

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

**Schmallenberg-Virus und Orbiviren in Gnitzen -
Beobachtungen in Feld und Labor**

von Sophie Zeiske

aus Großenhain

München 2026

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Virologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Markus Meissner

Angefertigt im Institut für Virusdiagnostik des Friedrich-Loeffler-Instituts,

Bundeforschungsinstitut für Tiergesundheit, Insel Riems

Mentor: Prof. Dr. Martin Beer

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der Ludwigs-Maximilians-Universität

München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Markus Meissner

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Michael Iwersen

Tag der Promotion: 07. Februar 2026

Die vorliegende Arbeit wurde Gemäß §6 Abs. 2 der Promotionsordnung für die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München in kumulativer Form verfasst.

Folgende wissenschaftliche Arbeiten sind in dieser Dissertationsschrift enthalten:

Sophie Zeiske, Helge Kampen, Franziska Sick, Oliver Dähn, Anja Voigt, Elisa Heuser, Martin Beer, Doreen Werner and Kerstin Wernike „**Monitoring of Schmallenberg virus, bluetongue virus and epizootic haemorrhagic disease virus in biting midges in Germany 2019-2023**” erschienen in Parasites and Vectors 2025, online verfügbar unter doi: 10.1186/s13071-025-06913-w.

(Dissertation Seite 20)

Anja Voigt, Helge Kampen, Elisa Heuser, Sophie Zeiske, Bernd Hoffmann, Dirk Höper, Mark Holsteg, Franziska Sick, Sophia Ziegler, Kerstin Wernike, Martin Beer and Doreen Werner „**Bluetongue virus serotype 3 and Schmallenberg virus in *Culicoides* biting midges, Western Germany, 2023**” erschienen in Emerging Infectious Diseases 2024, online verfügbar unter doi: 10.3201/eid3007.240275.

(Dissertation Seite 40)

Sophie Zeiske, Franziska Sick, Helge Kampen, Bernd Hoffmann, Martin Beer and Kerstin Wernike „**Experimental BTV-3 and BTV-8 infection of *Culicoides sonorensis* biting midges**” erschienen in Parasites and Vectors 2025, online verfügbar unter doi: 10.1186/s13071-025-06883-z.

(Dissertation Seite 45)

Eine weitere Arbeit, die nicht in der Dissertationsschrift enthalten ist:

Franziska Sick, Sophie Zeiske, Martin Beer and Kerstin Wernike „**Characterization of a natural 'dead-end' variant of Schmallenberg virus**” erschienen in Journal of General Virology 2024, online verfügbar unter doi: 10.1099/jgv.0.002005

„The distance is nothing when one has a motive.”

(Jane Austen)

Inhalt

1	Einleitung.....	1
2	Literaturübersicht.....	3
2.1	Schmallenberg-Virus	3
2.1.1	Toxonomie und Aufbau	3
2.1.2	Epidemiologie und Wirtsspektrum.....	3
2.1.3	Krankheitsbild	4
2.2	Virus der Blauzungenkrankheit und Virus der epizootischen Hämorrhagie der Hirsche.....	5
2.2.1	Taxonomie und Aufbau.....	5
2.2.2	Epidemiologie und Wirtsspektrum.....	5
2.2.3	Krankheitsbild	7
2.3	Gnitzen	8
2.4	Gnitzen als Überträger von Viren.....	9
2.5	Monitoring von Viren in Gnitzen	11
2.5.1	Definition und Ziele des Vektormonitoring	11
2.5.2	Gnitzenmonitoring in Europa.....	11
2.5.2.1	BTV-Monitoring in Gnitzen.....	14
2.5.2.2	SBV-Monitoring in Gnitzen.....	14
2.5.2.3	EHDV-Monitoring in Gnitzen	15
2.6	Experimentelle Gnitzen-Infektionsversuche mit BTV	15
3	Zielsetzung.....	19
3.1	Durchführung eines Gnitzenmonitoring in Deutschland	19
3.2	Untersuchung von BTV-3 in experimentellen Gnitzen-Infektionsversuchen	19
4	Ergebnisse.....	20
5	Diskussion.....	52
5.1	Gnitzenmonitoring in Deutschland 2019 bis 2023	52
5.2	Gnitzen-Infektionsversuche mit BTV-3 und BTV-8	60
6	Schlussfolgerung und Ausblick.....	63
7	Zusammenfassung	64
8	Summary	66
9	Literaturverzeichnis	68
10	Abkürzungsverzeichnis	83
11	Danksagung	84

1 Einleitung

Das Schmallenberg-Virus (SBV), das Virus der Blauzungkrankheit (bluetongue virus; BTV) und das Virus der epizootischen Hämorrhagie der Hirsche (epizootic hemorrhagic disease *virus*; EHDV) sind Insekten-übertragene Viren mit veterinärmedizinischer Bedeutung. SBV wird in die Simbu-Serogruppe innerhalb der Gattung der Orthobunyaviren (Familie *Peribunyaviridae*) eingeordnet und ist eng mit anderen Vertretern der Simbu-Serogruppe wie dem Shuni-Virus oder dem Akabane-Virus verwandt (1, 2). Viele Viren aus der Simbu-Serogruppe, wie auch SBV, lösen bei adulten Wiederkäuern asymptomatische Infektionen oder lediglich milde Symptome wie Fieber, Durchfall und Milchleistungsrückgang aus (3-7). Das größere Problem ist die Infektion von trächtigen Wiederkäuern, vor allem in der sensiblen Phase der frühen Trächtigkeit. Das Virus kann dann auf die Frucht übertragen werden und zu Aborten, Totgeburten und kongenitalen Missbildungen der Frucht führen (6-9). SBV wurde im Jahr 2011 zum ersten Mal in Deutschland, in der Nähe der Stadt Schmallenberg in einem Rind nachgewiesen und breitete sich anschließend in vielen europäischen Ländern aus (3, 10). In Deutschland tritt SBV heute endemisch auf (11, 12).

BTV und EHDV gehören zum Genus *Orbivirus* der (Familie *Sedoreoviridae*) und können bei der akuten Infektion von Wiederkäuern die Krankheit eines hämorrhagischen Fiebers auslösen (13, 14). Häufig auftretende Symptome sind Fieber, hyperämische Schleimhäute, Ödeme und Ulzerationen im Maul und Klauenbereich, sowie seröser bis blutiger Nasenausfluss (14-16). Tödliche Verläufe der Krankheit können infolge von hämorrhagischen Läsionen an den inneren Organen auftreten (17). Auch infolge von BTV- und EHDV-Infektionen trächtiger Wiederkäuer kann es zu Aborten oder Missbildungen der Feten kommen (18-20). Die ersten Berichte über die Blauzungkrankheit stammen aus Südafrika aus dem 19. Jahrhundert (21). Mit Ausnahme der Antarktis ist BTV heute weltweit verbreitet (22). Seit dem ersten Auftreten der Blauzungkrankheit in Südeuropa im Jahr 1998 und in Zentraleuropa im Jahr 2006, kam es immer wieder zu Ausbrüchen mit verschiedenen Serotypen (23). Klinisch relevant sind 24 BTV-Serotypen (1-24). EHDV wurde zuerst 1955 bei einem Ausbruch des hämorrhagischen Fiebers in Weißwedelhirschen in Nordamerika beschrieben (24). Auch EHDV ist weit verbreitet und kommt heute in Südamerika, Asien, Australien, Afrika und in Südeuropa mit 7 unterschiedlichen Serotypen vor (25-27).

Gnitzen aus der Gattung *Culicoides* sind für die Übertragung von SBV, BTV und EHDV auf die Wiederkäuer verantwortlich (28). Gnitzen gehören zu den kleinsten blutsaugenden Insekten und sind, mit Ausnahme der extremen Polarregionen, weltweit verbreitet (28). Im Vergleich zu

Einleitung

anderen Vektoren wie Stechmücken und Zecken wird die Übertragung von Krankheiten durch Gnitzen deutlich weniger erforscht (29). Mit den ersten Ausbrüchen der Blauzungenkrankheit in Südeuropa in den späten 1990er Jahren (30), dem ersten Ausbruch von BTV Serotyp 8 (BTV-8) in Zentraleuropa 2006/2007 (31), sowie dem ersten Auftreten der Schmallenberg-Krankheit 2011 (3) nahm die Bedeutung der Gnitzen als wichtige Krankheitsüberträger in Europa zu. Um die Artenzusammensetzung und die Prävalenz von Viren in den Gnitzen zu untersuchen, wurden in vielen europäischen Ländern Gnitzenmonitoring-Studien durchgeführt (32-40). Eine andere Möglichkeit zur Untersuchung von Gnitzen als Überträger von Viren ist die Durchführung von experimentellen Infektionsversuchen mit Gnitzen aus Laborkolonien oder im Feld gefangenen Gnitzen (29).

Im September 2023 kam es in den Niederlanden zum ersten Ausbruch des für Mitteleuropa neuen BTV Serotyps 3 (BTV-3) in Zentraleuropa (41). In Deutschland wurde der erste Fall im Oktober 2023 gemeldet. BTV-3 breitete sich ab dem Frühjahr 2024 rapide in Deutschland und Europa aus und führte zu erheblichen Verlusten in tierhaltenden landwirtschaftlichen Betrieben (Quelle: Tierseuchen-Nachrichtensystem (TSN)). Das Ausmaß des BTV-3 Ausbruchs 2023/2024 übertraf damit sogar den Ausbruch von BTV-8 2006/2007.

Die vorliegende Arbeit umfasst mehrere publizierte Studien, in welchen die Ergebnisse des Gnitzenmonitorings in Deutschland von 2019 bis 2023 vorgestellt werden. In diesen Studien wurden Gnitzen in ganz Deutschland auf landwirtschaftlichen Betrieben mit Nutztierhaltung gefangen, morphologisch vorbestimmt und auf die Virusgenome von SBV, BTV und EHDV untersucht. Die Spezies der virus-positiven Gnitzen wurden zudem durch spezifische molekularbiologische Methoden identifiziert. Ein weiterer Artikel befasst sich mit den Ergebnissen von experimentellen Infektionsversuchen mit Gnitzen. Bei diesen Versuchen wurden laborgezüchtete Gnitzen der nordamerikanischen Art *Culicoides sonorensis* jeweils mit BTV-3 oder mit BTV-8 infiziert.

2 Literaturübersicht

2.1 Schmallenberg-Virus

2.1.1 Taxonomie und Aufbau

Das Schmallenberg-Virus (SBV) ist ein RNA-Virus mit einem einzelsträngigen, segmentierten Genom und wird vom *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) in die Gattung *Orthobunyaviren* (Familie *Peribunyaviridae*, Ordnung *Bunyavirales*) eingeordnet (1). SBV gehört zusammen mit 32 weiteren Viren zur Simbu-Serogruppe (2). Innerhalb der Simbu-Gruppe werden, basierend auf der Nukleotidsequenz des größten RNA-Segmentes, mehrere Spezieskomplexe unterschieden (1). SBV wird mit den verwandten Viren Shamonda-Virus, Sathuperi-Virus und Douglas-Virus zum Spezieskomplex *Orthobunyavirus schmallenbergense* gezählt (1).

Die SBV-Partikel sind wie andere Orthobunyaviren behüllt, sphärisch und etwa 100nm groß (42). Alle Orthobunyaviren zeichnen sich durch einen simplen Aufbau der Viruspartikel mit insgesamt nur vier Strukturproteinen und zwei Nichtstrukturproteinen aus (43). Im Inneren des SBV-Partikels finden sich die für Orthobunyaviren typischen drei Genomsegmente aus einem einzelsträngigen RNA-Genom negativer Polarität (44). Die codierende Region in jedem Segment wird von nicht-translatierenden Regionen (NTR) am 5' und 3' Ende umschlossen. Komplementäre Nukleotidsequenzen in den NTRs führen zur Bildung von Panhandle-Strukturen der einzelnen Segmente (45).

2.1.2 Epidemiologie und Wirtsspektrum

Bei der Schmallenberg-Virus Erkrankung handelt es sich um eine durch Gnitzen der Gattung *Culicoides* übertragene, nicht-kontagiöse Erkrankung. Der Erstnachweis von SBV erfolgte 2011 in einem Rind an der deutsch-belgischen Grenze, nahe der Stadt Schmallenberg (3). SBV breitete sich rapide über Europa aus und kommt heute in den meisten europäischen Ländern endemisch vor (10, 29). SBV-RNA konnte außer in Rindern besonders auch in anderen domestizierten Wiederkäuern wie Schafen und Ziegen nachgewiesen werden (4, 46-48). In einer Vielzahl weiterer domestizierter und wildlebender Wiederkäuer, sowie in Kameliden konnte SBV serologisch nachgewiesen werden (12, 49-53). Auch SBV seropositive Wildschweine sind beschrieben (49).

2.1.3 Krankheitsbild

Adulte Wiederkäuer zeigen nach einer Infektion mit SBV eine kurze Virämie von 3-5 Tagen und zumeist keine oder lediglich milde Symptome wie leichtes Fieber, Milchleistungsrückgang oder Durchfall (3-5). Durch die Infektion von naiven trächtigen Kühen, Schafen oder Ziegen in der vulnerablen Gestationsphase kann das Virus auf die Frucht übertragen werden und zu Aborten, Frühgeburten, Totgeburten oder der Geburt von missgebildeten Lämmern oder Kälbern führen (8, 9). In der frühen Phase der Trächtigkeit führt die SBV-Infektion meist zum Tod der Frucht. Dahingegen kann eine Infektion zwischen dem 30. bis 60. Tag der Trächtigkeit bei Schafen und Ziegen bzw. zwischen Tag 30 und 150 beim Rind zu kongenitalen Missbildungen der Lämmer und Kälber führen (54, 55). Diese Missbildungen werden unter dem Begriff „Arthrogryposis-Hydranencephalie-Syndrom“ zusammengefasst und betreffen vor allem den Bewegungsapparat und das zentrale Nervensystem (42) (Abbildung 1). Bei weniger ausgeprägten Missbildungen können die Jungtiere überleben. Sie sind aber durch die zentralnervöse Schädigung stark eingeschränkt und teilweise nicht in der Lage, Milch zu saugen (46, 54, 56).



Abbildung 1: Missbildungen als Folge einer Schmallenberg-Virus-Infektion. Rinderfetus mit Arthrogrypose aller vier Gliedmaßen, Torticollis, Kyphose, Brachygnathia inferior und Hypoplasie der Skelettmuskulatur nach Collins et al. (57).

2.2 Virus der Blauzungenkrankheit und Virus der epizootischen Hämorrhagie der Hirsche

2.2.1 Taxonomie und Aufbau

Das Blauzungenvirus (BTV) und das Virus der epizootischen Hämorrhagie der Hirsche (EHDV) gehören in die Gattung der Orbiviren (Familie *Sedoreoviridae*, Ordnung *Reovirales*) (13). Im Jahr 2023 hat die ICTV eine Umbenennung der Virusspezies innerhalb der Gattung Orbiviren vorgenommen. Die verschiedenen BTV-Serotypen gehören jetzt zur Spezies *Orbivirus caerulinguae* und die EHDV-Serotypen zur Spezies *Orbivirus ruminantium* (58).

Die Viruspartikel von BTV und EHDV sind unbehüllt und ungefähr 80nm groß (13, 59). Sie sind aus den für Orbiviren typischen drei Proteinschichten aufgebaut, dem äußeren Capsid mit einer ikosaedrischen Form, einem inneren Capsid und dem Kern, der das Genom einschließt (13). Das Genom von BTV und EHDV besteht aus einer doppelsträngigen RNA (dsRNA), die in 10 Segmente eingeteilt vorliegt (13). Die dsRNA enthält die Informationen für insgesamt 7 Strukturproteine und 6 Nichtstrukturproteine (13).

2.2.2 Epidemiologie und Wirtsspektrum

BTV und EHDV werden, mit Ausnahme der atypischen BTV-Serotypen, durch Gnitzen zwischen den Wirbeltierwirten übertragen (60-63). Der erste Bericht über die Blauzungenkrankheit stammt aus dem 19. Jahrhundert aus Südafrika und lässt sich auf die Einführung von nord-afrikanischen Merinoschafen zurückführen (21). Heute werden insgesamt 24 klassische und mehrere atypische BTV-Serotypen unterschieden, die in verschiedenen Konstellationen auf jedem Kontinent, mit Ausnahme der Antarktis auftreten (22). Im September 2023 wurde BTV-3 zum ersten Mal in den Niederlanden nachgewiesen (41) und breitete sich ab dem Frühjahr 2024 massiv in Deutschland sowie weiteren europäischen Ländern aus (64) (Abbildung 2).

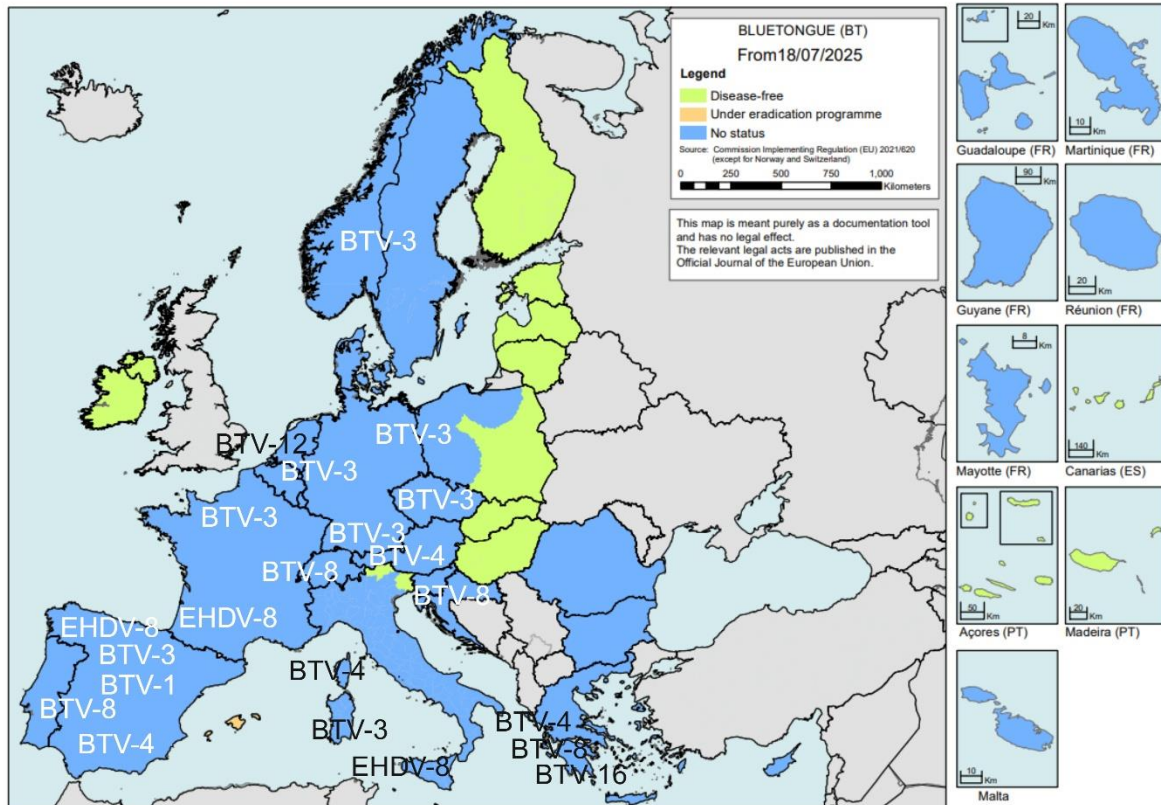


Abbildung 2: Landkarte der EU-Mitgliedsstaaten mit aktuellem Vorkommen von BTV- und EHDV-Serotypen, Stand: September 2025. Adaptierte Karte der Europäischen Kommission (65).

Die meisten domestizierten und wildlebenden Wiederkäuer sind empfänglich für die BTV-Infektion, jedoch gibt es je nach Wirtspezies und BTV-Stamm Unterschiede bei den daraus resultierenden klinischen Bildern und Effekten (66). Während viele Wiederkäuer-Spezies asymptomatisch oder subklinisch mit BTV infiziert werden, zeigen Schafe meist schwere Symptome und gelten als Hauptwirt (17). Rinder, Ziegen und indigene Schafrasse galten lange Zeit als Reservoir, weil sie meist keine klinische Erkrankung nach der BTV-Infektion zeigen (30). Bei mehreren Ausbrüchen mit verschiedenen BTV-Serotypen konnten klinische Symptome mit teilweise schweren Verläufen bei Rindern beobachtet werden. Ziegen gelten als Wirte für die atypischen BTV-Serotypen, die auch durch direkten Kontakt übertragen werden können (63).

EHDV wurde erstmals 1955 in Nordamerika bei einem Ausbruch der Krankheit in Weißwedelhirschen beschrieben (24). Seitdem wurde EHDV in Südamerika, Asien, Australien, Afrika und in Südeuropa gefunden (25-27) (Abbildung 2). EHDV-RNA wurde bei einer Vielzahl von domestizierten und wildlebenden Wiederkäuern nachgewiesen (25). Bis auf die

Weißwedelhirsche erkranken die verschiedenen Wiederkäuerarten meist nur asymptomatisch oder subklinisch (67-69). Das Krankheitsbild einer EHDV-Infektion ist, ähnlich wie bei BTV, vom Virusstamm und der Empfänglichkeit des Wirtes abhängig (25). Insgesamt werden sieben EHDV-Serotypen unterschieden (16). Ausbrüche mit verschiedenen EHDV-Serotypen haben gezeigt, dass Rinder und Schafe ebenfalls an EHDV erkranken können (26, 70).

2.2.3 Krankheitsbild

BTV und EHDV lösen durch eine direkte Schädigung der Endothelzellen das Krankheitsbild eines hämorrhagischen Fiebers mit Hyperämie, Ödemen, Petechien, Erosionen und Ulzerationen aus (14). Die Klinik äußert sich typischerweise in Symptomen wie Fieber, serösen bis blutigen Nasenausfluss, Läsionen und Ödemen im Maul- und Nasenbereich, sowie Lahmheit mit hyperämischen Läsionen am Kronsaum und Schwäche (15, 16) (Abbildung 3). Bei schweren Verläufen können zudem Lungenödeme, Pleuritis, Perikarditis, Pleura- und Perikardergüsse auftreten, in deren Folge es zur Atemnot und zum Tod der erkrankten Tiere kommen kann (17) (Abbildung 3). Durch die Infektion von trächtigen Kühen, Schafen oder Ziegen kann es zu Aborten oder Missbildungen der Feten kommen (18-20). Im Gegensatz zu SBV zeigen Tiere nach BTV- oder EHDV-Infektionen eine deutlich längere Virämie. BTV-RNA konnte bei infizierten Schafen bis zu 100 Tage und bei infizierten Rindern bis zu 180 Tage im Blut nachgewiesen werden (71, 72). BTV konnte bei Rindern bis zu 49 Tage und EHDV bis zu 50 Tage nach der Infektion aus dem Blut isoliert werden (68, 73).

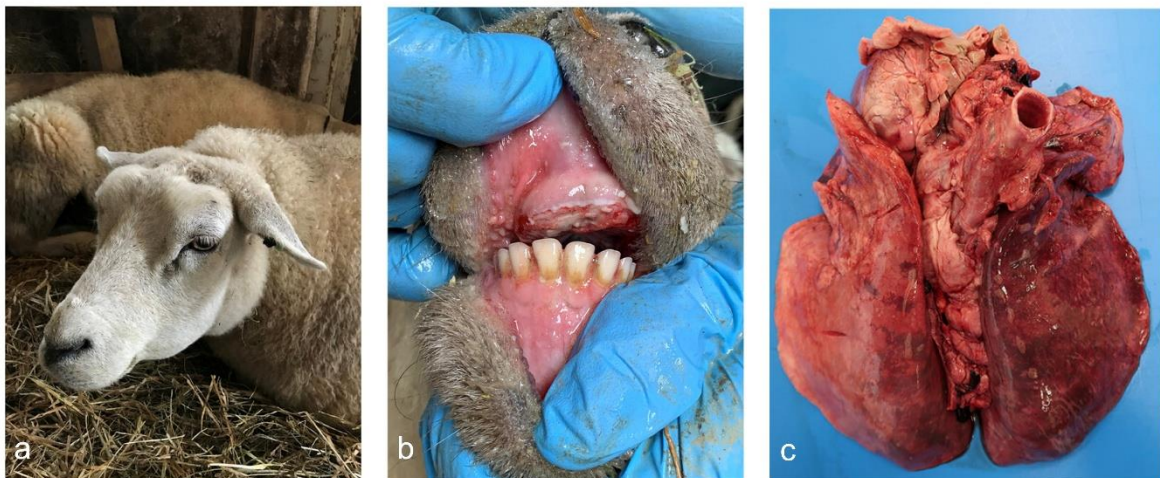


Abbildung 3: Klinische und pathologische Veränderungen in Schafen nach einer Infektion mit dem Blauzungenvirus (BTV) Serotyp 3. Verändert nach Van den Brink et al. (74). a) Ein Schaf mit ödematösen Veränderungen an Kopf und Kiefer. b) Das Maul eines Schafes mit ulzerativen Läsionen an der Dentalplatte. c) Ödematöse Veränderung der Lunge eines Schafes.

