

Schlussbericht zum Projekt

**Gniten als Vektoren von Viren in Deutschland unter
Berücksichtigung sich ändernder klimatischer
Bedingungen (CeratoVir)**

Teilprojekt 1 (Projektpartner FLI)

(Laufzeit: 01.05.2018 – 30.06.2022)

Friedrich-Loeffler-Institut (FLI)

gefördert durch die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE)

unter dem Förderkennzeichen

281B101816

I. Kurzdarstellung

I.1. Aufgabenstellung

FLI war an folgenden Arbeitspaketen des Verbundprojekts beteiligt:

2. Genetische Gnitzen-Identifizierung
3. Pathogen-Screening
5. Gnitzen-Zucht
4. Infektionsversuche

Die im Verbundprojekt insgesamt gewonnenen Daten sollten helfen, die Epidemiologien der Blauzungen- und der Schmallenbergkrankheiten sowie die Rolle der Überträger der verursachenden Viren – insbesondere vor dem Hintergrund eines sich verändernden Klimas – besser zu verstehen, Risikoanalysen zu ermöglichen und gezielte prophylaktische und reaktive Maßnahmen zu unterstützen.

I.1.2. Arbeitspaket 2 „Genetische Gnitzen-Identifizierung“

In diesem Teilprojekt sollten zum einen ausgewählte Unterproben des im Rahmen des Arbeitspakets 1 (Gnitzen-Monitoring) durch den Projektpartner ZALF gesammelten und vorsortierten Gnitzenmaterials genetisch bis auf Artebene identifiziert werden. Im Falle der viruspositiv getesteten Gnitzen sollte so eine Korrelation zwischen Gnitzen- und Virusspezies hergestellt werden.

Des Weiteren sollten PCR-Identifizierungstests für die Gnitzen der *Obsoletus*- und *Pulicaris*-Gruppen entwickelt werden, die alle bis heute beschriebenen Spezies und deren genetische Varianten (Haplotypen) erkennen würden, um taxonomisch-systematische Lücken zu schließen.

I.1.3. Arbeitspaket 3 „Pathogen-Screening“

Die vom ZALF zur Verfügung gestellten Gnitzenproben sollten mit evaluierten real-time RT-PCR Techniken auf das Vorkommen der viralen Erreger BTV und SBV untersucht werden. Die Resultate sollten zum einen Rückschlüsse auf die räumlich-zeitliche Zirkulation der Viren und – in Verbindung mit der Identifizierung der Gnitzen auf Artebene (s. I.1.2.) – deren Assoziation mit bestimmten Gnitzenarten ermöglichen. Zum anderen sollte die Untersuchung der epidemiologischen Überwachung und als Frühwarnsystem dienen.

I.1.4. Arbeitspaket 5 „Gnitzenzucht“

Ziel dieses Teilprojekts war es, eine Laborkolonie der Gnitzenart *Culicoides sonorensis* aufzubauen, die anschließend als Labormodell für Infektionsversuche mit Gnitzen und Viren genutzt werden sollte.

I.1.4. Arbeitspaket 6 „Infektionsversuche“

In diesem Teilprojekt sollten Wildtyp-Viren und rekombinant hergestellte Virus-Varianten im Gnitzen-Infektionsmodell hinsichtlich Vektorkompetenz der Gnitze (Infizierbarkeit mit SBV, Virusdissemination und -Übertragungsfähigkeit) getestet werden. Hierfür sollten Gnitzen aus der neuen Laborkolonie von *C. sonorensis* mit infektiösem Blut gefüttert, unter verschiedenen Temperaturbedingungen gehalten und nach der Inkubationsphase auf Virus-Infektion, -Dissemination und -Übertragungsfähigkeit getestet werden.

Wenn verfügbar, sollten für solche Infektionsversuche zusätzlich aus dem Freiland akquirierte Gnitzen verwendet werden.

I.2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Das FLI beschäftigt sich seit vielen Jahren auf nationaler und internationaler Ebene mit hämatophagen Arthropoden, von ihnen übertragenen Krankheitserregern und deren Interaktionen. Es hält Expertise und Erfahrung in der Ökologie und der genetischen Identifizierung von Gnitzen sowie im Nachweis von Viren in Gnitzen vor und hat Zugriff auf entsprechendes Referenz- und Kontrollmaterial. Es verfügt über mehrere Insektarien, in denen seit Jahren erfolgreich verschiedene Stechmückenarten gezüchtet werden, sowie Hochsicherheitslaboratorien, in denen die im Projekt geplanten Infektionsversuche durchgeführt werden können. Des Weiteren liegen umfangreiche Kenntnisse und langjährige Erfahrungen zur allgemeinen Virologie und zur Anwendung von Zellkultur- und molekularbiologischen Techniken in der Virusforschung, inklusive der Forschung an BTV und SBV, vor. Für die Arbeiten mit rekombinanten SBV-Virusvarianten war bereits zu Beginn des Projektes ein infektiöser Klon etabliert.

Bei dem Projekt konnte daher auf Erfahrung, Expertise und Protokolle aus früheren und verwandten aktuellen Arbeiten mit Gnitzen und Viren zurückgegriffen und aufgebaut werden.

