

CeratoVir

Gnitzen als Vektoren von Viren in Deutschland unter Berücksichtigung sich ändernder klimatischer Bedingungen



Mitarbeiter/innen: Franziska Sick, Sarah Groschupp, Oliver Dähn, Kerstin Wernike, Martin Beer, Doreen Werner, Helge Kampen

Gnitzen als Überträger von Viren von Nutztieren

Blutsaugende Gnitzen der Gattung *Culicoides* übertragen bedeutende Viren von Tieren, inkl. landwirtschaftlichen Nutztieren: Blauzungen-Virus (BTV), Schmallenberg-Virus (SBV), Pferdesterbe-Virus und das Virus der epizootischen Hämorrhagie der Hirsche. Insbesondere BTV und SBV haben auch in Deutschland große negative tiergesundheitliche und – aufgrund von Handelsbeschränkungen – ökonomische Folgen.

Erst nach dem unerwarteten Ausbruch der Blauzungenkrankheit in Mitteleuropa im Jahr 2006 wurde klar, dass einheimische *Culicoides*-Arten das BTV übertragen können. Vermutlich dieselben Arten übertragen das SBV, ein völlig neuartiges, zuvor unbekanntes Virus, das 2011 erstmals in Mittel-europa auftauchte. Beide Viren führten zu großen Epidemien und zirkulieren noch heute in Deutschland.

Einfluss des Klimas auf Virusinfektionen

Klimafaktoren, insbesondere die Temperatur, beeinflussen das Infektionsgeschehen Arthropoden-assoziiierter Krankheiten maßgeblich. Bei höheren Temperaturen saugen hämatophage Arthropoden öfter Blut und legen öfter Eier, der Entwicklungszyklus läuft schneller ab und die Populations-dichten steigen. Klimaerwärmung kann ebenso zu einer verlängerten saisonalen Aktivitätsperiode von Vektoren führen. Auch übertragbare Krank-heitserreger profitieren von höheren Temperaturen: die Entwicklung im Vektor verläuft schneller (oder wird überhaupt erst möglich) und der natürliche Transmissionszyklus wird effizienter.

Projektstruktur

Leibniz-Zentrum für Agrarlandschaftsforschung (ZALF)	Friedrich-Loeffler-Institut (FLI)	
Dr. Doreen Werner	Prof. Dr. Martin Beer PD Dr. Kerstin Wernike	PD Dr. Helge Kampen
<ul style="list-style-type: none"> Gnitzen-Monitoring auf landwirtschaftlichen Betrieben morphologische Identifizierung der Gnitzenarten/-Komplexe Vektorökologie einheimischer Gnitzenarten (vektorarme Zeit / Landschaftsstruktur- und Habitatbindung) 	<ul style="list-style-type: none"> Virus-Diagnostik reverse Genetik mit SBV 	<ul style="list-style-type: none"> genetische Identifizierung der Gnitzen Zucht von Gnitzen im Labor
	<ul style="list-style-type: none"> Infektions- und Übertragungsversuche 	
<ul style="list-style-type: none"> Aufbau einer deutschen Gnitzen-Datenbank 		