2.3 Gnitzen

Gnitzen der Gattung *Culicoides* gehören zur Familie *Ceratopogonidae* innerhalb der Ordnung *Diptera*. Die mehr als 1347 verschiedenen *Culicoides* Spezies sind nur 1-3mm groß und zählen damit zu den kleinsten blutsaugenden Zweiflüglern der Welt (28). In der paläarktischen Region, wie Deutschland, findet man vor allem *Culicoides*-Spezies aus dem Subgenus *Avaritia* Fox, gefolgt von dem Subgenus *Culicoides* Latreille und nur ein kleiner Teil der Gnitzen wird anderen Subgenera zugeordnet (35, 40, 75, 76). Die Arten aus dem Subgenus *Avarita*, die in Deutschland am häufigsten gefangen werden, sind: *C. obsoletus* (Abbildung 4), *C. scoticus*, *C. dewulfi* und *C. chiopterus* (34, 77-81). Aufgrund der morphologischen Ähnlichkeit der weiblichen Gnitzen werden *C. obsoletus* und *C. scoticus* dem Obsoletus Komplex zugeordnet (82). Aus dem Subgenus *Culicoides* treten in Deutschland häufig die Spezies *C. punctatus*, *C. impunctatus*, *C. deltus/lupicaris*, *C. newsteadi*, *C. grisescens* und *C. pulicaris* auf (34, 77-81). Durch das Auftreten der Gnitzen in großen Schwärmen können sie in landwirtschaftlichen Betrieben, in der Forstwirtschaft und in einigen touristischen Gebieten eine massive Belästigung für Mensch und Tier darstellen (83, 84). Die schmerzhaften Bisse der Gnitzen führen beim Menschen in der Regel zu juckenden papulösen Läsionen, die teilweise mehrere Wochen bestehen können (85). Bei Pferden dagegen können die Bisse schwere allergische Hautreaktionen („sweet itch“) verursachen (86). Gnitzenbisse sind nicht nur lästig, sie haben zudem eine große medizinische Bedeutung durch die Übertragung von Krankheitserregern wie Protozoen, Nematoden oder Viren (87).



Abbildung 4: Mikroskopische Aufnahme von Gnitzen der Gattung *Culicoides*.

2.4 Gnitzen als Überträger von Viren

Die durch Gnitzen übertragenen Viren werden als Arboviren („arthropod borne viruses“) bezeichnet. Während der Blutmahlzeit an den Wirbeltierwirten können die Arthropoden Viren von virämischen Tieren aufnehmen oder Viren auf den Wirt übertragen (Abbildung 5). Dabei sind bei den meisten *Culicoides*-Spezies die weiblichen Gnitzen für die Virusübertragung verantwortlich, da nur sie Blutmahlzeiten aufnehmen um die Eientwicklung zu ermöglichen. Insgesamt wurden weltweit mehr als 50 Viren aus den verschiedenen *Culicoides*-Spezies isoliert (88). Die meisten Viren gehören zu den Familien *Reoviridae*, *Peribunyaviridae* und *Rhabdoviridae*. Der Großteil dieser Viren löst Krankheiten bei Tieren aus und spielt vor allem für die Veterinärmedizin eine große Rolle. Zu den humanpathogenen Viren, die durch Gnitzen übertragen werden, gehören Orthobunyaviren der Simbu-Serogruppe wie das Oropouche Virus und eng verwandte Viren wie das Madre de Dios Virus oder Iquitos Virus, sowie das Shuni-Virus (89-91).

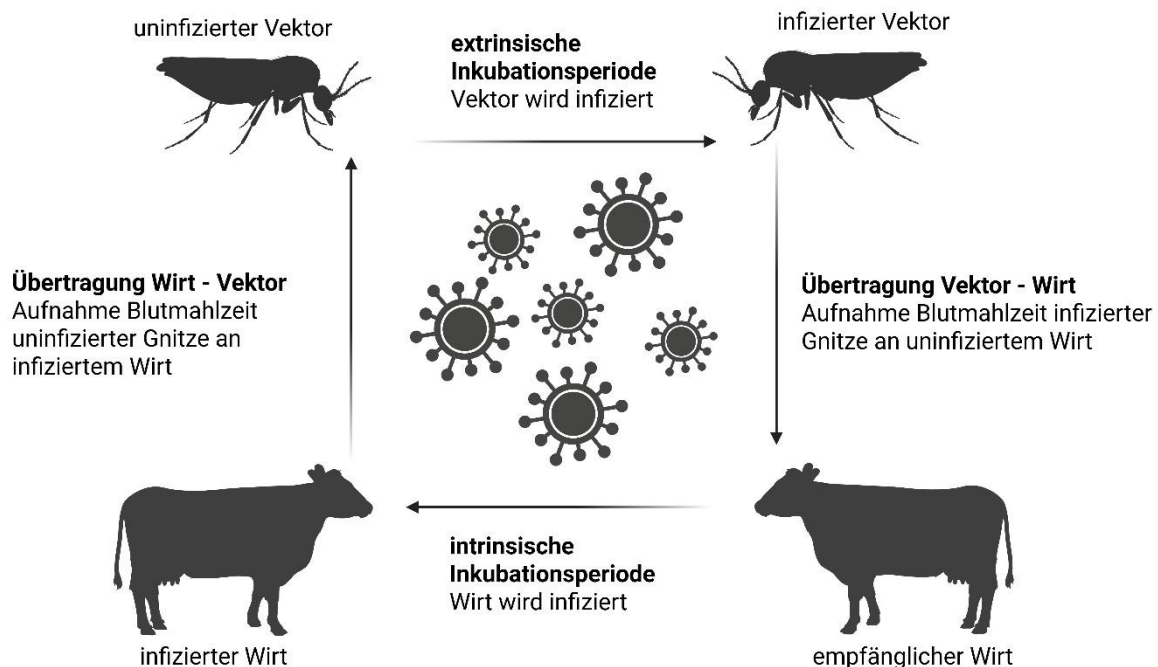


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Infektionszyklus zwischen Vektor und Wirt. Erstellt mit Biorender.com.

Die Aufrechterhaltung des Infektionszyklus von durch Gnitzen übertragenen Arboviren basiert auf der horizontalen Übertragung des Virus zwischen dem Insekten-Vektor und dem Wirbeltierwirt. Innerhalb der Gnitzen existieren Barrieren, die eine Virusausbreitung und damit die Übertragung verhindern (88). Die wichtigsten Barrieren scheinen dabei die Infektion der

Mitteldarm-Epithelzellen sowie der Escape aus den Darmepithel in das Haemocoel zu sein (88, 92, 93). Im Haemocoel der Insekten befindet sich eine weitere Barriere der Virusausbreitung in Form des Fettkörpers (92). Erst wenn das Virus auch den Fettkörper der Gnitze überwunden hat, kann die Infektion weiterer Organe, einschließlich der Speicheldrüse erfolgen (92). Eine erfolgreiche Infektion der Speicheldrüse ist die Voraussetzung für die Virusübertragung bei der nächsten Blutmahlzeit der Gnitze (88).

Jede der Barrieren hat einen Einfluss auf die Virusübertragung und damit auf die Vektorkompetenz der Gnitzen. Die Vektorkompetenz kann sich sowohl zwischen den einzelnen Gnitzen von verschiedenen Spezies als auch innerhalb einer Gnitzenart unterscheiden (94). Nur eine kleine Zahl an Gnitzenindividuen wird nach der oralen Aufnahme einer virushaltigen Blutmahlzeit tatsächlich infiziert und kann das Virus übertragen (95). Dagegen ist die Virusübertragung von der infizierten Gnitze an den Wirbeltierwirt sehr effizient (95).

Die sicherste Methode zur Festlegung der Vektorkompetenz ist die getrennte Untersuchung von Körper und Kopf der Gnitze. Nur wenn das Virus auch in den Köpfen der Gnitzen nachgewiesen werden kann, konnte das Virus die Barriere der Mitteldarmzellen und des Fettkörpers überwinden und in der Speicheldrüse replizieren (29, 88). Eine weitere Möglichkeit für den Nachweis der Vektorkompetenz ist der Nachweis von Virusreplikation im Rahmen von Infektionsexperimenten mit laborgezüchteten Gnitzen oder mit im Feld gefangenen einheimischen Gnitzen.

Insgesamt gibt es nur wenige Studien, die sich mit der Vektorkompetenz der in Europa heimischen Gnitzen beschäftigen. Für SBV wurde die Vektorkompetenz für die *Culicoides*-Arten aus dem *Obsoletus* Komplex und *C. imicola*, sowie mit Vorbehalt auch für *C. chiopterus* und *C. dewulfi* bewiesen (75, 96, 97). Für die Arten aus dem Subgenus *Culicoides* gibt es keinen Nachweis für Replikation und Übertragung von SBV (94). Die nachgewiesenen Vektoren für BTV in Europa sind *C. imicola*, *C. scoticus*, *C. obsoletus*, *C. nubeculosus*, *C. impunctatus* und *C. pulicaris* (98-103). Wobei *C. nubeculosus* und *C. impunctatus* vermutlich bei der natürlichen Infektion im Feld keine Rolle spielen (28, 104). Für das erst vor einigen Jahren in Europa auftretenden EHDV gibt es den Nachweis der Vektorkompetenz für *C. imicola*, *C. obsoletus*, *C. scoticus* und *C. punctatus* (25, 105, 106).

2.5 Monitoring von Viren in Gnitzen

2.5.1 Definition und Ziele des Vektormonitoring

Das Vektormonitoring, als Bestandteil der Vektor-Surveillance, wird definiert als die Untersuchung von Vektoren, wie beispielsweise Insekten, um das Risiko einer Übertragung einer vektorübertragenen Krankheiten auf den Wirt einzuschätzen (107). Das Vektormonitoring dient der Untersuchung von Vorkommen und Häufigkeit der krankheitsübertragenden Vektoren. Das Monitoring erlaubt in diesem Zusammenhang die Erfassung von Daten über örtliche Unterschiede in Vektor-Vorkommen sowie über temperatur- bzw. jahreszeitabhängige Unterschiede in der Vektoraktivität. Weiterhin können Unterschiede hinsichtlich der Spezies-Zusammensetzung von Vektor-Populationen detektiert werden. Ein weiterer Schwerpunkt des Vektor-Monitorings ist es einen Überblick über das Prävalenz von Pathogenen in den Vektoren zu bekommen. Mithilfe der Information über die Infektionsrate in den Vektoren und den Informationen über Vektordichte und Vektoraktivität ist es möglich das Risiko der Übertragung von den vektorübertragenen Krankheiten zu bestimmen. Entsprechend der Risikoeinschätzung können Handlungsmaßnahmen zur Vektorkontrolle oder zum Schutz der für die Krankheit empfänglichen Tiere oder Menschen getroffen werden (107).

2.5.2 Gnitzenmonitoring in Europa

Wichtige Vektoren für die Übertragung von Krankheiten bei Tieren und Menschen sind Gnitzen aus der Gattung *Culicoides*. Gnitzen sind, mit Ausnahme der Antarktis, weltweit verbreitet und übertragen verschiedene Pathogene. Dabei sind vor allem die durch Gnitzen-übertragenen Viren für die Human- und Veterinärmedizin von Bedeutung. Trotzdem wurden *Culicoides* in der Vergangenheit als Vektoren für Viruserkrankungen in Europa vernachlässigt. Erst der Eintrag von BTV, SBV und EHDV in Europa führte dazu, dass auch Gnitzen in den Fokus wissenschaftlicher Forschung gelangt sind.

Nach den Ausbrüchen von BTV in Südeuropa 1998 wurden im Jahr 2000 von der Europäischen Kommission eine Reihe von Regulationen für die BTV-Kontrolle für betroffene Länder beschlossen. Nach der EU-Verordnung (EC) Nummer 1266/2007 ist es verpflichtend, dass im Rahmen der BTV-Surveillance auch ein Monitoring der Gnitzen als BTV-Vektor umgesetzt wird. In einigen südeuropäischen Ländern wie Frankreich, Italien und Portugal wurden schon seit dem Jahr 2000 Gnitzenmonitoring-Programme als Reaktion auf mehrere BTV-Ausbrüche im Mittelmeerraum eingeführt (37, 39, 108, 109). Als Folge des Ausbruchs der Blauzungkrankheit 2006 wurden auch in vielen zentral- und nordeuropäischen Ländern

Gnitzenmonitoring-Programme implementiert. Gnitzen wurden unter anderem in Deutschland, Frankreich, Schweden, Belgien, der Schweiz, den Niederlanden, Rumänien, Spanien und England gefangen (80, 108, 110-119). Die verschiedenen publizierten Studien zum Gnitzenmonitoring in Europa lassen sich allerdings nur schwer vergleichen, da sie sowohl in der Durchführung der Gnitzenfänge, als auch in der Auswertung hinsichtlich der Speziesbestimmung oder der Virus-Detektion variieren.

Viele der Monitoring-Studien wurden durchgeführt um das Vorkommen und die Zusammensetzung der *Culicoides*-Population zu untersuchen, ohne Viren in den Gnitzen nachzuweisen. In den nord- und zentraleuropäischen Ländern, wie Deutschland, Schweden, der Schweiz, Belgien, den Niederlanden und England wurden fast 90% der gefangenen Gnitzen als Spezies aus dem Subgenus *Avaritia*, insbesondere als *Obsoletus* Komplex identifiziert (120) (Abbildung 6). Etwa 10% der Gnitzen aus dieser Region wurden dem Subgenus *Culicoides* zugeordnet (120) (Abbildung 6). Nur ein kleiner Teil der Gnitzen waren Spezies aus anderen Subgenera. Auch in Rumänien wurden mit fast 60% vor allem *Obsoletus* Gnitzen gefangen, etwa 30% der Gnitzen wurden als *Pulicaris* Gnitzen identifiziert und 10% wurden anderen Subgenera zugeordnet (114). In den südeuropäischen Ländern wie Spanien, Frankreich, Italien und Portugal wurden neben den Spezies aus der *Obsoletus*- und *Pulicaris*-Gruppe auch *Culicoides imicola* gefangen (Abbildung 6). In Portugal wurden 66% der gefangenen Gnitzen als *C. imicola* identifiziert, 17% als *C. obsoletus* und 11% als *C. pulicaris* (39). Auch in Andalusien (Spanien) wurde *C. imicola* insgesamt am häufigsten gefangen, gefolgt von den Spezies aus dem *Obsoletus* Komplex und dem *Pulicaris* Komplex (119) (Abbildung 6). In Italien wurde *C. imicola* im südlichen Teil des Landes, an den Mittelmeerküsten gefunden, während im Inneren des Landes vor allem Gnitzen aus den Speziesgruppen *Obsoletus* und *Pulicaris* auftreten (37, 121) (Abbildung 6). In Frankreich konnte sich *C. imicola* ebenfalls nur im Süden etablieren, während im restlichen Teil des Landes vor allem die Gnitzenarten aus dem *Obsoletus* Komplex, sowie *C. chiopterus*, *C. dewulfi* und Gnitzen aus dem Subgenus *Culicoides*, wie *C. pulicaris*, *C. lupicaris*, *C. punctatus* und *C. newsteadi* vorkommen (122) (Abbildung 6).

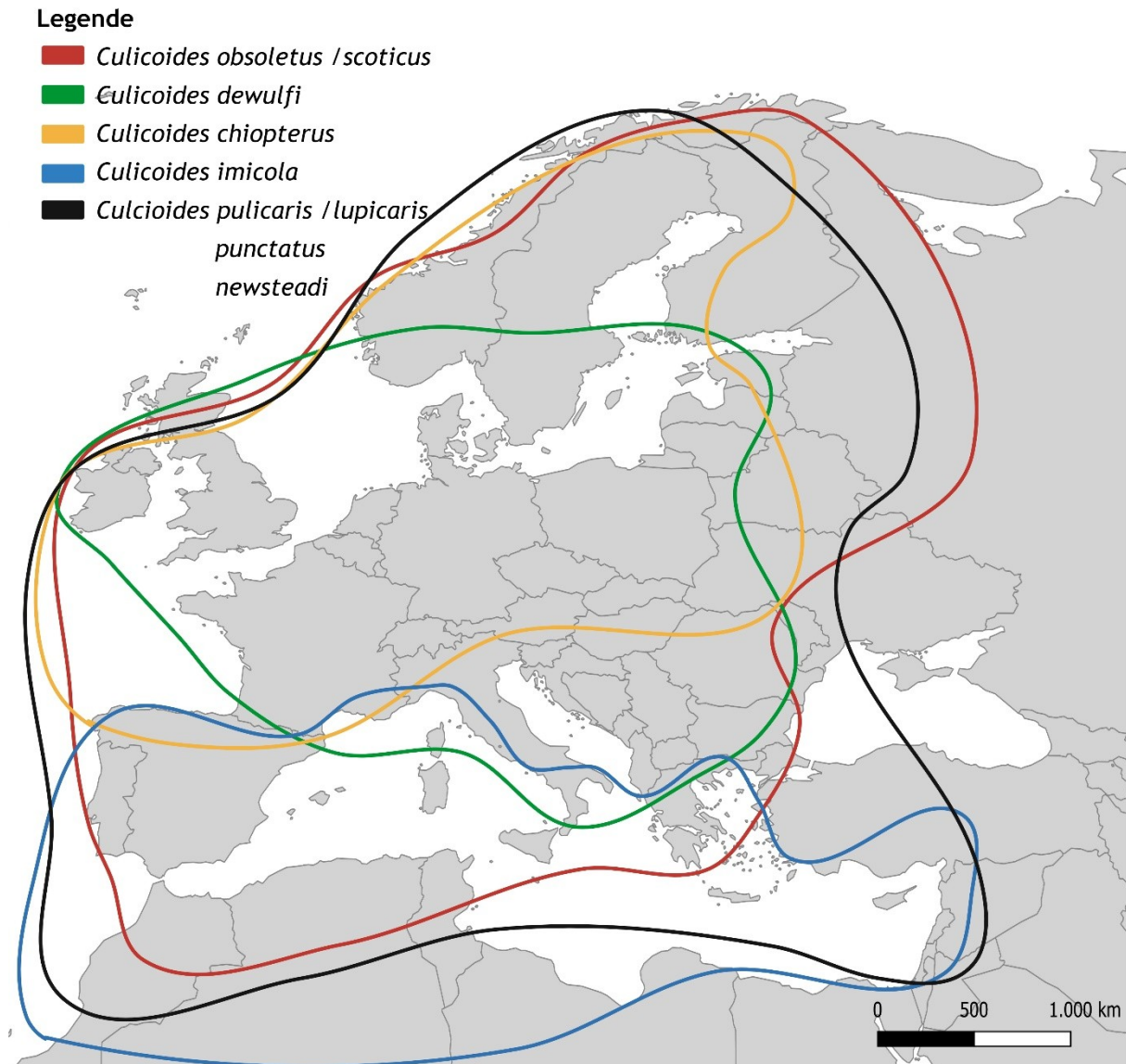


Abbildung 6: Auftreten der einheimischen *Culicoides* Arten in Europa im Oktober 2023. Die Europakarte stammt von Eurostat der Europäischen Kommission, Datensatz Länder, Stand 2024 (<https://ec.europa.eu/eurostat/de/web/gisco/geodata/administrative-units/countries>). Die Daten über die Verbreitung der Gnitzen in Europa stammen aus den „Biting midge maps“ des Europäischen Zentrums für die Prävention und die Kontrolle von Krankheiten (ECDC) (123). Erstellt mit Biorender.com.

2.5.2.1 BTV-Monitoring in Gnitzen

Infolge der Ausbrüche von verschiedenen BTV-Serotypen in Europa, wurden Gnitzenmonitoring-Studien in Verbindung mit Virusnachweisen in den Gnitzen durchgeführt. Um möglichst viele Gnitzen auf die Viren zu untersuchen, wurden die gefangenen Gnitzen in den meisten Studien entsprechend des Fangortes, des Fangdatums und der Spezies bzw. des Spezieskomplexes in Pools zusammengefasst.

In Deutschland wurden gefangene Gnitzen von 2007 bis 2008 auf BTV untersucht und 2,4% der Pools waren positiv (34). In fast allen BTV-positiven Pools konnten Gnitzenarten aus der *C. obsoletus*-Gruppe nachgewiesen werden (34). Während des Ausbruchs von BTV-1 und BTV-4 in den Jahren 2012-2014 in Italien konnte in etwa 1% der untersuchten Gnitzenpools BTV-RNA nachgewiesen werden (124). Die BTV-positiven Gnitzenpools enthielten die Spezies *C. imicola*, *C. newstaedi*, *C. pulicaris* und Spezies des Obsoletus Komplexes (124). In Frankreich wurden im Herbst 2006 Gnitzen von BTV-8 betroffenen und von nicht betroffenen Tierhaltungen untersucht und in keinem der Pools konnte BTV-RNA gefunden werden (125). In den Niederlanden 2007 konnte ein Pool mit der Spezies *C. chiopterus* von insgesamt 81 untersuchten Pools positiv auf BTV-RNA getestet werden (38). In Belgien wurde 2006 nach den Vektoren für BTV gesucht und BTV-RNA in mehreren Pools des Obsoletus Komplexes nachgewiesen (110).

2.5.2.2 SBV-Monitoring in Gnitzen

Mit dem Auftreten von SBV in Europa im Jahr 2011 wurden in mehreren Ländern Gnitzenmonitoring-Studien mit der Untersuchung der gefangenen Gnitzen auf SBV durchgeführt. In Deutschland wurden von 2011 bis 2014 Gnitzen gefangen und in zwei Pools von insgesamt 334 getesteten Pools konnte SBV-RNA gefunden werden (81). Die in den Pools enthaltenen Spezies gehörten zum Obsoletus Komplex (81). In Belgien konnte im Jahr 2011 SBV in 12 von insgesamt 178 getesteten Gnitzenpools nachgewiesen werden (32). Die SBV-positiven Gnitzenarten waren Spezies aus dem Obsoletus Komplex und *C. pulicaris* (32). In Dänemark konnten 2011 zwei von 22 getesteten Pools der *C. obsoletus*-Gruppe positiv auf SBV getestet werden (33) und im darauf folgenden Jahr waren 35 von insgesamt 174 Pools mit den Spezies *C. obsoletus* und *C. dewulfi* SBV-positiv (126). Auch in den Niederlanden wurden 2011 und 2012 Gnitzen gefangen. Im Jahr 2011 waren von 610 untersuchten Pools 14 positiv für SBV-RNA (127). In den Pools konnten die Spezies *C. scoticus*, *C. obsoletus* und *C. chiopterus* nachgewiesen werden (127). Im Jahr 2012 wurden 42 Pools untersucht und zwei Pools des

Obsoletus Komplexes konnte SBV-RNA gefunden werden (128). In Polen wurden 2012 insgesamt 402 Gnitzenpools auf SBV getestet und 44 waren positiv. Die positiven Pools enthielten Spezies aus dem Obsoletus Komplex und *C. punctatus* (76). In Polen wurde das Gnitzenmonitoring von 2013 bis 2017 fortgeführt. Insgesamt wurden 5146 Pools gesammelt und 66 Pools, mit den Spezies aus dem Obsoletus Komplex sowie *C. punctatus* und *C. pulicaris* waren SBV-positiv (36). Auch in Südeuropa wurden Gnitzen auf SBV getestet. In Italien wurden fast 7000 gefangene Gnitzen aus den Jahren 2011 und 2012 in Pools auf SBV untersucht (129). Im Jahr 2011 wurde SBV in sechs Pools und 2012 in einem Pool gefunden. Alle Pools enthielten Spezies des Obsoletus Komplexes (129). Auch in Spanien wurden von 2011 bis 2012 gefangene Gnitzen retrospektiv auf SBV untersucht, dabei konnte SBV-RNA in 2 von 309 getesteten Pools gefunden werden (130). Die positiven Pools wurden als Spezies des Obsoletus Komplexes identifiziert (130). In Frankreich wurden 2011 und 2012 Gnitzen für die SBV-Untersuchung gefangen. Dabei konnte SBV in den Spezies des Obsoletus Komplexes, in *C. dewulfi*, *C. chiopterus*, *C. pulicaris*, *C. newstaedi*, *C. lupicaris*, *C. imicola* und *C. nubeculosus* nachgewiesen werden (35). Insgesamt waren 65 der 3445 untersuchten Pools positiv (35).

2.5.2.3 EHDV-Monitoring in Gnitzen

Nach dem ersten Auftreten von EHDV-8 im Oktober 2022 in Italien auf Sizilien und Sardinien wurden Gnitzen auf Sardinien gefangen und auf EHDV untersucht. Von insgesamt 411 getesteten Pools waren 18 EHDV-positiv und enthielten die Spezies *C. imicola*, *C. obsoletus/scoticus*, *C. pulicaris*, *C. newsteadii* und *C. bysta* (131).

2.6 Experimentelle Gnitzen-Infektionsversuche mit BTV

Unter experimentellen Gnitzen-Infektionsversuchen versteht man die gezielte Infektion von Gnitzen mit Pathogenen. Gnitzen wurden im Rahmen von Infektionsstudien mit Parasiten (132, 133) aber vor allem mit verschiedenen Viren infiziert (134-136).

Bei der Durchführung von Infektionsversuchen mit Gnitzen gibt es zwei Varianten hinsichtlich des Ursprungs der verwendeten Insekten. Eine Möglichkeit ist die Verwendung von einheimischen Gnitzen. Diese können bisher nicht im Labor gezüchtet werden, sondern müssen für den Versuch aus dem Feld gefangen werden. Der Vorteil liegt darin, dass man die Vektorkompetenz für Viren auch in den in Europa natürlich vorkommenden Arten untersuchen

kann. Der große Nachteil dieser Methode ist zum einen, dass es schwierig ist die im Feld gefangenen Gnitzen morphologisch zu unterscheiden, sodass es teilweise nicht möglich ist die Gnitzen nach einer Spezies zu sortieren. Der andere Nachteil ist, dass sich im Feld die Gnitzen anhand der Bedingungen, unter denen sich die immaturren Stadien entwickeln, und anhand ihrer Altersstruktur stark unterscheiden können. Die Umgebungsbedingungen während der larvalen Entwicklung und das Alter können einen Einfluss auf das Überleben und die Replikationseigenschaften der Gnitzen im Infektionsversuch haben (28, 93).

