untergattung *Avaritia*, die als *C. obsoletus* Gruppe (Kremer 1965; Liu et al. 1993) oder *C. chiopterus* Gruppe (Khalaf 1954) zusammengefasst werden. Eine vergleichbare Situation ist für die *C. pulicaris* Gruppe, welche eindeutig eine klare und sinnvolle Zusammenfassung aller "Untergruppen" (*C. pulicaris* Gruppe, *C. impunctatus* Gruppe und *C. grisescens* Gruppe) innerhalb der Gattung *Culicoides* darstellt.

Die inkorrekte Benutzung der Artenbezeichnung z.B. für *C. obsoletus* (Mehlhorn et al. 2007, Mellor 2004), für *C. scoticus* und für *C. dewulfi* (Liebisch & Liebisch 2007) sowie für *C. pulicaris* (Mellor 2004, Liebisch et al. 2008, Kiehl et al. 2009) lässt die Determination der Arten und ihre Zuordnung in Artenkomplexe mehr oder weniger fraglich erscheinen. Sie erschwert die weitere Arbeit der Nutzer. Bowman (2005) beschreibt dieses Phänomen als "lumping" – eine Tendenz, weniger taxonomische Aufteilungen zu haben. Es wird als ein Tool frei verfügbarer internationaler politischer Instrumente angesehen, der in fast allen verfügbaren Artenlisten erscheint oder wenn ein Taxon als Indikatororganismus mit Umwelteinfluss oder ökonomischer Bedeutung erkannt wird.

Bei all diesen Betrachtungen ist es keine Frage, die Männchen zu determinieren. Ihre Zuordnung ist völlig unumstritten. Die minimale Anzahl der morphologischen Merkmale sowie die intra- und interspezifische Variation verhindert die korrekte Zuordnung der Weibchen z.B. des *Obsoletus* Komplexes in den meisten Fällen.

5.3.2 Taxonomische Merkmale

Morphologie: Für die Beschreibung der Arten bedient man sich der Beurteilung morphologischer Strukturen zur Abgrenzung von anderen Arten anhand klar definierter Unterschiede. Grenzen sind durch Mikrostrukturen gegeben.

Werkzeuge hierfür sind genadelte, konservierte oder präparierte Exemplare aus musealen Sammlungen und Aufsammlungen. Ökologische und geografische Details sowie Faunenstrukturen können zur Abgrenzung ebenfalls hilfreiche Hinweise liefern.

Wie für viele andere Gruppen von Dipteren ist auch für Gnitzen, insbesondere innerhalb der Gattung *Culicoides* und der Unterfamilie Forcipomyiinae, die Ausbildung von Komplexarten oder Zwillingarten charakteristisch. Solche isomorphen Arten sind nur unter Einbindung zytotaxonomischer, biochemischer oder molekularbiologischer Techniken trennbar. Es ist allgemein akzeptiert, dass sie nach der klassischen Definition Arten sind, die sich hinsichtlich ihrer Charakteristika, wie Einnischung ins Ökosystem, Wirtsspezifität, Pathogenität und Vektoreigenschaften unterscheiden können. Aus diesem Grund erlangt die Einbindung „moderner“ Differenzierungsmethoden immer umfangreichere Bedeutung.

Zytotaxonomie: Im Gegensatz zu anderen Dipterenfamilien, in denen man neben der morphologischen Betrachtung auch die Beurteilung der Riesenchromosomen für die Beschreibung und Abgrenzung der Arten benutzen kann, indem man die Bandmuster vergleicht und fixierte Inversionen im Zusammenhang morphologischer Merkmale beschreibt, kann man innerhalb der Familie Ceratiopogonidae diese Methode nicht benutzen.

Molekularbiologie: Molekularbiologische Studien innerhalb *Imicola* Komplexes (Sebastiani et al. 2001; Linton et al. 2002) können benutzt werden, um den Status der validen Arten mit guten morphologischen Merkmalen abzusichern. Der Vorteil dieser Methode liegt in der Möglichkeit, Bestimmungsschlüssel die morphologisch und/ oder molekularbiologisch benutzbar sind, zur Verfügung zu stellen. Die Nutzung dieser Bestimmungswerke von Nicht-Taxonomen ist ein ungeheurer Vorteil, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus verschiedenen Forschungsansätzen zu

gewährleisten. Im Gegensatz zum Imicola Komplex können die Arten des Obsoletus Komplexes und des Pulicaris Komplexes bisher noch nicht auf die gleiche Weise aufgearbeitet und Bestimmungsschlüssel zur Verfügung gestellt werden.

5.3.3 Internationale Aktivitäten/ Medreonet

Im Rahmen von Medreonet, einer von der EU gegründeten Koordinationsgemeinschaft zur Erfassung von Culicoides-übertragenen Infektionskrankheiten wie Blauzungenkrankheit (Bluetongue), Afrikanische Pferdesterbe (African Horse Sickness) und Epizootische Hamorrhagie der Hirsche (Epizootic Haemorrhagic Disease), wurde die Problematik der aktuellen taxonomischen Lage mit den Partner des Programmes diskutiert.

5.3.3.1 Teilnehmer Medreonet

Durch den wissenschaftlichen Austausch mit den Projektpartnern wurde die Erstellung einer Arbeit möglich, die die aktuelle taxonomische Situation widerspiegelt und durch eine Empfehlung zur einheitlichen Nutzung der taxonomischen Termini eine Grundlage zur Verfügung stellen wird, den Wissenschaftsaustausch zu verbessern. Die Richtlinien wurden in Abstimmung mit folgenden Spezialisten zusammengestellt:

- Algeria: Mouloud Djerbal (INMV-Tizi Ouz)
- Austria: Peter Sehnal (Natural History Museum Vienna)
- Belgium: Gill De Deken, Redgi De Deken (Prince Leopold Institute of Tropical Medicine, Department of Animal Health)
- Bulgaria: Georgi Georgiev (NVDRI, Sofia)
- Danmark: Rene Bødger, Carsten Kirkeby (DTU,)
- France: Thomas Balenghien, Claire Garros, Catherine Cêtre-Sossah, Hélène Guis (CIRAD, Montpellier);
Jean-Claude Delécolle, Bruno Mathieu (Université Strasbourg);
- Germany : Helge Kampen (Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health);
Doreen Werner (Senckenberg Deutsches Entomologisches Institut)
- Greece: Michael Papatakis (CVAI, Athens, Greece)
- Italy: Maria Goffredo, Armando Giovannini (IZS), Carla Ippoliti (IZSA)
- Morocco: Youssef Lhor (IAV)
- Netherland: Piet Van Rijn (... , Lelystad)
- Portugal: Isabel Fonseca, Rita Amador (DGV), Filipa Baptista, Fernando Boinas (FMV),
- Spain: Miguel Miranda, Nonito Pagès, Javier Lucientes; Jordi Casal (CreSa), Sarto i Monteys
- Switzerland: Francis Schaffner (University of Zurich)
- Turkey: Nahit Yazicioglu; Sirin G. Cizmeci (ECVC), Arife Ertürk (CVCRI)
- Tunesia: Soufien Sgahier; Salah Hammami (IRVT)
- UK: Simon Carpenter, Eric Denison, Anthony Wilson, Philip Mellor (IAH, Pirbright),
Matthew Baylis, Georgette Kluiters (Liverpool)

5.3.3.2 Ergebnisse Taxonomie Medreonet

Die Ergebnisse der taxonomischen Bearbeitung/ Richtlinien/ Beschlüsse werden in folgender Arbeit zusammen gefasst und die Veröffentlichung dieser ist wie folgt in Vorbereitung:

Werner, D.; Delécolle, J.-C., Garros, C.; Mathieu, B.; Miranda, M.A.; Schaffner, F.; Venter, G.; Kampen, H.: Taxonomic problems in Culicoides research – considerations and recommendations by an EU bluetongue vector expert group. – Zootaxa. In Prep.

5.3.4 Übersicht nomenklatorische Termini

Die folgende Übersicht präsentiert einen aktuellen Arbeitsstatus (Stand: Mai 2010, Medreonet Meeting Tunis, Ziel der Drucklegung: 2010)

Unter-gattung	Artenkomplex	Artengruppe	Arten	Zoogeo-graphische Region	Mittel-meer-raum	Mittel-europa	BTV Aufnahme-Möglichkeit
<i>Avaritia</i> Fox, 1955	Chiopterus	Obsoletus	<i>C. chiopterus</i>	PA	X	X	X ²
		Obsoletus	<i>C. abchazicus</i>	PA			
	Obsoletus	Obsoletus	<i>C. montanus</i>	PA		X	
	Obsoletus	Obsoletus	<i>C. filicinus</i>	PA		X	
	Obsoletus	Obsoletus	<i>C. gornostaevae</i>	PA		X	
		Obsoletus	<i>C. glushchenkoae</i>	PA		X	
	Obsoletus	Obsoletus	<i>C. obsoletus</i>	PA	X	X	X ^{1,2}
	Obsoletus	Obsoletus	<i>C. scoticus</i>	PA	X	X	X ^{1,2}
	Obsoletus	Obsoletus	<i>C. sinanoensis</i>	PA		X	
	Obsoletus	Obsoletus	<i>C. sanguisuga</i>	PA		X	
	Grahamii		<i>C. actoni</i>	AU/ AE/ OR			X ^{1,2}
	Imicola	Imicola	<i>C. bolitinos</i>	AE			X ^{1,2}
	Imicola	Imicola	<i>C. brevitarsis</i>	AU/ OR			X ^{1,2}
		Imicola	<i>C. brosetti</i>	AE			
		Imicola	<i>C. fulvus</i>	AU/ AE/ OR			X ²
	Imicola	Imicola	<i>C. imicola</i>	AE/ OR/ PA	X		X ^{1,2}
	Imicola	Imicola	<i>C. kwagga</i>	AE			
	Imicola	Imicola	<i>C. loxodontis</i>	AE			
		Imicola	<i>C. miombo</i>	AE/ Medag. Reg./ OR/ PA			
	Imicola	Imicola	<i>C. nudipalpis</i>	AE/ OR			X ²
	Imicola	Imicola	<i>C. pseudopallidipennis</i>	AE/ OR (?Yemen)			
	Imicola	Imicola	<i>C. truttifrutti</i>	AE			
	Orientalis	Orientalis	<i>C. brosetti</i>	AE			
	Orientalis	Orientalis	<i>C. dubitatus</i>	AE			

Unter-gattung	Artenkomplex	Artengruppe	Arten	Zoogeogra-phische Region	Mittel-meer-raum	Mittel-europa	BTV Aufnahme-Möglichkeit
	Orientalis	Orientalis	<i>C. dumdumi</i>	OR			
	Orientalis	Orientalis	<i>C. flavipunctatus</i>	OR			
	Orientalis	Orientalis	<i>C. fulvus</i>	OR/ AU			
	Orientalis	Orientalis	<i>C. hui</i>	OR			
	Orientalis	Orientalis	<i>C. jacobsoni</i>	OR/ AU			
	Orientalis	Orientalis	<i>C. obscurus</i>	OR			
	Orientalis	Orientalis	<i>C. orientalis</i>	OR			X ²
	Orientalis	Orientalis	<i>C. tainanus</i>	OR			
	Orientalis	Orientalis	<i>C. trifasciellus</i>	AE			
	Pusillus	Pusillus	<i>C. pusillus</i>	NO			X ²
	Suzukii		<i>C. wadai</i>	AU			X ^{1, 2}
	Gulbenkiani	Gulbenkiani	<i>C. brevipalpis</i>	OR			X ²
	Gulbenkiani	Gulbenkiani	<i>C. gulbenkiani</i>	AE			X ¹
			<i>C. tororoensis</i>	AE			X ²
			<i>C. dewulfi</i>	PA	X	X	X ²
<i>Culicoides</i> Latreille, 1809			<i>C. almeidae</i>	PA	X		
		Impunctatus	<i>C. deltus</i>	PA		X	
	Fagineus		<i>C. fagineus</i>	PA		X	
	? Fagineus		<i>C. flavipulicaris</i>	PA	X		
			<i>C. flavus</i>	PA		X	
	Pulicaris	Grisescens	<i>C. grisescens</i>	PA		X	X ²
	Pulicaris	Impunctatus	<i>C. impunctatus</i>	PA		X	X ^{1, 2}
	Newsteadi	Pulicaris	<i>C. newsteadi</i>	PA	X	X	X ²
	Pulicaris	Pulicaris	<i>C. pulicaris</i>	PA	X	X	X ²
	???	Pulicaris	<i>C. punctatus</i>	PA	X	X	X ²
			<i>C. subfagineus</i>	PA		X	
			<i>C. magnus</i>	AE			X ¹
<i>Silvati-culicoides</i> Glukhova, 1977			<i>C. achrayi</i>	PA		X	X ^{1, 2}
			<i>C. fascipennis</i>	PA		X	
			<i>C. ostroushkoae</i>	PA		X	
			<i>C. pallidicornis</i>	PA	X	X	X ¹
			<i>C. picturatus</i>	PA		X	
			<i>C. subfasciipennis</i>	PA		X	
<i>Beltranmyia</i> Vargas, 1953			<i>C. nivosus</i>	AE			
			<i>C. circumscriptus</i>	PA	X	X	
			<i>C. desertorum</i>	PA	X		
			<i>C. homochrous</i>	PA	X	X	
			<i>C. leucostictus</i>	PA	X		
			<i>C. manchuriensis</i>	PA	X	X	