I.3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Die im Teilprojekt ‚Gnitzen-Monitoring‘ vom Projektpartner ZALF vorsortierten, morphologisch nach Artenkomplexen identifizierten und gepoolten Gnitzen wurden in regelmäßigen Abständen an das FLI geliefert. Für die weitere Prozessierung wurde eine repräsentative Auswahl der Proben hinsichtlich Jahreszeit und Standorte vorgenommen, da sowohl die Proben- als auch die Individuenzahl die verfügbaren Kapazitäten zur Untersuchung der Gnitzen auf Viren sowie ihrer genetischen Identifizierung bei Weitem überstieg. Weitere Sortierungsarbeiten waren nötig, um ggf. Rückstellproben vorrätig zu haben, die bei auffälliger Häufung viruspositiver Gnitzen zu bestimmten Zeitperioden an bestimmten Standorten nachträglich in größerer zeitlicher und räumlicher Dichte hätten analysiert werden können.

Die ausgewählten Gnitzenproben sollten am FLI mit etablierten PCR-Methoden auf Virus-RNA getestet werden. Alle viruspositiven Pools wurden anschließend unter Einsatz publizierter PCR-Identifizierungstests sowie im Rahmen des Projektes neu entwickelter PCR-Tests, die die inzwischen deutlich angewachsene Anzahl bekannter Gnitzenarten und genetischer Varianten aus den *Obsoletus*- und *Pulicaris*-Gruppen erfassen würden, auf die Zusammensetzung mit Gnitzenarten untersucht.

Eine Laborzucht von *Culicoides sonorensis* für Infektionsversuche mit Viren sollte in den Insektarien des FLI aus Eiern, die von Kollegen aus England zur Verfügung gestellt werden würden, aufgebaut und etabliert werden.

Um Schmallenberg-Viren auf molekularer Ebene charakterisieren zu können, sollte ein revers-genetisches System zur künstlichen Herstellung von Schmallenberg-Virusvarianten genutzt werden. Dieses System ermöglicht es, gezielte Veränderungen am viralen Genom und den viralen Proteinen vorzunehmen. Verschiedene rekombinante SBV-Mutanten sollen hergestellt und in *in vitro*- und *in vivo*-Infektionsversuchen untersucht werden, um die Funktion der viralen Proteine näher zu charakterisieren.

Die Projektplanungen wurden im Rahmen jährlicher Meetings der Projektpartner besprochen und den aktuellen Entwicklungen und Gegebenheiten angepasst.

I.4. Wissenschaftlicher Stand, an den angeknüpft wurde

Im Jahr 2006 brach die Blauzungenkrankheit, eine Gnitzen-übertragene virale Erkrankung von Wiederkäuern, völlig überraschend in Mitteleuropa aus (Saegerman et al. 2009) und führte in den folgenden Jahren zu hohen Beeinträchtigungen der Tiergesundheit und enormen ökonomischen Verlusten in der Nutztierhaltung (Gethmann et al. 2010, Velthuis et al. 2010). Eine kaum weniger dramatische Epidemie ereignete sich 2011 mit dem ebenfalls von Gnitzen übertragenen SBV (Hoffmann et al. 2012; Beer et al. 2013), wobei bis heute unklar ist, woher dieses Virus kam, das zuvor völlig unbekannt gewesen war.

In Deutschland wurde als Reaktion auf den Ausbruch der Blauzungenkrankheit in den Jahren 2007-2008 ein entomologisches Monitoring durchgeführt, in dem grundlegende Daten zum Vorkommen und zur Verbreitung einheimischer Gnitzen-Taxa und deren Durchseuchung mit dem BTV erfasst wurden (Mehlhorn et al. 2007, Hoffmann et al. 2009). Ein weiteres, sehr viel eingeschränkteres Monitoring erfolgte nach dem Ausbruch der Schmallenberg-Krankheit im Jahr 2013 (Kameke et al. 2016). In beiden Fällen wurde reaktiv im Rahmen eines Ausbruchs gehandelt, so dass zwar wichtige epidemiologische Daten gesammelt, diese aber zunächst nicht zum Management des Seuchengeschehens genutzt werden konnten.

Nach dem Ausklang der Blauzungen-Epidemie im Jahr 2009 und dem Abflauen der Schmallenberg-Epidemie nach 2012 in Mitteleuropa wurde die zwischenzeitlich in Angriff

genommene Forschung an einheimischen Gnitzen als den Vektoren des BTV und des SBV in Deutschland wieder weitgehend eingestellt. Durch die beiden Viren verursachte Krankheitsfälle traten aber in Deutschland und benachbarten Ländern weiterhin auf. Infektionen mit BTV-1- und BTV-4 waren zuletzt hauptsächlich aus Südeuropa gemeldet worden, BTV-8 hatte sich 2016 massiv in Frankreich ausgebreitet (Radar Bulletin Februar 2017; <https://www.blv.admin.ch>). Insbesondere SBV-Fälle traten seit 2014 auch in Deutschland wieder vermehrt auf (Wernike et al. 2015, Gache et al. 2017, Wernike & Beer 2017). Nach wie vor ist unklar, welche Gnitzenarten unter welchen Bedingungen Vektoren für solche Viren sein können.