Die andere Möglichkeit für die Durchführung von Infektionsversuchen mit Gnitzen ist die Verwendung von im Labor gezüchteten Gnitzen. Es gibt allerdings nur wenige *Culicoides*-Arten, die unter Labor-Bedingungen gezüchtet werden können. Es gibt keine Laborkolonien der für die Übertragung von BTV relevanten *Culicoides* Spezies in Europa (94). *Culicoides nubeculosus* ist eine europäische Art, die als Laborkolonie vorliegt und genutzt werden kann (137). Allerdings scheint *C. nubeculosus* nicht am natürlichen Infektionszyklus von BTV im Feld teilzunehmen (94). Die aus diesem Grund häufig genutzte *Culicoides*-Art für experimentelle BTV-Infektionen ist *Culicoides sonorensis*. Anders als *C. nubeculosus* gilt *C. sonorensis* als kompetenter Überträger von BTV und EHDV in Nordamerika (61, 138). Der Vorteil der Verwendung von der *C. sonorensis* Laborkolonie ist, dass man genaue Informationen über Alter und Aufzuchtbedingungen der Gnitzen hat und damit den Versuch unter standardisierten Bedingungen durchführen kann. In den meisten bisher mit BTV durchgeführten Studien wurden Gnitzen aus der Laborkolonie *C. sonorensis* mit den Viren infiziert (139-146). In einigen Studien wurden Gnitzen aus dem Feld gefangen und mit BTV infiziert (98, 100, 147, 148).

Die Ergebnisse von unterschiedlichen experimentellen Infektionsstudien mit Gnitzen sind nur schwer vergleichbar. Die Studien unterscheiden sich häufig anhand der Herkunft bzw. der Anzuchtbedingungen der Gnitzen, der Versuchsdurchführung und der Auswertung. In den Infektionsversuchen können die Gnitzen entweder intrathorakal oder oral infiziert werden (92). Bei der intrathorakalen Infektion wird das Virus direkt in das Haemocoel, die Leibeshöhle der Gnitzen injiziert (92). Dabei handelt es sich um eine artefizielle Infektion, da die natürlichen Barrieren in der Gnitze, wie die Mitteldarmbarriere, umgangen werden. Der Vorteil ist, dass die Gnitzen sicher das Virus replizieren und übertragen können (92). Die andere Möglichkeit ist die orale Infektion mit einer virushaltigen Blutmahlzeit. Dabei gelangt das Blut wie beim natürlichen Saugakt in den Mitteldarm der Gnitzen. Der Vorteil an dieser Methode ist, dass die natürliche Infektion der Gnitze und die Empfänglichkeit für den Erreger nachgestellt werden

können. Der Nachteil ist, dass durch die individuellen Unterschiede hinsichtlich der Barrieren der Virusausbreitung in den Gnitzen, nur ein sehr kleiner Teil der Gnitzenpopulation das Virus auch in den Speicheldrüsen repliziert und damit übertragen kann.

Es gibt eine Reihe von publizierten experimentellen Infektionsversuch-Studien mit verschiedenen Serotypen von BTV. Die Fragestellungen hinter Gnitzen-Infektionsstudien mit Viren sind sehr unterschiedlich. Eine mögliche Fragestellung für die Durchführungen von Gnitzen-Infektionsstudien ist die Ermittlung der Vektorkompetenz der jeweiligen *Culicoides*-Spezies für den Erreger. Es wurden Infektionsversuche zur Untersuchung der Vektorkompetenz von *C. obsoletus*, *C. pulicaris* und *C. impunctatus* für BTV-9 durchgeführt (148). In einer weiteren Vektorkompetenz-Studie wurden *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. dewulfi* und *C. chiopterus* mit BTV-8 und BTV-9 infiziert (149). Außerdem wurde eine Studie mit der Untersuchung von BTV-2, verschiedenen BTV-4-Stämmen und BTV-8 in *C. obsoletus*/*C. scoticus* und *C. imicola* publiziert (100). In einer weiteren Studie wurde die Vektorkompetenz von *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. pulicaris* und *C. grisescens* für BTV-1, BTV-4 und BTV-8 untersucht (99). Durch die Infektionsversuche konnte gezeigt werden, dass die Arten aus dem Obsoletus Komplex, sowie *C. imicola*, *C. pulicaris* und *C. impunctatus* vektorkompetente Arten für BTV in Europa sind.

Der Nachweis der Vektorkompetenz kann zum einem durch den Nachweis des Virus im Speichel der Insekten erfolgen. Nur wenn die Viren in den Speicheldrüsen replizieren, kann das Virus bei der nächsten Blutmahlzeit übertragen werden (88). Bei Stechmücken kann gezielt Speichel gewonnen und untersucht werden. Bei Gnitzen ist es nicht möglich den Speichel allein zu gewinnen. Aus diesem Grund wird bei Gnitzen der gesamte Kopf auf die Viren untersucht. Gnitzen haben anders als Stechmücken keine Virusbarriere in der Speicheldrüse, sodass man bei einem positiven Virusnachweis im Kopf der Gnitze davon ausgehen kann, dass das Virus auch im Speichel zu finden ist (88). Eine andere Möglichkeit die Vektorkompetenz im Infektionsversuch nachzuweisen ist der Vergleich der Virus-Genomkopienzahl bzw. des Virustiters vor und nach der Inkubation. Nur wenn das Virus im Kopf, und damit auch in den Speicheldrüsen vorhanden ist, oder wenn es nach der Inkubation zu einem deutlichen Anstieg des Virustiters bzw. der Genomkopienzahl in der Gnitze kommt, kann man von einer Replikation und Virusausbreitung in der Gnitze ausgehen (88).

Durch Veränderungen von bestimmten Bedingungen im Experiment, wie zum Beispiel der Inkubationstemperatur, wurde in verschiedenen BTV-Infektionsstudien mit Gnitzen der

Einfluss der Temperatur auf die Virusreplikation erforscht. Zum Beispiel wurden die Infektionsraten von *C. sonorensis*, infiziert mit BTV-10, BTV-16 und BTV-17 bei unterschiedlichen Temperaturbedingungen während der Inkubation erforscht (136, 139). In einer weiteren Studie wurde der Temperatureinfluss auf mit BTV-2 und BTV-10 infizierte *C. sonorensis* untersucht (140). In den Infektionsversuche mit unterschiedlichen Inkubationstemperaturen konnte gezeigt werden, dass höhere Temperaturen eine schnellere Virusreplikation und eine reduzierte Überlebenszeit der Gnitzen zur Folge haben.

Auch die Veränderung von Methoden im Infektionsversuch wurde untersucht. In einer Studie mit *C. imicola* und *C. bolitinos* und den BTV-Serotypen 1, 5 und 9 wurden zwei Methoden der Fütterung der Gnitzen verglichen (147). In einer weiteren Studie wurde ein Teil der *C. sonorensis* intrathorakal mit BTV-1 und BTV-8 infiziert, diese wurden genutzt um Schafe zu infizieren und ein anderer Teil von *C. sonorensis* wurde durch die Blutmahlzeit an den Schafen infiziert (95). Um die Infektionskinetik der Virusübertragung durch die Gnitzen zu untersuchen wurden *C. sonorensis* mit BTV-3 infiziert, die dann genutzt wurden um Schafe mit BTV-3 zu infizieren (141).

In den Infektionsstudien mit mehreren BTV-Serotypen können mögliche Reassortierungen der Viren in den Gnitzen untersucht werden. Unter Reassortierung versteht man den Austausch von Gensegmenten von segmentierten Viren bei gleichzeitiger Infektion einer Zelle. Dadurch können neue Viren mit veränderten Eigenschaften (Antigenshift) entstehen (150). Zum Beispiel gibt es Studien mit Ko-Infektionen von *C. sonorensis* mit BTV-10 und BTV-17 (144, 145, 151) und mit BTV-2 und BTV-10 (140). In BTV-Infektionsstudien wurden auch genetische veränderte BTV-Viren, wie zum Beispiel in einer Studie mit veränderten BTV-1 und BTV-4 Stämmen in *C. sonorensis*, durchgeführt (143). In einem weiteren Gnitzen-Infektionsversuch wurden *C. sonorensis* mit BTV-1 infiziert, um das Transkriptom von den nicht-infizierten mit den infizierten Gnitzen zu vergleichen und Unterschiede in der Genexpression zu untersuchen (142).

3 Zielsetzung

3.1 Durchführung eines Gnitzenmonitoring in Deutschland

Gnitzen der Gattung *Culicoides* übertragen in Deutschland SBV und BTV auf Wiederkäuer und stellen somit eine Gefahr für die Gesundheit von Nutztieren wie Rindern, Schafen und Ziegen dar. Ausbrüche der Krankheiten können zu erheblichem Tierleid und zu wirtschaftlichen Verlusten in den betroffenen tierhaltenden Betrieben führen. Um aktuelle Daten über die Prävalenz der Viren in den verschiedenen Gnitzenarten in Deutschland zu generieren, wurden im Rahmen eines Monitoring-Programms Gnitzen auf tierhaltenden landwirtschaftlichen Betrieben gefangen. In dieser Arbeit werden die Ergebnisse der Virusdiagnostik der von 2019 bis 2023 gefangenen Gnitzen vorgestellt. Dabei wurden die Gnitzen von Januar 2019 bis Oktober 2022 deutschlandweit gefangen, um die jährlichen Veränderungen im Vorkommen der Viren, insbesondere des endemischen SBV, in der Gnitzenpopulation zu untersuchen. Nach dem ersten Auftreten von BTV-3 in den Niederlanden im September 2023, wurden die Gnitzen von September bis November 2023 in den westlichen Bundesländern Nordrhein-Westfalen und Niedersachsen gefangen und untersucht. Neben der Virusdiagnostik werden in dieser Arbeit die Ergebnisse der Speziesbestimmung von virus-positiven Gnitzen präsentiert.

3.2 Untersuchung von BTV-3 in experimentellen Gnitzen-Infektionsversuchen

Im September 2023 wurden zum ersten Mal BTV-3 Fälle in den Niederlanden nachgewiesen. Anschließend breitete sich BTV-3 rapide in Europa aus und wurde im Oktober 2023 auch in domestizierten Wiederkäuern in Deutschland detektiert. Nachdem die weitere Ausbreitung durch den Winter unterbrochen wurde, breitete sich BTV-3 im Verlauf des Jahres 2024 rasant in ganz Deutschland aus und übertraf damit sogar den Ausbruch von BTV-8 in den Jahren 2006/2007. Um die Replikationseigenschaften von BTV-3 und BTV-8 im Gnitzenvektor vergleichend zu analysieren, wurden zwei experimentelle Infektionsversuche in der Laborkolonie *Culicoides sonorensis* durchgeführt.

4 Ergebnisse

„Monitoring of Schmallenberg virus, bluetongue virus and epizootic haemorrhagic disease virus in biting midges in Germany 2019-2023”

Sophie Zeiske ¹, Helge Kampen¹, Franziska Sick ¹, Oliver Dähn ¹, Anja Voigt ², Elisa Heuser ¹, Martin Beer ¹, Doreen Werner ², Kerstin Wernike ¹

¹ Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Greifswald - Insel Riems, Germany

² Leibniz-Centre for Agricultural Landscape Research, Muencheberg, Germany

Parasites and Vectors 2025
doi: 10.1186/s13071-025-06913-w.

RESEARCH

Open Access



Monitoring of Schmallenberg virus, bluetongue virus and epizootic haemorrhagic disease virus in biting midges in Germany 2019–2023

Sophie Zeiske¹, Helge Kampen¹, Franziska Sick¹, Oliver Dähn¹, Anja Voigt², Elisa Heuser¹, Martin Beer¹, Doreen Werner² and Kerstin Wernike^{1*}

Abstract

Background Schmallenberg virus (SBV) was first detected in Germany in 2011 and today has an enzootic status in Central Europe. It is transmitted by biting midges of the genus *Culicoides*, which have a high abundance in livestock farms. In addition to SBV, *Culicoides* are considered vectors of other viruses relevant to livestock such as bluetongue virus (BTV) and epizootic haemorrhagic disease virus (EHDV). Monitoring of midges and transmitted viruses is of veterinary importance because the resulting diseases may cause animal suffering and entail economic losses due to control measures such as vaccination or trade restrictions.

Methods To gain an overview of the prevalence of viruses in *Culicoides* vectors in Germany, a monitoring programme was established in 2018. From 2019 to 2023, biting midges were caught at 79 sites throughout the country, of which 511,788 were morphologically differentiated according to *Culicoides* species or subgenus and pooled accordingly. The nucleic acids extracted from 19,521 midge pools of up to 50 individuals were tested in real-time reverse transcription polymerase chain reactions (RT-PCRs) for the genomes of SBV, EHDV and BTV. The species in virus-positive pools were analysed with molecular biological methods to identify potential vector species.

Results Whereas no EHDV and BTV were detected, SBV was found in every year of the five monitored years. The minimum infection rate (MIR) of SBV in the tested pools ranged from 3.75 in 2022 to 135.47 in 2023. Most SBV RNA-positive pools were represented by the subgenus *Avaritia* (*C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. dewulfi* and *C. chiopterus*). To a lesser extent, SBV RNA was detected in pools of the subgenus *Culicoides* (*C. punctatus*, *C. pulicaris*, *C. lupicaris* and *C. selandicus*). Only one pool of another subgenus, namely *C. griseidorsum*, was found positive for SBV genome.

Conclusions The results from the monitoring programme confirm an enzootic circulation of SBV in the German *Culicoides* population during summer and autumn with varying infection rates between the years. The lack of detection of BTV in the midges may suggest a circulation of BTV at a low level. The absence of EHDV genome in biting midges is in line with the epidemiological situation in ruminants in Germany.

Keywords Bunyavirus, Orbivirus, Schmallenberg virus, Bluetongue virus, Epizootic haemorrhagic disease virus, Insect vector, Prevalence, Biting midges, *Culicoides*, Monitoring

*Correspondence:

Kerstin Wernike

kerstin.wernike@fli.de

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2025. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Background

Schmallenberg virus (SBV) is an arbovirus of the genus *Orthobunyavirus*, which infects ruminants and is transmitted by biting midge species of the genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) [1]. Since its first emergence in 2011 in the west of Germany, SBV rapidly spread across the European continent [1, 2]. Recently, SBV has reached an enzootic status in Central Europe [3, 4]. Since 2011, SBV cases have been occurring every year in domestic ruminants in Germany with varying extent of virus detection between the years (source: German animal disease reporting system, *Tierseuchen-Nachrichtensystem* (TSN)). Occasionally, extensive virus circulation could be observed, resulting in a seroprevalence of up to 70%, and partly to 100%, in the affected livestock populations [5]. SBV causes mild or subclinical infections in ruminants such as cattle, sheep and goats [4, 6, 7]. The more severe problem is the infection of naïve pregnant dams, especially in early pregnancy [8]. When the virus is transmitted vertically, it can cause premature birth, stillbirth, abortions or malformations of the calves, lambs and goat kids [8, 9].

Further important viruses that are transmitted by *Culicoides* midges and affect domestic ruminants are the orbiviruses bluetongue virus (BTV) and epizootic hemorrhagic disease virus (EHDV) [10]. BTV occurs worldwide and can be differentiated into 24 classical and a number of “atypical” serotypes [11–13]. Several BTV serotypes and strains have been registered in Central Europe since its first emergence in 2006 [12, 14, 15]. The most recent introduction of a new serotype took place in 2023, when BTV serotype 3 (BTV-3) emerged in the Netherlands and subsequently spread to further Central European countries including Germany [16, 17]. Most domestic and wild ruminants are susceptible for BTV, but the severity of bluetongue disease depends on the affected ruminant species and the virus strain [13]. The BTV serotypes that emerged in Europe generally caused more severe disease in sheep than in cattle or goats [12]. Bluetongue disease is characterised by haemorrhagic fever with ulcerations, hyperaemia and oedemas especially of the facial mucosa, but it can also affect internal organs, causing breathing difficulties and death [18–21]. Furthermore, BTV may cause transplacental infections in pregnant cattle, goats and sheep leading to abortions or the birth of malformed fetuses [22–24].

Another representative of the orbiviruses that infects ruminants and is transmitted between its mammalian hosts by *Culicoides* biting midges is EHDV [25]. Similar to BTV, it affects the vascular system and causes haemorrhages and ulcerations. EHDV was first detected in North American white-tailed deer, which show severe clinical signs and high morbidities of up to 90% [10, 26, 27].

A wide range of other wild and domestic ruminants are susceptible to EHDV; however, the course of the disease can be quite variable, depending on the virus strain and the ruminant species [10]. It was assumed that most serotypes cause asymptomatic infections in cattle and sheep [28]. In 2022, EHDV serotype 8 was detected for the first time on the European continent, where it was found in Italy and Spain in cattle and sheep that showed BTV-like symptoms [29, 30].

Infections of domestic animals with SBV, BTV and EHDV cause massive economic damages to the livestock owners and the agricultural industry. The resulting diseases go along with direct costs for production loss, animal loss and veterinary treatment [31, 32]. Further, outbreaks of the diseases cause indirect costs for vaccination, if vaccines are available, trade restriction, diagnostics and surveillance [31, 32].

The genus *Culicoides* consists of around 1,350 species which have a body size of 1–3 mm and belong to the smallest haematophagous dipterans in the world [33–35]. They can be found in a wide range of habitats worldwide, except for the Arctic and Antarctic [35]. Specimens of the genus *Culicoides* can be identified by their wing patterns, morphological characters of the antenna, palpa and genital structures as depicted by Delécolle and Mathieu et al. for the European species [36, 37]. In the Palaearctic region, most *Culicoides* species belong to the subgenus *Avaritia* Fox, followed by the subgenus *Culicoides* Latreille, and only a minor part belongs to other subgenera [38–41]. Due to the morphological uniformity of the females, biting midges of the subgenera *Avaritia* and *Culicoides* often cannot be identified to species level by morphological methods and, for practical reasons, are only assigned to subgenus, species group or species complex [42–44]. Species of the subgenus *Avaritia* frequently observed in Germany are *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. dewulfi* and *C. chiopterus* [42, 45–49]. Based on the highly similar female morphology, *C. obsoletus* and *C. scoticus* are placed in the *Obsoletus* complex [50]. Widely distributed species of the subgenus *Culicoides* in Germany are *C. punctatus*, *C. impunctatus*, *C. deltus/lupicaris*, *C. newsteadi*, *C. griseicens* and *C. pulicaris* [42, 45–49]. Both in the subgenus *Avaritia* and in the subgenus *Culicoides*, haplotypes and cryptic species have been described, and there is increasing evidence that these genetic variants represent independent species [51–53].

The composition of the *Culicoides* fauna encountered in Germany can vary depending on the trapping location, environment and the time of the year, since the species differ in their distribution, host preference and behaviour [46, 54]. Since differences in vector competence occur, it is desirable to identify the *Culicoides* to species level. As reviewed by Purse et al. [55] vector competence was

compared for several midge-borne viruses and different midge species. Several of the *Culicoides* species within one subgenus are demonstrated vectors while others are not [55]. Vector competence is defined as the ability of a biting midge to replicate and transmit a virus during a blood meal [56]. The premise for the vector competence is the full dissemination of the virus in the body of the biting midge and the replication in the salivary glands [57]. The appropriate approach of demonstrating vector competence and infectivity of *Culicoides* is the separate examination of the body and the head [56]. Since biting midges do not possess salivary gland barriers, the detection of virus in the head of a midge is deemed sufficient evidence for full dissemination and infectivity [57]. Vector competence for SBV was only shown for the species of the *Obsoletus* complex, *C. imicola* (subgenus *Avaritia*) and, with some restrictions, for *C. chiopterus* and *C. dewulfi* [38, 58, 59]. By contrast, it could still not be shown yet whether species of the subgenus *Culicoides* can replicate and transmit SBV or are just carriers of the virus; therefore, they keep being regarded as putative vectors [56]. In Europe, confirmed vectors of BTV are *C. imicola*, *C. scoticus*, *C. obsoletus*, *C. nubeculosus*, *C. impunctatus* and *C. pulicaris* [55, 60–64], although *C. nubeculosus* and *C. impunctatus* seem to play a minor role in the field [35, 55]. Additionally, *C. chiopterus*, *C. dewulfi* and *C. punctatus* are considered vector-competent for BTV [55, 65, 66]. Competent European vectors of EHDV are *C. imicola*, *C. obsoletus*, *C. punctatus* and *C. scoticus* [67–69].

In Germany, species of *Culicoides* can occur as a nuisance to humans and animals with high population densities inside and outside of livestock farms. In agricultural settings, there is a ready supply of moist environments and organic materials that serve as breeding substrates for female midges. Additionally, the female midges have access to blood meals from farm animals, which is usually essential for their egg production [70, 71]. The life span of adult midges is usually between 10 and 20 days [35]. In their short life, they stay mostly in a close distance of a few hundred meters to the breeding sites [35]. However, in several cases, biting midges can be spread over much greater distances, assisted by prevailing winds [72]. In temperate zones, the adult activity of biting midges is particularly high from late spring to early autumn [56], but a low number of adults is also active during the winter months and can be trapped inside and outside livestock buildings [42, 46].

The means by which SBV and BTV overwinter remain unclear [73, 74]; however, transovarial transmission was demonstrated recently for EHDV in an experimental study with *C. sonorensis* [75]. Evidence from infection studies is missing for SBV; however, detection of SBV in

field-collected male or nulliparous female midges may indicate overwintering of the virus in immature stages of *Culicoides* [41, 76].

Since 2011, cases of SBV in domestic ruminants have been reported annually all over Germany, though with variations in the number of reports between the years (source: TSN). In addition, the newly introduced BTV-3 has been spreading within the ruminant population since October 2023 (source: TSN). To gain an overview of the prevalence of the viruses in the *Culicoides* spp. in Germany, a monitoring programme was established. Since 2019, biting midges have been caught inside and outside livestock farm buildings at numerous locations all over Germany. They are classified according to *Culicoides* subgenus or species, using morphology and genetics. The *Culicoides* females are also investigated for the presence of SBV, BTV and EHDV genome.

Methods

Culicoides trapping

From 2019 to 2022, biting midges were collected all over Germany on farms keeping cattle, sheep, goats and/or horses by BG-Sentinal traps equipped with 12 V light-emitting diode (LED) ultraviolet (UV) light (Biogents AG, Regensburg, Germany). In 2019, *Culicoides* were caught at 37 sites, in 2020 at 30 sites, in 2021 at 19 sites and in 2022 at 29 sites (Fig. 1). The traps were placed both inside and outside of livestock housing structures, whenever possible within barns. If indoor placement was not feasible due to local conditions, the trap was positioned outdoors in sheltered locations (e.g. under roof overhangs or animal shelters on pasture), always as close as possible to the animals. 'Inside' thus refers to trap placement within a conventional barn building, while 'outdoors' refers to sheltered positions in close proximity to livestock but not enclosed. The traps were mounted at a height of 1.5–2.0 m. A polyester mesh fabric with a mesh size of 4 mm was used to prevent the capture of larger insects. Traps were operated once a week for 24 h, although the trapping day was selected independently at each site. Outdoor sampling was not carried out during adverse weather conditions such as rain or strong winds; however, no overall synchronization across sites took place. In all monitored years, the trapping was conducted from April to October. In addition, several farms participated in a winter monitoring during the months of November to March: 11 farms from January to March 2019, 16 farms in both 2019/2020 and 2020/2021 and 12 farms in 2021/2022.

In 2023, additional UV-light traps were placed on 13 livestock farms close to the Dutch border in the German federal states of North Rhine-Westphalia and Lower

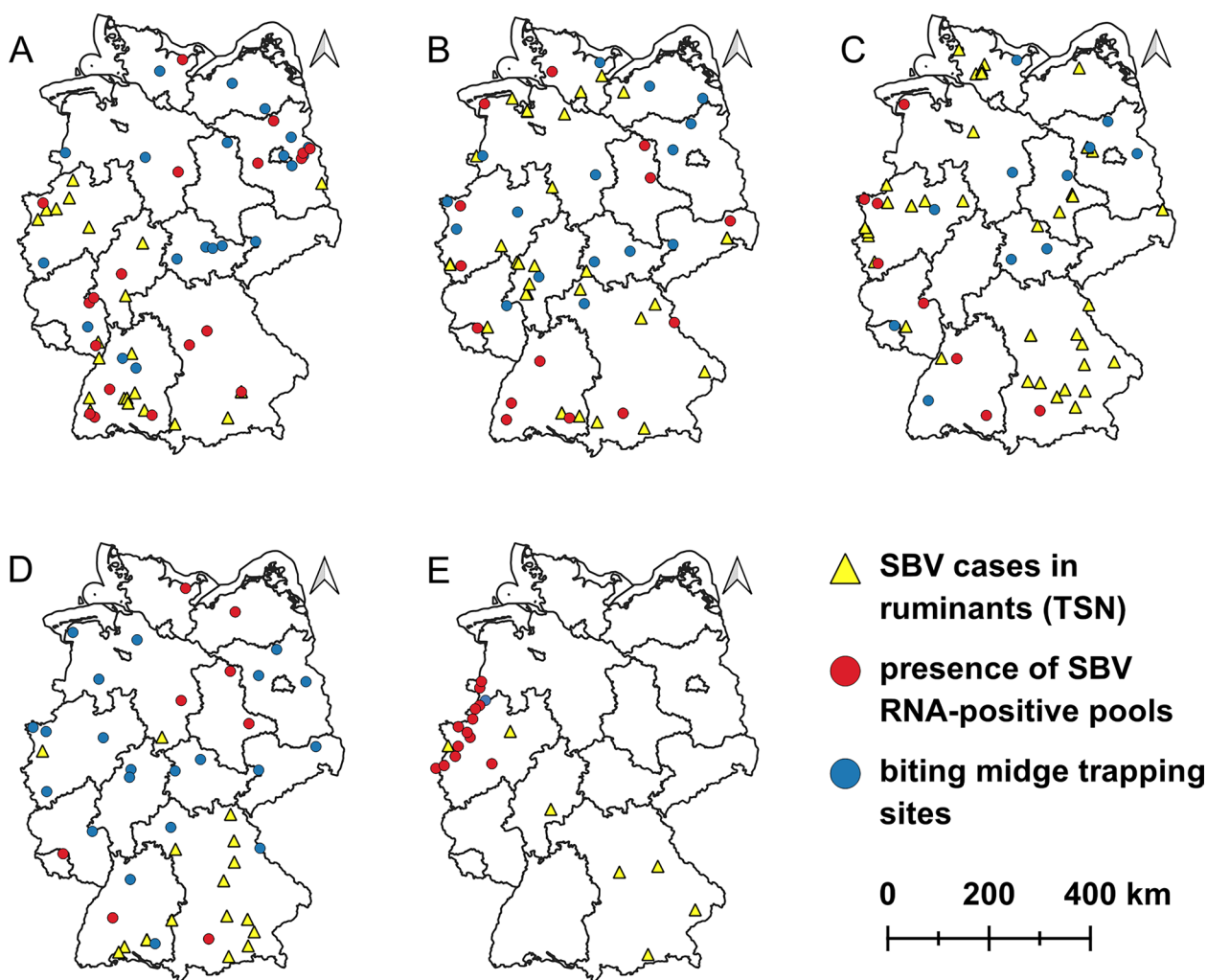


Fig. 1 *Culicoides* trapping sites in Germany. Biting midges were caught from January 2019 to March 2020 (A), from April 2020 to March 2021 (B), from April 2021 to March 2022 (C), from April to October 2022 (D) and from September to November 2023 (E). Blue dots depict trapping sites with no SBV RNA-detection in the pools, red dots depict trapping sites with SBV RNA-positive pools and yellow triangles mark SBV cases in ruminants in each monitored year (German animal disease reporting system, TSN). Map of Germany was retrieved from Federal Agency for Cartography and Geodesy, data set Verwaltungsgebiete 1:2 500 000, Stand 31.12. (VG2500 31.12.) (<https://gdz.bkg.bund.de/index.php/default/open-data/verwaltungsgebiete-1-2-500-000-stand-31-12-vg2500-12-31.html>), data license Germany– attribution–Version 2.0 (<https://www.govdata.de/dl-de/by-2-0>)

Saxony. From September 24 until November 12, the midges were collected daily at these places (Fig. 2B).