Unter-gattung	Artenkomplex	Artengruppe	Arten	Zoogeogra-phische Region	Mittel-meer-raum	Mittel-europa	BTV Aufnahme-Möglichkeit
			<i>C. salinarius</i>	PA		X	
			<i>C. sphagnumensis</i>	PA/NE		X	
<i>Haemato-myidium</i> Goeldi, 1905			<i>C. stellifer</i>	NE			X ²
<i>Hoffma-nia</i> Fox, 1948	Guttatus	Guttatus	<i>C. insignis</i>	NO			X ²
			<i>C. filarifer</i>	NO			
	Milnei		<i>C. milnei</i>	AE			X ^{1,2}
	Peregrinus		<i>C. peregrinus</i>	OR			X ²
	???		<i>C. zuluensis</i>	AE			X ¹
<i>Remmia</i> Glukhova, 1977			<i>C. enderleini</i>	AE			X ¹
			<i>C. nevillei</i>	AE			
			<i>C. oxystoma</i>	OR			X ²
			<i>C. schultzei</i>	AE			
			unknown				X ²
<i>Meijer-ehelea</i> Wirth & Hubert, 1961			<i>C. leucostictus</i>	Madag. region			X ^{1,2}
<i>Oecacta</i> Poey, 1853			<i>C. albicans</i>	PA		X	
			<i>C. azerbaijanzhanicus</i>	PA		X	
			<i>C. brunnicans</i>	PA		X	X ¹
			<i>C. clintoni</i>	PA		X	
			<i>C. corsicus</i>	PA	X		
			<i>C. longipennis</i>	PA	X	X	
			<i>C. sahariensis</i>	PA	X		
			<i>C. santonicus</i>	PA	X	X	
			<i>C. semimaculatus</i>	PA	X	X	
			<i>C. sergenti</i>	PA	X	X	
			<i>C. truncorum</i>	PA		X	
			<i>C. vexans</i>	PA		X	
			<i>C. pycnostictus</i>	AE			X ^{1,2}
	Furens		<i>C. furens</i>	NO			X ²
<i>Monoculi-coides</i> Khalaf, 1954			<i>C. cornutus</i>	AE			
			<i>C. bedfordi</i>	AE			X ¹
			<i>C. helveticus</i>	PA		X	
			<i>C. huambensis</i>	AE			X ¹
			<i>C. expectator</i>				X ^{1,2}
			<i>C. longicollis</i>	PA		X	

Unter-gattung	Artenkomplex	Artengruppe	Arten	Zoogeogra-phische Region	Mittel-meer-raum	Mittel-europa	BTV Aufnahme-Möglichkeit
	Nubeculosus		<i>C. nubeculosus</i>	PA	X	X	X ¹
			<i>C. parroti</i>	PA	X	X	
	Nubeculosus		<i>C. puncticollis</i>	PA	X	X	
			<i>C. riethi</i>	PA	?	X	X ¹
			<i>C. stigma</i>	PA	X	X	
			<i>C. onderstepoortensis</i>	AE			
	Variipennis		<i>C. occidentalis</i>	NO			X ²
	Variipennis		<i>C. sonorensis</i>	NO			X ^{1,2}
	Variipennis		<i>C. variipennis</i>	NO			X ^{1,2}
			<i>C. lahillei</i>	NO			X
			<i>C. crepuscularis</i>	NO			X ²
			<i>C. debilipalpis</i>	NO			X ²
			<i>C. haematopotus</i>	NO			X ²
<i>Wirthomyia</i> Vargas, 1973		Festivipennis	<i>C. clastrieri</i>	PA		X	
		Festivipennis	<i>C. festivipennis</i>	PA	X	X	X ¹
unplaced			<i>C. trilineatus</i>	NO			

Tab. 5: Auflistung der *Culicoides* Arten der Untergattungen *Avaritia*, *Culicoides* und *Monoculicoides* der Palaearktischen Region sowie der Palaearktischen Arten anderer Untergattungen, welche die Möglichkeit aufweisen das Blauzungenvirus aufzunehmen. Die Zuordnung in Arten-Gruppen/ -Komplexen unter Berücksichtigung folgender Literaturdaten:

Becker et al. (2010), Bellis et al. (1994), Blackburn et al. (1985), Boorman & Van Harten (2002), Braverman et al. (1981), Caracappa et al. (2003), Doyle (1992), Carpenter et al. (2009), Glukhova (1989), Greiner et al. (1985), Greiner & Gibbs (1992), Hoffmann et al. (2009), Jennings & Mellor (1988), Kramer et al. (1985), Lopez et al. (1992), Meiswinkel (1991, 1992, 1998, 2004), Meiswinkel et al. (2004), Mellor et al. (1984, 2000), Mellor & Pitzolis (1979), Mo et al. (1994), Mullen & Anderson (1998), Muller et al. (1982), Nolan et al. (2007), Pagès et al. (2009), Paweska & Venter (2004), Savini et al. (2005), Sukarsih et al. (1996), Tabachnick (1996), Tabachnick & Holbrook (1992), Vanbinst et al. (2009), Venter et al. (1998, 2008), Venter & Meiswinkel (1994), Walker & Davies (1971), Wittman et al. (2002). Zoogeographische Regionen (AE – Aethiopia, NO – Neotropis, PA – Palaearctis, OR – Orientalis)

Vektor Kompetenz X¹ – Labordaten; X² - Felddaten

5.4 Morphologische Daten

5.4.1 Gattung *Culicoides*

Die Gattung *Culicoides* umfasst weltweit 1400 beschriebene Arten, von denen 96% obligate Blutsauger an Säugetieren sind (Mellor et al. 2000).

5.4.1.1 Artenspektrum der Gattung *Culicoides* in Europa

Die Taxonomy und Systematik der Arten innerhalb der Gattung *Culicoides* sind sehr verwirrend. Das spiegelt sich in der Zuordnung in zahlreiche Untergattungen wieder. Eine umfangreiche Anzahl von Arten steht in ungeklärter Verwandtschaftsanalyse zueinander. Es müssten zahlreiche Untergattungen zum Gattungsstatus erhoben werden, und manche wie z.B. *Paradasyhelea* vom Gattungsstatus in den Untergattungsstatus. Umfangreiche Arbeiten auf diesem Gebiet sind daher dringend notwendig.

Die für Europa relevanten Arten sind in der folgenden Tabelle 6 gelistet.

Untergattung <i>Avaritia</i>
<i>C. (Avaritia) abchazicus</i> Zavaroff 1964
<i>C. (Avaritia) chiopterus</i> (Meigen, 1830)
<i>C. (Avaritia) dewulfi</i> Goetghebuer, 1936
<i>C. (Avaritia) imicola</i> Kieffer, 1913
<i>C. (Avaritia) montanus</i> Shakirzjanova, 1962
<i>C. (Avaritia) obsoletus</i> (Meigen, 1818)
<i>C. (Avaritia) scoticus</i> Downes & Kettle, 1952
Untergattung <i>Beltranmyia</i>
<i>C. (Beltranmyia) circumscriptus</i> Kieffer, 1918
<i>C. (Beltranmyia) salinarius</i> Kieffer, 1914
<i>C. (Beltranmyia) sphagnumensis</i> Williams, 1955
Untergattung <i>Culicoides</i>
<i>C. (Culicoides) deltus</i> Edwards, 1939
<i>C. (Culicoides) fagineus</i> Edwards, 1939
<i>C. (Culicoides) flavipulicaris</i> Dzhafarov, 1964
<i>C. (Culicoides) grisescens</i> Edwards, 1939
<i>C. (Culicoides) impunctatus</i> Goetghebuer, 1920
<i>C. (Culicoides) lupicaris</i> Downes & Kettle, 1952
<i>C. (Culicoides) newsteadi</i> Austen, 1921
<i>C. (Culicoides) pulicaris</i> (Linné, 1758)
<i>C. (Culicoides) punctatus</i> (Meigen, 1804)
<i>C. (Culicoides) subfagineus</i> Delécolle & Ortega, 1998
Untergattung <i>Monoculicoides</i>
<i>C. (Monoculicoides) helveticus</i> Callot, Kremer & Déduit, 1962
<i>C. (Monoculicoides) nubeculosus</i> Meigen, 1830
<i>C. (Monoculicoides) parroti</i> Kieffer, 1922
<i>C. (Monoculicoides) puncticollis</i> (Becker, 1903)

<i>C. (Monoculicoides) riethi</i> Kieffer, 1914
<i>C. (Monoculicoides) stigma</i> Meigen, 1818
Untergattung <i>Pontoculicoides</i>
<i>C. (Pontoculicoides) tauricus</i> Gutsevich, 1959
Untergattung <i>Silvaticulicoides</i>
<i>C. (Silvaticulicoides) achrayi</i> Kettle & Lawson, 1955
<i>C. (Silvaticulicoides) fascipennis</i> (Staeger, 1839)
<i>C. (Silvaticulicoides) pallidicornis</i> Kieffer, 1919
<i>C. (Silvaticulicoides) picturatus</i> Kremer & Déduit, 1961
<i>C. (Silvaticulicoides) subfasciipennis</i> Kieffer, 1919
Untergattung <i>Synhelea</i>
<i>C. (Synhelea) corsicus</i> Kremer, Leberre & Beaucournu-S., 1971
<i>C. (Synhelea) semimaculatus</i> Clastrier, 1958
Untergattung <i>Wirthomyia</i>
<i>C. (Wirthomyia) cameroni</i> Campbell & Pelham Cl., 1960
<i>C. (Wirthomyia) minutissimus</i> (Zetterstedt, 1855)
<i>C. (Wirthomyia) reconditus</i> Campbell & Pelham-Clinton, 1960
<i>C. (Wirthomyia) riouxi</i> Callot & Kremer, 1961
<i>C. (Wirthomyia) segnis</i> Campbell & Pelham-Clinton, 1960
Ungeklärte Zuordnung
<i>C. cataneii</i> Clastrier, 1957
<i>C. duddingstoni</i> Kettle & Lawson, 1955
<i>C. geigelensis</i> Dzhafarov, 1964
<i>C. alazanicus</i> Dzhafarov, 1961
<i>C. simulator</i> Edwards, 1939
<i>C. vidourlensis</i> Callot, Kremer, Molet & Bach, 1968
<i>C. jumineri</i> Callot & Kremer, 1969
<i>C. kurensis</i> Dzhafarov, 1960
<i>C. heteroclitus</i> Kremer & Callot, 1965
<i>C. jurensis</i> Callot, Kremer & Déduit, 1962
<i>C. kibunensis</i> Tokunaga, 1937
<i>C. paradisionensis</i> Boorman, 1988
<i>C. riebi</i> Delécolle, Mathieu & Baldet, 2005
<i>C. begueti</i> Clastrier, 1957
<i>C. haranti</i> Rioux, Descous & Pech, 1959
<i>C. brunnicans</i> Edwards, 1939
<i>C. santonicus</i> Callot, Kremer, Rault & Bach, 1968
<i>C. albicans</i> Winnertz, 1852
<i>C. vexans</i> Staeger, 1839

<i>C. caucoliberensis</i> Callot, Kremer, Rioux & Descous, 1967
<i>C. submaritimus</i> Dzhafarov, 1962
<i>C. maritimus</i> Kieffer, 1924
<i>C. maritimus paucisensillatus</i> Callot, Kremer & Rioux, 1963
<i>C. griseidorsum</i> Kieffer, 1918
<i>C. pictipennis</i> (Staeger, 1839)
<i>C. poperinghensis</i> Goetghebuer, 1953
<i>C. univittatus</i> Vimmer, 1932
<i>C. clastrieri</i> Callot, Kremer & Déduit, 1962
<i>C. festivipennis</i> Kieffer, 1914
<i>C. paolae</i> Boorman, 1996
<i>C. shaklawensis</i> Khalaf, 1961
<i>C. dendriticus</i> Boorman, 1976
<i>C. derisor</i> Callot & Kremer, 1965
<i>C. dzhafarovi</i> Remm, 1967
<i>C. furcillatus</i> Callot, Kremer & Paradis, 1962
<i>C. malevillei</i> Kremer & Coluzzi, 1971
<i>C. indistinctus</i> Khalaf, 1961
<i>C. odiatus</i> Austen, 1921
<i>C. longipennis</i> Khalaf, 1957
<i>C. sahariensis</i> Kieffer, 1923
<i>C. clintoni</i> Boorman, 1984
<i>C. truncorum</i> Edwards, 1939
<i>C. comosioculatus</i> Tokunaga, 1956
<i>C. heliophilus</i> Edwards, 1921
<i>C. albihalteratus</i> Goetghebuer, 1935

Tab. 6: Arten der Gattung *Culicoides* im europäischen Faunengebiet

5.4.1.2 Artenspektrum der Gattung *Culicoides* in Deutschland

Eine vergleichende Darstellung der *Culicoides*-Arten wird im Rahmen von MEDREONET vorbereitet. Deutschland wird mit seinen Ergebnissen aus dem Entomologischen Monitoring an dieser Arbeit beteiligt. Die Koordinatoren sind: J.C. Delecolle, B. Mathieu und C. Garros.

In der folgenden Tabelle 7 sind die Daten von Frankreich als Vergleich gelistet.