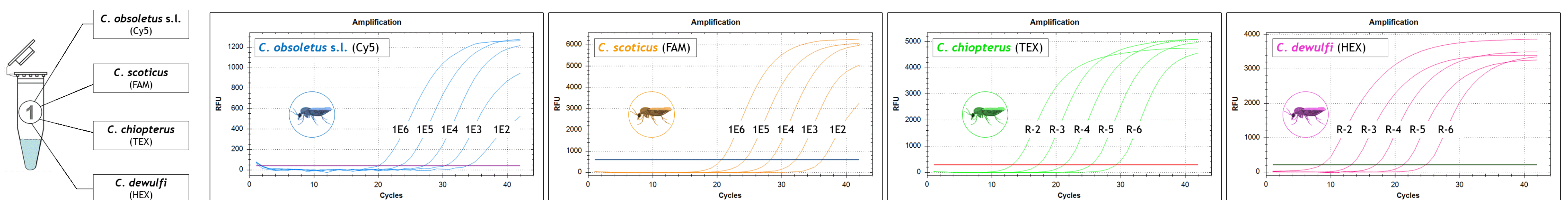


Gnitzen-Identifizierung

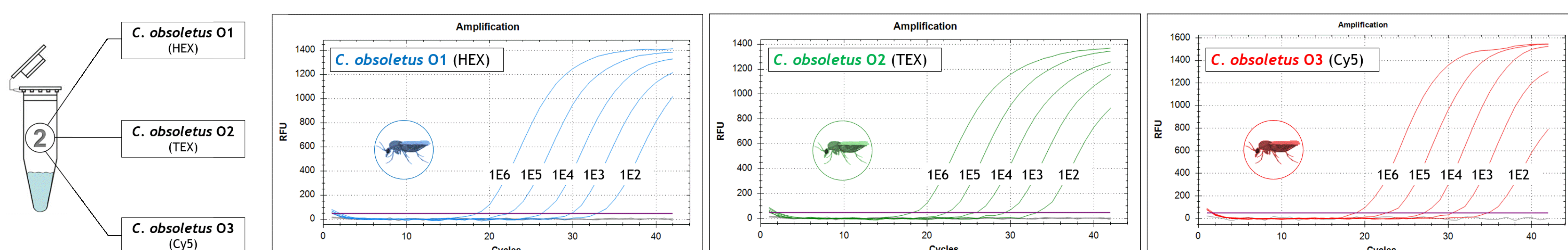
Alle epidemiologischen Untersuchungen in Zusammenhang mit einer Gnitzen-assoziierten Erkrankung erfordern eine zuverlässige und praktikable Artidentifizierung. Nur diese gewährleistet, dass zielgerechte, auf die Biologie der Vektoren abgestimmte Maßnahmen wirken. Da die wichtigsten Überträger sehr nah verwandt und morphologisch schwer differenzierbar sind (Artenkomplexe), müssen genetische Verfahren eingesetzt werden.

Die wichtigsten potenziellen BTV- und SBV-Vektoren gehören zu den Obsoletus- und Pulicaris-Gruppen, die gleichzeitig die häufigsten und am weitesten verbreiteten Gnitzenarten in Mitteleuropa darstellen. In den letzten Jahren wurden in diesen Gruppen zahlreiche genetische Varianten entdeckt, die eine Überarbeitung bestehender molekularbiologischer Tests erforderlich machte. Im Rahmen des Projektes wurde u.a. eine Two-Step PCR zur Differenzierung der Arten der Obsoletus-Gruppe entwickelt.

Bei diesem werden in einem ersten Schritt mittels spezies-spezifischer Primer und verschiedenen, mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Sonden die Arten *C. scoticus*, *C. chiopterus*, *C. dewulfi* und *C. obsoletus* sensu lato (s.l.) unterschieden.



In einer zweiten PCR können anschließend die drei genetischen Varianten von *C. obsoletus* (O1, O2 und O3) nach gleichem Prinzip unterschieden werden. Dabei können Gnitzen von bis zu 100 Individuen in einer Probe gepoolt, deren DNA extrahiert und anschließend getestet werden.



Bei der Pulicaris-Gruppe gestaltet sich die PCR-Entwicklung ungleich schwerer, da diese nach derzeitigem Kenntnisstand aus 23 genetischen Varianten besteht. Aktuell wird an der Entwicklung mehrerer konventioneller, d.h. gelbasierter PCR-Tests zur Artidentifizierung innerhalb dieser Gruppe gearbeitet.