All insects were trapped directly into 80% ethanol, as provided in a beaker in the trapping net. Upon collection, samples were kept in the dark at room temperature. Biting midges remained in ethanol until nucleic acid extraction, i.e. from capture through storage and sorting.

Culicoides identification

The insects were examined under a stereomicroscope (Leica model M205 C; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) to sort out by-catch and

non-haematophagous midges. Only *Culicoides* biting midges were included in subsequent analyses, with female and male specimens being processed separately. The morphological differentiation of the female biting midges was done prior to pooling using the identification keys of Mathieu et al. [36] and Delécolle [37]. Because of morphological similarities, not all midges could be differentiated on species level and were therefore assigned to the subgenera *Avaritia* or *Culicoides*. Species belonging to other subgenera were provisionally assigned to their specific subgenera before genetic identification. Females were additionally categorised on the basis of visible

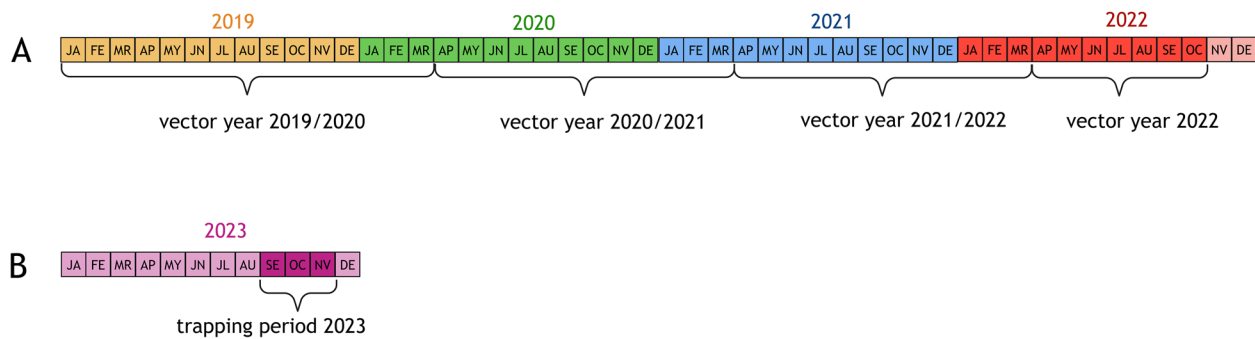


Fig. 2 Definition of the trapping periods. **A** Definition of the vector years 2019/2020, 2020/2021, 2021/2022 and 2022. **B** Additional trapping period 2023. The coloured squares depict the months of the years (2019 yellow, 2020 green, 2021 blue, 2022 red, 2023 magenta). Months in which midges were trapped are coloured in a darker colour shade, and months in which no trapping was conducted are coloured in a lighter shade. JA January, FE February, MR March, AP April, MY May, JN June, JL July, AU August, SE September, OC October, NV November, DE December

blood-feeding status (blood-fed/non-blood-fed). Other parity-related classifications, such as nulliparous/parous or gravid, were not assessed. Blood-fed females were processed using the same virus screening protocol as non-blood-fed specimens.

For virus screening, midges were pooled with up to 50 midges according to the date and location of trapping and the determined subgenus or species. If more than 50 midges of a subgenus or species were caught on 1 day on a trapping location, they were pooled in several pools containing up to 50 midges. *Culicoides* specimens morphologically identified to species level were tested individually. Not all pools of female midges were tested for virus RNA, but several were stored as retention samples. Biting midge pools which tested positive for SBV, BTV or EHDV were subsequently analysed by polymerase chain reactions (PCR) for species included in the pool [51, 52].

Nucleic acid extraction and virus screening by real-time RT-PCR

To prepare the biting midge pools for nucleic acid extraction, the ethanol was drawn off and the midges were dried overnight at room temperature. Thereafter, the pools were homogenised in 200 µl Lysis Buffer from the NucleoMag Vet Kit using the TissueLyser (Qiagen, Hilden, Germany) with a 5-mm steel bead at a frequency of 30 Hz for 3 min. Nucleic acid was extracted with the King Fisher 96 Flex purification system and the NucleoMag Vet Kit (Machery Nagel, Düren) according to the manufacturer's instructions. All extracts were tested by previously described real-time reverse transcription polymerase chain reactions (RT-PCRs) for the presence of SBV [77] and BTV and EHDV RNA [78].

Molecular identification of other *Culicoides* species

Barcoding of the cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene was used to identify individual *Culicoides* that did not belong to the subgenera *Avaritia* or *Culicoides*. PCR amplification was performed with the forward primers PanCuli-COX1-025F [51] or PanCuli-COX1-211F, paired with the reverse primer PanCuli-COX1-727R, using an adapted protocol (54 °C annealing temperature) from Lehmann et al. [79]. PCR products were mixed with 2.5 µL of 6× DNA loading dye (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany) and analysed on 1.5% agarose gels containing 5 mg/mL ethidium bromide. Electrophoresis was conducted at 100 V for 50 min, and PCR bands were visualised using a ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, Feldkirchen, Germany). Amplicons of the expected size were excised and purified with the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen).

DNA fragments were cycle-sequenced in one or both directions using the PCR primers and the BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific). The resulting PCR products were purified with the Bioanalysis NucleoSEQ Kit (Machery–Nagel), and 15 µL of each eluate was combined with an equal volume of Hi-Di formamide (Thermo Fisher Scientific). Finally, sequencing was carried out using a 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems/Hitachi, Darmstadt, Germany).

Calculation of the minimum infection rate (MIR)

To compare the spatial and temporal differences in virus circulation, minimum infection rates (MIR) were calculated [76]. The MIR is the number of positive pools divided by the number of tested pools multiplied by 1000.

Statistical analysis

The statistical analysis was carried out using the open-source software environment R [80]. Differences in the MIR of the individual German federal states over the monitored years from 2019 to 2022 and of North-Rhine Westphalia and Lower Saxony from 2019 to 2023 were compared by two-sided Fisher's exact tests with Monte Carlo simulations. Differences were considered significant when $P < 0.05$. If the initial test showed a significant result, a post hoc analysis involving multiple two-sided Fisher's exact tests was conducted to compare the year with the highest MIR with the other years. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

Definition of the vector year

For better comparison of virus detection in biting midges with the occurrence of disease in domestic ruminants, the respective vector year was defined to begin on 1 April and end on 31 March in the following year (Fig. 2A). This timeframe includes the acute cases of virus infections in ruminants, that can be detected within the vector season (April to October), and virus detection in aborted or malformed calves, lambs and goat kids, which occur up to 8 months after the acute infection of the pregnant dam. There are two notable exceptions from this approach: the months January to March were included in the vector year 2019/2020. Further, in 2022, midges were collected until October; therefore, the vector year 2022 comprises only the months April to October (Fig. 2A).

Results

Virus screening

The total number of *Culicoides* specimens collected across the study years was as follows: 226,083 in 2019 (including 4,506 males), 194,836 in 2020 (3,271 males), 580,162 in 2021 (7,990 males) and 224,282 in 2022 (4,537 males). Of all biting midges caught from 2019 to 2023, a total of 511,788 female *Culicoides* specimens were selected, morphologically identified and sorted into 19,521 pools, containing either species of the subgenus *Avaritia*, the subgenus *Culicoides* or other subgenera. All pools were tested for genome of SBV, BTV and EHDV by real-time RT-PCR. SBV genome was detected in every study year, in a total of 721 pools (3.7%). None of the pools were positive for BTV or EHDV.

From 2019 to 2022, midges were collected during the whole year, and from January 2019 to March 2020, a total of 42,202 biting midges from 40 trapping locations (livestock farms) were grouped into 5,046 pools. In the tested pools of 17 trapping locations, SBV RNA could be detected (Fig. 1). In total from January 2019 to March 2020, 48 pools (MIR: 9.51) tested positive for SBV RNA (Fig. 3). In the vector year 2020/2021, 48,433

Culicoides biting midges were processed and sorted into 3,901 pools. SBV RNA was found in a total of 22 pools (MIR: 5.64) in 15 out of 31 tested farms (Figs. 1 and 3). In the next vector year 2021/2022, 151,981 midges from 19 trapping locations were grouped into 3,741 pools. SBV RNA-positive pools were found on eight farms in a total of 111 pools (MIR: 29.67) (Figs. 1 and 3). From April to October 2022, a total of 104,549 *Culicoides* was sorted into 2,928 pools. Altogether, 11 pools (MIR: 3.76) from eight farms out of 29 tested trapping locations were positive for SBV RNA (Figs. 1 and 3).

Over the monitored years from 2019 to 2022 more *Culicoides* pools collected in the months from April to October were tested than collected in the months from November to March (Fig. 4). The highest rate of SBV RNA-positive pools was found in September (MIR: 34.75), followed by August (MIR: 20.43), November (MIR: 15.03) and October (MIR: 12.78), while the MIRs obtained for April (2.09), May (3.90), June (3.45) and July (5.23) were markedly lower (Fig. 4). The first SBV RNA-positive pool in a year was sampled in Beerfelde (federal state of Brandenburg) on 24 April 2019. The latest catch midges tested SBV RNA-positive was made on 21 November 2020 on the trapping site in Mühlenbach (Baden-Wuerttemberg).

The MIR of SBV RNA in biting midge populations varied over the monitored years in the individual German federal states (Fig. 5). In 3 out of the 14 monitored German federal states, namely Lower Saxony, Baden-Wuerttemberg and Bavaria, the MIR was significantly higher in 1 year than in the other years. Statistical analysis of the MIRs in the other federal states revealed no significant differences, although in most of the states, a higher MIR is observed for at least one of the years. In Lower Saxony, the highest MIR was detected in 2019 with 48.08. In the other years, the MIR was much lower with 5.38 (2020), 5.84 (2021) and 3.77 (2022). Statistical analysis showed a highly significant difference ($P < 0.001$) in the measured MIRs in Lower Saxony, and individual comparison of the MIRs from 2019 with the MIRs from 2020, 2021 and 2022 resulted in P -values of $P = 0.00238$ for 2019 versus 2020, $P = 0.00033$ for 2019 versus 2021 and $P = 0.00329$ for 2019 versus 2022. A high MIR could be observed in Rhineland-Palatinate with 11.49 and in Schleswig-Holstein with 16.67 in 2019 as well. In Rhineland-Palatinate, SBV RNA was found in only one other monitored year, namely in 2021 (MIR: 7.72). In Schleswig-Holstein, the MIR was 4.93 in 2020 and 7.81 in 2022, while no SBV RNA was found in 2021. In contrast, in the southern German federal states Bavaria and Baden-Wuerttemberg, the highest MIR (39.51 and 72.45, respectively) was observed in 2021, while MIRs of 10.42 (2019), 7.72 (2020) and 2.44 (2022) were calculated for Baden-Wuerttemberg.

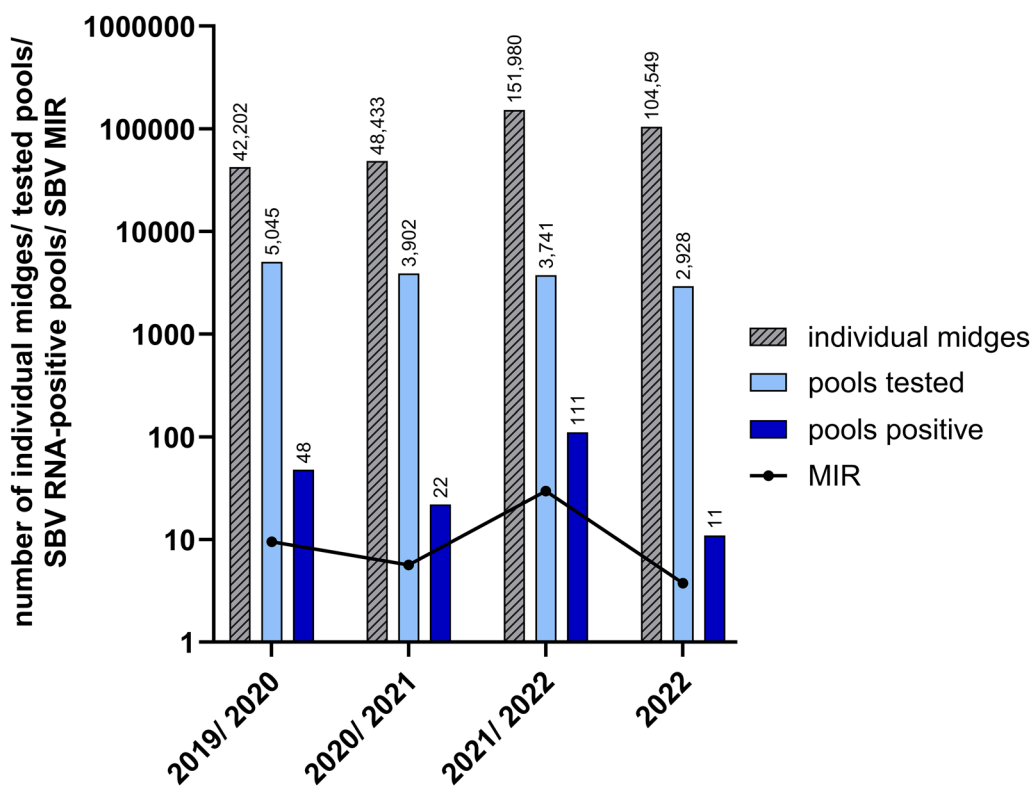


Fig. 3 Comparison of the number of individual midges, tested pools, and Schmallenberg (SBV) RNA-positive pools over the monitored vector years. The number of individual midges is depicted by a grey bar, the total number of tested pools is depicted by a light blue bar and the number of SBV RNA-positive pools is depicted by a dark blue bar. The precise number of each group is written above each bar. To show differences of SBV circulation over the monitored vector years, the minimum infection rate (MIR) (black line) was calculated

MIRs of 19.87 (2019), 8.33 (2020) and 11.27 (2022) were determined for Bavaria in the other years. The measured high MIRs in 2021 resulted in a significant difference in Bavaria ($P=0.0383$) and Baden-Wuerttemberg ($P<0.001$). Individual comparison of the MIR from 2021 with the MIRs from 2019, 2020 and 2022 measured in Bavaria showed significant differences for 2021 versus 2020 with $P=0.0309$ and 2021 versus 2022 with $P=0.0247$, while the comparison of 2021 versus 2019 showed no significant difference. All individual comparisons of the MIR 2021 of Baden-Wuerttemberg with the MIRs of the other years revealed highly significant P -values of $P<0.001$. In 2021, there was a slight increase of SBV RNA-positive pools also in North Rhine-Westphalia with a MIR of 15.78, which was higher than in the other years that had MIRs of 8.40 (2019), 7.72 (2020) and 0 (2022). In Saxony-Anhalt (Central Germany), there was an increase of the detected MIR in two of the monitored years with 9.26 in 2020 and 10.75 in 2022, while no SBV RNA was found in 2019 and 2021. In four of the German federal states, SBV RNA-positive pools were found in only one of the tested years, namely in Hesse in 2019 (MIR 10.07), in Brandenburg in 2019 (MIR 5.56), in

Saxony in 2020 (MIR 7.58) and in Mecklenburg-Western Pomerania in 2022 (MIR 12.99). In two of the monitored federal states, namely Thuringia and Berlin, no SBV RNA could be detected in any of the tested biting midge pools, although it has to be taken into account that Berlin was only sampled in 2019 and not in the following years.

In 2023, 164,623 biting midges were caught from the end of September to the beginning of November on 13 farms located near the German–Dutch border. The midges were grouped into 3,905 pools, and SBV RNA-positive pools could be detected on every tested livestock farm except for one (Fig. 1). Since many pools were tested positive for SBV RNA in 2023, the results of this timeframe were compared with the results of the corresponding timeframe and area in the other monitored years (Fig. 6). In 2023, SBV RNA was found in 529 out of 3,905 tested pools (MIR: 135.47). In the same federal states and in the respective time period in 2019, SBV RNA was found in 4 out of 110 tested pools (MIR: 36.36), while in 2020, 2021 and 2022, no SBV RNA was detected in any of the pools collected in North Rhine-Westphalia and Lower Saxony from the end of September to the beginning of November. Statistical analysis of comparison of

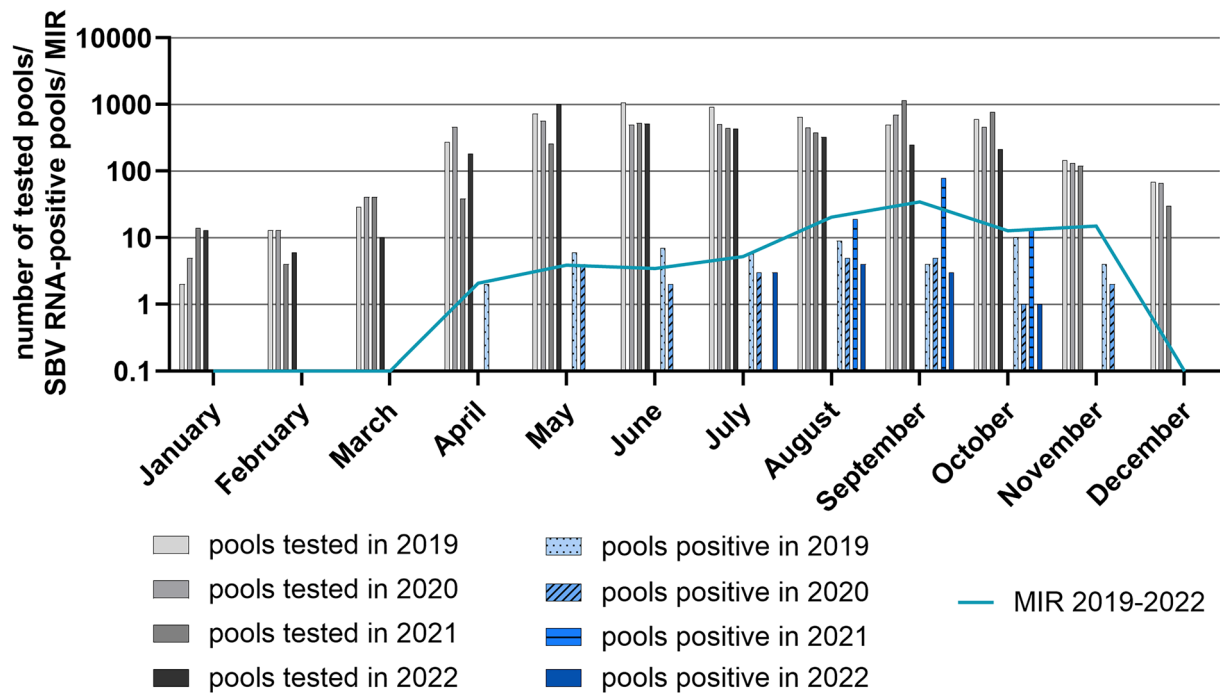


Fig. 4 Number of tested biting midge pools and Schmallenberg virus (SBV) RNA-positive pools. For each month from 2019 to 2022, the number of tested pools is displayed in grey and the number of SBV RNA-positive pools in blue. To show monthly differences of SBV circulation over the monitored years, the minimum infection rate (MIR) (line) was calculated

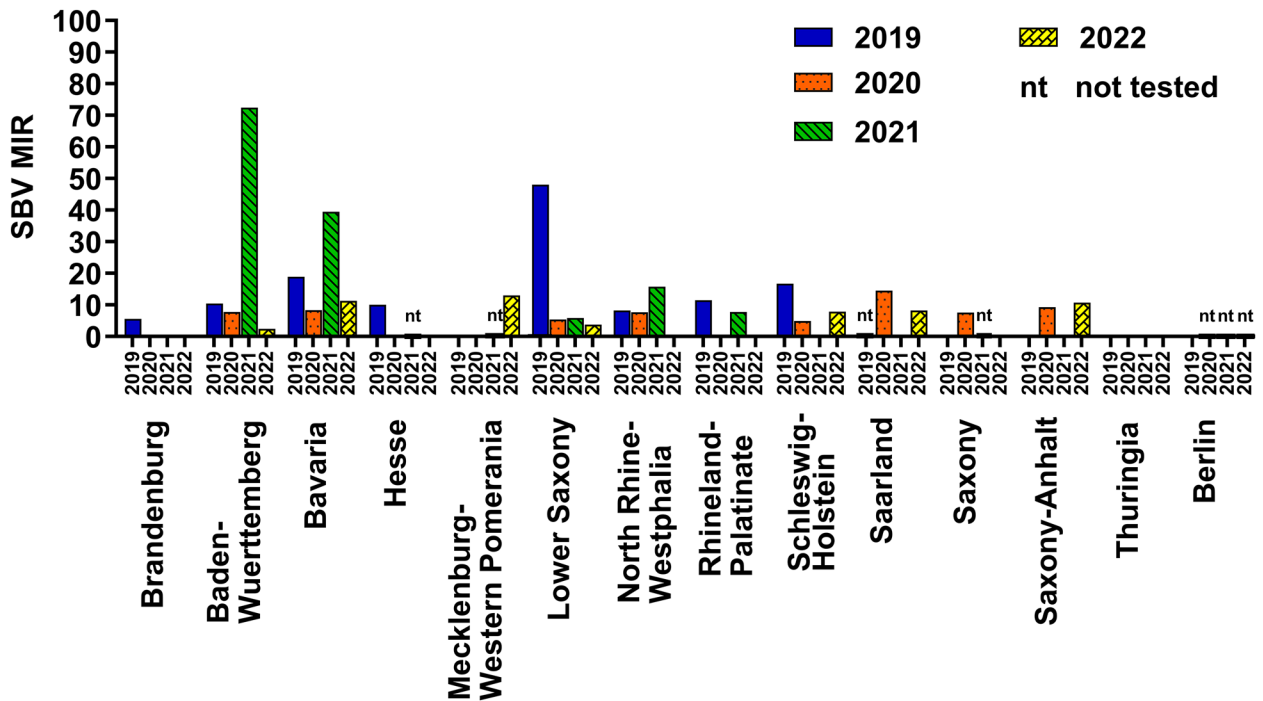


Fig. 5 Schmallenberg virus (SBV) RNA detection in the different German federal states. To show regional differences of SBV RNA prevalence, the minimum infection rate (MIR) was calculated for the individual German federal states from 2019 to 2022

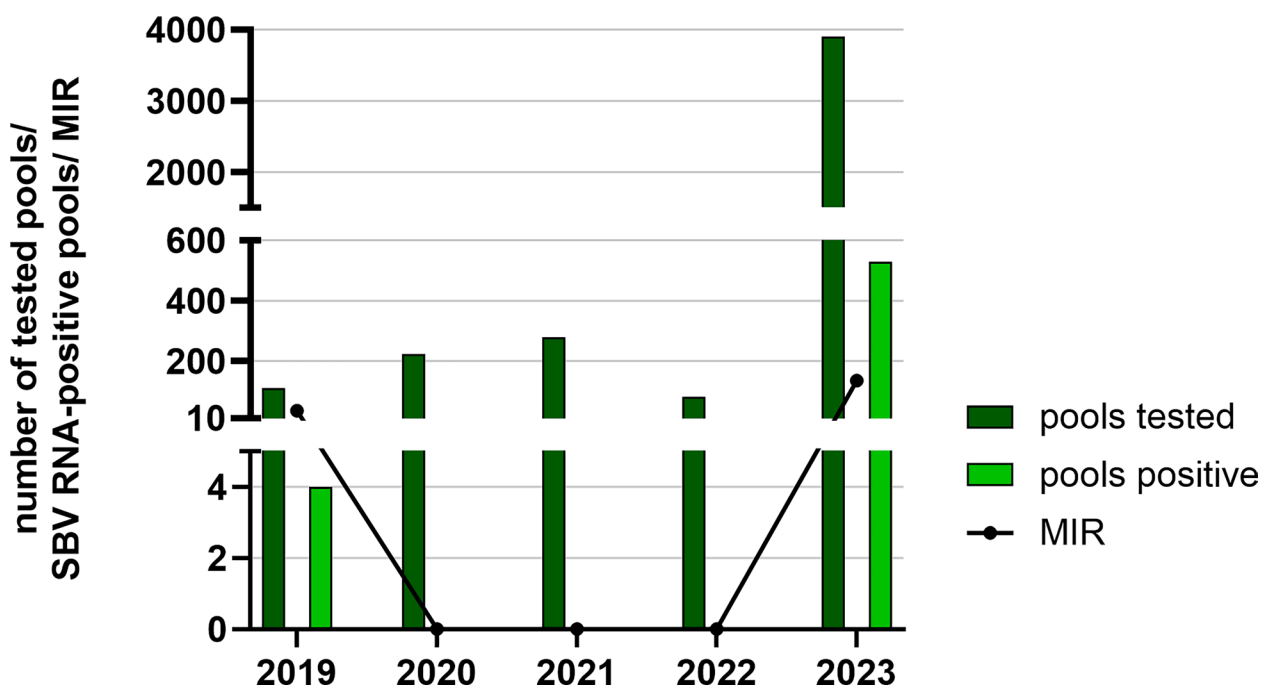


Fig. 6 Comparison of Schmallenberg virus (SBV) RNA circulation in the west of Germany. The tested midge pools (dark green) and SBV RNA-positive pools (light green) were collected from 24 September to 12 November in 2019, 2020, 2021, 2022 and 2023 in North Rhine-Westphalia and Lower Saxony. To show the differences in SBV RNA occurrence, the minimum infection rate (MIR) in the midges was calculated for each monitored year

the SBV MIRs measured from 2019 to 2023 in North-Rhine Westphalia and Lower Saxony revealed a highly significant difference, with $P < 0.001$. All the individual comparisons of 2023 with 2019, 2020, 2021 and 2022 resulted in highly significant P -values ($P < 0.001$) as well.