	France	Germany
Species name		
<i>C. (Avaritia) abchazicus</i> Zavaroff 1964	X	X
<i>C. (Avaritia) chiopterus</i> (Meigen, 1830)	X	X
<i>C. (Avaritia) dewulfi</i> Goetghebuer, 1936	X	X
<i>C. (Avaritia) imicola</i> Kieffer, 1913	X	
<i>C. (Avaritia) montanus</i> Shakirzjanova, 1962	X	
<i>C. (Avaritia) obsoletus</i> (Meigen, 1818)	X	X
<i>C. (Avaritia) scoticus</i> Downes & Kettle, 1952	X	X
<i>C. (Beltranmyia) circumscriptus</i> Kieffer, 1918	X	X
<i>C. (Beltranmyia) salinarius</i> Kieffer, 1914	X	X
<i>C. (Beltranmyia) sphagnumensis</i> Williams, 1955	X	X
<i>C. (Culicoides) deltus</i> Edwards, 1939	X	X
<i>C. (Culicoides) fagineus</i> Edwards, 1939	X	X
<i>C. (Culicoides) flavipulicaris</i> Dzhafarov, 1964	X	
<i>C. (Culicoides) grisescens</i> Edwards, 1939	X	X
<i>C. (Culicoides) impunctatus</i> Goetghebuer, 1920	X	X
<i>C. (Culicoides) lupicaris</i> Downes & Kettle, 1952	X	X
<i>C. (Culicoides) newsteadi</i> Austen, 1921	X	X
<i>C. (Culicoides) pulicaris</i> (Linné, 1758)	X	X
<i>C. (Culicoides) punctatus</i> (Meigen, 1804)	X	X
<i>C. (Culicoides) subfagineus</i> Delécolle & Ortega, 1998	X	
<i>C. (Monoculicoides) helveticus</i> Callot, Kremer & Déduit, 1962		X
<i>C. (Monoculicoides) nubeculosus</i> Meigen, 1830	X	X
<i>C. (Monoculicoides) parroti</i> Kieffer, 1922	X	X
<i>C. (Monoculicoides) puncticollis</i> (Becker, 1903)	X	X - Erstnachweis
<i>C. (Monoculicoides) riethi</i> Kieffer, 1914	X	X
<i>C. (Monoculicoides) stigma</i> Meigen, 1818	X	X
<i>C. (Pontoculicoides) tauricus</i> Gutsevich, 1959	X	
<i>C. (Silvaticulicoides) achrayi</i> Kettle & Lawson, 1955	X	X
<i>C. (Silvaticulicoides) fascipennis</i> (Staeger, 1839)	X	X
<i>C. (Silvaticulicoides) pallidicornis</i> Kieffer, 1919	X	X
<i>C. (Silvaticulicoides) picturatus</i> Kremer & Déduit, 1961	X	X - Erstnachweis
<i>C. (Silvaticulicoides) subfasciipennis</i> Kieffer, 1919	X	X
<i>C. (Synhelea) corsicus</i> Kremer, Leberre & Beaucournu-S., 1971	X	
<i>C. (Synhelea) semimaculatus</i> Clastrier, 1958	X	
<i>C. (Wirthomyia) cameroni</i> Campbell & Pelham Cl., 1960	X	? X
<i>C. (Wirthomyia) minutissimus</i> (Zetterstedt, 1855)	X	
<i>C. (Wirthomyia) reconditus</i> Campbell & Pelham-Clinton, 1960	X	X
<i>C. (Wirthomyia) riouxi</i> Callot & Kremer, 1961	X	X
<i>C. (Wirthomyia) segnis</i> Campbell & Pelham-Clinton, 1960	X	X
<i>C. cataneii</i> Clastrier, 1957	X	X
<i>C. duddingstoni</i> Kettle & Lawson, 1955	X	X
<i>C. gejjelensis</i> Dzhafarov, 1964	X	

<i>C. alazanicus</i> Dzhafarov, 1961	X	X
<i>C. simulator</i> Edwards, 1939	X	X
<i>C. vidourensis</i> Callot, Kremer, Molet & Bach, 1968	X	
<i>C. jumineri</i> Callot & Kremer, 1969	X	
<i>C. kurensis</i> Dzhafarov, 1960	X	
<i>C. heteroclitus</i> Kremer & Callot, 1965	X	
<i>C. jurensis</i> Callot, Kremer & Déduit, 1962	X	X
<i>C. kibunensis</i> Tokunaga, 1937	X	X
<i>C. paradisionensis</i> Boorman, 1988	X	
<i>C. riebi</i> Delécolle, Mathieu & Baldet, 2005	X	
<i>C. begueti</i> Clastrier, 1957	X	
<i>C. haranti</i> Rioux, Descous & Pech, 1959	X	
<i>C. brunnicans</i> Edwards, 1939	X	X
<i>C. santonicus</i> Callot, Kremer, Rault & Bach, 1968	X	
<i>C. albicans</i> Winnertz, 1852	X	X
<i>C. vexans</i> Staeger, 1839	X	X
<i>C. caucoliberensis</i> Callot, Kremer, Rioux & Descous, 1967	X	
<i>C. submaritimus</i> Dzhafarov, 1962	X	
<i>C. maritimus</i> Kieffer, 1924	X	X
<i>C. maritimus paucisensillatus</i> Callot, Kremer & Rioux, 1963	X	
<i>C. griseidorsum</i> Kieffer, 1918	X	X - Erstnachweis
<i>C. pictipennis</i> (Staeger, 1839)	X	X
<i>C. poperinghensis</i> Goetghebuer, 1953	X	X
<i>C. univittatus</i> Vimmer, 1932	X	
<i>C. clastrieri</i> Callot, Kremer & Déduit, 1962	X	X
<i>C. festivipennis</i> Kieffer, 1914	X	X
<i>C. paolae</i> Boorman, 1996	X	
<i>C. shaklawensis</i> Khalaf, 1961	X	
<i>C. dendriticus</i> Boorman, 1976	X	
<i>C. derisor</i> Callot & Kremer, 1965	X	
<i>C. dzhafarovi</i> Remm, 1967	X	
<i>C. furcillatus</i> Callot, Kremer & Paradis, 1962	X	X
<i>C. malevillei</i> Kremer & Coluzzi, 1971	X	
<i>C. indistinctus</i> Khalaf, 1961	X	
<i>C. odiatus</i> Austen, 1921	X	
<i>C. longipennis</i> Khalaf, 1957	X	

<i>C. sahariensis</i> Kieffer, 1923	x	
<i>C. clintoni</i> Boorman, 1984	x	x
<i>C. truncorum</i> Edwards, 1939	x	x
<i>C. comosioculatus</i> Tokunaga, 1956	x	x
<i>C. heliophilus</i> Edwards, 1921	x	x
<i>C. albihalteratus</i> Goetghebuer, 1935	x	
<i>C. manchuriensis</i> Tokunaga, 1941		x
<i>C. longicollis</i> Glukhova, 1971		x
<i>C. saevus</i> Kieffer, 1922		x
<i>C. seifadinei</i> Dzshafarov, 1958		x
<i>C. slovacus</i> Orszagh, 1969		x
<i>C. pumilus</i> (Winnertz, 1852)		x
<i>C. pseudoheliphilus</i> Callot & Kremer, 1961		x
<i>C. semimaculatus</i> Clastrier, 1958		x

Tab. 7: Liste der bisher für Deutschland nachgewiesenen *Culicoides*-Arten im Vergleich zu Frankreich (Quelle: Daten Entomologisches Monitoring, Arbeiten Havelka, Material im DEI oder Museum Karlsruhe)

5.4.1.3 Artenspektrum der Gattung *Culicoides* im Entomologischen Monitoring

Von den über 1,5 Millionen gesammelten *Culicoides* konnten 83,3% der *Obsoletus*-Gruppe, 13,5% der *Pulicaris*-Gruppe und 0,1% dem *Nubeculosus*-Komplex zugeordnet werden. Aus diesen drei Gruppen sind bisher die potenziellen Vektoren für die Übertragung des BTV für Mitteleuropa bekannt. Ein Anteil von 0,3% des Materials waren *Culicoides*-Arten, die keinem dieser drei Gruppen zugeordnet werden konnten, 2,8% konnten nicht auf Gruppen- oder Artniveau bestimmt werden.

Die Gnitzenzahlen, ihre Höchstwerte und ihr jahreszeitlicher Verlauf variierten zwischen den einzelnen Fallenstandorten beachtlich, wobei geographische Einflüsse eine wesentliche Rolle spielen. Die größten Individuenzahlen konnten im Juli und August 2008 festgestellt werden. Ab Oktober sanken sowohl die Gesamtindividuenzahl als auch die *Culicoides*-Zahlen beträchtlich. Die Ergebnisse zu dieser Untersuchung sind ausführlich im Abschlußbericht zum Forschungsprojekt 06HS041 bzw. in den Publikationen der einzelnen Arbeitsgruppen dargestellt – vgl. Kiel et al. 2009, Vorsprach et al. 2009, Mehlhorn et al. 2009, Conraths et al. 2009, Clausen et al. 2009, Werner et al. in prep.)

5.4.2 Verteilung der Arten

Die Vergleichsproben der Untersuchungsflächen wurden lt. Arbeitsplan bearbeitet. Die Gnitzenzahlen, ihre Höchstwerte und ihr jahreszeitlicher Verlauf variierten zwischen den einzelnen Fallenstandorten beachtlich, wobei geographische Einflüsse eine wesentliche Rolle spielen.

Die mittels morphologischer Kriterien durchgeführte Feinbestimmung der in den 93 bzw. zusätzlichen 10 Lichtfallen in der Nähe von Rinderbetrieben gefangenen Gnitzen ergab – neben zahlreichen Arten der Gattung *Forcipomyia* – im Entomologischen Monitoring eine Liste von 28 *Culicoides*-Arten (Tab. 6).

Die morphologische Bestimmung des bearbeiteten Materials im Entomologischen Monitoring ergab folgendes Artenspektrum (Nomenklatur verändert nach: Borkent 2008, Havelka & Aguilar 1999):

Subfamilie Ceratopogonidae Newman, 1834

Genus *Culicoides* Latreille, 1809

Subgenus *Avaritia* Fox, 1955
chiopterus (Meigen), 1830
(*dewulfi* Goetghebuer, 1935)
obsoletus (Meigen), 1818
scoticus Downes and Kettle, 1952

Subgenus *Beltranmyia* Vargas, 1953
circumscriptus Kieffer, 1918

Subgenus *Culicoides* Latreille, 1809
fagineus Edwards, 1939
grisescens Edwards, 1939
impunctatus Goetghebuer, 1920
lupicaris Downes & Kettle, 1952
newsteady Austen, 1921
pulicaris (Linnaeus, 1758)
punctatus (Meigen, 1804)

Subgenus *Monoculicoides* Khalaf, 1954
nubeculosus (Meigen, 1830)
? syn. zu *puncticollis* Goetghebuer, 1912:
parroti Kieffer, 1922
riethi Kieffer, 1914
stigma (Meigen, 1818)

Subgenus *Silvaticulicoides* Glukhova, 1977
achrayi Kettle & Lawson, 1955
subfascipennis Kieffer, 1919

Subgenus *Wirthomyia* Vargas, 1973
albicans (Winnertz, 1852)
brunnicans Edwards, 1939
clastrieri Callot, Kremer & Deduit 1962
festivipennis Kieffer, 1914
poperinghensis Goetghebuer, 1953
simulator Edwards 1939
vexans (Staeger, 1839)

fragliche Nachweise – Vgl. mit Typenmaterial notwendig (steht vor Drucklegung der Ergebnisse noch aus):

griseidorsum Kieffer, 1918 – RP AZ 09/2007; HE GI 08/ 2007
fascipennis (Staeger, 1839) – NI SHG 07/2007; HE GI 08/ 2007
lucorum (Meigen), 1818 – HE RÜD 08/2007 (Atrichopogon – kein Vektor!)

5.4.2.1 Verteilung der Arten auf die Bundesländer

Die Artverteilung innerhalb der Bundesländer erscheint auf den ersten Blick sehr homogen, wobei die potentiellen Vektoren der Obsoletus Gruppe [*C. chiopterus* (1); *C. dewulfi* (2); *C. obsoletus* (3); *C. scoticus* (4)] bzw. der Pulicaris Gruppe [*C. pulicaris* (11); *C. punctatus* (12)] sehr häufig vertreten waren.

Zahlreiche weitere Arten wie *C. newsteady* (10), *C. circumscriptus* (5), *C. nubeculosus* (13) und *C. festivipennis* (22) sind ebenfalls sehr häufig vertreten und verteilt.

Um jedoch auch für die Verbreitung der weiteren Arten (6. *fagineus*; 7. *grisescens*; 8. *impunctatus*; 9. *lupicaris*; 14. *parroti*; 15. *riethi*; 16. *stigma*; 17. *achrayi*; 18. *subfascipennis*; 19. *albicans*; 20. *brunnicans*; 21. *clastrieri*; 23. *poperinghensis*; 24. *simulator*; 25. *truncorum*; 26. *vexans*) Aussagen treffen zu können, sind die Verteilung auf das Fallenniveau notwendig.

Bundesland	Artenspektrum																									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
Baden-Württemberg	+	+	+	+					+	+	+	+					+		+		+	+				
Bayern		+	+	+	+					+	+	+					+		+		+	+				
Brandenburg				+						+	+	+														
Bremen	+		+						+	+	+	+	+				+		+			+				
Hamburg	+	+	+			+		+	+	+	+	+														
Hessen	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+		+		+		+	+	+	+				+
Mecklenburg/Vorpommern		+	+	+						+	+	+														
Niedersachsen	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nordrhein-Westfalen	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rheinland-Pfalz	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+		+	+		+	+	+	+	+	+		+
Saarland	+	+	+	+						+	+	+							+		+	+				
Schleswig-Holstein	+	+	+	+	+	+				+	+	+	+				+		+			+	+			
Sachsen-Anhalt	+	+	+	+						+	+	+			+							+				+
Thüringen		+	+			+		+	+	+	+	+	+		+		+		+		+	+				

Tab. 7: Artverteilung auf die untersuchten Bundesländer (1. *chiopterus*; 2. *dewulfi*; 3. *obsoletus*; 4. *scoticus*; 5. *circumscriptus*; 6. *fagineus*; 7. *grisescens*; 8. *impunctatus*; 9. *lupicaris*; 10. *newsteady*; 11. *pulicaris*; 12. *punctatus*; 13. *nubeculosus*; 14. *parroti*; 15. *riethi*; 16. *stigma*; 17. *achrayi*; 18. *subfascipennis*; 19. *albicans*; 20. *brunnicans*; 21. *clastrieri*; 22. *festivipennis*; 23. *poperinghensis*; 24. *simulator*; 25. *truncorum*; 26. *vexans*)

5.4.2.2 Verteilung der Arten auf die Fallen im Entomologischen Monitoring

In den Tabellen 8 und 9 sind die Verteilung der einzelnen Artnachweise gelistet. Es wird deutlich, dass die Arten der Obsoletus Gruppe (1. *chiopterus*; 2. *dewulfi*; 3. *obsoletus*; 4. *scoticus*) und der Pulicaris Gruppe (11. *pulicaris*; 12. *punctatus*) im gesamten Untersuchungsgebiet flächendeckend vorkommen.