Gnizen-Vektoren im Kontext der Klimaveränderung

Hintergrund

Vermutlich durch die Klimaerwärmung bedingt, breitet sich einer der Hauptüberträger des Blauzungen- und des Schmallenberg-Virus, *Culicoides imicola*, nach Norden aus (Abb. 1). Auch einheimische *Culicoides*-Arten gelten als potenzielle Vektoren der Viren. Im Projekt sollten folgende Fragen adressiert werden

- Ist *Culicoides imicola* weiter in den Norden von Europa vorgedrungen und auch in Deutschland vertreten?
- In welchen Monaten sind einheimische potenzielle Vektoren aktiv?
- Ist die Risikoeinschätzung zur BTV-Übertragung, basierend auf der saisonalen Gnizenaktivität noch aktuell (vektorfremde/-arme Periode)?

Material und Methoden

Deutschlandweit wurden auf landwirtschaftlichen Betrieben mit Wiederkäuerhaltung UV-Lichtfallen einmal wöchentlich für 24 Stunden eingesetzt, um *Culicoides*-Arten zu fangen. Die Proben wurden in 75% Ethanol konserviert, taxonomisch bestimmt und ausgezählt.

Ergebnisse

Culicoides imicola scheint in Deutschland weiterhin nicht vorzukommen. Aktivitäten der einheimischen *Culicoides*-Arten wurden das ganze Jahr über beobachtet. Unterschiede wurden zwischen den untersuchten Jahren und Standorten festgestellt, was darauf hindeutet, dass die Aktivitäten nicht nur temperatur-, sondern auch standortabhängig sind (Abb. 2). Aufgrund relativ hoher frühsaisonalen Temperaturen wurden an nahezu allen Standorten bereits im April signifikante Aktivitäten von *Culicoides*-Arten festgestellt. Eine Überarbeitung der bisher geltenden Risikobewertung, die auf Daten von vor 2008 basiert, scheint dringend notwendig (Abb. 3). Weitere Datenerhebungen sind notwendig, um die Risikoeinschätzung effizient laufend anpassen zu können.