Im Freiland wurden BTV und SBV in Mittel- und Nordeuropa i.W. in Gnitzen der *Obsoletus*- und *Pulicaris*-Gruppen/-Komplexe nachgewiesen (z.B. Hoffmann et al. 2009, De Regge et al. 2012, Elbers et al. 2013), doch Studien zur Vektorkompetenz von Gnitzen und zu den Übertragungsbedingungen sind rar bzw. fehlen ganz. Da die meisten Gnitzenarten, u.a. auch solche, die als Vektoren in Deutschland in Betracht kommen, im Labor nicht gezüchtet werden können, konzentrieren sich die experimentellen Studien vor allem auf den nordamerikanischen BTV-Überträger *C. sonorensis* und die europäische Schadart *C. nubeculosus* (Carpenter et al. 2008, Veronesi et al. 2013a, b), zwei der wenigen Spezies, die erfolgreich in Zucht gehalten werden können. Während in Laborversuchen mit *C. sonorensis* BTV-infizierte Gnitzen zur Virus-Übertragung gebracht werden konnten (Carpenter et al. 2008), ließen nach Infektion mit SBV Disseminierung und Replikation des Virus sowie dessen Nachweis im Gnitzen-Speichel darauf schließen, dass diese Gnitzenart zur Übertragung befähigt ist (Veronesi et al. 2013b). In Gnitzen der Spezies *C. nubeculosus* disseminierte das SBV nach intrathorakaler Infektion dagegen nur ausnahmsweise (Veronesi et al. 2013a, b). Diese Infektionsmodelle eignen sich daher, um valide Ergebnisse für die Praxis zu generieren, die dann auf die heimischen Gnitzenarten übertragen werden müssen. Einzelne Infektionsversuche im Labor mit Arten, die nicht gezüchtet werden können, wurden zudem mit im Freiland gefangenen Gnitzen-Weibchen durchgeführt (Venter et al. 2011). Solche Forschungsarbeiten fehlen aber gänzlich für mitteleuropäische Gnitzenarten. Die Kombination solcher Studien erlaubt dann ein vollständiges Bild.

Des Weiteren herrscht Unkenntnis darüber, wie BTV und SBV in Mittel- und Nordeuropa überwintern, ob in bisher unbekanntem natürlichen Wirbeltierreservoir oder in den Vektoren, z.B. indem die Viren von Gnitzen vertikal (transovariell) an die nächste Generation weitergegeben werden (Carpenter et al. 2013). Versuche, diese Fragen durch die Untersuchung frisch geschlüpfter und noch nicht blutgesogener Gnitzen, inklusive solcher, die als Larve überwintert haben, zu klären, existieren bisher nicht.

Um die Rolle der verschiedenen in Mitteleuropa vorkommenden Gnitzenarten als Vektoren zu klären, ist deren zuverlässige Artidentifizierung eine zwingende Voraussetzung. Wie so oft bei

Artenkomplexen ist aber die Systematik und Taxonomie weiterhin im Fluss, und es werden immer wieder neue Arten und Haplotypen beschrieben (z.B. Pagès et al. 2009, Wenk et al. 2012, Nielsen und Kristensen 2015, Ander et al. 2013, Ramilo et al. 2013, Sarvašová et al. 2014, Yildirim et al. 2019; Zittra et al. 2020). So hat sich mittlerweile die Anzahl der zu den Obsoletus- und Pulicaris-Komplexen gehörenden anerkannten Arten deutlich erhöht. PCR-Tests, die nach den großen BTV- und SBV-Epidemien in Zentraleuropa zur Identifizierung von vermeintlichen Vektorarten unter den Gnitzen entwickelt wurden, sind daher längst nicht mehr aktuell, obwohl sie vielfach noch eingesetzt werden. Die Modifizierung der Tests bzw. Entwicklung neuer Tests aufgrund aktueller wissenschaftlicher Erkenntnisse war zwingend erforderlich.

SBV zirkuliert in einem Infektionszyklus zwischen empfänglichen Säugetieren (Wiederkäuer wie Rinder, Schafe und Ziegen) und kompetenten Vektoren (Gnitzen der Gattung *Culicoides*) (Wernike und Beer 2017). Einzelheiten über molekulare Viruseigenschaften, Wechselwirkungen zwischen Virus und Vektor und die Funktion der viralen Proteine im Insektenvektor sind rar. Das aus drei Segmenten bestehende SBV-Genom kodiert lediglich für sechs Proteine (Barr et al. 2011). Um Aussagen über die Funktion dieser Proteine im Insektenvektor treffen zu können, benötigt man Systeme zur gezielten genetischen Veränderung von Viren.

Verwendete Fachliteratur (wissenschaftlicher Stand, an den angeknüpft wurde):

- Ander M, Troell K, Chirico J (2013): Barcoding of biting midges in the genus *Culicoides*: a tool for species determination. *Med Vet Entomol* 27, 323-331.
- Barr, J.N.;Walter, C.T. (2011): Recent advances in the molecular and cellular biology of bunyaviruses. *J. Gen. Virol.*, 92, 2467-2484.
- Beer B, Conraths FJ, van der Poel WHM (2013): 'Schmallenberg virus' – a novel orthobunyavirus emerging in Europe. *Epidemiol Infect* 141, 1-8.
- Bilk S, Schulze C, Fischer M, Beer M, Hlinak A, Hoffmann B (2012): Organ distribution of Schmallenberg virus RNA in malformed newborns. *Vet Microbiol* 159, 236-238.
- Boorman J (1987): Induction of salivation in biting midges and mosquitoes, and demonstration of virus in the saliva of infected insects. *Med Vet Entomol* 1, 211-214.
- Carpenter S, Groschup MH, Garros C, Felipe-Bauer ML, Purse BV (2013): *Culicoides* biting midges, arboviruses and public health in Europe. *Antivir Res* 100, 102-113.
- Carpenter S, McArthur C, Selby R, Ward R, Nolan DV, Mordue Luntz AJ, Dallas JF, Tripet F, Mellor PS (2008): Experimental infection studies of UK *Culicoides* with BTV 8 and 9. *Vet Rec* 163, 589-592.
- De Regge N, Deblauwe I, De Deken R, Vantieghem P, Madder M, Geysen D, Smeets F, Losson B, van den Berg T, Cay AB (2012): Detection of Schmallenberg virus in different *Culicoides* spp. by real-time RT-PCR. *Transbound Emerg Dis* 59, 471-475.
- Elbers ARW, Meiswinkel R, van Weezep E, Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM, Kooi EA (2013): Schmallenberg virus in *Culicoides* spp. biting midges, the Netherlands, 2011. *Emerg Infect Dis* 19, 106-109.
- Folmer O, Black M, Hoe W., Lutz R, Vrijenhoek R (1994): DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3, 294-299.
- Gache K, Touratier A, Bournez L, Zientara S, Bronner A, Dion F, Garin E, Calavas D (2017): Detection of Schmallenberg virus in France since 2012. *Vet Rec* 180, 24.