Arten wie z.B. *C. newsteady* (10); *C. nubeculosus* (13), *C. albicans* (19) und *C. festivipennis* (22) sind ebenfalls sehr gemein vertreten und weit verbreitet in Deutschland nachweisbar.

Die weiteren Nachweise innerhalb der Gattung *Culicoides* umfassen folgende Arten: *C. circumscriptus* (5); *C. fagineus* (6); *C. grisescens* (7); *C. impunctatus* (8); *C. lupicaris* (9); *C. parroti* (14); *C. riethi* (15); *C. stigma* (16); *C. achrayi* (17); *C. subfascipennis* (18); *C. brunnicans* (20); *C. clastrieri* (21); *C. poperinghensis* (23); *C. simulator* (24); *C. truncorum* (25); *C. vexans* (26).

Gr.	TRAP-CODE	Artenspektrum																											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26		
1	NRW KLE				+																								
1	NRW ME																												
1	NRW VIE				+																								
1	NRW WES																												
1	NRW AC																												
1	NRW BM																												
1	NRW HS																												
1	NRW GL(GM)				+																								
1	NRW SU																												
1	NRW BOR																												
1	NRW COE																												
1	NRW ST																												
1	NRW WAF																												
1	NRW HX																												
1	NRW MI				+																								
1	NRW HSK																												
1	NRW MK				+																								
1	NRW SI																												
2	ST WB			+							+	+	+																
2	ST BTF			+							+	+	+			+							+						+
2	NI OHA			+							+	+	+																
2	NI NI	+	+	+	+						+	+	+																
2	NI SFA		+	+	+							+	+																
2	NI ROW	+	+	+							+	+	+																
2	NI PE			+								+	+																+
2	NI WOB	+	+	+	+						+	+	+																+
2	ST OK	+	+	+	+							+	+																+
2	NI UE	+	+	+							+	+	+																
2	ST SDLA	+	+	+	+							+	+																
2	ST SDLB		+	+							+	+	+																+

Gr.	TRAP-CODE	Artenspektrum																									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
2	BB PR				+						+	+	+														
2	NI LG		+	+							+	+	+														
2	MV LWL		+	+	+						+	+	+														
3	NI HI		+	+	+	+	+	+			+	+	+	+		+	+		+	+	+	+	+		+		
3	NI H			+	+	+		+			+	+	+	+				+	+		+	+	+	+	+	+	+
3	NI CE	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+							+	+			+			+
3	NI SHG			+	+	+		+		+	+	+	+					+		+	+		+	+			
4	HE KB	+	+	+	+						+	+	+						+			+	+				+
4	HE KS	+		+	+	+				+	+	+	+							+			+				+
4	HE HR			+	+		+				+	+	+	+						+							+
4	HE FD	+	+	+	+							+	+	+										+			
4	HE LM			+	+					+	+	+	+			+		+					+				+
4	HE GI	+	+	+	+		+				+	+	+	+		+		+					+				
4	HE RÜD	+		+							+	+	+						+		+	+	+	+			
4	HE DA	+		+							+	+	+	+									+				+
4	HE ERB	+		+	+						+	+	+						+								+
4	HE FB	+	+	+	+					+	+	+	+								+		+				
5	NI AUR	+	+	+	+						+	+	+			+	+			+		+	+				+
5	NI WST	+	+	+	+						+	+	+		+					+							
5	NI BRA	+	+	+						+	+	+	+							+			+				
5	NI NOH	+	+	+	+							+	+			+	+			+							
5	NI CLP	+	+	+	+		+			+	+	+	+			+	+			+							
5	NI DH	+	+	+	+		+			+	+	+	+	+		+		+		+			+				
5	NI VEC	+	+	+	+					+	+	+	+														
5	NI OS	+	+	+	+					+	+	+	+							+			+				
5	NI OHZ	+	+	+							+	+	+			+	+			+	+	+			+		
5	NI CUX	+	+	+	+		+			+		+	+			+				+		+	+	+			
5	NI STD			+							+	+	+	+					+		+		+				
5	NI EL	+		+	+		+	+			+	+	+	+						+			+				
5	HB HB	+		+					+	+	+	+	+					+		+			+				
5	HH HH	+	+	+			+		+	+	+	+	+														
5	SH OD	+		+		+	+				+	+	+	+				+		+					+		

Gr.	TRAP-CODE	Artenspektrum																									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
5	SH IZ	+	+	+	+		+				+	+	+					+		+			+				
6	BW HD			+	+						+	+	+														
6	BW OG	+		+							+	+	+					+				+					
6	BW WN	+	+	+	+					+		+	+							+							
6	BW LB	+		+	+							+												+			
6	BW BL	+	+	+								+	+							+			+				
6	BY AB			+								+	+														
6	BY WÜ			+									+														
6	BY NES			+								+	+						+				+	+			
6	BY SW			+								+	+	+													
7	RPDÜW		+	+	+	+						+	+							+	+		+	+			
7	RPTR	+	+	+	+						+	+	+	+					+				+				+
7	RPAK		+	+	+							+	+	+	+					+							+
7	RPKUS			+	+		+					+	+	+						+			+				
7	RPGER			+								+	+						+			+	+				
7	RPDAUN	+	+	+	+							+	+	+	+			+	+			+					+
7	RPRHK		+	+	+						+	+	+	+	+	+			+			+	+	+			
7	RPMYK	+		+	+			+				+	+	+					+			+		+			
7	RPAW	+	+	+	+	+		+				+	+	+	+	+		+	+		+	+		+	+		
7	RPAZ	+	+	+	+			+				+	+	+	+					+			+				+
7	SLMW	+	+	+	+							+	+										+	+			
7	SLWEN			+								+	+	+						+			+				
8	TH EIF			+						+	+	+	+	+		+				+							
8	TH UHK		+	+					+				+	+		+			+			+	+				
8	TH WBK			+								+	+		+					+							
8	TH KHK			+			+					+	+	+	+		+			+			+				
8	TH SD			+								+	+	+	+		+			+			+				

Tab. 8: Artverteilung auf die untersuchten Fallen im Untersuchungsgebiet (1. *chiopterus*; 2. *dewulfi*; 3. *obsoletus*; 4. *scoticus*; 5. *circumscriptus*; 6. *fagineus*; 7. *grisescens*; 8. *impunctatus*; 9. *lupicaris*; 10. *newsteady*; 11. *pulicaris*; 12. *punctatus*; 13. *nubeculosus*; 14. *parroti*; 15. *riethi*; 16. *stigma*; 17. *achrayi*; 18. *subfascipennis*; 19. *albicans*; 20. *brunnicans*; 21. *clastrieri*; 22. *festivipennis*; 23. *poperinghensis*; 24. *simulator*; 25. *truncorum*; 26. *vexans*)

Gr.	TRAP-CODE	Artenspektrum																									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
A	Menzer	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+			+
B	Bonn	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+
C	Thüringen I	+	+	+	+	+				+	+	+	+	+		+					+	+					+
D	Thüringen II	+	+	+	+	+	+		+				+	+		+		+		+	+	+	+				+
E	BRB I KW	+	+	+	+	+					+	+		+							+	+					+
F	BRB II GB		+	+	+		+			+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+		+				+
G	BRB III PA	+	+	+	+	+			+	+	+	+		+				+		+							+
H	Sachsen I RB	+		+	+	+	+				+	+	+	+		+	+	+	+	+			+				
I	Sachsen II RA	+	+	+	+	+				+	+	+	+		+				+		+						+
K	MV I	+	+	+	+	+	+		+		+	+	+	+		+		+	+	+			+				

Tab. 9: Artverteilung auf die untersuchten zusätzlichen Fallen im restlichen Gebiet Deutschlands (1. *chiopterus*; 2. *dewulfi*; 3. *obsoletus*; 4. *scoticus*; 5. *circumscriptus*; 6. *fagineus*; 7. *griseus*; 8. *impunctatus*; 9. *lupicaris*; 10. *newsteady*; 11. *pulicaris*; 12. *punctatus*; 13. *nubeculosus*; 14. *parroti*; 15. *riethi*; 16. *stigma*; 17. *achrayi*; 18. *subfascipennis*; 19. *albicans*; 20. *brunnicans*; 21. *clastrieri*; 22. *festivipennis*; 23. *poperinghensis*; 24. *simulator*; 25. *truncorum*; 26. *vexans*)

5.4.3 Molekularbiologische Analysen und Virusdiagnostik

Lt. Studienprotokoll wurden die morphologisch vorbestimmten Gnitzenarten für die weiterführenden Arbeiten im Rahmen der molekularbiologischen Identifizierung und der Virusdiagnostik auf Einzelindividueniveau zur Verfügung gestellt.

Die Ergebnisse werden in den folgenden Kapiteln dargestellt.

5.5 Molekularbiologische Bestimmung

Da die Amplifikation mit den von Dallas et al. (2003) publizierten Primern häufig nicht bei allen Gnitzen-Arten zu kräftigen und sauberen Banden und damit zu problemlos sequenzierbaren PCR-Produkten führte (Abb. 41), wurde zunächst versucht mit verschiedenen anderen Primern (LCO-S-1490/HCO-N-2198 aus Folmer et al. 1994 und UEA2/UEA8 aus Lunt et al. 1996), welche außerhalb der COI-Region hybridisieren und deren Amplifikate den interessierenden Bereich einschließen, dieses Problem zu umgehen. Auch dieser Ansatz führte letztendlich zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis.

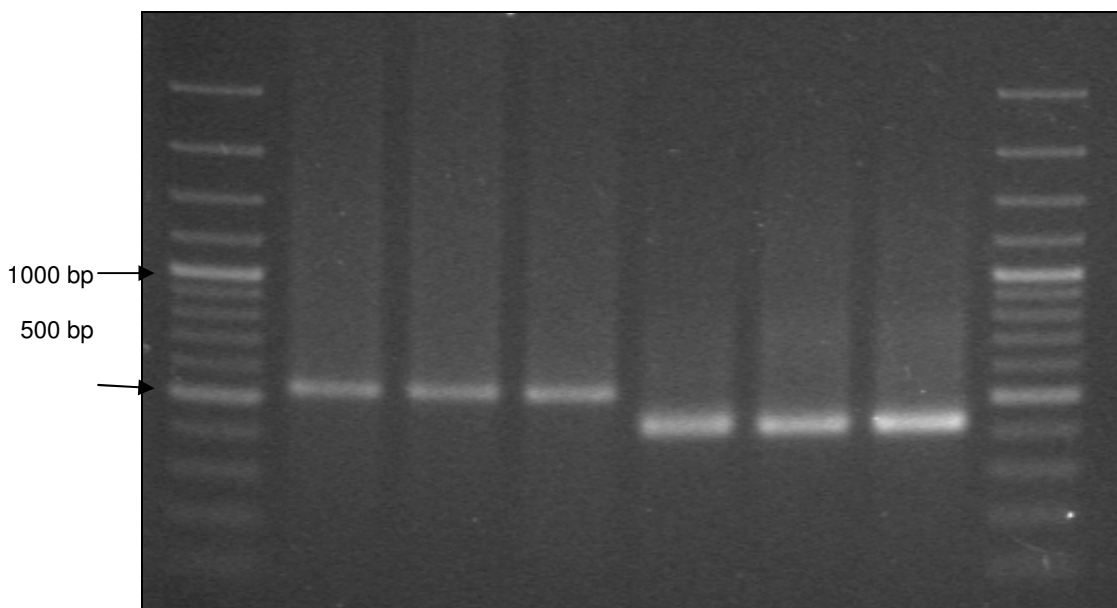


Abb. 41: Gelelektrophorese von PCR-Produkten mit Primern nach Dallas et al. (2003) (COI) und Gomulski et al. (2006) (ITS2): Spuren 1+8: GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Fermentas); Spur 2: *C. obsoletus* COI; Spur 3: *C. pulicaris* COI; Spur 4: *C. punctatus* COI; Spur 5: *C. obsoletus* ITS2; Spur 6: *C. pulicaris* ITS2; Spur 7: *C. punctatus* ITS2.

5.5.1 Entwicklung von Primern der COI Region

Es wurden daher unter Zuhilfenahme von Daten aus der GenBank folgende weitere Primer für die COI-Region von *C. chiopterus*, *C. impunctatus*, *C. scoticus* und *C. dewulfi* konstruiert:

C. chiopterus (Amplifikatlänge ca. 430bp):
 C1-J-chio: 5'-CTGATATAGCCTTTTCCACG-3'
 C1-N-chio: 5'-TGTTGGTAAAGAATAGGGTC-3'

C. impunctatus (Amplifikatlänge ca. 420bp):
 C1-J-impct: 5'-ATATAGCATTTCCTCCG-3'
 C1-N-impct: 5'-GGTATAAAATGGGATCTCC-3'

C. scoticus (Amplifikatlänge ca. 440bp):
 C1-J-sco: 5'-ATACTAGGTGCCCCAGATATAGC-3'
 C1-N-sco: 5'-GTTGGTAAAGAATGGGGTCAC-3'

C. dewulfi (Amplifikatlänge ca. 420bp):
 C1-J-dew: 5'-CCGACATAGCATTCCCTC-3'
 C1-N-dew: 5'-ATAAGATTGGGTCACCTCC-3'

Die Primer hybridisieren innerhalb der amplifizierten Region der Primer C1-J-1718 und C1-N-2191 (Abb. 42).