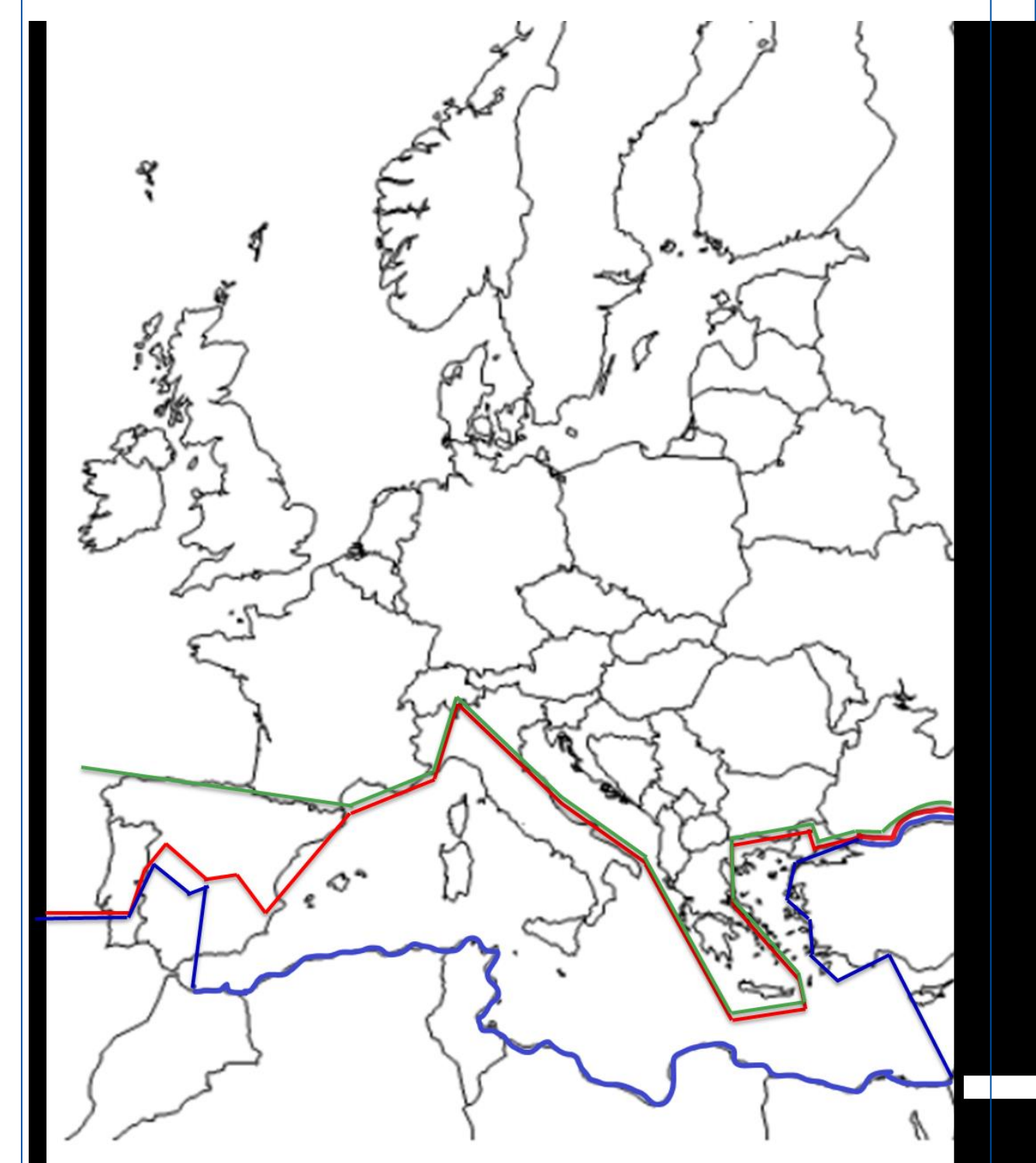


Abb. 1: Publierte nördliche Verbreitungsgrenzen von *Culicoides imicola*; blaue Linie: 1998 rote Linie: 2004 grüne Linie: 2019 (Purseet al., 2005, <https://efsa.maps.arcgis.com>, 2019)