The majority of all SBV RNA-positive pools from 2019 to 2023 showed quantification cycle values (Cq values) above 30. The percentage of the positive pools with Cq values below 30 was 4.1% in 2019, 13.6% in 2020, 16.2% in 2021, 0% in 2022 and 31.0% in 2023. In 2019, the Cq values ranged from 29.3 to 40.3, in 2020 from 26.3 to 40.2, in 2021 from 24.0 to 41.9, in 2022 from 32.6 to 40.4 and in 2023 from 22.5 to 41.7 (Fig. 7). The lowest Cq values (< 25) were found in pools of 50 midges from the subgenus *Avaritia* (Fig. 8). Only two *Avaritia* pools with less than 15 midges showed Cq values below 30 (Fig. 8). The pools of the subgenus *Culicoides* and other subgenera averagely contained less midges but showed high Cq values above 30 (Fig. 8).

Culicoides identification

For this study, 511,788 female *Culicoides* midges caught from 2019 to 2023 were morphologically identified. The majority of 450,607 individual midges was assigned to the subgenus *Avaritia* and placed in 14,055 pools (72.0%) with an average pool size of 32.3 midges. A total of 60,606

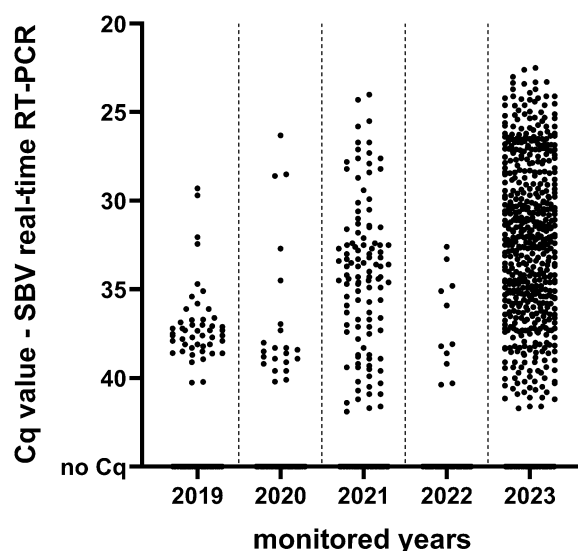


Fig. 7 Distribution of quantification cycle values (Cq values) resulting from the Schmallenberg virus (SBV) real-time RT-PCR. The Cq values of the tested biting midge pools are depicted for each monitored year from 2019 to 2023

specimens were identified as subgenus *Culicoides* and pooled in 5,052 pools (25.9%) with a mean pool size of 12.0 midges. Only 574 *Culicoides* midges were assigned

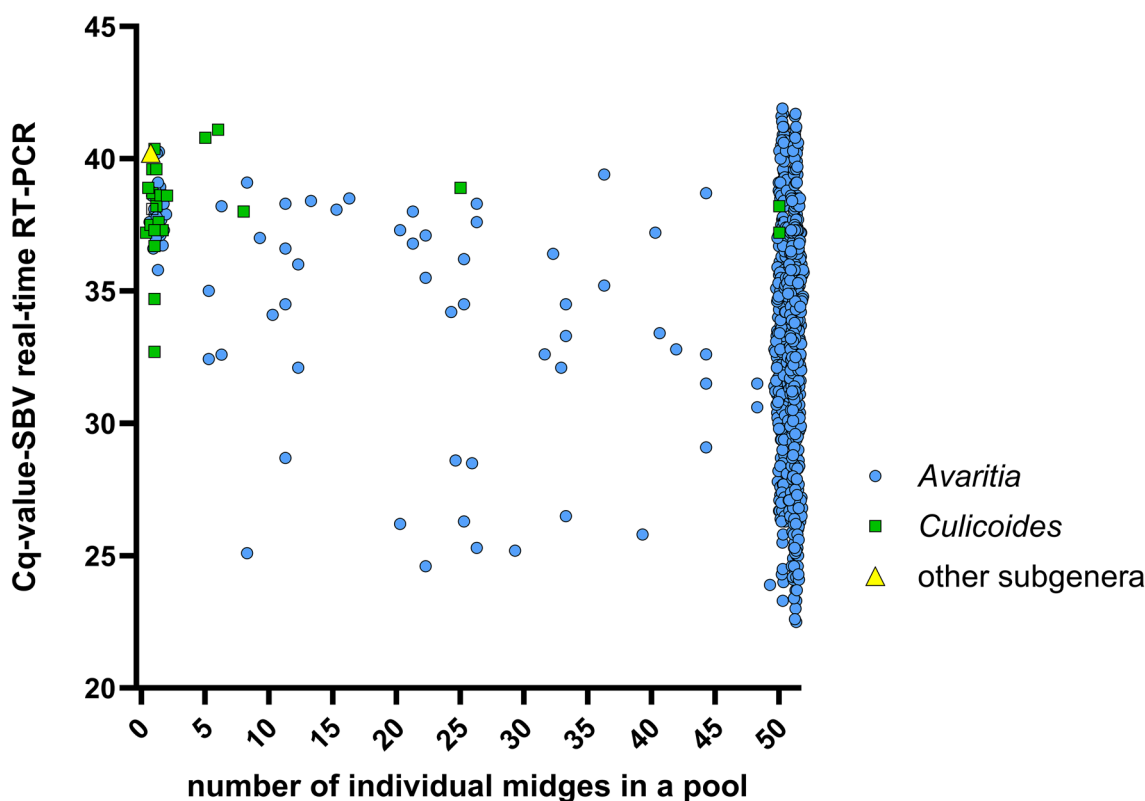


Fig. 8 Number of individual midges per pool in relation to the quantification cycle values (Cq value) of the Schmallenberg virus (SBV) real-time RT-PCR. The subgenus *Avaritia* is depicted by blue circles, the subgenus *Culicoides* is depicted by green squares and other subgenera are depicted by yellow triangles

to species of other subgenera and put in 414 pools (2.1%) with an average of 1.4 midges per pool. The detailed results of the morphological identification of the tested *Culicoides* biting midges for every monitored year are displayed in Fig. 9 and Table 1.

In every monitored year, the most SBV RNA-positive pools were represented by the subgenus *Avaritia* (Fig. 9 and Table 1). The respective percentages of SBV RNA-positive pools of the subgenus *Culicoides* were lower (Fig. 9 and Table 1). In all monitored years, only two pools with morphologically incorrectly identified other *Culicoides* subgenera from the year 2019 were found positive for SBV RNA.

In the species-specific PCR for the subgenus *Avaritia*, which was used to identify the species composition

in the SBV RNA-positive pools, the most abundant detected species were *C. obsoletus* and *C. scoticus*. Several pools additionally contained the species *C. dewulfi* and *C. chiopterus*. In the PCR for the differentiation of the haplotype/clade of *C. obsoletus*, the clade O1 was most often detected. In the species-specific PCR for the SBV RNA-positive pools of the subgenus *Culicoides*, *C. punctatus* was most often found, followed by *C. pulicaris*. One pool that was morphologically determined as *C. newsteadi* was found to be *C. selandicus* by sequencing. The two SBV RNA-positive pools of other species were sequenced, and the pool of *C. circumscriptus* was found to be *C. griseidorsum*, and *C. riethi* was identified as *C. lupicaris* haplotype L2. The detailed results of the species identification are listed in the Supplementary Dataset in

(See figure on next page.)

Fig. 9 Proportion of tested pools and specimens of the subgenus *Avaritia*, subgenus *Culicoides* and other subgenera as based on morphological identification. The results of the of Schmallenberg virus (SBV) RNA-positive and -negative pools from the vector year 2019/2020 are depicted in **A**, the vector year 2020/2021 in **B**, the vector year 2021/2022 in **C**, the vector year 2022 in **D** and the period from September to November 2023 in **E**. Absolute numbers are displayed in the individual figures

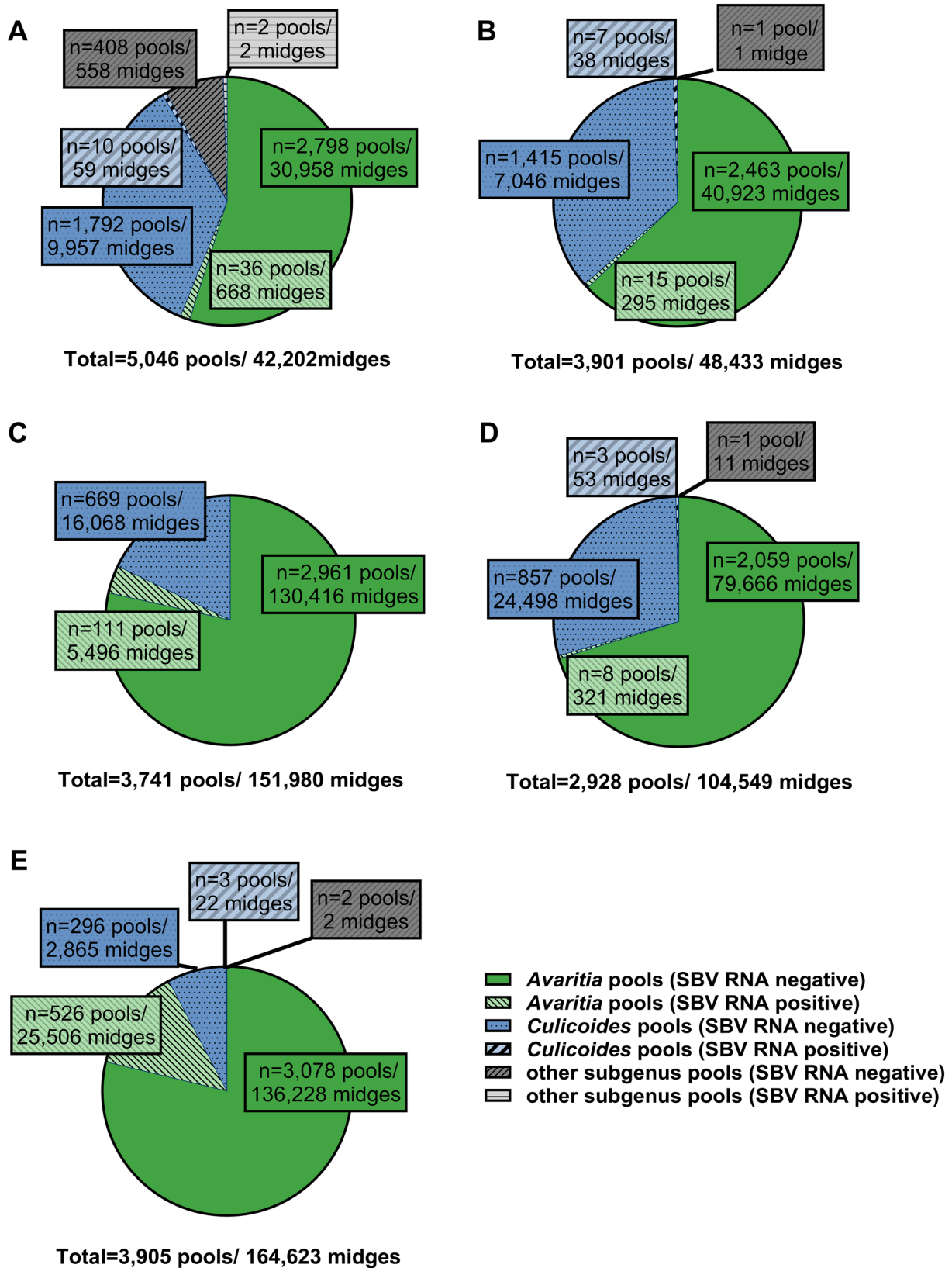


Fig. 9 (See legend on previous page.)

Table 1 Number of *Culicoides* morphologically identified in every vector year

Vector year	Subgenus	Individual midges	Tested pools	Average pool size	SBV RNA positive pools
2019/2020	<i>Avaritia</i>	31,626	2,834 (56.2%)	11.2	36 (1.3%)
	<i>Culicoides</i>	10,016	1,802 (35.7%)	5.6	10 (0.6%)
	Other subgenera	560	410 (8.1%)	1.4	2 (0.5%)
2020/2021		42,202	5,046	8.4	48 (1.0%)
	<i>Avaritia</i>	41,348	2,478 (63.5%)	16.7	15 (0.6%)
	<i>Culicoides</i>	7,084	1,422 (36.5%)	5.0	7 (0.5%)
2021/2022		48,433	3,901	12.4	22 (0.6%)
	<i>Avaritia</i>	135,913	3,072 (82.1%)	44.2	111 (3.6%)
	<i>Culicoides</i>	16,068	669 (17.9%)	24.0	0 (0.0%)
2022		0	0 (0.0%)	0.0	0 (0.0%)
		151,981	3,741	40.6	111 (3.0%)
	<i>Avaritia</i>	79,987	2,067 (70.6%)	40.9	8 (0.4%)
2023	<i>Culicoides</i>	24,551	860 (29.4%)	28.9	3 (0.3%)
	Other subgenera	11	1 (0.03%)	11.0	0 (0.0%)
		104,549	2,928	37.2	11 (0.4%)
2023	<i>Avaritia</i>	161,734	3,604 (92.3%)	44.9	526 (14.6%)
	<i>Culicoides</i>	2,887	299 (7.7%)	9.7	3 (1.0%)
	Other subgenera	2	2 (0.05%)	1	0 (0.0%)
		164,623	3,905	42.2	529 (13.6%)

The midges morphologically identified as subgenus *Avaritia*, subgenus *Culicoides* or other subgenera, the respective pool numbers and the SBV RNA positive pools are displayed in total numbers. The percentages in the brackets refer to the total number of pools tested in the respective vector year. Additionally, the average pool size was calculated for the pools

the Zenodo repository (<https://doi.org/10.5281/zenodo.15083498>).

Discussion

In our monitoring programme, we collected data on SBV, BTV and EHDV occurrence in *Culicoides* biting midges all over Germany for five consecutive years (2019–2023). The investigated period of 5 years and the nationwide collection of midges make it possible to follow the spatial and temporal differences in the occurrence of the viruses in the midges. It should be noted that the investigated viruses may cause subclinical diseases in adult ruminant hosts such as cattle, which nevertheless can lead to economic losses, e.g. due to increased abortion rates or reduced milk yields. Because it is often difficult to detect the diseases in ruminants, the detection of the viruses in the midge vector is a suitable alternative to retrospectively monitor the occurrence of SBV, BTV and EHDV.

Our results confirm an annual circulation of SBV in biting midges, while neither BTV nor EHDV were found. We could detect SBV genome every year in the biting midges, although with variations in the regional and seasonal distribution. When comparing the detected MIRs, it should be taken into account that the calculation assumes only one positive midge in a pool, which may not reflect reality. The more midges are pooled together,

the higher the probability that more than one positive midge is included [17]. From 2019 to 2022, biting midges were caught year-round, including the winter months. We found SBV RNA in pools of biting midges caught from April to November and none in the months from December to March. Most of the SBV RNA-positive pools were collected in August and September, although a high proportion of pools tested positive also in November. Other monitoring studies in Europe found similar results. The majority of the studies from Belgium, Netherlands, Denmark, Poland, France, Spain and Italy were conducted in summer or autumn and found an increased SBV circulation from August to October [40, 41, 58, 81–83]. Studies that included *Culicoides* sampling in the winter months were conducted in Italy and Belgium. In Italy, biting midges were caught from June 2011 to June 2012. SBV RNA-positive pools were found from September to October 2011 and in May 2012 [84]. In Belgium, midges were collected from January to December 2011, with pools from August to October 2011 found SBV RNA-positive [38]. Overall, these former studies are not easy to compare. They vary in pool size, period of biting midge collection, placement of the traps and patterns of the midge collection from the traps. Furthermore, the studies differed in the evaluation of the positive pools, with calculations of variable parameters and separated

results of the different *Culicoides* species or trapping regions. In Germany, only one other study investigating SBV circulation in the biting midges was conducted from 2011 to 2014 [49]. In this study, 945 pools with a total of 21,397 midges collected all over Germany were screened for SBV RNA. Only two pools (0.2%) caught in summer 2012 were found positive, although there was a massive outbreak of SBV in domestic ruminants. A conceivable reason for the detected low percentage of SBV RNA-positive pools in 2012 is that the biting midges were caught on trapping sites that had initially not been selected to be used for SBV screening, and traps had been placed on farms not necessarily keeping ruminant host animals. The chance to find SBV on these untargeted trapping sites obviously was small. From the results of our monitoring and of other studies [40, 47, 58, 76, 81, 82, 84, 85], we conclude that the risk of SBV transmission in Europe is especially high in late summer and early autumn. First and foremost, in mild climatic regions, more biting midges are active in these seasons [56]. The biting midge species of the subgenus *Avaritia* and the subgenus *Culicoides* are mostly multivoltine, which means that they have multiple generations from spring to autumn and one generation overwintering as larvae in mild climatic regions such as Germany [86]. Usually two peaks of adult activity are visible over the course of a year, one peak in spring after the development of the overwintering larvae and a second, even larger peak in late summer or early autumn after the emergence of the imagines of the second generation [87]. Another reason for the effective SBV circulation in the biting midge population in summer and early autumn is the improved chance of virus transmission due to temperatures above 25 °C. This was mainly described for orbiviruses in laboratory colonies of *C. sonorensis* [88–91]. A similar correlation of temperature and transmission of SBV under natural conditions is very likely [92]. The highest average temperatures in Germany from 2019 to 2022 were measured during the summer from June to August (source: Deutscher Wetterdienst).

The abundance of native biting midges and the chance of virus transmission have been shown to be reduced in winter owing to slower development of midges at low temperatures [42]. Several studies indicated that the threshold temperature of virus replication and transmission in the *Culicoides* vector is about 12 °C [35, 88, 93]. In Germany, an average temperature below this threshold (12 °C) was observed in the months from October/November to April/May from 2019 to 2022 (source: Deutscher Wetterdienst). In our study, in the winter months from December to March, fewer biting midges were caught, and, therefore, less midges were screened for viruses than in other seasons, with no SBV RNA being found in any of the tested pools. However, it should

be considered that fewer biting midges could be caught during the winter than in summer because less UV-traps had been operated. Nonetheless, in comparison with the number of biting midges caught from April to November, the number of caught midges decreased remarkably in the time from December to March. Therefore, the risk of virus transmission seems to be drastically reduced during the winter months.

In addition to the differences of SBV circulation over the course of the year, we found spatial variations over the monitored years. When taking a closer look at the detected MIRs in the individual German federal states from 2019 to 2022, it becomes apparent that a high level of SBV circulation cannot be stated for all federal states equally. Rather, there are regional peaks of SBV RNA-positive pools in different years. These annual peaks are especially apparent, as well as statistically significant in the federal states of Baden-Wuerttemberg (2021), Bavaria (2021) and Lower Saxony (2019); however, in almost all the other federal states, except for Thuringia and Berlin (which was included only in 2019), an increased MIR could be observed for at least one of the monitored years from 2019 to 2022. In 2023, a statistically significant high SBV RNA occurrence level could again be detected in North Rhine-Westphalia and Lower Saxony. However, it must be considered that no other federal states were tested in 2023. On the basis of these findings, it can be concluded that there was a high SBV circulation in 2019 in the northwest of Germany, in 2021 in the south of Germany and in 2023 most notably in the west of Germany. We hypothesize that the variation in the levels of SBV circulation is a consequence of the cyclic re-circulation pattern of SBV in ruminants [3, 94, 95]. After the first outbreak of SBV in 2011, many European countries observed a re-circulation of SBV to a larger extent in domestic ruminants every 2 to 4 years [3, 94–97]. In general, the risk of SBV outbreaks is expected to increase as seroprevalence in the ruminant population gradually decreases over time. Though natural SBV infection leads to the production of long persisting antibodies [98], the herd seroprevalence is gradually declining over time owing to the slaughter of immunoprotected animals, the rapid decrease of maternal antibodies of newborn animals and the import of naïve animals [98]. In the years of low infection prevalences in ruminants, the transmission of virus to biting midges during a blood meal is less likely. In contrast, in years of extensive SBV circulation in the mammalian host animals, the chances of virus transmission to the biting midges increase. Evidence of annual fluctuations of SBV occurrence in biting midge populations can be found also in former published SBV monitoring studies from other European countries. In

Belgium and the Netherlands, the first outbreak had its peak in 2011, leading to relatively high SBV prevalences in the midges, with 6.7% in Belgium (with up to 25 midges/pool) and 2.3% in Netherlands (with 10 midges/pool) [83, 85]. The consequence was a higher proportion of immunoprotected ruminants and therefore reduced SBV circulation in the biting midge population in 2012 with SBV prevalences of 3.6% in Belgium (with a mean of 19.3 midges/pool) and 1.5% in Netherlands (50 midges/pool) [82, 99]. In Denmark, SBV also arrived in 2011, though later in the year than in Central Europe, and therefore circulated again at a higher extend in 2012 [81], with a detected SBV prevalence of 9.1% in 2011 (5 midges/pool) and an even higher prevalence of 15.8% in 2012 (with a mean pool size of 6.5 midges/pool) [81, 100]. In 2016, extensive SBV recirculation in biting midges and domestic ruminants was detected in Belgium and Poland, confirming the idea of SBV recurrence in midges when immunoprotected ruminants are scarce [76, 101]. In our study, we saw a similar fluctuation of SBV circulation in the biting midge population in different regions of Germany. According to our findings in the midges, we should therefore have seen a high SBV prevalence in the domestic ruminants in 2021 in the south and in 2023 in the west of Germany. In fact, there was no noticeable increase of reported SBV cases in ruminants; this may be a consequence of a massive under-detection and under-reporting [94]. However, from September 2021 to January 2022, a study searching for SBV in wildlife in five federal states of Germany found SBV antibodies in feral ruminants, especially in Hesse, Rhineland-Palatinate and, to a lesser extent, in North Rhine-Westphalia, while no antibodies were found in Bavaria and Mecklenburg-Western Pomerania [4]. Unfortunately, we did not test any biting midges from 2021 from Hesse; however, in the same year, we detected SBV RNA-positive midges in North Rhine-Westphalia and Rhineland-Palatinate. In accordance with our findings of high MIRs in the *Culicoides* population in North-Rhine Westphalia and Rhineland Palatinate in 2023, a high seroprevalence of over 40% was found in wild ruminants in 2023 in North-Rhine Westphalia which proves extensive SBV circulation at that time [102].

In contrast to SBV, we could not find any EHDV or BTV in the tested *Culicoides* pools from 2019 to 2022. The absence of EHDV genome in biting midges is in line with the epidemiological situation in ruminants in Germany. However, since the first introduction of EHDV in the south of Europe in 2022, the virus spread northwards, leading to the detection of the first ruminant EHDV cases in France in September 2023 [103]. Although in 2024 the spread of EHDV through France was stopped, with a

limited occurrence of EHDV in the south and northwest of the country (source: ESA), a further spread of EHDV in Europe with an emergence in Germany cannot be ruled out in the next years.

As was the case for EHDV, BTV was not detected in the period from 2019 to 2022. However, the epidemiological situation of BTV in Germany is different from that for EHDV. After Germany was free of BTV from 2012 to December 2018, BTV-8 re-occurred in 2019 with 59 cases in domestic ruminants in the southwest of the country (source: TSN). In 2020 and 2021, three cases were reported, and in 2022, no cases of BTV-8 were reported (source: TSN). According to the data from the German animal disease reporting system, we suppose that BTV-8 circulation in the biting midge population from 2019 to 2022 was on a low level, causing only regional outbreaks with a very limited number of cases, not comparable with the massive outbreak seen in 2006/2007. With the results of our study, we confirmed this very low BTV circulation also in the biting midge population. After the emergence of BTV-3 in 2023 in the Netherlands and the rapid spread within the country and to the west of Germany, we searched for BTV-3 positive biting midge pools in the affected regions in North Rhine-Westphalia and Lower Saxony. Again, none of the tested pools were positive for BTV genome. However, a part of the biting midge pools in our monitoring programme that had been caught in autumn 2023 was analysed prior to this study. In this preceding virus screening, we were able to find the BTV-3 genome in one of the tested biting midge pools [17], confirming that BTV-3 circulated on a very low level in the west of Germany in autumn 2023. Likewise, BTV-3 was only detected in a few ruminants in the west of Germany (source: TSN). Cold temperatures stopped its circulation in the biting midges and prevented further spreading until early 2024. However, in spring, summer and autumn 2024, BTV-3 continued to circulate, at that time on a much higher extent with a massive outbreak in ruminants all over Germany (source: TSN). The dynamic disease situation in ruminants in Europe makes it essential to continue the monitoring and the virus screening in the *Culicoides* biting midges.