- Garros C, Balenghien T, Carpenter S, Delécolle J-C, Meiswinkel R, Pédarrieu A, Rakotoarivony I, Gardès L, Golding N, Barber J, Miranda M, Borràs D, Goffredo M, Monaco F, Pagès N, Sghaier S, Hammami S, Calvo JH, Lucientes J, Geysen D, De Deken R, Sarto Monteys V, Schwenkenbecher J, Kampen H, Hoffmann B, Lehmann K, Werner D, Baldet T, Lancelot R, Cêtre-Sossah C (2014): Towards the PCR-based identification of Palaearctic *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae): results from an international ring trial targeting four species of the subgenus *Avaritia*. *Parasit Vectors* 7, 223.
- Gethmann J, Hoffmann B, Probst C, Beer M, Conraths FJ, Mettenleiter TC (2010): Drei Jahre Blauzungenkrankheit Serotyp 8 in Deutschland – Ein Überblick. *Tierärztl Umschau* 65, 4-12.
- Hébert PDN, Ratnasingham S, De Waard JR (2003): Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc R Soc Lond B: Biol Sci* 270, S96-S99.
- Hoffmann B, Bauer B, Bauer C, Bätza HJ, Beer M, Clausen PH, Geier M, Gethmann JM, Kiel E, Liebisch G, Liebisch A, Mehlhorn H, Schaub GA, Werner D, Conraths FJ (2009): Monitoring of putative vectors of bluetongue virus serotype 8, Germany. *Emerg Infect Dis* 15, 1481-1484.
- Hoffmann B, Scheuch M, Höper D, Jungblut R, Holsteg M, Schirrmeier H, Eschbaumer M, Goller KV, Wernike K, Fischer M, Breithaupt A, Mettenleiter TC, Beer M (2012): Novel orthobunyavirus in cattle, Europe, 2011. *Emerg Infect Dis* 18, 469-472.
- Jennings M, Mellor PS (1989): *Culicoides*: biological vectors of Akabane virus. *Vet Microbiol* 21, 125-131.
- Kameke D, Werner D, Hoffmann B, Lutz W, Kampen H (2016): Schmollenberg virus in Germany 2011–2014: searching for the vectors. *Parasitol Res* 115, 527-534.
- Kameke D, Kampen H, Walther D (2017): Activity of *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) inside and outside of livestock stables in late winter and spring. *Parasitol Res* 116, 847-858.
- Kampen H, Werner D (2014): Gnitzen (Ceratopogonidae) als Überträger von sich ausbreitenden Infektionskrankheiten bei Tieren. In: Lozan JL, Grassl H, Piepenburg D, Brandt A (Hrsg.): Warnsignal Klima: Gesundheitsrisiken/ Gefahren für Pflanzen, Tiere und Menschen. 2. Auflage, online Version: 1-7 (http://www.warnsignale.uni-hamburg.de/wp-content/uploads/2014/06/kampen_werner.pdf).
- Kampen H, Werner D (2015): Die wiederkehrende Notwendigkeit von Stechmücken-Surveillance und -Forschung. *Bundesgesundheitsbl* 58, 1101-1109.
- Kraatz F, Wernike K, Hechinger S, König P, Granzow H, Reimann I, Beer M (2015): Deletion mutants of Schmollenberg virus are avirulent and protect from virus challenge. *J Virol* 89, 1825-1837.
- Langner KF, Darpel KE, Denison E, Drolet BS, Leibold W, Mellor PS, Mertens PP, Nimtz M, Greiser-Wilke I (2007): Collection and analysis of salivary proteins from the biting midge *Culicoides nubeculosus* (Diptera: Ceratopogonidae). *J Med Entomol* 44, 238-248.
- Lehmann K, Werner D, Hoffmann B, Kampen H (2012): PCR identification of culicoid biting midges (Diptera, Ceratopogonidae) of the Obsoletus Complex including putative vectors of bluetongue and Schmollenberg viruses. *Parasit Vectors* 5, 213.
- Mathieu B, Perrin A, Baldet T, Delécolle JC, Albina E, Cêtre-Sossah C (2007): Molecular identification of western European species of Obsoletus Complex (Diptera: Ceratopogonidae) by an internal transcribed spacer-1 rDNA multiplex polymerase chain reaction assay. *J Med Entomol* 44, 1019-1025.
- 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 HJ, Conraths FJ, Hoffmann B, Beer M (2007): Bluetongue disease in Germany (2007–2008): monitoring of entomological aspects. *Parasitol Res* 105, 313-319.
- Munoz-Munoz F, Talavera S, Carpenter S, Nielsen SA, Werner D, Pages N (2014): Phylogenetic differentiation and phylogenetic signal of wing shape in western European biting midges, *Culicoides* spp., of the subgenus *Avaritia*. *Med Vet Entomol* 28, 319-329.
- Nielsen SA, Kristensen M (2015): Delineation of *Culicoides* species by morphology and barcode exemplified by three new species of the subgenus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) from Scandinavia. *Parasit Vectors* 8, 151.
- Purse B, Mellor PS, Rogers DJ, Samuel AR, Mertens PPC, Baylis M (2006): Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nat Rev Microbiol* 3, 171-181.
- Pagès N, Muñoz-Muñoz F, Talavera S, Sarto V, Lorca C, Núñez JI (2009): Identification of cryptic species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in the subgenus *Culicoides* and development of species-specific PCR assays based on barcode regions. *Vet Parasitol* 165, 298-310.