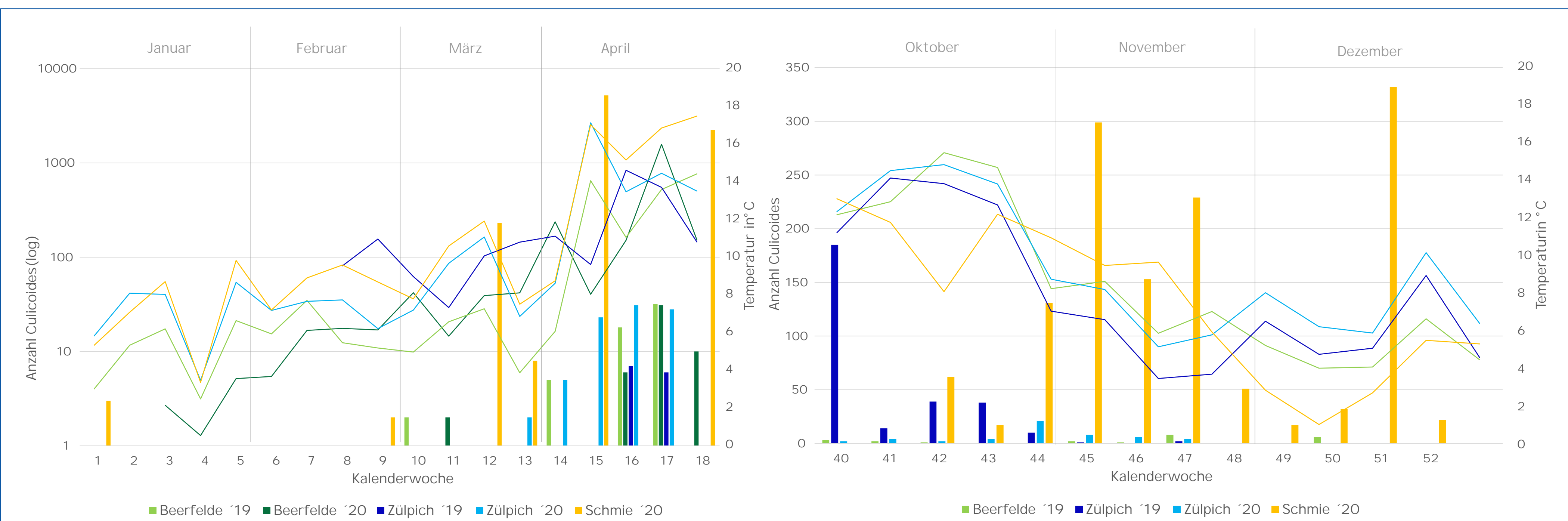


Abb. 2: *Culicoides*-Fänge an drei exemplarischen Standorten aus den Jahren 2019 ('19) und 2020 ('20). Säulen stellen die Anzahl der gefangenen *Culicoides*-Individuen dar, Linien die wöchentliche Durchschnittstemperatur. Die Standorte befinden sich in Brandenburg (Beerfelde), Nordrhein-Westfalen (Zulpich) und Baden-Württemberg (Schmie).



Abb. 3: Oben links: Risikoeinschätzung basierend auf Daten von vor 2008 (FLI, 2019). Unten: Daten aus den Jahren 2019 und 2020 zeigen, dass bereits im April das Übertragungsrisiko erhöht bzw. hoch ist. Die übrigen Zeiträume stimmen überein oder bedürfen weiterer Datenerfassung.

Schmallenberg

Schmallenberg-Virus

SBV (Abb. 4) wird als arthropod Virus durch blutsaugende Gnizen der Gattung *Culicoides* übertragen. Während der Blutmahlzeit können Viren auf empfängliche Wiederkäuer-Wirte wie Rind, Schaf und Ziege übertragen werden. Akute Infektionen verlaufen meist asymptomatisch oder mit milden Symptomen wie Fieber, Durchfall oder einem vorübergehenden Rückgang der Milchleistung. Werden trächtige Tiere allerdings während einer sensiblen Phase der Trächtigkeit infiziert, kann es zu schweren kongenitalen Missbildungen des Fetus, Mumifikation oder Abort kommen.

In-vivo Infektionsversuche im Gnizenmodell

Um SBV-Infektionen im Insektenvektor und den Einfluss klimatischer Bedingungen, wie Temperatur, auf die Virusinfektion näher zu charakterisieren, wurde eine Laborzucht von Gnizen der Gattung *Culicoides sonorensis* etabliert. Gnizen wurden experimentell mittels infektiöser Blutmahlzeit mit SBV infiziert (Abb. 5). Zur Blutverdauung wurden sie anschließend im Inkubator bei 27°C gehalten und zu verschiedenen Zeitpunkten mittels real-time RT-PCR auf das Vorkommen von SBV untersucht, um die Viruslasten direkt nach der Blutmahlzeit mit den Viruslasten nach einer bestimmten Inkubationsperiode zu untersuchen. Hieraus sollte eine Aussage über die Virusreplikation in den Gnizen getroffen werden. Es wurde nachgewiesen, dass Gnizen unter den gewählten Bedingungen Viren mit der Blutmahlzeit aufnehmen, da sie anschließend PCR-positiv reagierten. Die Erhöhung der Viruslast nach 4, 6 und 8 Tagen in ca. 2% der Gnizen zeigte eine Virusreplikation an (Abb. 6).