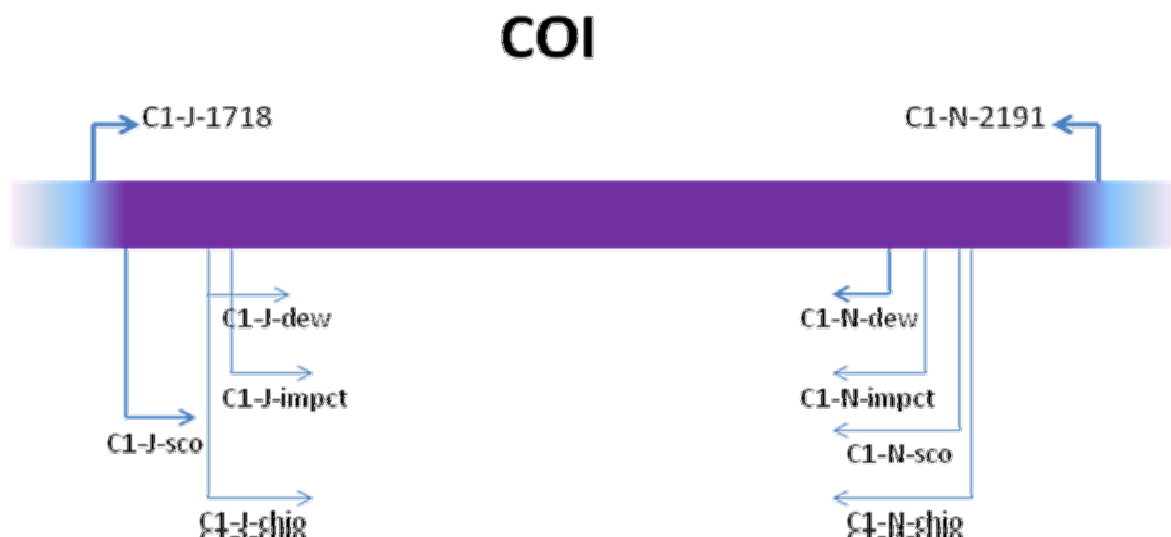


Abb. 42: Position der neu generierten spezifischen Primer für *C. scoticus*, *C. dewulfi*, *C. chiopterus* und *C. impunctatus* in der COI-Region

Für *C. scoticus*, *C. dewulfi*, *C. chiopterus* und *C. impunctatus* konnten nun bessere Daten erhalten werden, sowohl hinsichtlich PCR (Abb. 43) als auch Sequenzierung. Trotzdem war diese Lösung noch nicht befriedigend, da durch die Amplifikation eines kürzeren COI-Abschnittes Teile des ursprünglichen 523bp-COI-Amplifikats nicht erfasst wurden und damit Informationen für die Entwicklung der speziesspezifischen Primer fehlten.

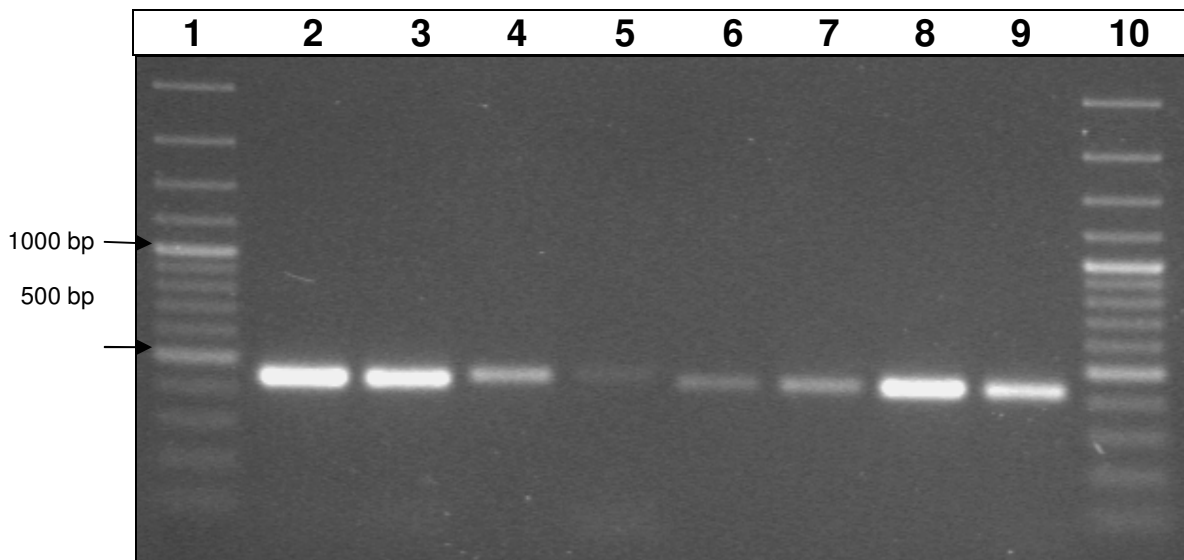


Abb. 43: Gelelektrophorese von PCR-Produkten mit den neu generierten spezifischen Primern: Spuren 1+10: GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Fermentas); Spuren 2+3: *C. chiopterus*; Spuren 4+5: *C. scoticus*; Spuren 6+7: *C. dewulfi*; Spuren 8+9: *C. impunctatus*

5.5.2 Sequenzierung der PCR Produkte

Für die anschließende Sequenzierung wurden die PCR-Produkte aufgereinigt. Bei diffusen Banden bzw. Hintergrundschmier im Agarosegel wurde das gewünschte Fragment aus dem Gel extrahiert (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen). Bei sauberen Banden erfolgte eine Aufreinigung aus dem Reaktionsansatz (MinElute PCR Purification Kit, Qiagen). Die zurückgewonnene DNA wurde schließlich mit 20 µl Puffer eluiert, das Eluat nochmals mittels Gelelektrophorese überprüft und mitsamt Primern zur Sequenzierung abgegeben.

Nachfolgend ist eine Übersicht über die Anzahl der aktuell vorliegenden brauchbaren Sequenzen der verschiedenen Gnitzenspezies für die beiden DNA-Regionen gegeben. Erfasst wurden sowohl beidseitig sequenzierte DNA-Fragmente als auch solche, die bislang nur aus einer Richtung sequenziert wurden.

	CO1	ITS2
<i>C. achrayi</i>	+++ (4)	+ (3)
<i>C. albicans</i>	+++ (8)	+ (6)
<i>C. brunnicans</i>		+ (2)
<i>C. chiopterus</i>	+++ (12)	++ (8)
<i>C. circumscriptus</i>	+++ (8)	++ (9)
<i>C. clastrieri</i>	+++ (5)	(2)
<i>C. deltus</i>		++ (2)
<i>C. dewulfi</i>	++ (6)	+ (3)
<i>C. fagineus</i>		
<i>C. festivipennis</i>	++ (5)	+ (2)
<i>C. flavipulicaris</i>	++ (3)	
<i>C. griseidorsum</i>		++ (2)
<i>C. grisescens</i>	++ (5)	++ (5)
<i>C. halophilus</i>	+++ (1)	
<i>C. imicola</i>	+++ (5)	(1)
<i>C. impunctatus</i>	+++ (4)	++(3)
<i>C. lupicaris-delta</i>	++ (3+2)	
<i>C. newsteadi</i>	++ (7)	++ (1)
<i>C. obsoletus s.l.</i>	(3)	(1)
<i>C. obsoletus s.s.</i>	(1)	++ + (32)
<i>C. poperinghensis</i>		
<i>C. pulicaris</i>	++ (10)	+ (11)
<i>C. punctatus</i>	++ (23)	+++ (20)
<i>C. puncticollis</i>	+ (2)	+ (2)
<i>C. riethi</i>	(1)	(1)
<i>C. salinarius</i>	+ (1)	
<i>C. scoticus</i>	+++ (5)	++ (7)
<i>C. simulator</i>	+++ (1)	
<i>C. stigma</i>	(1)	(1)
<i>C. truncorum</i>		+ (1)
<i>C. vexans</i>	+++ (1)	

Tab. 10: Listung der Sequenzen der jeweiligen Arten für die COI- und die ITS2-Region; die blau markierten *Culicoides*-Arten gehören zur Obsoletus-Gruppe, die rot unterlegten zur Pulicaris-Gruppe. Die Zahlen in Klammern stellen die Anzahl der Sequenzen dar, die Zeichen davor bewerten deren Qualität (+, ++ oder +++).

5.5.3 Molekularbiologische Differenzierung - Arbeitsstand

Die molekularbiologischen Arbeiten zur Entwicklung einer Multiplex- und Real Time-PCR zur Identifizierung einheimischer *Culicoides*-Arten (Diptera: Ceratopogonidae) werden im Rahmen eines Einzelforschungsprojektes (2809HS010), welches noch bis zum 31.12.2010 gefördert wird, fortgeführt. Daher können die hier vorgestellten Ergebnisse nur den Status eines Zwischenberichtes haben.

Das Ziel der Arbeiten war die Auswertung von ca. 10 Sequenzen pro Spezies. Die bisherige Datenlage gibt einen umfangreicheren Pool für gemeine Arten und deren Analysen. Jedoch werden für seltenere Arten in Ermangelung an Einzeltieren diese Pools nicht erreichbar sein. In diesen Fällen werden alle verfügbaren Daten ausgewertet.

Die vorhandenen COI-Sequenzen wurden mit BLAST hinsichtlich ihrer Identität geprüft, bearbeitet und innerhalb der Spezies miteinander verglichen. Sofern möglich wurden in der GenBank vorhandene Daten ergänzend hinzugezogen. Dort sind ca. 340 COI-Sequenzen für *Culicoides*-Arten verfügbar. Neben hier nicht bearbeiteten Spezies befinden sich darunter Daten für Arten des *C. obsoletus*-Komplexes, *C. dewulfi*, *C. impunctatus*, *C. pulicaris* und *C. punctatus*. Allerdings sind die Daten in der GenBank mit Vorsicht zu betrachten, da man nicht immer von einer korrekten morphologischen Zuordnung der dort veröffentlichten Arten ausgehen kann.

Dank neu überarbeiteter, degenerierter Primer (ursprünglich von Dallas et al. (2003) publiziert, von Bernd Hoffmann, FLI Riems, modifiziert) konnten bessere Ergebnisse hinsichtlich der Amplifikation der COI-Region erzielt werden. Allerdings erwiesen sich diese Primer nicht optimal für alle *Culicoides*-Arten. Die Erfahrung, dass offenbar keine COI-Primer gefunden werden können, die bei allen Gnitzenarten gute PCR-Produkte erbringen, wurde mittlerweile von anderen Arbeitsgruppen bestätigt (KAMPEN, FLI; GARROS, CIRAD, persönl. Mitteilungen). Insbesondere *C. obsoletus* s.s. stellte sich als problematisch heraus. Die Amplifikation der entsprechenden Proben muss daher mit einer anderen Primer-Kombination ergänzt werden. Auch für *C. fagineus* werden noch weitere Sequenzen benötigt. Von den seltenen Arten werden so viele Individuen wie verfügbar bearbeitet. Es muss noch entschieden werden, für welche Arten (neben denen der *C. obsoletus*- und *C. pulicaris*-Komplexe) spezifische Primer entwickelt werden sollen.

Die Sequenzierungsergebnisse der Amplikate der ITS2-Region konnten deutlich verbessert werden. Eine zu hohe DNA-Konzentration wirkte sich negativ auf die Sequenzierung aus. Da die Konzentration bei den ITS2-PCR-Produkten beträchtlich schwankte und via Gelelektrophorese nicht exakt genug abgeschätzt werden konnte, musste eine andere Bestimmungsmöglichkeit gefunden werden. Es ergab sich die Möglichkeit einer Mitbenutzung des NanoDrops (NanoDrop ND 1000, Peqlab) einer anderen Arbeitsgruppe im Institut für Biologie der HU Berlin. Mit dessen Hilfe kann der DNA-Gehalt der ITS2-Proben zuverlässig ermittelt werden. Die Proben wurden im Anschluss, sofern nötig, verdünnt, so dass die für die Sequenzierung notwendige Menge nicht überschritten wurde. Dies führte zu einer deutlichen Verbesserung der Sequenzqualität der ITS2-Proben. Dennoch traten weiterhin Doppelpeaks in den Elektropherogrammen auf, die sich bei der forward- und reverse-Sequenzierung an den gleichen Stellen befanden und unabhängig von der Art der Aufreinigung der Proben (Gelextraktion oder direkte Aufreinigung aus der PCR) und der eingesetzten DNA-Konzentration waren.

Auch die vorhandenen ITS2-Sequenzen wurden mit BLAST überprüft, die Proben intraspezifisch verglichen und, falls möglich, mit GenBank-Daten ergänzt. Für die ITS2-Region sind im Gegensatz zu COI deutlich weniger Vergleichsmöglichkeiten verfügbar.