- Ramilo D, Garros C, Mathieu B, Benedet C, Allène X, Silva E, Alexandre-Pires G, Fonseca IP, Carpenter S, Rádrová J, Delécolle JC (2013): Description of *Culicoides paradoxalis* sp. nov. from France and Portugal (Diptera: Ceratopogonidae). *Zootaxa* 3745, 243-256.
- Sarvašová A, Kočišová A, Halán M, Delécolle J-C, Mathieu B (2014): Morphological and molecular analysis of the genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in Slovakia with five new records. *Zootaxa* 3872, 541-560.
- Saegerman C, Berkvens B, Mellor PS (2009): Bluetongue epidemiology in the European Union. *Emerg Infect Dis* 14, 539-544.
- Velthuis AGJ, Saatkamp HW, Mourits MCM, de Koeijer AA, Elbers ARW (2010): Financial consequences of the Dutch bluetongue serotype 8 epidemics of 2006 and 2007. *Prev Vet Med* 93, 294-304.
- Venter GJ, Wright IM, Del Rio R, Lucientes J, Miranda MA (2011): The susceptibility of *Culicoides imicola* and other South-African livestock-associated *Culicoides* species to infection with bluetongue virus serotype 8. *Med Vet Entomol* 25, 320-326.
- Veronesi E, Antony F, Gubbins S, Golding N, Blackwell A, Mertens PCC, Brownlie J, Darpel KE, Mellor PS, Carpenter S (2013a) Measurement of the infection and dissemination of bluetongue virus in *Culicoides* biting midges using a semi-quantitative RT-PCR assay and isolation of infectious virus. *PLoS One* 8, e70800.
- Veronesi E, Henstock M, Gubbins S, Batten C, Manley R, Barber J, Hoffmann B, Beer M, Attoui H, Mertens PPC, Carpenter S (2013b): Implicating *Culicoides* biting midges as vectors of Schmallenberg virus using semi-quantitative RT-PCR. *PLoS One* 8, e57747.
- Werner D, Bauer C, Schulz C, Kampen H (2012): The breeding habitat preferences of Obsoletus Complex *Culicoides* species. *Mitt Dtsch Ges Allg Angew Entomol* 18, 3123-329.
- Wernike K, Hoffmann B, Conraths FJ, Beer M (2015): Schmallenberg virus recurrence, Germany, 2014. *Emerg Infect Dis* 21, 1202-1204.
- Wernike K, Beer M (2017): Schmallenberg virus: a novel virus of veterinary importance. *Adv Virus Res* 99, 39-60.
- Yildirim A, Dik B, Duzlu O, Onder Z, Ciloglu A, Yetismis G, Inci A (2019): Genetic diversity of *Culicoides* species within the Pulicaris Complex (Diptera: Ceratopogonidae) in Turkey inferred from mitochondrial COI gene sequences. *Acta Trop* 190, 380-388.
- Zittra C, Wöss G, van der Vloet L, Bakran-Lebl K, Shahi Barogh B, Sehnal P, Fuehrer H-P (2020): Barcoding of the genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in Austria – a update of the species inventory including the first records of three species in Austria. *Pathogens* 9, 406.

Benutzte Informations- und Dokumentationsdienste:

PubMed, Medline, EBSCO, Scopus

Tierseuchennachrichtensystem des FLI (www.tsn.fli.de): Fallmeldungen von BTV und SBV bei Wiederkäuern

I.5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Das Projekt wurde in Kooperation mit dem Partner ZALF (Leibniz-Zentrum für Agrarlandschaftsforschung e.V.), Müncheberg, durchgeführt. Insbesondere das Vorgehen bei der Akquise der Gnitzen im Freiland (z.B. Standortwahl), deren Sortierung (Poolen), Vorbestimmung und Weiterverarbeitung sowie die Auswahl der auf Viren zu untersuchenden Proben wurde eng zwischen den Projektpartnern abgestimmt. Die gewonnenen Daten der Untersuchungen auf das Vorkommen von Viren in den Gnitzen sowie die Artbestimmung der Gnitzen bei viruspositiven Proben wurden mit der Bitte zur Eingabe in die Datenbank an das ZALF weitergegeben.

Für die Etablierung der Gnitzen-Laborzucht wurde mit dem Pirbright Institute, England, zusammengearbeitet, die die Gnitzeneier für den Aufbau der Laborkolonie von *C. sonorensis* am FLI zur Verfügung stellten.

II. Eingehende Darstellung

II.1 Erzielte Ergebnisse

II.1.1 Arbeitspaket 2 „Genetische Gnitzen-Identifizierung“

Vorgegebene Ziele: Identifizierung von Gnitzen aus Virus-positiven Pools auf Artebene sowie Entwicklung von PCR-Tests zur Bestimmung der Arten und genetischen Varianten der Obsoletus- und Pulicaris-Gruppen

Die Identifizierung der Gnitzen aus den SBV-positiven Pools ergab ausschließlich Arten der Obsoletus- und Pulicaris-Gruppen. Erstmals konnten Virusinfektionen den beschriebenen Haplotypen diverser Arten zugeordnet werden.