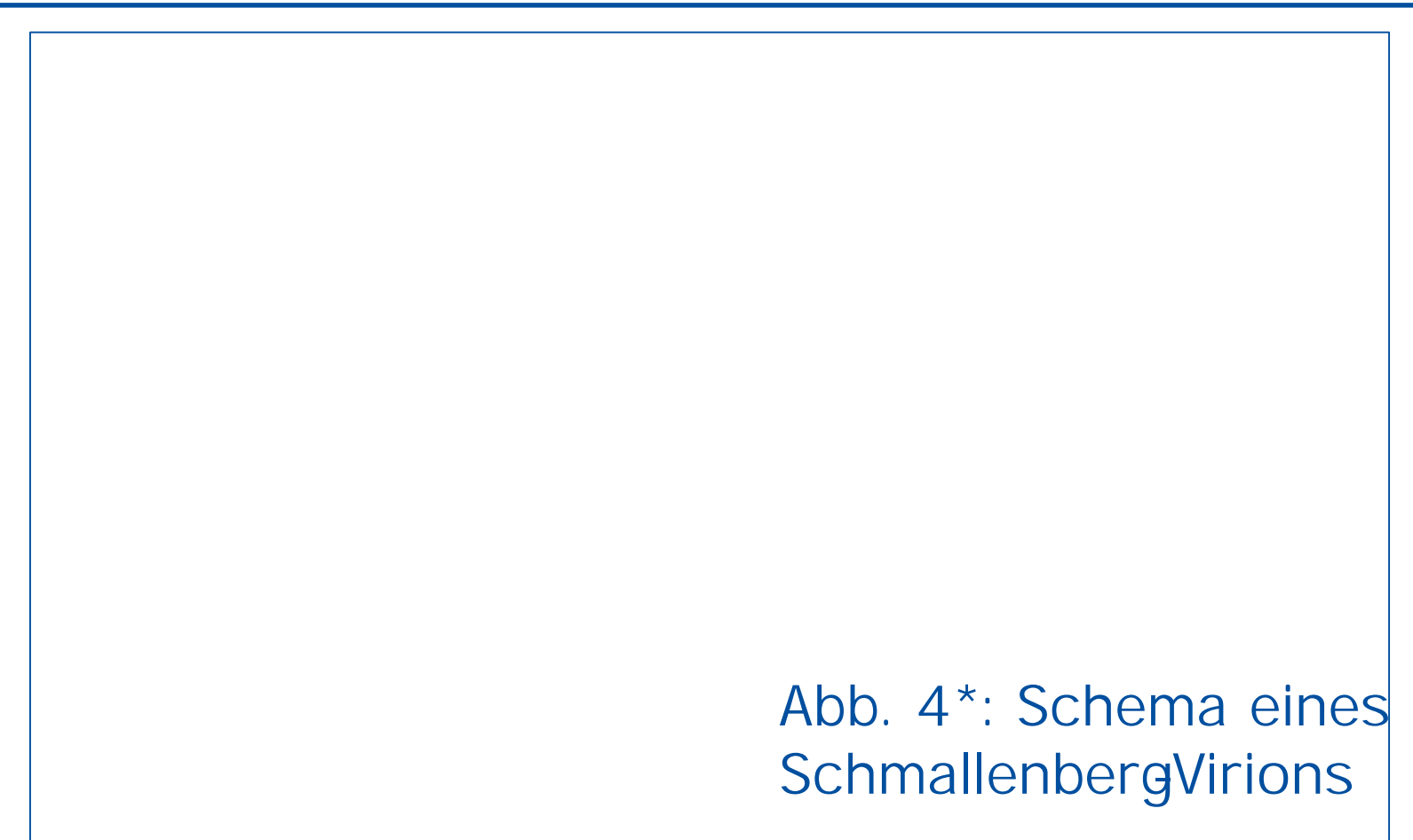


Abb. 4*: Schema eines Schmallenberg-Virusions



Abb. 5*: oben: Membranfütterungssystem verfüttert wird frisches Schafblut, gemischt mit Virus aus einer Zellkultur; unten: blutgesogene Gnizen