Es gibt ungefähr 140 ITS2-Sequenzen von *Culicoides*-Arten in der GenBank, wovon einige allerdings die zu analysierende Region nur partiell abdecken. Benötigt werden derzeit noch weitere Proben bzw. ITS2-Sequenzen folgender, zu den Komplexen gehörender Arten: *C. fagineus*, *C. impunctatus*, *C. lupicaris-delta* und *C. newsteadi*.

C. imicola und *C. flavipulcaris* wurden nicht in Deutschland gefangen, aber freundlicherweise von einer spanischen Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Sie sollen lediglich als Vergleich in die phylogenetischen Untersuchungen einfließen. Die bereits vorhandenen Proben dieser Arten (plus die vorhandenen GenBank-Daten) sind daher ausreichend.

5.5.4 Entwicklung der speziesspezifischen Primer

Die gewonnenen COI-Daten sollen als Grundlage für die Entwicklung speziesspezifischer Primer dienen. Zu diesem Zweck ist zunächst aus allen Alignments innerhalb einer Art die jeweilige Konsensussequenz zu ermitteln. Dies geschieht mittels geeigneter Computerprogramme. Anschließend werden die Konsensussequenzen der verschiedenen Arten miteinander verglichen. Auf diese Weise können konservierte und nichtkonservierte Bereiche identifiziert werden. Konserviert bedeutet, dass diese Information zwischen den Spezies nahezu unverändert ist und die Sequenzen in diesen Bereichen große Ähnlichkeiten aufweisen. Ein spezieller, nur für eine Spezies funktionierender Primer sollte daher in einem nichtkonservierten DNA-Abschnitt liegen, da sich die Spezies dort voneinander unterscheiden und so gewährleistet werden kann, dass die komplementäre Bindung von Primer und DNA sowie die PCR-Amplifikation wirklich nur bei der gewünschten Art stattfinden.

5.5.5 Medreonet – molekularbiologische Ringtests

Die Ausbreitung der Blauzungenkrankeheit in Europa und die damit einhergehende Notwendigkeit zur Klärung der Vektorenfrage machte es erforderlich, die teilnehmenden EU-Staaten auf einen vergleichbaren Stand in der Vektorenbestimmung zu bringen. Die Arbeitsgruppe sowie das FLI nahmen erfolgreich an zwei Ringtests teil, die vom CIRAD, Frankreich, organisiert wurden und die der Standardisierung der Gnizen-Bestimmung dienen sollten. Die vorliegenden Arbeiten bestätigten die Eignung der etablierten Methode für die molekularbiologische Bestimmung. Probleme und Lücken wurden konstruktiv mit den anderen teilnehmenden Institutionen diskutiert und minimiert. Die Ergebnisse dieser Studie werden im EU-Rahmen in Kürze unter: <http://medreonet.cirad.fr/> verfügbar sein.

5.6 Virusnachweis einheimischer *Culicoides*

Neben der morphologischen Grob- und Feindifferenzierung der Fänge des entomologischen Monitorings war ein Schwerpunkt der Arbeit der Nachweis von BTV-Genom. Hierzu wurden die meisten der gesammelten Gnitzen zum Nationalen Referenzlabor für Blauzungenkrankheit (NRL-BT) am Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) auf der Insel Riems versandt.

5.6.1 Virusnachweis im Entomologischen Monitoring (Pool-Nachweis)

Hier wurden aus den eingesandten Gnitzen Pools von bis zu 50 Tieren hergestellt. Nach Extraktion der Gesamt-RNA wurden die Pools auf das Vorkommen von BTV-8-Genom mittels real-time RT-PCR analysiert. Insgesamt wurden 24 513 Pools auf das Vorkommen von BTV-8 untersucht. Bei 585 Pools (2,4%) konnte ein positiver BTV-8-Genomnachweis geführt werden (siehe Abb. 44). Allerdings war eine genetische Charakterisierung der positiven Pools aufgrund der Multi-Spezies-Zusammensetzung nur bedingt möglich (Hoffmann et al. 2009).

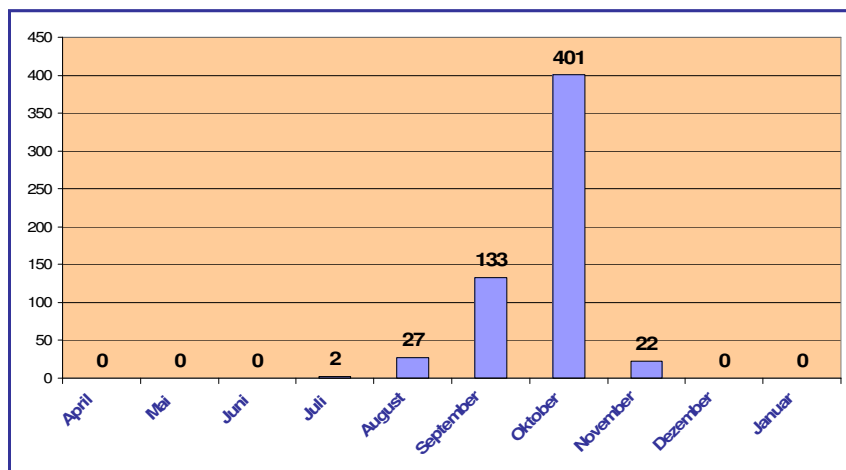


Abb. 40: Monatlicher Nachweis von BTV-8 in Gnitzen aus dem entomologischen Monitoring 2007/2008

5.6.2 Virusnachweis in Einzelindividuen

Um Aussagen treffen zu können, welche Arten als Vektoren im Rahmen des Geschehens der Blauzungenkrankheit in Frage kommen, ist der Virusnachweis im Einzelindividuum notwendig. Nur so lassen sich der positive BTV-Genomnachweis und die genetische Identifizierung der Art sicher durchführen. Da die umfassende Einzeluntersuchung von Gnitzen aufgrund der teilweisen geringen BTV-Prävalenz nicht kostengünstig ist, wurden durch die oben genannten Pooluntersuchungen Gnitzenfänge identifiziert, die eine erhöhte BTV-Prävalenz aufwiesen. Gleichzeitig wurde bei diesen Analysen ein kleiner Rest für mögliche Nachuntersuchungen zurückgehalten.

Das Ziel der hier vorgestellten Studie war, ausgehend von den bei der Untersuchung von Poolproben gemachten Erfahrungen, die Identifizierung von Fängen mit hoher BTV-Prävalenz, die Extraktion der Gesamt-RNA für jede Einzelgnitze aus vorhandenen Restbeständen, sowie der individuelle BTV-Genomnachweis mittels real-time RT-PCR. Darüber hinaus sollten die identifizierten BTV-positive Einzelgnitzen genetisch charakterisiert und typisiert werden.

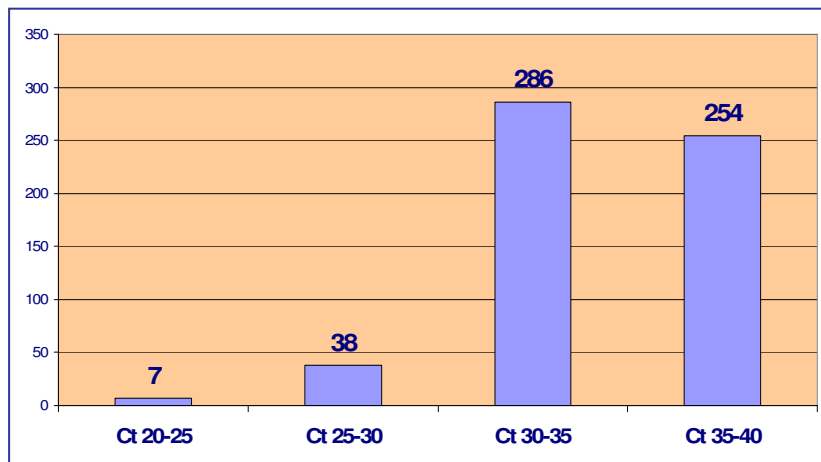


Abb. 41: Virusgenomlast in BTV-8-positiven Gnitzen-Pools des entomologischen Monitoring 2007/2008

Nach Aufteilung der Restgnitzen zeigte sich, dass 2600 Einzelgnitzen der Einsendung BH306/07 für die Untersuchungen noch zur Verfügung standen. Diese Gnitze wurden in 2ml Eppendorfgefäße einzeln überführt und homogenisiert. Die extrahierte RNA wurde in einer Pan-BTV real-time RT-PCR eingesetzt. Von positiven Proben wurde die real-time RT-PCR wiederholt. Proben wurden nur dann als sicher positiv gewertet, wenn beide unabhängigen PCR-Läufe ein positives Resultat erbrachten. Die Ct-Werte beider PCR-Läufe wurden gemittelt.

Im Ergebnis der Untersuchungen kann festgehalten werden, dass 285 Einzelgnitzen in beiden PCR-Läufen positiv reagierten. Somit konnten bei 10,96% der 2600 untersuchten Einzelgnitzen ein sicherer BTV-Genom-Nachweis geführt werden. 3 Einzelgnitzen (1,05% der positiven Gnitzen) zeigten einen mittleren Ct-Wert unter 30 und 50 weitere Gnitzen lieferten noch einen Ct-Wert unter 35 (17,54% der positiven Gnitzen). Genaue Angaben zu den Ct-Werten der BTV-real-time RT-PCR sind in Tabelle 11 gelistet.

5.6.2.1 Genetische Charakterisierung von BTV-positiven Einzelgnitzen

Basierend auf den ermittelten BTV-Genomlasten erfolgte die Auswahl der zur genetischen Charakterisierung vorgesehenen Einzelgnitzen. Für alle Gnitzen (insgesamt 53), die einen Ct-Wert <35 in der BTV-real-time PCR aufwiesen, wurde eine genetische Charakterisierung angestrebt. Dazu wurde das jeweilige Pan-*Culicoides*-IC-Fragment aufgereinigt und sequenziert. Die höchste Homologie der ermittelten Sequenzen wurde mittels BLASTn-Suche definiert. Für 40 der 53 wurde eine auswertbare Sequenz generiert. In der BLASTn-Search zeigte sich, dass 31 Gnitzen die höchste Sequenzhomologie zu *C. scoticus*-Sequenzen der GenBank aufwiesen. Weitere sieben Gnitzen konnten der Art *C. obsoletus* s.s. zugeordnet werden. Jeweils eine Gnitze zeigte die höchste Sequenzverwandtschaft zu einem Vertreter der Art *C. dewulfi* und der Art *C. lupicaris*. Für 13 BTV-positive Gnitzen konnte entweder kein Pan-*Culicoides*-IC-Fragment erzeugt werden oder die Sequenzierung der Gnitzen-DNA erbrachte keine auswertbaren Resultate. Die genauen Ergebnisse der bisherigen genetischen Charakterisierung sind in Tabelle 11 dargestellt.

Einsendungs-Nr.	Gnitzen-Nr.	Mittlere Ct-Wert der BTV-real-time RT-PCR	Ergebnis der genetischen Charakterisierung
BH 306-07	12-114	29,01	C. obsoletus s.s.
BH 306-07	9-7	29,21	C. scoticus
BH 306-07	12-419	29,69	C. scoticus
BH 306-07	12-37	30,6	C. scoticus
BH 306-07	1-7	31,29	C. scoticus
BH 306-07	1-42	32,11	C. scoticus
BH 306-07	1-8	32,2	C. scoticus
BH 306-07	1-85	32,54	C. scoticus
BH 306-07	1-23	32,65	C. scoticus
BH 306-07	1-12	32,75	C. scoticus
BH 306-07	2-340	32,84	C. scoticus
BH 306-07	32-17	33,12	C. scoticus
BH 306-07	1-62	33,16	C. scoticus
BH 306-07	1-22	33,25	nicht auswertbar
BH 306-07	1-48	33,26	C. scoticus
BH 306-07	1-57	33,28	C. scoticus
BH 306-07	1-50	33,33	C. scoticus
BH 306-07	1-73	33,34	C. obsoletus s.s.
BH 306-07	1-46	33,37	C. scoticus
BH 306-07	1-41	33,4	C. scoticus
BH 306-07	2-332	33,42	C. obsoletus s.s.
BH 306-07	18-265	33,45	C. scoticus
BH 306-07	1-18	33,63	C. scoticus
BH 306-07	12-484	33,65	C. obsoletus s.s.
BH 306-07	12-53	33,67	C. scoticus
BH 306-07	1-15	33,78	C. scoticus
BH 306-07	1-4	33,85	C. scoticus
BH 306-07	1-45	33,88	C. scoticus
BH 306-07	12-212	33,92	C. obsoletus s.s.
BH 306-07	30-3	33,93	C. lupicaris
BH 306-07	32-8	34,03	C. scoticus
BH 306-07	2-520	34,07	C. scoticus
BH 306-07	2-73	34,08	C. scoticus
BH 306-07	1-32	34,1	C. scoticus
BH 306-07	12-35	34,13	C. scoticus
BH 306-07	1-89	34,17	nicht auswertbar
BH 306-07	1-69	34,24	C. scoticus
BH 306-07	2-184	34,25	C. obsoletus s.s.
BH 306-07	29-31	34,25	C. dewulfi
BH 306-07	1-55	34,31	nicht auswertbar
BH 306-07	29-11	34,34	nicht auswertbar
BH 306-07	29-76	34,47	C. scoticus
BH 306-07	30-17	34,51	nicht auswertbar
BH 306-07	29-20	34,52	nicht auswertbar
BH 306-07	1-40	34,6	C. scoticus
BH 306-07	30-6	34,68	nicht auswertbar
BH 306-07	2-127	34,77	nicht auswertbar
BH 306-07	29-38	34,79	nicht auswertbar
BH 306-07	12-38	34,82	nicht auswertbar
BH 306-07	29-87	34,85	nicht auswertbar
BH 306-07	12-401	34,89	nicht auswertbar
BH 306-07	12-51	34,96	C. obsoletus s.s.
BH 306-07	29-64	34,97	nicht auswertbar

Tabelle 11: Ergebnisse der Pan-BTV-real-time RT-PCR und der genetischen Charakterisierung von 53 Gnitzen mit der höchsten Virusgenomlast

5.6.2.2 Diskussion der Ergebnisse

Basierend auf den BTV-real-time RT-PCR-Resultaten des entomologischen Monitorings 2007/2008 (Hoffmann et al. 2009) wurde die Einsendung BH306/07 aus Rheinland-Pfalz als die Einsendung mit der höchsten BTV-Prävalenz identifiziert. Die Rückhalteproben von 2600 Gnitzen wurden einzeln auf BTV analysiert. Hierbei wurde bei 285 Einzelgnitzen BTV-Genom sicher festgestellt.