Mehrere Multiplex-PCR-Tests (Gel-basiert, real time) wurden entwickelt, um die aktuell bekannten Spezies und Haplotypen der Obsoletus- und Pulicaris-Gruppen zu differenzieren. Auf der Basis aller verfügbaren Sequenzeinträge in der GenBank wurden hierfür spezifische PCR-Primer und -Sonden konstruiert. Die Tests wurden mit im Freiland gesammeltem Gnitzenmaterial bzw. synthetisch erstellter Target-DNA validiert.

Die Arbeiten zu diesem Arbeitspaket konnten somit fristgerecht erfolgreich beendet werden.

II.1.2 Arbeitspaket 3 „Pathogen-Screening“

Vorgegebene Ziele: Etablierung von real-time PCRs für die Detektion von SBV- und BTV-Genom, Untersuchung von Gnitzenpools auf das Vorkommen von SBV und BTV.

Repräsentative Unterproben der vom Projektpartner am ZALF in ganz Deutschland mithilfe von UV-Lichtfallen gesammelten Gnitzen der Jahre 2019 und 2020 wurden auf das Vorkommen von SBV und BTV untersucht. Für das Sammeljahr 2019 ergaben sich insgesamt 48 SBV-positive Gnitzenpools (aus ca. 5.000 untersuchten Pools mit ca. 42.000 Gnitzen), die sich auf 20 Fallenstandorte verteilen. Für das Sammeljahr 2020 ergaben sich 21 SBV-positive Gnitzenpools (aus ca. 4.000 untersuchten Pools mit ca. 44.000 Gnitzen) an insgesamt 15 verschiedenen Fallenstandorten. Kein Gnitzenpool der Sammeljahre 2019 und 2020 war BTV-positiv.

Des Weiteren wurden am Standort Lychen 1.035 frisch geschlüpfte Einzelgnitzen aus Emergenzfallen-Fängen auf SBV untersucht, um die Möglichkeit zur Überwinterung des Virus in den Gnitzen zu überprüfen. Alle getesteten Gnitzen waren Virus-negativ.

Die Arbeiten wurden fristgerecht erfüllt.

II.1.3 Arbeitspaket 3 „Gnitzen-Zucht“

Vorgegebene Ziele: Eine Laborkolonie der Gnitzenart *Culicoides sonorensis* sollte im Insektarium des FLI aufgebaut werden, um Infektionsversuche mit BTV und SBV durchzuführen. Die Gnitzen-Eier zum Start der Zucht sollten vom Pirbright Institute, England, zur Verfügung gestellt werden.

Die Zucht von *C. sonorensis* konnte am FLI erfolgreich etabliert werden. Leider musste sie nach dem zwischenzeitlichen plötzlichen Tod des Insektariumsmanagers auf Anordnung der zuständigen Institutsleiterin frühzeitig im Projektzeitraum wieder eingestellt werden, da sie sehr arbeitsaufwändig ist und keine Vertretungslösung im notwendigen zeitlichen Umfang möglich war. Infektionsversuche konnten daher nur in beschränktem Maße über einen kurzen Zeitraum durchgeführt werden.

II.1.4 Arbeitspaket 6 „Infektionsversuche“

Vorgegebene Ziele: Gewinnung frisch geschlüpfter, ungesogener Gnitzen im Freiland aus Kuhfladen für Infektionsversuche im Labor; Charakterisierung von Wildtyp- und rekombinanten Viren in Zellkultur und Gnitzen.

Im Frühjahr auf Wiesen gesammelte, überwinterte Kuhfladen wurden im Labor in Mini-Ekklektoren bebrütet. Da die natürliche Struktur des Brutssubstrates bei der Gewinnung und beim Transport beschädigt wurde und die Kuhfladen während der nachfolgenden Lagerung im Labor schnell anfangen zu schimmeln, wurden eine Vielzahl von Anpassungen bezüglich Sammlung, Lagerung und Inkubation des Kuhdung vorgenommen. Schließlich gelang es, Insekten, die sich in den Fladen entwickelten, zum Schlupf zu bringen. Gnitzen waren allerdings nicht darunter. Aufgrund der fortgeschrittenen Projektlaufzeit und der Corona-bedingten Einschränkungen, die große Engpässe in anderen Projektaufgaben mit sich brachten, wurden keine weiteren Versuche mehr unternommen, Gnitzen aus dem Freiland zu akquirieren. Der Meilenstein 6.1. „Gnitzenakquise (Freiland)“ konnte somit nicht erfolgreich abgeschlossen werden.

Für die *in vivo*- und *in vitro*-Infektionsversuche wurden verschiedene SBV-Varianten ausgewählt. Sowohl rekombinant hergestellte SBV-Varianten als auch Wildtyp-Viren wurden per Wachstumskinetiken in verschiedenen Zellkultursystemen charakterisiert. Damit konnte der Meilenstein 6.2 „*in vitro*-Infektionen“ fristgerecht erfüllt werden.

Im Rahmen des Meilensteins 6.3. „*in vivo*-Infektionen“ wurden Gnitzen der FLI-eigenen Laborzucht mit ausgewählten SBV-Varianten mittels einer infektiösen Blutmahlzeit infiziert, unter bestimmten Temperaturbedingungen für unterschiedliche Zeitspannen inkubiert und

anschließend analysiert. Gnitzen konnten mit diesem neu etablierten System erfolgreich infiziert und Unterschiede zwischen verschiedenen SBV-Varianten untersucht werden. Der Meilenstein 6.3 „in vivo-Infektionen“ konnte somit fristgerecht abgeschlossen werden.