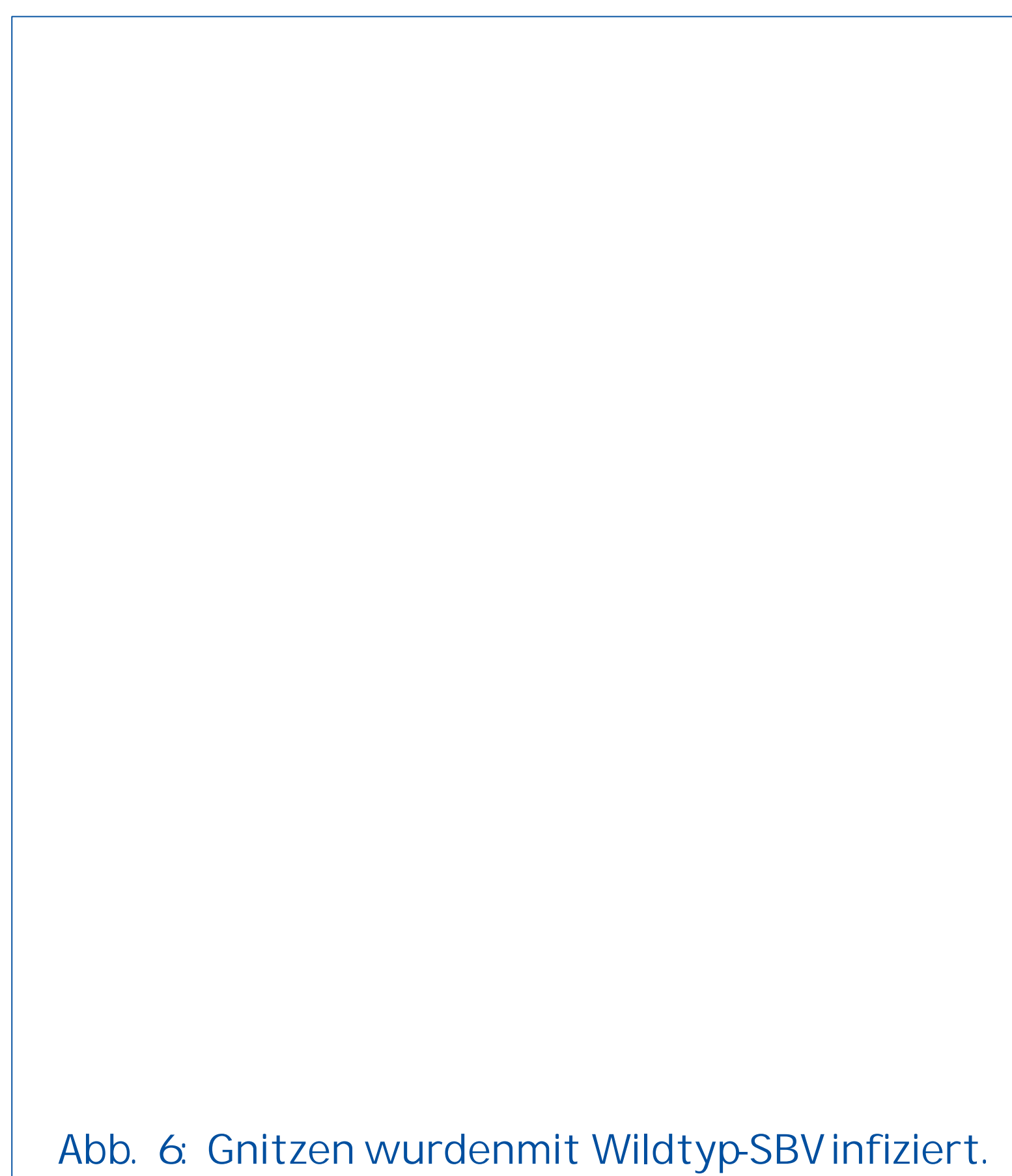


Abb. 6: Gnizen wurden mit Wildtyp-SBV infiziert.

Ausblick

Mit diesem Modell steht ein Werkzeug zur Verfügung, mit dem in Zukunft weitere Infektionen mit verschiedenen SBV-Isolaten im Insektenvektor charakterisiert werden können. Verschiedene klimatische Bedingungen können simuliert werden, um deren Einfluss auf die Virusinfektion zu untersuchen.