Bei 73 Gnitzen konnte ein mittlerer Ct-Wert unter 35 gefunden werden. Bei diesen Gnitzen mit der höchsten BTV-Genomlast wurde mittels Sequenzierung des Pan-Culicoides-IC-Fragmentes die genetische Charakterisierung angestrebt. Bei 60 Proben konnte eine auswertbare Sequenz für einen Sequenzabgleich mittels BLASTn generiert werden.

Die Sequenzen von 31 Gnitzen waren zu Sequenzen der Art *C. scoticus* homolog, 7 zu *C. obsoletus* und je eine Gnitze zeigte die höchste Homologie zu Gnitzen der Arten *C. dewulfi* und *C. lupicaris*. Das Ergebnis zeigt, dass sicher nicht nur eine Gnitzenart für die Infektion und fulminante Verbreitung von BTV-8 im Jahre 2007 verantwortlich war.

Allerdings könnte das Ergebnis auch darauf hin deuten, dass *C. scoticus* im BTV-8-Ausbruchsgeschehen eine besondere Bedeutung zukommt. Ergebnisse von Infektionsversuchen mit BTV-8 mit verschiedenen Gnitzenarten deuten ebenfalls darauf hin, dass *C. scoticus* ein hochkompetenter Vektor in Nord- und Mitteleuropa sein könnte (Carpenter et al. 2008). Weitere Untersuchungen sind notwendig um die in dieser Studie bisher generierten Daten zu verifizieren.

Durch Sequenzierung alternativer Genabschnitte (z.B. Cytochrom Oxidase Unit I) muss das Ergebnis der oben genannten genetischen Charakterisierung auf Basis von ITS2 bestätigt werden. Diese alternative Sequenzierungsstrategie kann auch helfen, für die Gnitzen, für die bisher keine verwertbare Sequenz erzielt wurde, eine genetische Charakterisierung durchführen zu können.

Die bei Hoffmann et al. (2009) gemachten genetischen Charakterisierungen der BTV-positiven Pools basierte auf einer Spezies-spezifischen PCR nach Nolan et al. (2007). Hier wurde vor allem *C. obsoletus* s.s. als wahrscheinlicher kompetenter Vektor identifiziert. Leider hat sich bei unseren Arbeiten und auch nachfolgenden internationalen Ringtesten (Medreonet) zur genetischen Charakterisierung von Gnitzen des *C. obsoletus*-Komplexes herausgestellt, dass gerade die Methode nach Nolan et al. (2007) nicht geeignet ist, die genetische Identifikation von Gnitzen der Art *C. scoticus* zu ermöglichen. Somit stehen die hier gemachten Erkenntnisse nicht im Widerspruch zu den bereits zuvor gemachten Analysen der Poolproben. Alternative, besser validierte PCR-Verfahren zur genetischen Identifizierung von Gnitzen stehen zur Verfügung (Mathieu et al., 2007) und sollten genutzt werden, um die genetische Charakterisierung der BTV-positiven Einzelgnitzen weiter zu verifizieren.

Für die weitere Einschätzung des gehäuften Auftretens von *C. scoticus* in den BTV-positiven Gnitzen ist es unerlässlich, den Anteil von *C. scoticus* in der untersuchten Gesamtpopulation zu ermitteln.

Damit soll geklärt werden, ob es eine Überrepräsentation von *C. scoticus* in BTV-positiven Gnitzen gibt oder ob der Anteil von *C. scoticus* über die gesamte analysierte Population sehr hoch war und dadurch der hohe Anteil von *C. scoticus* bei den BTV-positiven Gnitzen begründbar wäre. Um diese Frage zu klären, sind genetische Charakterisierungen von BTV-negativen Gnitzen durchzuführen. Dies kann einerseits durch die Sequenzierung einer repräsentativen Zahl von BTV-negativen Gnitzen erfolgen.

Alternativ und einfacher umsetzbar wäre die Anwendung der spezies-spezifischen PCR nach Mathieu et al. (2007).

Sollte sich in weiteren Experimenten herausstellen, dass *C. scoticus* in der Gruppe der BTV-positiven Gnitzen der Einsendung 306/07 überrepräsentiert ist, wären entsprechende vergleichende Untersuchungen mit anderen Gnitzenfängen aus anderen Gebieten und Zeitpunkten sinnvoll. Nur so lassen sich allgemeingültige Aussagen zur Vektorkompetenz für BTV ableiten. Für diese Studien liegen weitere Rückstellproben (z.B. aus Hessen) zur Untersuchung bereit.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass in einer sehr umfangreichen Analyse von Einzelgnitzen aus einem BTV-Ausbruchsgebiet sehr erfolgreich BTV-8-positive Gnitzen identifiziert und teilweise 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.

6 Abschlussbetrachtung

(nach Kampen & Werner 2010)

Mit wenigen Ausnahmen fanden Vektor-assoziierte Erkrankungen in Mittel- und Nordeuropa lange Zeit wenig Beachtung. Seit den Ausbrüchen der Blauzungenkrankheit (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.

7 Danksagung

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

Müncheberg, 20.06.2010

Dr. Doreen Werner

8 Literatur

- AKIBA, K. (1960): Studies on the Leucocytozoon found in the chicken in Japan. On the transmission of *L. caulleryi* by *Culicoides arakawae*. – Japanese Journal of Veterinary Science 22: 309-317, Tokyo.
- ANDERSON, R. C. (2000): Nematode parasites of vertebrates. Their Development and Transmission. – CABI Publishing, 2. Auflage. 1-664, Wallingford.
- Anonymus (1867/1877): Entomological investigations. – Annual report of the Council for Scientific and Industrial Research, Australia, 1931–1932: 20-23, Canberra.
- BECKER, C. H. (1974): Bluetongue. – In: Beer, J. (Hrsg.): Infektionskrankheiten der Haustiere Teil I, Gustav-Fischer-Verlag, 1-692, Jena.
- 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(2): 345-349.
- BENSASSON, D.; ZHANG, D. X.; HARTL, D. L. & HEWITT, G. M. (2001): Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. - Trends Ecol. Evol. 16: 314–321.
- BISHOP, A. L. & MCKENZIE, H. J. (1994): Overwintering of *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) in the Hunter Valley, New South Wales. – Journal of the Australian Entomological Society 33: 159-163, Canberra.
- BOORMAN, J. (1993): Biting midges (Ceratopogonidae). In: Lane, R. P. & Crosskey, R. W. (eds.): Medical Insects and Arachnids. – Chapman & Hall, 1-309, London.
- BORKENT, A. & WIRTH, W. W. (1997): World species of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). – Bulletin of the American Museum of Natural History 233: 1–257, New York.
- BORKENT, A. (2006): World species of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). – Royal British Columbia Museum Kanada, 1-240, Victoria.
- BORKENT, A. (2008): World Species of Biting Midges (Diptera: Ceratopogonidae). - <http://www.inhs.uiuc.edu/research/FLYTREE/CeratopogonidaeCatalog.pdf>
- BRAVERMAN, Y. (1994): Nematocera (Ceratopogonidae, Psychodidae, Simuliidae and Culicidae) and control methods. – Revue scientifique et technique / Office International des Epizooties 13: 1175-1179, Paris.
- 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.
- CARPENTER, S.; LUNT, H. L.; ARAV, D.; VENTER, G. J. & MELLOR, P. S. (2006): Oral susceptibility to bluetongue virus of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) from the United Kingdom. – Journal of Medical Entomology 43: 73-78, College Park, MD.

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(20):589–592.

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.

CLAUSEN, P.-H.; STEPHAN, A.; BARTSCH, S.; JANDOWSKY, A.; HOFFMANN-KÖHLER, P.; SCHEIN, E.; MEHLITZ, D. & BAUER, B. (2009): Seasonal dynamics of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae, *Culicoides* spp.) on dairy farms of Central Germany during the 2007/2008 epidemic of bluetongue. – *Parasitol. Res.* 105: 381-386.

CONRATHS, F. J.; BEER, M.; HOFFMANN, B.; GETHMANN, J.; KRAMER, M.; UNGER, F. & STAUBACH, C. (2007): Übertragung der Blauzungenkrankheit durch *Culicoides* spp. in Westeuropa. – *Vet-Med-Report V5* 31: 1-2, Berlin.

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. – *Der praktische Tierarzt* 88 Suppl. 2: 9-15, Hannover.

CONRATHS, F.J.; HOFFMANN, B.; BEER, M.; BAUER, B.; CLAUSSEN, P.-H.; BAUER, C.; BÄTZA, H.-J.; GEIER, M.; GETHMANN, J.M.; KIEL, E.; LIEBISCH, G.; LIEBISCH, A.; MEHLHORN, H.; SCHAUB, G.A. & WERNER, D. (2009): *Culicoides obsoletus* sensu stricto. Wichtiger Vektor für Blauzungenkrankheit in Deutschland. — *Vet.-Med. Report* 33, Sonderreport V5: 6.

DADHICH, H. (2004): Bluetongue: an overview of recent trends in diagnostics. – *Veterinaria Italiana* 40: 564-566, Faenza.

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.

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. - *Bioinformation* 2: 456-460.

DELECOLLE, 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 : 1-238, Strasbourg.

DEPAQUIT, J.; FERTE, H.; LEGER, 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.

DOWNES, J. A. & WIRTH, W. W. (1981): Ceratopogonidae. – 393-421. – In: McALPINE et al. (eds.): Manual of Nearctic Diptera. Vol. 1. – Research Branch Agriculture Canada, Monograph 27: 1-674.

DJURIČIĆ, B.; JERMOLENKO, G.; MILOSEVIĆ, B.; RADOJIĆIĆ, S; DEBELJAK, Z. & TOMIĆ, A. (2004): The first bluetongue virus isolation in Yugoslavia. – Veterinaria Italiana 40: 581-582, Faenza.

DRUMMOND, D. C. & BOORMANN, J. (2003): Further records of some *Aurum* species and their insect visitors. – Entomologists Monthly Magazine 139: 163-166, Brightwood.

DRUMMOND, D. C. & HAMMOND, P. M. (1991): Insects visiting *Aurum dioscoridis* Sm. and *A. orientale* M. BIEB. – Entomologists Monthly Magazine 127: 151-156, Brightwood.

DUBAY, S. A.; ROSENSTOCK, S. S.; STALLKNECHT, D. E. & DEVOS, J. C. (2006): Determining prevalence of bluetongue and epizootic hemorrhagic disease viruses in mule deer in Arizona (USA) using whole blood dried on paper strips compared to serum analyses. – Journal of Wildlife Diseases 42: 159-163, Ames.

EDWARDS, F. W. (1939): Ceratopogonidae. - 25-50. – In: EDWARDS, F. W.; OLDROYD, H. & SMART, J. (Hrsg.): British blood-sucking flies. i-viii + 1-156, 45 Tafeln, British Museum, London.

FREEMAN, W.M.; WALKER, S.J. & VRANA, K.E. (1999): Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. - Biotechniques 26(1): 112-122.

FRENZEL, M. (1993): Gnitzen (Diptera: Ceratopogonidae) und Cantharidin. Die Gier nach einem außergewöhnlichen Naturstoff; Phänomen und experimentelle Ansätze zur Klärung der Ursachen der Canthariphilie. –Dissertation Universität Bayreuth: 1-168, Bayreuth.

FRENZEL, M. & DETTNER, K. (1994): Quantification of cantharidin in canthariphilous Ceratopogonidae (Diptera), Anthomyiidae (Diptera) and cantharidin-producing Oedemeridae (Coleoptera). – Journal of Chemical Ecology 20: 1795-1812, Dordrecht.

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 *Hepatozoon* (= *Plasmodium*) *kochi* (LAVERAN, 1899). – Nature 190: 739-741, London.

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

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.