Another aim of our monitoring programme was to find out which *Culicoides* species are possibly involved in virus transmission. The morphologically determined *Culicoides* species of all monitored years belonged almost exclusively to the subgenus *Avaritia* and the subgenus *Culicoides*. The species of these two subgenera are the most abundant in Europe [104] and were therefore more frequently collected and tested for viruses than other *Culicoides* species. In our study, only a small share of caught biting midges was identified as other species, resulting in a possibly biased detected prevalence of

viruses. The finding that mainly biting midges of the subgenus *Avaritia* were infected with SBV matches the outcome of other European studies [41, 42, 48, 59, 76, 100]. By further differentiating the morphologically presorted subgenera by molecular biological methods, it was possible to narrow down the putative vector species. The SBV RNA-positive subgenus *Avaritia* pools were further differentiated into the taxa *C. obsoletus* clade O1, *C. obsoletus* clade O2, *C. scoticus*, *C. dewulfi* and *C. chiopterus*. The SBV RNA-positive subgenus *Culicoides* pools contained *C. punctatus* and *C. pulicaris*. One single midge, which was found in the north of Germany and tested positive, was identified by sequencing as *C. selandicus*. This species belongs to the subgenus *Culicoides* and was thought to be mainly found in Denmark [105] but has recently been recorded in Sweden, Slovakia, the UK and Germany [51]. The SBV RNA-positive pools that had been morphologically incorrectly identified as *C. circumscriptus* and *C. riethi* were sequenced and found to be *C. griseidorsum* and *C. lupicaris* L2, respectively. Genetic identification is much more reliable than morphological identification since clear data are generated that are not prone to subjective misinterpretation. *Culicoides lupicaris* is a species of the subgenus *Culicoides*. Although SBV has already been found in this species in previous studies [40], this is the first time that an SBV-positive *C. lupicaris* midge could be specified as haplotype L2. *Culicoides griseidorsum* is a species within the subgenus *Sensiculicoides* Shevchenko [106]. While this is the first detection of SBV genome in the species *C. selandicus* and *C. griseidorsum*, no information is available about their vector competence for SBV. The midges might just have contained a residual blood meal from a viremic host without facilitating virus replication.

The detection of SBV genomes in biting midges in the field is not sufficient evidence for vector competence unless the virus is detected in the salivary glands. In our study, the tested midges were analysed as whole individuals. With the usage of the whole midge for virus detection, it is not possible to confirm whether the virus was present in the digestive track only or disseminated in the body and also spread to the salivary glands. Only when the virus reaches the salivary glands, the midge is able to transmit the virus when taking a blood meal from a naïve host [76]. In addition, up to four different taxa were found in some SBV RNA-positive pools by the species-specific PCRs. In these cases, it is not possible to determine which of the species might be the putative vector. Vector competence studies that demonstrate the ability of *Culicoides* species to replicate and transmit a virus are scarce. All of the SBV RNA-positive pools with biting midges of the subgenus *Culicoides* and other species had rather high Cq values of over 32. By contrast, we found

several SBV RNA-positive pools containing the midge taxa *C. obsoletus* clade O1, *C. dewulfi*, *C. chiopterus* and *C. scoticus* with Cq values under 32. From infection studies with SBV in laboratory colonies of biting midges it is known that midges with high virus replication rates and therefore low Cq values (<24 or <32) could carry transmissible infections [58, 107, 108]. However, Cq values under 32 may be detected as well when the midges were freshly fed on a viremic host. Additionally, we have to take into account that a pool consisted of up to 50 midges, including the possibility that more than one midge was virus-positive. Therefore, the most informative pools might be the pools containing only a few individual midges and displaying low Cq values in the SBV-specific PCR. In our study, this applies only to a few pools with midges of the subgenus *Avaritia*. In a pool of eight midges with a Cq value of 25.1, the included species were found to be *C. obsoletus* clade O1 and *C. chiopterus*, and in a pool of 11 midges with a Cq value of 28.7, the species were identified as *C. scoticus*, *C. obsoletus* clade O1 and *C. chiopterus*. From our results, we conclude that several pools of the subgenus *Avaritia* possibly contained biting midges with transmissible infections.

In the distribution of the Cq values in the SBV RNA-specific real-time RT-PCR, it becomes apparent that there were more pools in 2023 with Cq values below 32 than in the years before. Overall, it is possible that in 2023 more biting midges replicated SBV to a transmissible level than in the previous years. However, the storage duration of the pools in ethanol may also play a role for the detected Cq values. In 2023, the RNA extraction was done immediately after collection and species differentiation. In the years before, the pools had been stored in 80% ethanol at room temperature for several months or even years. We suspect that, to a certain degree, the RNA degrades during the long-time storage in the alcohol. In a previous study, the long-term preservation of viral RNA at room temperatures was evaluated for situations when storage at low temperatures was not possible, e.g. for collection and transport. There was no loss of viral RNA detectable at the end of the experiment after the storage of infected mosquitoes for 8 weeks in 99.5% ethanol [109]. However, in our monitoring study, the pooled midges from 2019 to 2022 had been usually stored longer than 8 weeks in 80% ethanol. Therefore, further studies evaluating the storage of the midges in ethanol at room temperature for longer than 8 weeks are required.

In summary, we showed SBV circulation in the biting midges in Germany in every monitored year, although on a different extent, depending on the region, the season and the year of midge sampling. Altogether, our study allowed the retrospective detection of circulating viruses in the biting midge population and the identification of

potential vector species. We could confirm the species of the *Obsoletus* complex, as well as the two species of the subgenus *Avaritia* *C. chiopterus* and *C. dewulfi*, as the main putative vectors of SBV, enabling its annual circulation. Further continuation of the study will distinguish the role of other species, e.g. *C. punctatus*, *C. pulicaris*, *C. lupicaris*, *C. griseidorsum* and *C. selandicus*, for the transmission of SBV and other viruses.

Conclusions

The results from the monitoring programme confirm an enzootic circulation of SBV in the biting midge population in Germany during summer and autumn. Additionally, the ongoing outbreak of BTV-3 in Europe and the emergence of EHDV in southern Europe threaten the domesticated ruminants and the agricultural sector at large. Therefore, continuation of the monitoring programme is indispensable.

Abbreviations

SBV	Schmallenberg virus
BTV	Bluetongue virus
EHDV	Epizootic haemorrhagic disease virus
MIR	Minimum infection rate
PCR	Polymerase chain reactions
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reactions
TSN	Tierseuchen-Nachrichtensystem (German animal disease reporting system)
Cq value	Quantification cycle value
LED	Light-emitting diode
UV	Ultraviolet

Acknowledgements

We thank the technical staff of the working groups from FLI: Bianka Hillmann, Uday Gottam, Dennis Karnatz, Max Kreuzt, Leonie Lemm and Aileen Stoll and from ZALF: Oliver Tauchmann, Andreas Graeben, Sebastian Schuran and Sabine Siewert for their excellent assistance and support.

Author contributions

Conceptualization: M.B., K.W., H.K. and D.W.; formal analysis: S.Z., F.S., E.H., O.D., A.V., M.B. and K.W.; funding acquisition: H.K., D.W., M.B. and K.W.; investigation: S.Z., F.S., A.V., O.D. and E.H.; methodology: H.K., D.W., M.B. and K.W.; supervision: H.K., M.B., K.W. and D.W.; visualization: S.Z.; writing – original draft: S.Z.; writing—review and editing: M.B., K.W., H.K., D.W., F.S., A.V., E.H. and O.D. All authors reviewed the manuscript.

Funding

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. This work was supported by the German Federal Ministry of Agriculture, Food and Regional Identity (BMLFH) through the Federal Office for Agriculture and Food (BLE) under grants 281B101816 and 28N207601. The funder had no role in the conceptualization, design, data collection, analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

Data availability

The datasets generated and analysed during the current study are available in the Zenodo repository, <https://doi.org/10.5281/zenodo.15083498>.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Author details

¹Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Greifswald - Insel Riems, Germany. ²Leibniz-Centre for Agricultural Landscape Research, Muencheberg, Germany.

Received: 7 April 2025 Accepted: 23 June 2025

Published online: 05 July 2025

References

- Hoffmann B, Scheuch M, Höper D, Jungblut R, Holsteg M, Schirrmeyer H, et al. Novel orthobunyavirus in cattle, Europe, 2011. *Emerg Infect Dis*. 2012;18:469–72.
- Beer M, Conraths FJ, van der Poel WH. 'Schmallenberg virus' – A novel orthobunyavirus emerging in Europe. *Epidemiol Infect*. 2013;141:1–8.
- Wernike K, Beer M. Re-circulation of Schmallenberg virus, Germany, 2019. *Transbound Emerg Dis*. 2020;67:2290–5.
- Wernike K, Fischer L, Holsteg M, Aebischer A, Petrov A, Marquart K, et al. Serological screening in wild ruminants in Germany, 2021/2022: no evidence of SARS-CoV-2, bluetongue virus or pestivirus spread but high seroprevalences against Schmallenberg virus. *Transbound Emerg Dis*. 2022;69:e3289–96.
- Wernike K, Conraths F, Zanella G, Granzow H, Gache K, Schirrmeyer H, et al. Schmallenberg virus—two years of experiences. *Prev Vet Med*. 2014;116:423–34.
- Jiménez-Ruiz S, Vicente J, Rialde MA, Acevedo P, Cano-Terriza D, González-Barrio D, et al. Survey of *Culicoides*-borne bluetongue and Schmallenberg viruses at the wildlife-livestock interface in Doñana National Park (Spain). *Transbound Emerg Dis*. 2022;69:e1815–24.
- Linden A, Desmecht D, Volpe R, Wirtgen M, Gregoire F, Pirson J, et al. Epizootic spread of Schmallenberg virus among wild cervids, Belgium, Fall 2011. *Emerg Infect Dis*. 2012;18:2006–8.
- Wernike K, Holsteg M, Schirrmeyer H, Hoffmann B, Beer M. Natural infection of pregnant cows with Schmallenberg virus – A follow-up study. *PLoS ONE*. 2014;9:e98223.
- Herder V, Wohlsein P, Peters M, Hansmann F, Baumgärtner W. Salient lesions in domestic ruminants infected with the emerging so-called Schmallenberg virus in Germany. *Vet Pathol*. 2012;49:588–91.
- Maclachlan NJ, Zientara S, Wilson WC, Richt JA, Savini G. Bluetongue and epizootic hemorrhagic disease viruses: recent developments with these globally re-emerging arboviral infections of ruminants. *Curr Opin Virol*. 2019;34:56–62.
- Spedicato M, Compagni ED, Caporale M, Teodori L, Leone A, Ancora M, et al. Reemergence of an atypical bluetongue virus strain in goats, Sardinia. *Italy Vet Sci Res*. 2022;151:36–41.
- Subhadra S, Sreenivasulu D, Pattnaik R, Panda BK, Kumar S. Bluetongue virus: past, present, and future scope. *J Infect Dev Ctries*. 2023;17:147–56.
- Maclachlan NJ, Mayo CE, Daniels PW, Savini G, Zientara S, Gibbs EP. Bluetongue. *Rev Sci Tech*. 2015;34:329–40.
- Toussaint JF, Vandenbussche F, Mast J, De Meester L, Goris N, Van Dessel W, et al. Bluetongue in northern Europe. *Vet Rec*. 2006;159:327.
- Zhang S, Zhang Q, Zhang H, Liang R, Chen Q, Niu B. Assessing the export trade risk of bluetongue virus serotypes 4 and 8 in France. *Risk Anal*. 2023;43:1124–36.
- Boender GJ, Hagenaars TJ, Holwerda M, Spierenburg MAH, van Rijn PA, van der Spek AN, et al. Spatial transmission characteristics of the bluetongue virus serotype 3 epidemic in the Netherlands, 2023. *Viruses*. 2024;16:625.
- Voigt A, Kampen H, Heuser E, Zeiske S, Hoffmann B, Höper D, et al. Bluetongue virus serotype 3 and Schmallenberg virus in *Culicoides* biting midges, Western Germany, 2023. *Emerg Infect Dis*. 2024;30:1438–41.

18. Darpel KE, Batten CA, Veronesi E, Shaw AE, Anthony S, Bachanek-Bankowska K, et al. Clinical signs and pathology shown by British sheep and cattle infected with bluetongue virus serotype 8 derived from the 2006 outbreak in northern Europe. *Vet Rec.* 2007;161:253–61.
19. Elbers AR, Backx A, Meroc E, Gerbier G, Staubach C, Hendrickx G, et al. Field observations during the bluetongue serotype 8 epidemic in 2006. I Detection of first outbreaks and clinical signs in sheep and cattle in Belgium, France and the Netherlands. *Prev Vet Med.* 2008;87:21–30.
20. Saminathan M, Singh KP, Khorajiya JH, Dinesh M, Vineetha S, Maity M, et al. An updated review on bluetongue virus: epidemiology, pathobiology, and advances in diagnosis and control with special reference to India. *Vet Q.* 2020;40:258–321.
21. Dal Pozzo F, Saegerman C, Thiry E. Bovine infection with bluetongue virus with special emphasis on European serotype 8. *Vet J.* 2009;182:142–51.
22. Zanella G, Durand B, Sellal E, Breard E, Sailleau C, Zientara S, et al. Bluetongue virus serotype 8: abortion and transplacental transmission in cattle in the Burgundy region, France, 2008–2009. *Theriogenology.* 2012;77:65–72.
23. Worwa G, Hilbe M, Ehrensperger F, Chaignat V, Hofmann MA, Griot C, et al. Experimental transplacental infection of sheep with bluetongue virus serotype 8. *Vet Rec.* 2009;164:499–500.
24. Coetzee P, Stokstad M, Myrmet M, Mutowembwa P, Loken T, Venter EH, et al. Transplacental infection in goats experimentally infected with a European strain of bluetongue virus serotype 8. *Vet J.* 2013;197:335–41.
25. Maclachlan NJ, Zientara S, Savini G, Daniels PW. Epizootic haemorrhagic disease. *Rev Sci Tech.* 2015;34:341–51.
26. Shope RE, MacNamara LG, Mangold R. Epizootic haemorrhagic disease of deer. *New Jersey Outdoors.* 1955, 16, 21.
27. Becker ME, Roberts J, Schroeder ME, Gentry G, Foil LD. Prospective study of epizootic hemorrhagic disease virus and bluetongue virus transmission in captive ruminants. *J Med Entomol.* 2020;57:1277–85.
28. Eschbaumer M, Wernike K, Batten CA, Savini G, Edwards L, Di Gennaro A, et al. Epizootic hemorrhagic disease virus serotype 7 in European cattle and sheep: diagnostic considerations and effect of previous BTV exposure. *Vet Microbiol.* 2012;159:298–306.
29. Lorusso A, Cappai S, Loi F, Pinna L, Ruiu A, Puggioni G, et al. Epizootic hemorrhagic disease virus serotype 8, Italy, 2022. *Emerg Infect Dis.* 2023;29:1063–5.
30. Spedicato M, Profeta F, Thabet S, Teodori L, Leone A, Portanti O, et al. Experimental infection of cattle, sheep, and goats with the newly emerged epizootic hemorrhagic disease virus serotype 8. *Vet Ital.* 2023;59-4. <https://doi.org/10.12834/VetIt.3433.23112.1>.
31. Gethmann J, Probst C, Conraths FJ. Economic impact of a bluetongue serotype 8 epidemic in Germany. *Front Vet Sci.* 2020;7:65.
32. Stavrou A, Daly JM, Maddison B, Gough K, Tarlinton R. How is Europe positioned for a re-emergence of Schmallenberg virus? *Vet J.* 2017;230:45–51.
33. Borkent A, Dominiak P. Catalog of the biting midges of the world (Diptera: Ceratopogonidae). *Zootaxa.* 2020;4787. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4787.1.1>.
34. Borkent A, Dominiak P, Daz F. An update and errata for the catalog of the biting midges of the world (Diptera: Ceratopogonidae). *Zootaxa.* 2022;5120:53–64.
35. Mellor PS, Boorman J, Baylis M. *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annu Rev Entomol.* 2000;45:307–40.
36. Mathieu B, Cêtre-Sossah C, Garros C, Chavernac D, Balenghien T, Carpenter S, et al. Development and validation of IIKC: an interactive identification key for *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) females from the Western Palaearctic region. *Parasit Vectors.* 2012;5:137.
37. Delécolle JC. Nouvelle contribution à l'étude systématique et iconographique des espèces du genre *Culicoides*, (Diptera): (Ceratopogonidae) du Nord-Est de la France: Delecolle (JC); 1985.
38. De Regge N, De Deken R, Fassotte C, Losson B, Deblauwe I, Madder M, et al. *Culicoides* monitoring in Belgium in 2011: analysis of spatiotemporal abundance, species diversity and Schmallenberg virus detection. *Med Vet Entomol.* 2015;29:263–75.
39. Hristescu D, Bărbuceanu F, Dascălu L, Nițescu C, Goffredo M, Santilli A, et al. Species composition and relative abundance of the genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in Romania. *Parasit Vectors.* 2020;13:393.
40. Ségard A, Gardès L, Jacquier E, Grillet C, Mathieu B, Rakotoarivony I, et al. Schmallenberg virus in nulliparous *Culicoides Latreille* (Diptera: Ceratopogonidae) populations in France during 2011–2012 outbreak. *Transbound Emerg Dis.* 2018;65:e94–103.
41. Larska M, Lechowski L, Grochowska M, Żmudziński JF. Detection of the Schmallenberg virus in nulliparous *Culicoides obsoletus/scoticus* complex and *C. punctatus* – The possibility of transovarial virus transmission in the midge population and of a new vector. *Vet Microbiol.* 2013;166:467–73.
42. Groschupp S, Kampen H, Werner D. Occurrence of putative *Culicoides* biting midge vectors (Diptera: Ceratopogonidae) inside and outside barns in Germany and factors influencing their activity. *Parasit Vectors.* 2023;16:307.
43. Kampen H, Werner D. Biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) as vectors of viruses. *Microorganisms.* 2023;11:2706.
44. Harrup LE, Bellis GA, Balenghien T, Garros C. *Culicoides Latreille* (Diptera: Ceratopogonidae) taxonomy: current challenges and future directions. *Infect Genet Evol.* 2015;30:249–66.
45. Werner D, Groschupp S, Bauer C, Kampen H. Breeding habitat preferences of major *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae) in Germany. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17:5000.
46. Groschupp S, Kampen H, Werner D. Winter activity of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) inside and outside stables in Germany. *Med Vet Entomol.* 2024;38:552–65.
47. Kiel E, Liebisch G, Focke R, Liebisch A, Werner D. Monitoring of *Culicoides* at 20 locations in northwest Germany. *Parasitol Res.* 2009;105:351–7.
48. Hoffmann B, Bauer B, Bauer C, Bätza HJ, Beer M, Clausen PH, et al. Monitoring of putative vectors of bluetongue virus serotype 8, Germany. *Emerg Infect Dis.* 2009;15:1481–4.
49. Kameke D, Werner D, Hoffmann B, Lutz W, Kampen H. Schmallenberg virus in Germany 2011–2014: searching for the vectors. *Parasitol Res.* 2016;115:527–34.
50. Meiswinkel R, De Bree F, Bossers-De Vries R, Elbers AR. An unrecognized species of the *Culicoides obsoletus* complex feeding on livestock in the Netherlands. *Vet Parasitol.* 2015;207:324–8.
51. Dähn O, Werner D, Mathieu B, Kampen H. Development of conventional multiplex PCR assays for the identification of 21 west Palaearctic biting midge taxa (Diptera: Ceratopogonidae) belonging to the *Culicoides* subgenus *Culicoides*, including recently discovered species and genetic variants. *Diversity.* 2023;15:699.
52. Dähn O, Werner D, Mathieu B, Kampen H. Large-scale cytochrome c oxidase subunit I gene data analysis for the development of a multiplex polymerase chain reactions test capable of identifying biting midge vector species and haplotypes (Diptera: Ceratopogonidae) of the *Culicoides* subgenus *Avaritia* Fox, 1955. *Genes.* 2024;15:323.
53. Pagès N, Muñoz-Muñoz F, Talavera S, Sarto V, Lorca C, Núñez JI. 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.* 2009;165:298–310.
54. Möhlmann TWR, Bekendam AM, van Kemenade I, Wennergren U, Favia G, Takken W, et al. Latitudinal diversity of biting midge species within the *Obsoletus* group across three habitats in Europe. *Med Vet Entomol.* 2019;33:420–6.
55. Purse BV, Carpenter S, Venter GJ, Bellis G, Mullens BA. Bionomics of temperate and tropical *Culicoides* midges: knowledge gaps and consequences for transmission of *Culicoides*-borne viruses. *Annu Rev Entomol.* 2015;60:373–92.
56. Sick F, Beer M, Kampen H, Wernike K. *Culicoides* biting midges—underestimated vectors for arboviruses of public health and veterinary importance. *Viruses.* 2019;11:376.
57. Mellor PS. Replication of arboviruses in insect vectors. *J Comp Pathol.* 2000;123:231–47.
58. Pagès N, Talavera S, Verdún M, Pujol N, Valle M, Bensaid A, et al. Schmallenberg virus detection in *Culicoides* biting midges in Spain: first laboratory evidence for highly efficient infection of *Culicoides* of the *Obsoletus* complex and *Culicoides imicola*. *Transbound Emerg Dis.* 2018;65:e1–6.