II.2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die Verwendung der Mittel erfolgte gemäß Zuwendungsbescheid.

Die Personalmittel wurden zur Finanzierung von zwei Doktorand:innenstellen für jeweils drei Jahre eingesetzt. Die Reisetätigkeit der Doktoranden umfasste Freilandarbeit, Tagungsbesuche und Projektmeetings. Die Verbrauchsmittel wurden i.W. im Labor für Chemikalien, Kits, Enzyme und Plastikware verwendet.

II.3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die Ausbruchsbedingungen und -dynamiken von Blauzungen- und Schmallenbergkrankheit werden von klimatischen Faktoren sowie den biologischen Charakteristika der viralen Erreger, ihrer Vektoren, der Wirbeltierwirte und ihrer Interaktionen vorgegeben. Um sie verstehen, Risikoanalysen durchführen sowie pro- und reaktive Managementmaßnahmen implementieren zu können, sind umfassende Kenntnisse aller Faktoren notwendig. Insbesondere zum Verhalten der Viren und ihrer Vektoren, Gnitzenarten der Obsoletus- und Pulicaris-Komplexe, bestehen große Wissenslücken, nicht zuletzt weil einheimische Gnitzenarten erst mit dem Ausbruch der Blauzungenkrankheit in Mitteleuropa im Jahr 2006 als Virusvektoren erkannt wurden und das SBV ein völlig neuartiges Virus ist.

Daten zur Zirkulation der Viren in Gnitzen in Deutschland sind insbesondere wichtig, um Rückschlüsse auf die Vektorspezies und Hotspots der Virusverbreitung ziehen zu können. Die erbrachten Resultate bestätigen die verdächtigen Gnitzenspezies als potenzielle Vektoren, deuten darüber hinaus aber auch auf weitere, zuvor nicht mit den Viren assoziierte Gnitzenarten als mögliche Vektoren von SBV hin.

Die Rolle der verschiedenen Gnitzenarten im Infektionsgeschehen und der Epidemiologie der Blauzungen- und Schmallenbergkrankheit kann nur ausreichend untersucht werden, wenn die diversen einheimischen Gnitzenarten zuverlässig identifiziert werden können. Nur dann können ihnen Verhaltensweisen, Blutwirt- und Habitatpräferenzen, Überwinterungsstrategien oder Vektorkompetenzen zugeordnet werden, die ggf. zur Ergreifung von Maßnahmen zur Expositionsreduktion von Wiederkäuern verwendet werden können. Die Entwicklung von genetischen Werkzeugen für morphologisch nicht differenzierbare Gnitzenarten war daher essenziell.

Da die als Virusvektoren verdächtigen einheimischen Gnitzenarten nicht in Zucht gehalten werden können, sind experimentelle Untersuchungen zu deren Vektorkompetenz und zur Bestimmung der exakten Übertragungsbedingungen nicht möglich. Infektionsversuche mit dem Labormodell *C. sonorensis* lassen aber prinzipielle Rückschlüsse auf die Wechselwirkungen zwischen Vektor und Virus zu, die z.T. auf die einheimischen Gnitzenarten übertragen werden können. Auch *in vitro*-Infektionen in Gnitzen-Zellkultursystemen lassen erste Erkenntnisse über das Verhalten von Viren im Vektor zu. Die Infektionsversuche mit Wildtyp-Viren und Mutanten tragen daher ebenfalls zum besseren Verständnis der hinter der Übertragung von Krankheitserregern durch Gnitzen stehenden Prozesse bei.

II.4. Voraussichtlicher Nutzen der Ergebnisse

Die Ergebnisse tragen dazu bei,

- Gnitzen-Spezies als Vektoren von BTV und SBV zu identifizieren,
- Hotspots der Viruszirkulation zu identifizieren,
- Frühwarnsysteme für das Auftreten von BTV und SBV zu entwickeln,
- Handlungsempfehlungen für landwirtschaftliche Betriebe zu erstellen, um Gnitzen-Populationen bzw. den Kontakt der Nutztiere mit Gnitzen zu minimieren,
- Handlungsempfehlungen für den Seuchenfall zu entwickeln und Maßnahmen der Gnitzen-Bekämpfung im Falle eines Krankheitsausbruchs schnell und gezielt umzusetzen,
- Mechanismen der Virusentwicklung in Gnitzen zu identifizieren,
- transovarielle Übertragung der Viren durch Gnitzen zu erkennen und damit Rolle von Gnitzen als Virusreservoir einzuschätzen,
- die Fähigkeit und Effizienz der Virusinfektion von und -übertragung durch Gnitzen unter verschiedenen klimatischen Bedingungen zu verstehen,
- auf die mögliche Einschleppung weiterer Gnitzen-übertragener Pathogene besser vorbereitet zu sein,
- generelle zukunftsprojizierte Risikoanalysen für die Übertragung von Viren durch Gnitzen in Deutschland zu ermöglichen.

II.5. Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordene Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Da sich das Verbundprojekt explizit mit der Situation in Deutschland beschäftigte, entsprechende Daten geografisch nicht zuverlässig transferiert werden können und in Deutschland keine nicht dem Verbundprojekt angehörige Arbeitsgruppen einschlägige

Untersuchungen durchführen, sind vergleichbare Studien auf dem Gebiet des Vorhabens nicht existent.