- GOFFREDO, M., ROMEO, G., MONACO, F., GENNARO, A. D. & SAVINI, G. (2004): Laboratori survival and blood feeding response of wild-caught *Culicoides obsoletus* complex (Diptera: Ceratopogonidae) through natural and artificial membranes. – *Veterinaria Italiana* 40: 282-285, Faenza.
- GOMULSKI, L.M.; MEISWINKEL, R.; DELECOLLE, 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.
- GRAY, D. P. & BANNISTER, G. L. (1961): Studies on Bluetongue — I. Infectivity of the virus in the sheep ked, *Melophagus ovinus* (L.). – *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science* 25: 230-232, Ottawa.
- HAVELKA, P. (1976): Limnologische und systematische Studien an Ceratopogoniden (Diptera: Nematocera). – *Beiträge für Entomologie* 26: 211-305, Berlin.
- HAVELKA, P. (1978): Ceratopogonidae. – In: ILLIES, J. (Hrsg.): *Limnofauna Europaea*. Gustav-Fischer-Verlag 1-532, Stuttgart.
- HAVELKA, P. & AGUILAR, M. (1999): Ceratopogonidae. – 33-38. – In: SCHUMANN, H. BÄHRMANN, R. & STARK, A. (Hrsg.): *Checkliste der Dipteren Deutschlands*. – *Studia Dipterologica Suppl.* 2: 1-354, Halle (Saale).
- HENDRICKX, P.; DE LA ROCQUE, S.; ALBINA, E.; DELÉCOLLE, J.-C.; ZIENTARA, S. & GREGORY, M. (1998): The diseases emerging as a result of global warming and the spread of wetlands – The impact on animal health: the case of blue-tongue of sheep. *EID Méditerranée: Climate Change: Fantasy or Reality*. – *Proceedings of Round Tables*. www.eid-med.org/FR/les_Actes/les_actes_en_ang/hendrick_bas.htm
- HILLIS D. M. (1991): Evidence for biased gene conversion in concerted evolution of ribosomal DNA. - *Science* 251: 308-310.
- HO, M.-W. & CUMMINS, J. (2008): Horizontal Gene Transfer from GMOs Does Happen. - *ISIS*, 10.03.
- 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. & F.J. CONRATHS (2009): Monitoring of putative vectors of bluetongue virus serotype 8, Germany. — *Emerg. Infect. Dis.* 15: 1481-1484.
- HOURRIGAN, J. L. & KLINGSPORN, A. L. (1975): Bluetongue: the disease in cattle. – *The Australian Veterinary Journal* 51: 170-174, Sidney.
- HULL, R.; BROWN, F. & PAYNE, C. C. (1989): *Virology, directory and dictionary of animal, bacterial and plant viruses*. – Macmillan Press Ltd, 1-325, London.
- 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. - *Proceedings of the Royal Society* 272: 1525-1534.

KAMPEN, H.; KIEL, E. & SCHRÖDER, W. (2007): Blauzungenkrankheit in Deutschland 2006. Epizootiologischer Hintergrund, entomologische Analyse und notwendige Konsequenzen (Diskussionsbeitrag). – UWSF - Zeitschrift für Umweltchemie und Ökotoxikologie 19: 37-46, Landsberg.

KAMPEN, H. & WERNER, D. (2010): Three years of bluetongue disease in northern Europe: what lessons can be learned? — Wiener Klinische Wochenschrift, im Druck.

KETTLE, D. S. (1962): The bionomics and control of *Culicoides* and *Leptoconops* (Diptera, Ceratopogonidae = Heleidae). – Annual Review of Entomology 7: 401-418, Palo Alto.

KIEHL, E.; WALLDORF, V.; KLIMPEL, S.; AL-QURAIISHY, 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(2):331-336.

KIEL, E.; LIEBISCH, G.; FOCKE, R.; LIEBISCH, A. & WERNER, D. (2009): Monitoring of *Culicoides* at 20 locations in northwest Germany. — Parasitol. Res. 105: 351-357, 591.

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.

LANGNER, K. F. A. (2005): Das Sommerexzem des Pferdes: Untersuchungen zu potentiellen Allergenen aus *Culicoides nubeculosus*. – Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover: 1-178, Hannover.

LIBERATO, C. DE; PURSE, B. V.; GOFFREDO, M.; SCHOLL, F. & SCARAMOZZINO, P. (2003): Geographical and seasonal distribution of the bluetongue virus vector, *Culicoides imicola*, in central Italy. – Medical and Veterinary Entomology 17: 388-394, Oxford.

LINLEY, J. R. (1985): Biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) as vectors of nonviral animal pathogens. – Journal of Medical Entomology 22: 589-599, Honolulu.

LINLEY, J. R.; HOCH, A. L. & PINHEIRO, F. P. (1983): Biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) and human health. – Journal of Medical Entomology 20: 347-364, Honolulu.

LINLEY, J. R. & ADAMS, G. M. (1972): A study of the mating behaviour of *Culicoides melleus* (COQUILLET) (Diptera: Ceratopogonidae). – Transactions of the Royal Entomological Society of London 124: 81-121, London.

LUNT, D.H.; ZHANG, D.X.; SZYMURA, J.M. & HEWITT, G.M. (1996): The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. - Insect Mol. Biol. 5:153-165.

MACLACHLAN, N. J. (2004): Bluetongue: pathogenesis and duration of viraemia. – Veterinaria Italiana 40: 462-467, Faenza.

- MACLACHLAN, N. J.; DANIELS, P. W.; PEARSON, J. E.; SENDOW, I.; PRITCHARD, L. I.; SUKARSIH, E. A. T. (2004): Regional overview of bluetongue viruses in South-East Asia: viruses, vectors and surveillance. – *Veterinaria Italiana* 40: 94-100, Faenza.
- 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(6):1019-1025.
- MECHAM, J. O.; WHITE, D. M.; DROLET, B. S. & WILSON, W. C. (2005): Persistence of bluetongue virus in the insect vector and its implications for disease control. – *United States Animal Health Association Proceedings* 108: 100-107, Richmond, VA.
- MEHLHORN, H.; WALLDORF, V.; KLIMPEL, S.; JAHN, B.; JAEGER, F.; ESCHWEILER, J.; HOFFMANN, B. & BEER, M. (2007): First occurrence of *Culicoides obsoletus* - transmitted bluetongue virus epidemic in central Europe. – *Parasitology Research* 101: 219-228, Berlin.
- 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.; NEVILL, E. M. & VENTER, G. J. (1994): Vectors: *Culicoides* spp. – *Australian Journal of Zoology* 38: 68-89, Melbourne.
- MEIGEN, J. W. (1830): Systematische Beschreibung der bekannten europäischen zweiflügeligen Insekten 6: 1-401, Hamm.
- MEISWINKEL, R.; NEVILL, E. M. & VENTER, G. J. (1994): Vectors: *Culicoides* spp. – *Australian Journal of Zoology* 38: 68-89, Melbourne.
- MEISWINKEL, R.; VAN RIJN, P.; LEIJS, P. & GOFFREDO, M. (2007): Potential new *Culicoides* vector of bluetongue virus in northern Europe. – *Veterinary Record* 161: 564-565, London.
- 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 & HENRY). – *Annals of Tropical Medicine Parasitology* 4: 463–469, Leeds.
- MELLOR, P. S. & LEAKE, C.J. (2000): Climatic and geographic influences on arboviral infections and vectors. – *Revue scientifique et technique / Office International des Epizooties* 19: 41-54, Paris.
- MELLOR, P. S., BOORMAN, J. & BAYLIS, M. (2000): *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors. – *Annual Review of Entomology* 45: 307-340, Palo Alto, CA.

- MELLOR, P. S. (2004): Infection of vectors and bluetongue epidemiology in Europe. – *Veterinaria Italiana* 40: 167-174, Faenza.
- 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, London.
- MULLEN, G. (2002): Biting midges (Ceratopogonidae). In: MULLEN, G. & DURDEN, L. (eds): *Medical and veterinary Entomology*. Elsevier Academic Press, Amsterdam. 163-183.
- MULLENS, B. A. & HOLBROOK, F. R. (1991): Temperature effects on the gonotrophic cycle of *Culicoides variipennis* (Diptera, Ceratopogonidae). – *Journal of the American Mosquito Control Association* 7: 588-591, Mount Aurel, NJ.
- 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. – *Veterinary Parasitology* 140: 35-43, Ranchi.
- MURRAY, J. O. & TRAINER, D. O. (1970): Bluetongue virus in North American elk. – *Journal of Wildlife Diseases* 6: 144-148, Ames.
- NOLAN, D. V.; DALLAS, J. F. & MORDUE A. J. (2004): Molecular taxonomy and population structure of a *Culicoides* midge vector. – *Veterinaria Italiana* 40 (3): 352-359, Faenza.
- 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(1-2): 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. – Dissertation Tierärztliche Hochschule Hannover: 1-159, Hannover.
- OLSEN, O. W. (1974): *Animal Parasites, their Life Cycles and Ecology*. – University Park Press, 3. Auflage: 1-562, Baltimore, MD.
- OSMANI, A.; MURATI, B.; KABASHI, Q.; GOGA, I.; BERISHA, B. & WILSMORE, A. J. (2006): Evidence for the presence of bluetongue virus in Kosovo between 2001 and 2004. – *Veterinary Record* 158: 393, London.
- OTTLEY, M. L. & MOORHOUSE, D.E. (1980): Laboratory transmission of *Onchocera gibsoni* by *Forcipomyia (Lasiohelea) townsvillensis*. – *Australian Veterinary Journal* 56: 559-60, Sidney.
- OTTLEY, M. L.; DALLEMAGNE, C. & MOORHOUSE, D. E. (1983): Equine onchocerciasis in Queensland and the Northern territory of Australia. – *Australian Veterinary Journal* 60: 200-203, Sidney.

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.

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 Reviews Microbiology 3: 171-183, Basingstoke.

RAWLINGS, P. (1996): A key, based on wing pattern of biting midges (genus *Culicoides* Latreille – Diptera: Ceratopogonidae) in the Iberian Peninsula, for use in epidemiological studies. - Graellsia 52: 57-71.

ROBINSON, R. M.; HAILEY, T. L.; LIVINGSTON, C. W. & THOMAS, J. W. (1967): Bluetongue in the Desert Bighorn Sheep. – Journal of Wildlife Management 31: 165-168, Lawrence.

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 reassortment in the vector. – Journal of General Virology 68: 2319-2329, Reading.

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. - Bulletin of Entomological Research 99(4): 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.

SELLERS, R. F. (1992): Weather, *Culicoides*, and the distribution and spread of bluetongue and African horse sickness viruses. – In: WALKER, T. E. & OSBURN, B. I. (Hrsg.), Bluetongue, African Horse Sickness, and Related Orbiviruses. – CRC Press, 1-1042, Boca Raton, FL.

STEINKE, D. & BREDE, N. (2006): Taxonomie des 21. Jahrhunderts – DNA-Barcoding. - Biuz 36: 40-46.

SELLERS, R. F. & MELLOR, P. S. (1993): Temperature and the persistence of viruses in *Culicoides* spp. during adverse conditions. – Revue scientifique et technique / Office International des Epizooties 12: 733-755, Paris.

SERVICE, M. (2000): Medical Entomology for Students, 2nd Edition, Cambridge University Press: 1-283, Cambridge, England.

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. – Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 96: 451-458, Rio de Janeiro.

SMITH, K. G. V. (1973): Insects and other arthropods of medical importance. – British Museum (Natural History), i-xiv + 1-561, 11 Tafeln, London.

TANYA, V. N.; GREINER, E. C. & GIBBS, E. P. J. (1992): Evaluation of *Culicoides insignis* (Diptera: Ceratopogonidae) as a vector of bluetongue virus. – Veterinary Microbiology 31: 1-14, Amsterdam.

TAKAMATSU, H.; MELLOR, P. S.; MERTENS, P. P. C.; KIRKHAM, P. A.; BURROUGHS & PARKHOUSE, R. M. E. (2005): A possible overwintering mechanism for bluetongue virus in the absence of the insect vector. – Journal of General Virology 84: 227-235, Berlin.

THANWISAI, A., KUVANGKADILOK, C. & BAIMAI, V. (2006): Molecular phylogeny of black flies (Diptera: Simuliidae) from Thailand, using ITS2 rDNA. - Genetica 128: 177-204.

THORNE, E. T.; WILLIAMS, E. S.; SPRAKER, T. R.; HELMS, W. & SEGERSTROM, T. (1988): Bluetongue in free-ranging pronghorn antelope (*Antilocapra americana*) in Wyoming: 1976 and 1984. – Journal of Wildlife Diseases 24: 113-119, Ames.

TOUSSAINT, J.F.; SAILLEAU, C.; BREARD, E.; ZIENTARA, S. & DE CLERCQ, K. (2007) : Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. – J. Virol. Methods 140(1-2): 115-123.

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). – Journal of Parasitology 88: 864-868, Lawrence.

VALKIŪNAS, G. & IEZHOVA, T. A. (2004): Transmission of *Haemoproteus belopoluskyi* (Haemosporida: Haemoproteidae) of blackcap by *Culicoides impunctatus* (Diptera: Ceratopogonidae). – Journal of Parasitology 90: 196–198, Lawrence.

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. – Veterinary Parasitology 93: 113-120, Amsterdam.

WERNER, D. & KAMPEN, H. (2007): Gnitzen (Diptera: Ceratopogonidae). Informations-schrift zur Morphologie, Lebensweise und Verbreitung der Mücken sowie zum Schadbild und zur Epidemiologie der Blauzungenkrankheit in Deutschland. – Studia dipterologica 14: 231-257.

WHITE, D. M.; WILSON, W. C.; BLAIR, C. D. & BEATY, B. J. (2005): Studies on overwintering of bluetongue viruses in insects. – Journal of General Virology 86: 453-462, Berlin.

WILSON, W. C.; DROLET, B. S. & MECHAM, J. O. (2005): Update on bluetongue virus persistence in *Culicoides sonorensis*. – United States Animal Health Association Proceedings, 109th Annual Meeting, 3.-10.11.2005, Hershey, PA.

WIRTH, W.W. (1956): New species and records of biting midges ectoparasitic on insects (Diptera; Heleidae). – *Annals of the Entomological Society of America* 49: 356-364, Lanham.

WITTMANN, E.J. & BAYLIS, M. (2000): Climate change: effects on *Culicoides*-transmitted viruses and implications for the UK. – *Veterinary Journal* 160: 107-117, Amsterdam.

VORSPRACH, B.; MEISER, C.K.; WERNER, D.; BALCZUN, C. & SCHAUB, G.A. (2009): Monitoring of ceratopogonidae in southwest Germany. – *Parasitol Res.* 105(2): 337-344.