59. Balenghien T, Pagès N, Goffredo M, Carpenter S, Augot D, Jacquier E, et al. The emergence of Schmallenberg virus across *Culicoides* communities and ecosystems in Europe. *Prev Vet Med.* 2014;116:360–9.
60. Carpenter S, McArthur C, Selby R, Ward R, Nolan DV, Mordue Luntz AJ, et al. Experimental infection studies of UK *Culicoides* species midges with bluetongue virus serotypes 8 and 9. *Vet Rec.* 2008;163:589–92.
61. Paslaru AI, Mathis A, Torgerson P, Veronesi E. Vector competence of pre-alpine *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) for bluetongue virus serotypes 1, 4 and 8. *Parasit Vectors.* 2018;11:466.
62. Federici V, Goffredo M, Mancini G, Quaglia M, Santilli A, Di Nicola F, et al. Vector competence of Italian populations of *Culicoides* for some bluetongue virus strains responsible for recent Northern African and European outbreaks. *Viruses.* 2019;11:941.
63. Jennings DM, Mellor PS. The vector potential of British *Culicoides* species for bluetongue virus. *Vet Microbiol.* 1988;17:1–10.
64. Carpenter S, Lunt HL, Arav D, Venter GJ, Mellor PS. Oral susceptibility to bluetongue virus of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) from the United Kingdom. *J Med Entomol.* 2006;43:73–8.
65. Meiswinkel R, van Rijn P, Leijts P, Goffredo M. Potential new *Culicoides* vector of bluetongue virus in northern Europe. *Vet Rec.* 2007;161:564–5.
66. Dijkstra E, van der Ven IJ, Meiswinkel R, Hölzel DR, Van Rijn PA, Meiswinkel R. *Culicoides chiopterus* as a potential vector of bluetongue virus in Europe. *Vet Rec.* 2008;162:422.
67. Maurer LM, Paslaru A, Torgerson PR, Veronesi E, Mathis A. Vector competence of *Culicoides* biting midges from Switzerland for African horse sickness virus and epizootic haemorrhagic disease virus. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 2022;164:66–70.
68. Paweska JT, Venter GJ, Hamblin C. A comparison of the susceptibility of *Culicoides imicola* and *C. bolitinos* to oral infection with eight serotypes of epizootic haemorrhagic disease virus. *Med Vet Entomol.* 2005;19:200–7.
69. Savini G, Afonso A, Mellor P, Aradaib I, Yadin H, Sanaa M, et al. Epizootic haemorrhagic disease. *Res Vet Sci.* 2011;91:1–17.
70. Thompson GM, Jess S, Murchie AK. Differential emergence of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) from on-farm breeding substrates in Northern Ireland. *Parasitology.* 2013;140:699–708.
71. Lassen SB, Nielsen SA, Kristensen M. Identity and diversity of blood meal hosts of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae: *Culicoides* Latreille) in Denmark. *Parasit Vectors.* 2012;5:143.
72. Aguilar-Vega C, Fernández-Carrión E, Sánchez-Vizcaino JM. The possible route of introduction of bluetongue virus serotype 3 into Sicily by windborne transportation of infected *Culicoides* spp. *Transbound Emerg Dis.* 2019;66:1665–73.
73. Wernike K, Kohn M, Conraths FJ, Werner D, Kameke D, Hechinger S, et al. Transmission of Schmallenberg virus during winter. *Germany Emerg Infect Dis.* 2013;19:1701–3.
74. Zhang X, Gerry AC. Host-seeking activity of adult *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) during winter in southern California, USA, and assessment of bluetongue virus overwintering. *J Med Entomol.* 2023;60:789–95.
75. Erram D, McGregor B, Acevedo C, Alto BW, Burkett-Cadena N. Epizootic hemorrhagic disease virus oral infection affects midge reproduction and is vertically transmitted to offspring in *Culicoides sonorensis*. *Sci Rep.* 2025;15:16078.
76. Kęsik-Maliszewska J, Larska M, Collins ÁB, Rola J. Post-epidemic distribution of Schmallenberg virus in *Culicoides* arbovirus vectors in Poland. *Viruses.* 2019;11:447.
77. Bilk S, Schulze C, Fischer M, Beer M, Hlinak A, Hoffmann B. Organ distribution of Schmallenberg virus RNA in malformed newborns. *Vet Microbiol.* 2012;159:236–8.
78. Wernike K, Hoffmann B, Beer M. Simultaneous detection of five notifiable viral diseases of cattle by single-tube multiplex real-time RT-PCR. *J Virol Methods.* 2015;217:28–35.
79. Lehmann K, Werner D, Hoffmann B, Kampen H. PCR identification of culicoid biting midges (Diptera, Ceratopogonidae) of the *Obsoletus* complex including putative vectors of bluetongue and Schmallenberg viruses. *Parasit Vectors.* 2012;5:213.
80. R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2021.
81. Rasmussen LD, Kirkeby C, Bødker R, Kristensen B, Rasmussen TB, Belsham GJ, et al. Rapid spread of Schmallenberg virus-infected biting midges (*Culicoides* spp.) across Denmark in 2012. *Transbound Emerg Dis.* 2014;61:12–6.
82. De Regge N, Madder M, Deblauwe I, Losson B, Fassotte C, Demeulemeester J, et al. Schmallenberg virus circulation in *Culicoides* in Belgium in 2012: field validation of a real time RT-PCR approach to assess virus replication and dissemination in midges. *PLoS ONE.* 2014;9:e87005.
83. Elbers AR, Meiswinkel R, van Weezep E, Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM, Kooi EA. Schmallenberg virus in *Culicoides* spp. biting midges, the Netherlands, 2011. *Emerg Infect Dis.* 2013;19:106–9.
84. Goffredo M, Monaco F, Capelli G, Quaglia M, Federici V, Catalani M, et al. Schmallenberg virus in Italy: a retrospective survey in *Culicoides* stored during the bluetongue Italian surveillance program. *Prev Vet Med.* 2013;111:230–6.
85. De Regge N, Deblauwe I, De Deken R, Vantieghem P, Madder M, Geysen D, et al. Detection of Schmallenberg virus in different *Culicoides* spp. by real-time RT-PCR. *Transbound Emerg Dis.* 2012;59:471–5.
86. Campbell JA, Pelham-Clinton EC. X—A taxonomic review of the British species of *Culicoides* Latreille (Diptera, Ceratopogonidae). *Proc R Soc Edinburgh Sect B Biol.* 1960;67:181–302.
87. Mayo CE, Mullens BA, Reisen WK, Osborne CJ, Gibbs EP, Gardner IA, et al. Seasonal and interseasonal dynamics of bluetongue virus infection of dairy cattle and *Culicoides sonorensis* midges in northern California—Implications for virus overwintering in temperate zones. *PLoS ONE.* 2014;9:e106975.
88. Carpenter S, Wilson A, Barber J, Veronesi E, Mellor P, Venter G, et al. Temperature dependence of the extrinsic incubation period of orbiviruses in *Culicoides* biting midges. *PLoS ONE.* 2011;6:e27987.
89. Carpenter M, Kopanke J, Lee J, Rodgers C, Reed K, Sherman TJ, et al. Evaluating temperature effects on bluetongue virus serotype 10 and 17 coinfection in *Culicoides sonorensis*. *Int J Mol Sci.* 2024;25:3063.
90. Kopanke J, Lee J, Stenglein M, Carpenter M, Cohnstaedt LW, Wilson WC, et al. Exposure of *Culicoides sonorensis* to enzootic strains of bluetongue virus demonstrates temperature- and virus-specific effects on virogenesis. *Viruses.* 2021;13:1016.
91. Gubbins S, Carpenter S, Baylis M, Wood JL, Mellor PS. Assessing the risk of bluetongue to UK livestock: uncertainty and sensitivity analyses of a temperature-dependent model for the basic reproduction number. *J R Soc Interface.* 2008;5:363–71.
92. Gubbins S, Turner J, Baylis M, van der Stede Y, van Schaik G, Abrahantes JC, et al. Inferences about the transmission of Schmallenberg virus within and between farms. *Prev Vet Med.* 2014;116:380–90.
93. Brugger K, Köfer J, Rubel F. Outdoor and indoor monitoring of livestock-associated *Culicoides* spp. to assess vector-free periods and disease risks. *BMC Vet Res.* 2016;12:88.
94. Larska M. Schmallenberg virus: a cyclical problem. *Vet Rec.* 2018;183:688–9.
95. Delooz L, Saegerman C, Quinet C, Petitjean T, De Regge N, Cay B. Resurgence of Schmallenberg virus in Belgium after 3 years of epidemiological silence. *Transbound Emerg Dis.* 2017;64:1641–2.
96. McGowan SL, La Rocca SA, Grierson SS, Dastjerdi A, Choudhury B, Steinbach F. Incursion of Schmallenberg virus into Great Britain in 2011 and emergence of variant sequences in 2016. *Vet J.* 2018;234:77–84.
97. Collins ÁB, Barrett DJ, Doherty ML, McDonnell M, Mee JF. Significant re-emergence and recirculation of Schmallenberg virus in previously exposed dairy herds in Ireland in 2016. *Transbound Emerg Dis.* 2017;64:1359–63.
98. Wernike K, Holsteg M, Szillat KP, Beer M. Development of within-herd immunity and long-term persistence of antibodies against Schmallenberg virus in naturally infected cattle. *BMC Vet Res.* 2018;14:368.
99. Elbers AR, Meiswinkel R, van Weezep E, Kooi EA, van der Poel WH. Schmallenberg virus in *Culicoides* biting midges in the Netherlands in 2012. *Transbound Emerg Dis.* 2015;62:339–42.
100. Rasmussen LD, Kristensen B, Kirkeby C, Rasmussen TB, Belsham GJ, Bødker R, et al. *Culicoides* as vectors of Schmallenberg virus. *Emerg Infect Dis.* 2012;18:1204–6.
101. Sohier C, Deblauwe I, Van Loo T, Hanon JB, Cay AB, De Regge N. Evidence of extensive renewed Schmallenberg virus circulation in Belgium during summer of 2016 – Increase in arthrogryposis-hydranencephaly cases expected. *Transbound Emerg Dis.* 2017;64:1015–9.
102. Wernike K, Fischer L, Twietmeyer S, Beer M. Extensive Schmallenberg virus circulation in Germany, 2023. *Vet Res.* 2024;55:134.

103. Gondard M, Postic L, Garin E, Turpaud M, Vorimore F, Ngwa-Mbot D, et al. Exceptional bluetongue virus (BTV) and epizootic hemorrhagic disease virus (EHDV) circulation in France in 2023. *Virus Res.* 2024;350:199489.
104. Cuéllar AC, Kjær LJ, Kirkeby C, Skovgard H, Nielsen SA, Stockmarr A, et al. Spatial and temporal variation in the abundance of *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in nine European countries. *Parasit Vectors.* 2018;11:112.
105. Nielsen SA, Kristensen M, Pape T. Three new Scandinavian species of *Culicoides* (Culicoides): *Culicoides boyi* sp. nov., *Culicoides selandicus* sp. nov. and *Culicoides kalix* sp. nov. (Diptera: Ceratopogonidae). *Biodivers Data J.* 2015;3:e5823. <https://doi.org/10.3897/BDJ.3.e5823>.
106. Szadziewski R, Filatov S, Dominiak P. A redescription of *Culicoides griseidorsum* Kieffer, 1918, with comments on subgeneric position of some European taxa (Diptera: Ceratopogonidae). *Zootaxa.* 2016;4107:413.
107. Veronesi E, Henstock M, Gubbins S, Batten C, Manley R, Barber J, et al. Implicating *Culicoides* biting midges as vectors of Schmallenberg virus using semi-quantitative RT-PCR. *PLoS ONE.* 2013;8:e57747.
108. Wernike K, Vasic A, Amler S, Sick F, Răileanu C, Dähn O, et al. Schmallenberg virus non-structural proteins NSs and NSm are not essential for experimental infection of *Culicoides sonorensis* biting midges. *J Virol.* 2025;99:e00343-25.
109. Kai I, Kobayashi D, Itokawa K, Sanjoba C, Itoyama K, Isawa H. Evaluation of long-term preservation methods for viral RNA in mosquitoes at room temperature. *J Virol Methods.* 2024;325:114887.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

„Bluetongue virus serotype 3 and Schmallenberg virus in *Culicoides* biting midges, Western Germany, 2023”

Anja Voigt ¹, Helge Kampen², Elisa Heuser ², Sophie Zeiske ², Bernd Hoffmann ², Dirk Höper ², Mark Holsteg ³, Franziska Sick ², Sophie Ziegler ², Kerstin Wernike ², Martin Beer ², Doreen Werner ¹

¹ Leibniz-Centre for Agricultural Landscape Research, Muencheberg, Germany

² Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Greifswald - Insel Riems, Germany

³ Chamber of Agriculture for North Rhine-Westphalia, Bad Sassendorf, Germany

Emerging Infectious Diseases 2024

doi: 10.3201/eid3007.240275.

Bluetongue Virus Serotype 3 and Schmallenberg Virus in *Culicoides* Biting Midges, Western Germany, 2023

Anja Voigt, Helge Kampen, Elisa Heuser, Sophie Zeiske, Bernd Hoffmann, Dirk Höper, Mark Holsteg, Franziska Sick, Sophia Ziegler, Kerstin Wernike, Martin Beer, Doreen Werner

In October 2023, bluetongue virus serotype 3 (BTV-3) emerged in Germany, where Schmallenberg virus is enzootic. We detected BTV-3 in 1 pool of *Culicoides* biting midges collected at the time ruminant infections were reported. Schmallenberg virus was found in many vector pools. Vector trapping and analysis could elucidate viral spread.

Biting midge-borne bluetongue virus (BTV), an orbivirus of the *Sedoreoviridae* family, can cause epizootic disease in domestic and wild ruminants (1). Bluetongue (BT) is a World Organisation for Animal Health-listed disease and is regulated within the European Union (EU) in accordance with Regulation (EU) 2016/429 and its delegated regulations (2). Under those regulations, BT outbreaks require trade restrictions in EU member states to prevent the etiologic agent from spreading.

BTV serotype 3 (BTV-3) emerged in continental Europe in early September 2023, when clinical disease was observed on 4 sheep farms in the Netherlands (M. Holwerda et al., unpub. data, <https://doi.org/10.1101/2023.09.29.560138>). By mid-October, >1,000 outbreaks had been detected throughout the Netherlands, increasing to 5,884 by mid-December 2023 (3). At the same time, BTV-3 reached Belgium and was detected in the United Kingdom in November 2023 (4,5).

Author affiliations: Leibniz-Centre for Agricultural Landscape Research, Muencheberg, Germany (A. Voigt, D. Werner); Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald-Insel Riems, Germany (H. Kampen, E. Heuser, S. Zeiske, B. Hoffmann, D. Höper, F. Sick, S. Ziegler, K. Wernike, M. Beer); Chamber of Agriculture for North Rhine-Westphalia, Bad Sassendorf, Germany (M. Holsteg)

DOI: <https://doi.org/10.3201/eid3007.240275>

In contrast to emerging BTV-3, the orthobunyavirus Schmallenberg virus (SBV) is enzootic in continental Europe; it was initially detected in 2011 near the border between Germany and the Netherlands (6). Another biting midge-borne virus, epizootic hemorrhagic disease virus (EHDV), emerged in Europe in 2022 (7). Those 3 viruses share major epidemiologic characteristics; all 3 are transmitted by *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) and affect mainly ruminants (1,6). Germany was declared free of BTV-8 in June 2023 (8), but on October 12, 2023, a case of BTV-3 was confirmed in a sheep in the Kleve district, close to the border with the Netherlands. By April 18, 2024, a total of 55 additional BTV-3 cases were reported from sheep and cattle farms in the federal states of North Rhine-Westphalia and Lower Saxony, Germany (Figure). We collected biting midges from those 2 states to evaluate the extent of vectorborne viruses in the region.

The Study

After BTV-3 emerged in the Netherlands, and before any clinically suspicion cases had been announced in ruminants in Germany, we installed biting midge traps in animal stables in western Germany to collect putative BTV-3 vectors and test them for virus infection. Traps were equipped with a UV light but no CO₂ source (Biogents, <https://eu.biogents.com>). During September 24–26, we set 1 trap each on 18 cattle, sheep, and goat farms in North Rhine-Westphalia and Lower Saxony, along the border with the Netherlands. We placed the traps close to the animals at sites protected from wind and rain. Traps operated continuously, and we recovered collected insects every day until November 9 or 11, depending on the location.

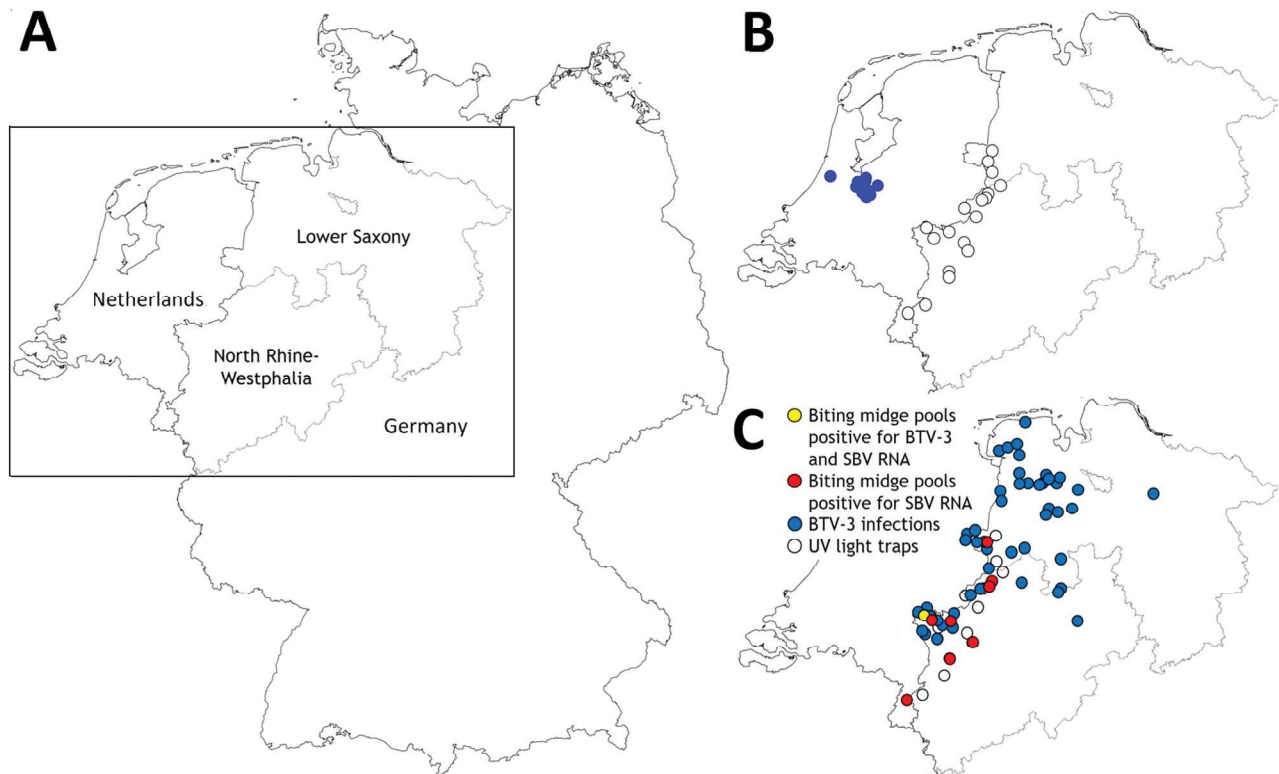


Figure. Sampling locations and infection sites in study of BTV-3 and SBV in *Culicoides* biting midges, western Germany, 2023. A) Overview map of Germany and the Netherlands showing North Rhine-Westphalia and Lower Saxony study areas. B) BTV-3 cases in the Netherlands (blue dots) as of September 8, 2023, and locations of UV light traps (white dots) along the border between Germany and the Netherlands. C) BTV-3 infections in ruminants (blue dots) reported to the animal disease reporting system in Germany as of April 18, 2024, and geographic assignment of farms with biting midge pools that tested positive for BTV-3 and SBV RNA (yellow dot) and those with pools only positive for SBV RNA (red dots). BTV-3, bluetongue virus serotype 3; SBV, Schmallenberg virus.

After those dates, the traps were only activated for 24 hours per week and samples were collected that day.

We collected biting midges and placed them in 80% ethanol, and stored them at room temperature in the dark until processing. A few days, but not >4 weeks, after collection, we morphologically identified midges as *C. obsoletus* group, *C. pulicaris* complex, and other *Culicoides*. *C. obsoletus* group and *C. pulicaris* complex-midges are considered the main BTV and SBV vectors in Europe (9). We used a multiplex quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) to screen pools of ≤ 50 *C. obsoletus* group and *C. pulicaris* complex midges for BTV and EHDV RNA (10). EHDV only recently emerged in southern and western Europe (7) and might be the next biting midge-borne virus to spread to central Europe. We also tested midge pools for SBV RNA because that virus is enzootic in the ruminant population in the region and expected to be detectable in insect vectors (11). We subsequently analyzed pools that tested BTV-positive by using a BTV-3-specific qRT-PCR (12). We retrospectively examined BTV-3-positive pools to determine the specific biting midge species (13,14).

During September 26–November 9, we collected 1,603 biting midge pools at 9 sites. The number of pools per site ranged from 27–466, depending on the number of midges collected. We tested those pools for viral RNA; 1 pool of *C. obsoletus* group midges collected in Kleve (Figure, panel C) on October 12 tested positive for BTV RNA (quantification cycle [Cq] value 35.6). We subsequently confirmed that pool as BTV-3-positive (Cq 37.5). The pool consisted of a mixture of *C. obsoletus* clade O1 (or *C. montanus*, which cannot be reliably differentiated from *C. obsoletus* clade O1 with the test system used but is not supposed to occur in Central Europe), *C. scoticus*, and *C. chiopterus*. Another pool of *C. obsoletus* group midges captured on the same day and at the same site tested SBV RNA-positive. In addition, we detected SBV in 534 midge pools collected during the 6.5-week period from all 9 locations: 1 site in Lower Saxony in the Grafschaft-Bentheim district, and 8 sites in North Rhine-Westphalia (3 in Kleve district, 2 in Wesel district, 2 in Borken district, and 1 in Heinsberg district) (Figure; Appendix, <https://wwwnc.cdc.gov/EID/>

DISPATCHES

article/30/7/24-0275-App1.pdf). Except for 2 *C. pulicaris* complex pools, all SBV RNA-positive pools belonged to the *C. obsoletus* group (Appendix). No pools were positive for both BTV and SBV RNA, and all tested pools were EHDV-negative.

We calculated the minimum infection rates (MIR; i.e., number of positive pools divided by number of tested pools, multiplied by 1,000) for each virus (15). We found an MIR of 333.13 for SBV, indicating high circulation, and an MIR of 0.62 for BTV-3, indicating low circulation. However, MIR can be affected by pool size; the more specimens in a pool, the higher the possibility that ≥ 1 positive biting midge would be included, but that effect would not become evident when pools are examined. Conversely, the sensitivity of detection decreases with increasing pool size if only 1 positive biting midge was in the pool.

Using an isolate obtained from a BTV-3-positive sheep blood sample and further characterized on both *Culicoides* cells and baby hamster kidney cells, we produced a nearly complete genome sequence (International Nucleotide Sequence Database Collaboration, <http://www.insdc.org>; project no. PRJEB72862). The obtained genome was 99.94% identical to the sequence of a recent BTV-3 isolate from the Netherlands (GenBank accession nos. OR603992–4001) at the nucleotide level and 99.95% at the amino acid level. The genome segments of the strain from Germany were 83.24%–97.67% identical to the BTV-3 SAR2018 strain isolated from a sheep in Italy in 2018 (GenBank accession nos. MK348537–46) and 81.26%–97.89% identical to the TUN2016 strain isolated from a sheep in Tunisia in 2016 (GenBank accession nos. KY432369–78).

Conclusions

BTV-3 was confirmed in an infected sheep in Germany on October 12, 2023, and viral spread was detected in 2 federal states by winter 2023–2024. The isolated BTV-3 is nearly identical to virus strains from outbreaks in the Netherlands. A pool of *C. obsoletus* group biting midges collected on a cattle farm in the same district on the same day BTV-3 was confirmed in Germany tested positive for BTV-3 RNA. Detecting BTV-3 in its putative vectors confirms an ongoing transmission cycle, albeit circulating at a low level; only 1 insect pool tested positive, and only a few animals were BTV-3-positive on affected farms. In contrast, we found SBV RNA in numerous *Culicoides* pools, reflecting its intense circulation in ruminant populations; SBV-infected cattle, sheep, and goats have been reported in Germany since 2011, although prevalence between years varies (6). The Cq values of the SBV qRT-PCR in some of the investigated *Culicoides* pools

indicate substantial virus loads, reflecting extensive regional SBV circulation in autumn 2023 (Appendix).

In conclusion, circulation of BTV-3 in Germany is likely to continue, intensify, and spread with the onset of seasonal biting midge activity in spring 2024. Large-scale biting midge monitoring combined with rapid analysis for viruses could contribute to an early warning system for emerging biting midge-borne diseases.

This article was preprinted at <https://doi.org/10.1101/2024.02.26.582175>.

Acknowledgments

We thank all farmers who supported the study and volunteered to tend biting midge traps.

The study was funded by the German Federal Ministry of Food and Agriculture (BMEL) through the Federal Office for Agriculture and Food (BLE), grant nos. 28N207601 and 28N207602, and EU Horizon 2020 program project Versatile Emerging infectious disease Observatory (VEO), grant no. 874735.

About the Author

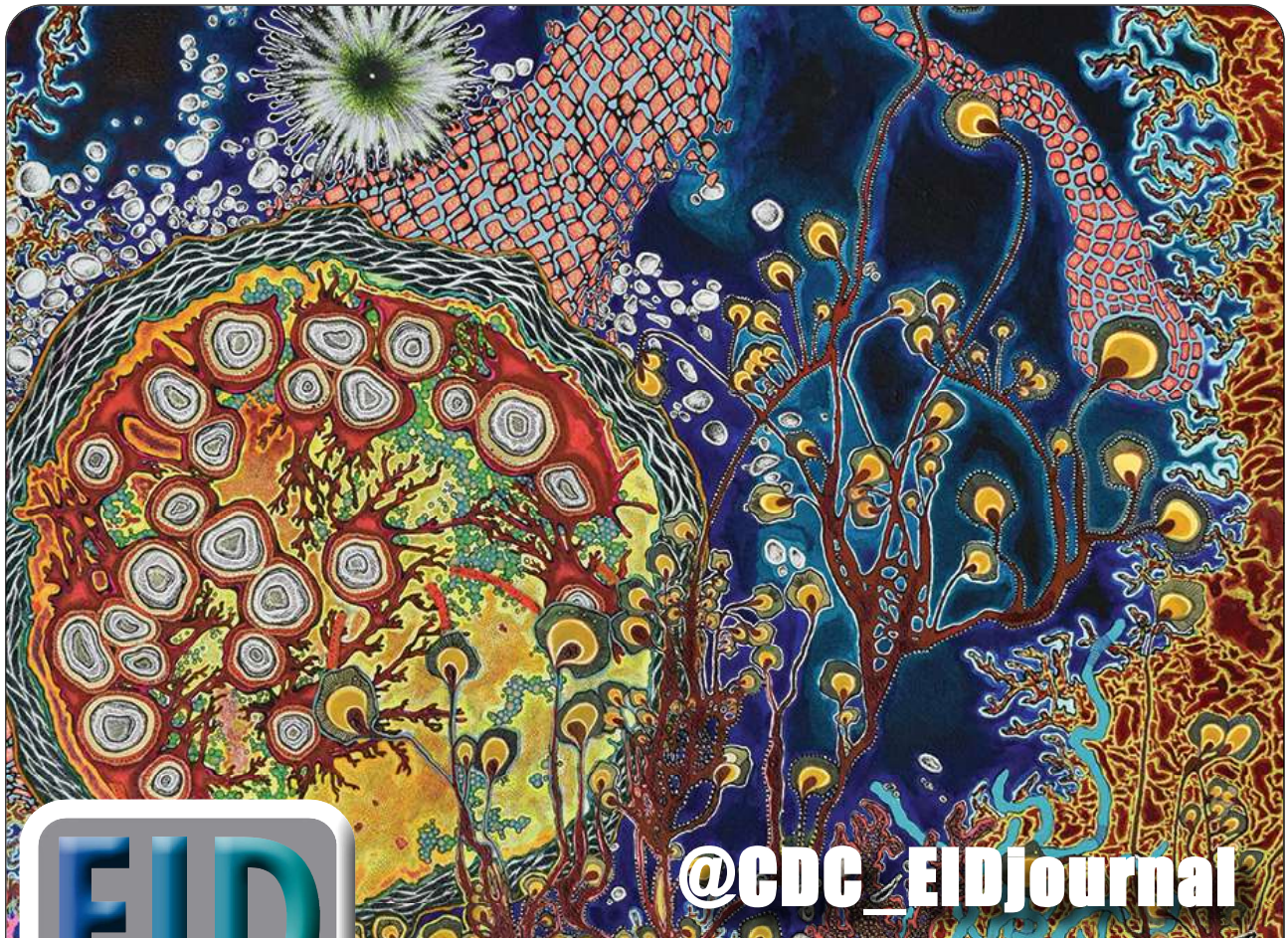
Ms. Voigt is a PhD student at the Leibniz-Centre for Agricultural Landscape Research, Muencheberg, Germany. Her research interests include behavior and habitat binding of biting midge vectors.