II.6. Veröffentlichung der Ergebnisse

Publizierte Fachartikel unter Beteiligung des FLI, die aus dem Projekt hervorgegangen sind:

Sick F, Beer M, Kampen H, Wernike K (2019): *Culicoides* biting midges – underestimated vectors for arboviruses of public health and veterinary importance. *Viruses* 11, 376.

In Vorbereitung befindliche Fachartikel mit Bezug zum Projekt:

Sick F, Wernike K, Beer M.: Characterization of a Schmallenberg virus dead end variant

Dähn O, Mathieu B, Werner D, Kampen H: Development of conventional multiplex PCR assays for the identification of 21 European biting midge species (Diptera: Ceratopogonidae) belonging to the Pulicaris Group, including recently discovered species and genetic variants

Dähn O, Mathieu B, Werner D, Kampen H: Development of a gel-based multiplex PCR test for the identification of important biting midge vector species (Diptera: Ceratopogonidae) of the subgenus *Avaritia* Fox, capable to differentiate three different haplotypes of *Culicoides obsoletus*

Dähn O, Mathieu B, Werner D, Kampen H: Development of a high-throughput real-time PCR test for the determination of newly discovered genotypes of biting midge species (Diptera: Ceratopogonidae) the subgenus *Avaritia* Fox, putative vectors of BTV and SBV in Europe

Dähn O, Mathieu B, Beer M, Pfaff F, Kampen H, Werner D: Morphological and genetic characterisation of German *Culicoides (Avaritia) gornostaevae* Mirzaeva, 1984-like biting midges, potential vectors of the Obsoletus Group (Diptera: Ceratopogonidae)

Dähn O, Werner D, Kampen H, Beer M, Wernike K, Sick F: Circulation of Schmallenberg virus in German biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in 2019 and 2020, including first reports of the virus from *Culicoides selandicus* and *Culicoides griseidorsum*

Präsentationen bei wissenschaftlichen Tagungen mit Bezug zum Projekt:

Sick F, Reimann I, Wernike K, Beer M (2019): Functional characterization of Simbu virus nonstructural proteins in the insect vector (Poster), 13th EPIZONE Annual Meeting "Breaking Walls", 26-28.08.2019, Berlin

Dähn O, Werner D, Kampen H (2019): Das Problem der Artidentifizierung innerhalb der Obsoletus- und Pulicaris-Komplexe (Diptera: Ceratopogonidae: *Culicoides*) (Vortrag), Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Medizinische Entomologie und Acarologie (DGMEA), 12.-14.09.2019, Dornbirn, Österreich

Dähn O, Werner D, Kampen H (2021): Species identification within the Obsoletus and Pulicaris Complexes – a crucial and challenging step in determining culicoid vector

species of bluetongue and Schmallenberg viruses (Vortrag), 29th Annual Meeting of the German Society for Parasitology, 15.-17.03.2021, Bonn

Sick F, Wernike K, Beer M (2021): Establishment of a reverse genetics system for Shuni virus (Poster), 30th Annual Meeting of the Society for Virology, 24-26.03.2021, virtuell

Sick F, Wernike K (2021): Shuni-Virus – ein Verwandter des Schmallenberg-Virus auf dem Vormarsch? (Vortrag), 39. Jahrestagung der Fachgruppe AVID, 14.-15.09.2021

Dähn O, Werner D, Kampen H (2021): Revision aktueller PCR-Nachweisverfahren für die Arten der *Obsoletus*- und *Pulicaris*-Gruppen (Diptera: Ceratopogonidae: *Culicoides*) (Vortrag), Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Medizinische Entomologie und Acarologie (DGMEA), 01.10.2021, virtuell

Gnizen als Vektoren von Viren in Deutschland unter Berücksichtigung sich ändernder klimatischer Bedingungen (CeratoVir) – Teilprojekt 1

Kurzfassung

Im Rahmen des Projektes wurden entomologische, virologische und infektiologische Untersuchungen durchgeführt, die zum besseren Verständnis der Epidemiologie von Blauzungen- und Schmallenberg-Krankheit in Deutschland beitragen, insbesondere unter dem Aspekt der Klimaerwärmung. Für die Jahre 2019 und 2020 konnte demonstriert werden, dass das Schmallenberg-Virus in weiten Teilen Deutschlands nach wie vor auch in der Gnizenpopulation zirkuliert. Neben bekannten mutmaßlichen Überträgerarten wurden Infektionen bei zusätzlichen Gnizenarten und neu beschriebenen genetischen Varianten bekannter Arten aus den *Obsoletus*- und *Pulicaris*-Gruppen nachgewiesen. Es wurden genetische Tests entwickelt, die die in den letzten Jahren deutlich erhöhte Anzahl beschriebener Arten und Genotypen aus diesen beiden Gruppen berücksichtigen und differenzieren können. Mit Methoden der reversen Genetik konnten Mutanten und Reassortanten des Schmallenberg-Virus erzeugt werden, die im Zellkultursystem charakterisiert wurden. Deren Wechselwirkungen mit Gnitzen wurden in ersten Laborversuchen im Infektionsmodell *Culicoides sonorensis*, für das im Rahmen des Projektes ein Laborzucht etabliert wurde, erforscht.

Die Projektergebnisse tragen dazu bei, die Gefahr von Krankheitsausbrüchen durch Gnitzen-assoziierte Erreger in Deutschland besser abschätzen und geeignete Maßnahmen im pro- und reaktiven Management solcher Krankheiten ergreifen zu können.