References

- MacLachlan NJ, Mayo CE, Daniels PW, Savini G, Zientara S, Gibbs EP. Bluetongue. *Rev Sci Tech*. 2015;34:329–40. <https://doi.org/10.20506/rst.34.2.2360>
- European Commission. Regulation (EU) No. 2016/429 of 9 March 2016 on transmissible animal diseases and amending and repealing certain acts in the area of animal health ('Animal Health Law'). *Off J EU*. 2016; L84:1–208.
- Leis P. Bluetongue (BTV-3). Presented: PAFF Animal Health and Welfare committee meeting; the Netherlands: December 14, 2023 [cited 24 Apr 2024]. https://food.ec.europa.eu/system/files/2023-12/reg-com_ahw_20231214123_pres-07.pdf
- World Animal Health Information System. Belgium – Bluetongue virus (Inf. with), event 5265, report ID 163218 [cited 2024 Apr 24]. <https://wahis.woah.org/#/in-event/5265/dashboard>
- World Animal Health Information System. United Kingdom – Bluetongue virus (Inf. with), event 5330, report ID 163824 [cited 2024 Apr 24]. <https://wahis.woah.org/#/in-event/5330/dashboard>
- Wernike K, Beer M. Schmallenberg virus: a novel virus of veterinary importance. *Adv Virus Res*. 2017;99:39–60. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2017.07.001>
- Lorusso A, Cappai S, Loi F, Pinna L, Ruiu A, Puggioni G, et al. Epizootic hemorrhagic disease virus serotype 8, Italy, 2022. *Emerg Infect Dis*. 2023;29:1063–5. <https://doi.org/10.3201/eid2905.221773>
- European Commission. Commission implementing regulation (EU) 2021/620. *Off J EU*. 2021;131:78.

9. Mellor PS, Boorman J, Baylis M. *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annu Rev Entomol.* 2000; 45:307–40. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.45.1.307>
10. Wernike K, Hoffmann B, Beer M. Simultaneous detection of five notifiable viral diseases of cattle by single-tube multiplex real-time RT-PCR. *J Virol Methods.* 2015;217:28–35. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.02.023>
11. Bilk S, Schulze C, Fischer M, Beer M, Hlinak A, Hoffmann B. Organ distribution of Schmallenberg virus RNA in malformed newborns. *Vet Microbiol.* 2012;159:236–8. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.03.035>
12. Lorusso A, Sghaier S, Di Domenico M, Barbria ME, Zaccaria G, Megdich A, et al. Analysis of bluetongue serotype 3 spread in Tunisia and discovery of a novel strain related to the bluetongue virus isolated from a commercial sheep pox vaccine. *Infect Genet Evol.* 2018;59:63–71. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.01.025>
13. Dähn O, Werner D, Mathieu B, Kampen H. Development of conventional multiplex PCR assays for the identification of 21 West Palaearctic biting midge taxa (Diptera: Ceratopogonidae) belonging to the *Culicoides* subgenus *Culicoides*, including recently discovered species and genetic variants. *Diversity (Basel).* 2023;15:699. <https://doi.org/10.3390/d15060699>
14. Dähn O, Werner D, Mathieu B, Kampen H. Large-scale cytochrome c oxidase subunit I gene data analysis for the development of a multiplex polymerase chain reaction test capable of identifying biting midge vector species and haplotypes (Diptera: Ceratopogonidae) of the *Culicoides* subgenus *Avaritia* Fox, 1955. *Genes (Basel).* 2024;15:323. <https://doi.org/10.3390/genes15030323>
15. Walter SD, Hildreth SW, Beaty BJ. Estimation of infection rates in population of organisms using pools of variable size. *Am J Epidemiol.* 1980;112:124–8. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a112961>

Address for correspondence: Martin Beer, Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Suedufer 10, 17493 Greifswald-Insel Riems, Germany; email: martin.beer@fli.de



@CDC_EIDJournal

Want to stay updated on the latest news in *Emerging Infectious Diseases*? Let us connect you to the world of global health. Discover groundbreaking research studies, pictures, podcasts, and more by following us on X at @CDC_EIDjournal.

„Experimental BTV-3 and BTV-8 infection of *Culicoides sonorensis* biting midges”

Sophie Zeiske ¹, Franziska Sick ¹, Helge Kampen¹, Bernd Hoffmann ¹, Martin Beer ¹,
Kerstin Wernike ¹

¹ Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Greifswald -
Insel Riems, Germany

Parasites and Vectors 2025
doi: 10.1186/s13071-025-06883-z.

BRIEF REPORT

Open Access



Experimental BTV-3 and BTV-8 infection of *Culicoides sonorensis* biting midges

Sophie Zeiske^{1†}, Franziska Sick^{1†}, Helge Kampen¹, Bernd Hoffmann¹, Martin Beer^{1*} and Kerstin Wernike¹

Abstract

Background Bluetongue virus (BTV) is the etiologic agent of a major infectious disease of livestock and is transmitted between its ruminant hosts by *Culicoides* biting midges. The first outbreak ever recorded in central Europe was caused by serotype BTV-8 and led to a major epidemic. In 2023, serotype BTV-3 emerged in the Netherlands and spread rapidly to neighbouring countries. Compared with the BTV-8 outbreak in 2006, the course of the BTV-3 epizootic is more severe, in regards to clinical signs and faster spread of the virus.

Methods To explore possible causes of the different epidemiologies, we performed laboratory infection experiments and compared the replication properties of BTV-8 and BTV-3 in *Culicoides sonorensis* biting midges.

Results Oral infection with BTV-3 resulted in a significantly higher viral load in the infected midges with demonstrated replication than BTV-8 infection.

Conclusions The higher viral load observed in midges with BTV-3 replication than in midges with BTV-8 replication may be a factor contributing to the observed faster outbreak progression of the current BTV-3 outbreak in comparison to the BTV-8 outbreak in 2006/2007.

Keywords Orbivirus, Bluetongue virus, BTV-3, *Culicoides*, Biting midges, Vector, Vector competence, Experimental infection

Background

Bluetongue virus (BTV) is a non-contagious orbivirus transmitted primarily between its mammalian hosts by *Culicoides* biting midges, causing severe disease in ruminant livestock [1, 2]. The first BTV outbreak ever recorded in central Europe in 2006 was caused by a serotype 8 strain (BTV-8) and led to a major epidemic [3]. In 2023, a devastating BTV-3 outbreak started in the Netherlands and rapidly spread to neighbouring countries [4]. Compared with the clinical signs in domestic ruminants during the BTV-8 outbreak in

2006/2007, the clinical course of disease caused by BTV-3 is more severe [5]. BTV-3 induces high mortality in sheep and goats [6] and cattle [7]. Cases of calves with dullness, standing and sucking difficulties (“dummy calves”) caused by BTV-3 have been described in England, with similarity to BTV-8-affected calves [8].

Arthropod-borne pathogens such as BTV are mainly spread by the dispersal of infected vectors and the movement of infected livestock [4]. In Europe, the confirmed vectors of BTV with demonstrated replication in the salivary glands either from experimental infection studies or field-collected midges are *Culicoides imicola*, *Culicoides scoticus*, *Culicoides obsoletus*, *Culicoides nubeculosus*, *Culicoides impunctatus* and *Culicoides pulicaris* [9–14]. However, *C. nubeculosus* and *C. impunctatus* seem to play a minor role in the field [14, 15]. Additionally, *Culicoides chiopterus*, *Culicoides dewulfi* and *Culicoides punctatus* are considered

[†]Sophie Zeiske and Franziska Sick contributed equally to this work.

*Correspondence:
Martin Beer
martin.beer@fli.de

¹ Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Südufer 10, Greifswald - Insel Riems, Germany



© The Author(s) 2025. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

competent vectors for BTV [14, 16, 17]. *Culicoides sonorensis* is considered the main vector for BTV in North America [18]. During vector monitoring in late 2023 in Germany near the Dutch border, BTV-3 was detected in a pool sample of *Culicoides* biting midges. The pool sample contained *C. obsoletus*, *C. scoticus* and *C. chiopterus* [19].

Comparison of the spread between farms of BTV-8 in 2006/2007 and BTV-3 in 2023 by transmission kernel analysis, which describes the distance-dependent probability of disease transmission from an infected farm to a susceptible farm, revealed a very similar kernel shape parameter of the BTV-8 and the BTV-3 outbreaks. This suggests that the mechanisms of disease spread through short-distance dispersal of infected midges and other modes for longer distances, such as livestock movement, were similar between the two outbreaks [4]. However, a much higher amplitude parameter was observed for the 2023 BTV-3 epidemic, indicating a faster disease spread. This could be due to higher temperatures of about 2 °C above normal during the observed period (September–November) of the 2023 BTV-3 outbreak compared with the corresponding period of the 2006 BTV-8 outbreak, since biting activity and virus replication in the biting midges are temperature-dependent [20].

The efficiency of virus transmission from host to midge is crucial for maintaining the natural infection cycle of BTV. While the efficiency of virus transmission from the infected midge to the vertebrate host is extremely high, only a few midges get infected after feeding on a viremic host, as demonstrated in experimental infection studies [21]. Next to the influence of higher temperatures, another reason for the observed faster disease spread of BTV-3 in 2023 than BTV-8 in 2006/2007 might be a higher infection and transmission efficiency of the midges for BTV-3 than for BTV-8 [4].

Laboratory colonies of the relevant European biting midge vector species are not available. Therefore, infection studies with BTV are commonly conducted by using field-caught midges or laboratory-reared *C. sonorensis*. The experimental infections studies investigating the vector competence of *Culicoides* species with different BTV strains conducted so far have been carried out with field-caught midges [9, 11, 22]. The laboratory colony of *C. sonorensis* is a suitable model to study infection dynamics under standardised laboratory conditions [20, 21, 23, 24] since this species plays a crucial role for BTV transmission in North America [18]. Although most experimental BTV-8 infection studies using field-captured midges aim to calculate replication rates, the results of different studies are not easily comparable due to differences in experimental design, sample processing and data analysis. They are also not

easily comparable due to variation in the age structure of field-collected midges and uncertainty about conditions experienced by midges in the larval and adult stages prior to capture.

Apart from a study describing intrathoracic inoculation and oral infection of *C. sonorensis* with BTV-3 [25], no direct comparison of the currently circulating BTV-3 to BTV-8 from the 2006/2007 outbreak is available. Therefore, we performed infection experiments with a laboratory colony of *C. sonorensis* to directly compare the replication properties of BTV-8 and BTV-3 in biting midges.

Methods

Viruses

One BTV-3 isolate and one BTV-8 isolate were selected. BTV-8 strain BH311/06 was isolated from a German sheep during the 2006 outbreak on ENT-R cells and passaged two more times on ENT-R cells (RIE0455, Collection of cell lines in veterinary medicine [CCLV], Friedrich-Loeffler-Institut [FLI], Greifswald-Insel Riems, Germany) and 11 times on BHK-21 [C-13] cells (RIE0179, CCLV). BTV-3 was isolated from a German sheep in 2023 on KC cells (RIE1062, CCLV) and passaged twice on BHK21 (RIE164, CCLV) [19]. Both virus stocks were propagated on BHK21 cells (RIE164, CCLV).

Experimental setup

The laboratory colony of *Culicoides sonorensis* was developed and supplied by The Pirbright Institute [26]. This colony was reared in the biosafety level 2 insectary of the FLI, Greifswald-Insel Riems, as described previously [27]. The 3-day-old biting midges were offered caprine (trial 1) or ovine (trial 2) heparin blood, obtained from the FLI, mixed 1:1 with BTV-8 or BTV-3 in cell culture medium (Minimum Essential Medium). The blood meal contained 10⁶ 50% tissue culture infective dose per mL (TCID₅₀/mL), which was confirmed by back-titration after feeding. As a negative control (NC), blood was mixed with virus-free cell culture medium. After preheating to 37 °C, the blood meal was offered to the midges using a “Hemotek membrane feeding system” (Hemotek, Blackburn, UK) for 30 min. Midges were sorted under short-term CO₂ anaesthesia on a cooling plate. Clearly engorged females were transferred to a new cage and kept for the course of the experiment. Sixteen blood-fed midges per group (BTV-8, BTV-3, NC) were processed immediately after feeding (Fig. 1). The remaining blood-fed midges were kept inside gauze-covered cages in an incubator at 27 °C and a relative humidity of 85% with an 8 h dark/16 h light regime and supplied with 5% glucose ad libitum. After an incubation period of 6 days, the surviving midges were harvested. All midges were placed individually in tubes

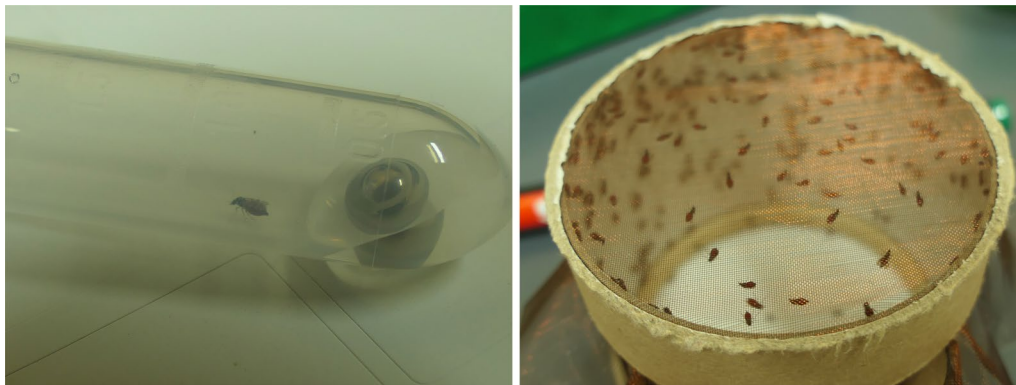


Fig. 1 Freshly engorged *C. sonorensis* (left). The biting midge was placed individually in a tube containing 200 μ L phosphate-buffered saline (PBS) and a 5 mm stainless steel bead for further processing. Engorged females in a new netted cardboard cage after blood feeding (right)

containing 200 μ L phosphate-buffered saline (PBS) and a 5 mm stainless steel ball (Fig. 1). Two consecutive trials with the same set-up were performed as biological replicates and to achieve a higher number of analysable midges.

Following homogenization using a TissueLyzer (Qiagen, Hilden, Germany) for 3 min at 30 Hz, total RNA was extracted for each sample using the King Fisher 96 Flex (Thermo Scientific, Braunschweig, Germany) in combination with the NucleoMag VET kit (Macherey Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions.

The RNA extracts were analysed by a BTV-specific reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) [28] with an external full virus BTV-3 standard, which was used to calculate the number of BTV genome copies per midge. The BTV-3 standard is suitable for calculation of the genome copy numbers of both BTV-3- and BTV-8-infected midges, as the applied BTV-specific RT-qPCR cannot differentiate between the serotypes. The highest copy number detected in a midge of each day-0 group was used as a cut-off value for the virus intake background. Virus replication in midges of the day-6 group was assessed using the day-0 cut-off value. Midges exceeding the BTV copy number of the day-0 cut-off were considered replicating the virus. Midges with BTV copy number values below the cut-off were considered to contain residual blood meal without replication of the virus. The usage of this method was described in other vector competence studies in midges on BTV [29] and bovine ephemeral fever virus [30].

Statistical analysis

Replication properties of midges were assessed as follows: Percentages of midges above the day-0 cut-off (midges with virus replication) were compared

by two-sided Fisher exact test, and differences were regarded significant when $p < 0.05$. From the BTV genome copy load of the midges with virus replication, the corresponding day-0 cut-off value was subtracted, and the resulting values were compared using a Mann-Whitney test. Differences were regarded as significant when $p < 0.05$.

Results and discussion

A total of 503 (first trial BTV-3), 485 (second trial BTV-3), 551 (first trial BTV-8) and 355 (second trial BTV-8) midges fed on the virus-spiked blood meal. A total of 16 midges per group and trial were processed immediately, and the remaining midges were transferred to a new cage for further incubation. Ingestion of virus-spiked blood (BTV-8 and BTV-3) led to polymerase chain reaction (PCR) positivity in all midges harvested directly after the blood meal (day 0). The highest copy numbers of BTV-3-infected midges from the day-0 group (day-0 cut-off values) in trial 1 and trial 2 were 59,040 BTV copies/midge and 159,000 BTV copies/midge, respectively. For the day-0 group of BTV-8-infected midges 313,200 BTV copies/midge for trial 1 and 366,800 copies/midge for trial 2 were set as the day-0 cut-off values. Out of all 1830 blood-fed midges that were kept for the 6-day incubation period, a total of 1121 (61.25%) of the midges survived.

In the first trial using BTV-3, 89 out of 319 surviving midges tested positive by RT-qPCR at 6 days of incubation, and 17 of these (5.32%) had viral loads higher than the day-0 group, indicating efficient virus replication. In the BTV-8 group of the first trial, 197 out of 330 surviving midges tested positive by RT-qPCR, and 12 of them (3.64%) showed efficient virus replication. In the second trial, 133 out of 250 surviving midges of the BTV-3 group tested positive by RT-qPCR, and 8 of them (3.20%) showed virus replication. In the BTV-8 group of the

second trial, 110 out of 222 surviving midges tested positive by RT-qPCR, and 7 (3.15%) of them showed virus replication. Midges of the negative control group tested negative by RT-qPCR at all times (Table 1; Fig. 2). Midges with BTV copy number values below the day-0 cut-off were considered to contain residual blood meal without replication of the virus. Midges exceeding the BTV copy number of the day-0 cut-off were considered replicating. Overall, 4.39% of the midges infected with BTV-3 replicated the virus, while 3.44% of the midges infected with BTV-8 replicated the virus (Fig. 2). The detailed results of the genome quantification are listed in the Supplementary Dataset in the Zenodo repository (Doi: 10.5281/zenodo.14888759).

The calculated rate of midges replicating BTV-8 presented in this study is in line with infection rates previously published on BTV-8 in *C. sonorensis*, ranging from 1.9% to 7.3% [21]. For BTV-3, an infection rate of 6.82% was described [25]. However, the experimental setup of these studies differed from our study in regard to incubation time and temperature, feeding method and analysis of the infection rate.

Statistical analysis showed that the differences in the percentages of midges with BTV-3 or BTV-8 replication are not significant (two-sided Fisher exact test, $p=0.4446$; odds ratio [OR], 1.289; 95% confidence interval [CI], 0.7–2.4). However, a comparison of the BTV genome copy numbers of the midges replicating BTV-3 or BTV-8 showed a significantly higher genome load in midges replicating BTV-3 (Mann–Whitney test, $p=0.0001$). Therefore, BTV-3 seems to have better replication properties compared with BTV-8 under controlled experimental conditions. The higher viral genome loads in the BTV-3-infected midges might have a functional meaning. An important replication barrier in midges that prevents full dissemination to the salivary glands is the midgut barrier. Midges in which the midgut barrier has been overcome exhibit high virus titres ($>2.5 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$). In cases in which infections are restricted

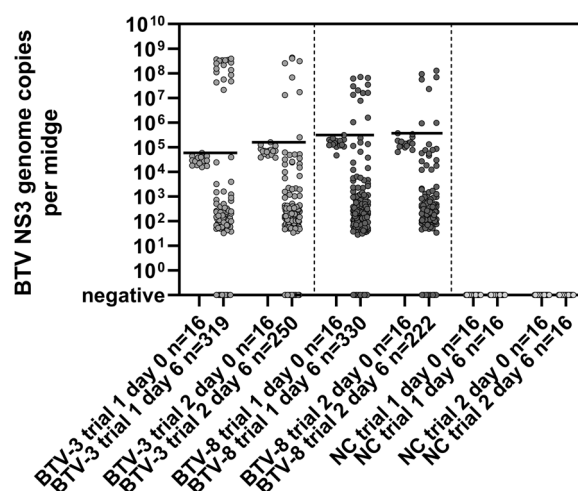


Fig. 2 RT-qPCR results of midges experimentally infected with BTV-3- or BTV-8-spiked blood meals and midges fed with virus-free blood (negative control [NC]). Individual midges were tested for BTV genome immediately after ingestion of the blood meal (day 0) or 6 days after the blood meal (day 6). Horizontal black lines indicate the highest BTV copy number measured in any of the midges of the respective group immediately after blood meal ingestion. The experiment was performed in two subsequent trials, the trial number is given in the label of the x-axis

to the cells of the mesenteron, lower titres are observed [31]. Although we did not perform virus titration of the midges, the higher genome copy numbers per midge in the BTV-3-infected group may suggest a more effective escape of the midgut barrier and full virus dissemination within the midge.

However, since virus replication in the biting midges is temperature-dependent, the climatic conditions should also be taken into account, both in the field and in experimental infection studies [20]. Besides the potential better replication properties of BTV-3 in midges, a temperature difference of about 2 °C between the 2023 BTV-3 outbreak and 2006 BTV-8 outbreak may be another factor contributing to the observed faster outbreak progression

Table 1 Number of midges harvested at day 6 post infection

		Day-6 group	Number and percentage of BTV-RNA-positive midges	Number and percentage of midges with virus replication
Trial 1	BTV-3	319	89 (27.90%)	17 (5.32%)
	BTV-8	330	197 (59.70%)	12 (3.64%)
	NC	16	0	0
Trial 2	BTV-3	250	133 (53.20%)	8 (3.20%)
	BTV-8	222	110 (49.55%)	7 (3.15%)
	NC	16	0	0

All midges were analysed by BTV PCR. BTV-RNA-positive midges/midges with virus replication are indicated in absolute numbers and in percentage in brackets

of BTV-3 in nature [4]. To ensure that the observed differences in replication are not solely driven by the high temperature used in the presented experimental infection study, further infections of midges should be conducted at other incubation temperatures in the future.

Conclusions

Oral BTV-3 or BTV-8 infection of laboratory-reared *C. sonorensis* resulted in a significantly higher BTV genome load of virus-positive midges with demonstrated replication for BTV-3 than for BTV-8. The significantly higher BTV genome load may be a factor contributing to the observed faster outbreak progression of the current BTV-3 outbreak in comparison to the BTV-8 outbreak in 2006/2007. However, future experiments will have to evaluate dissemination and transmission rates of the different serotypes to confirm this result.

Abbreviations

BTV	Bluetongue virus
<i>C. sonorensis</i>	<i>Culicoides sonorensis</i>
PCR	Polymerase chain reaction
RT-qPCR	Reverse transcriptase quantitative PCR
NC	Negative control
TCID	Tissue culture infective dose
CCLV	Collection of cell lines in veterinary medicine
PBS	Phosphate-buffered saline

Acknowledgements

We would like to thank Uday Gottam and Ulrike Neumann for their excellent technical assistance. *Culicoides sonorensis* were originally developed and supplied by The Pirbright Institute under Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC) project code BBS/E/1/00007039.

Author contributions

Conceptualization: M.B., K.W., H.K., F.S. and S.Z.; formal analysis: F.S., S.Z., M.B. and K.W.; funding acquisition: H.K., M.B. and K.W.; investigation: S.Z., F.S. and B.H.; methodology: H.K., M.B., K.W. and B.H.; supervision: H.K., M.B. and K.W.; visualization: F.S. and S.Z.; writing—original draft: F.S. and S.Z.; writing—review and editing: H.K., B.H., M.B. and K.W.

Funding

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. This work was supported by the German Federal Ministry of Food and Agriculture (BMEL) through the Federal Office for Agriculture and Food (BLE), grant number 28N207601. The funder had no role in the conceptualization, design, data collection, analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

Availability of data and materials

The datasets generated and analysed during the current study are available in the Zenodo repository (doi: 10.5281/zenodo.14888759).

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Received: 19 February 2025 Accepted: 5 June 2025

Published online: 20 June 2025

References

- Sellers RF. Bluetongue in Africa, the Mediterranean region and Near East—disease, virus and vectors. *Prev Vet Med.* 1984;2:371–8.
- Batten C, Darpel K, Henstock M, Fay P, Veronesi E, Gubbins S, et al. Evidence for transmission of Bluetongue virus serotype 26 through direct contact. *PLoS ONE.* 2014;9:e96049.
- Elbers ARW, Backx A, Meroc E, Gerbier G, Staubach C, Hendrickx G, et al. Field observations during the Bluetongue serotype 8 epidemic in 2006: I. detection of first outbreaks and clinical signs in sheep and cattle in Belgium, France and the Netherlands. *Prev Vet Med.* 2008;87:21–30.
- Boender GJ, Hagenaars TJ, Holwerda M, Spiereburg MAH, van Rijn PA, van der Spek AN, et al. Spatial transmission characteristics of the Bluetongue virus serotype 3 epidemic in the Netherlands, 2023. *Viruses.* 2024;16:625.
- van den Brink K, Santman-Berends I, Harkema L, Scherpenzeel CGM, Dijkstra E, Bisschop PIH, et al. Bluetongue virus serotype 3 in ruminants in the Netherlands: clinical signs, seroprevalence and pathological findings. *Vet Rec.* 2024;195:e4533.
- Santman-Berends I, van den Brink K, Dijkstra E, van Schaik G, Spiereburg MAH, van den Brom R. The impact of the Bluetongue serotype 3 outbreak on sheep and goat mortality in the Netherlands in 2023. *Prev Vet Med.* 2024;231:106289.
- van den Brink K, Brouwer-Middelesch H, van Schaik G, Lam T, Stegeman JA, van den Brom R, et al. The impact of Bluetongue serotype 3 on cattle mortality, abortions and premature births in the Netherlands in the first year of the epidemic. *Prev Vet Med.* 2025;239:106493.
- Swinson V, Reichel R, Pittalis L, Bidewell C, Wighton H. Brain lesions in BTV-3-positive calves in England. *Vet Rec.* 2025;196:192–3.
- Carpenter S, McArthur C, Selby R, Ward R, Nolan DV, Mordue Luntz AJ, et al. Experimental infection studies of UK *Culicoides* species midges with Bluetongue virus serotypes 8 and 9. *Vet Rec.* 2008;163:589–92.
- Paslaru AI, Mathis A, Torgerson P, Veronesi E. Vector competence of pre-alpine *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) for Bluetongue virus serotypes 1, 4 and 8. *Parasit Vectors.* 2018;11:466.
- Federici V, Goffredo M, Mancini G, Quaglia M, Santilli A, Di Nicola F, et al. Vector competence of Italian populations of *Culicoides* for some Bluetongue virus strains responsible for recent northern African and European outbreaks. *Viruses.* 2019. <https://doi.org/10.3390/v11100941>.
- Jennings DM, Mellor PS. The vector potential of British *Culicoides* species for Bluetongue virus. *Vet Microbiol.* 1988;17:1–10.
- Carpenter S, Lunt HL, Arav D, Venter GJ, Mellor PS. Oral susceptibility to Bluetongue virus of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) from the United Kingdom. *J Med Entomol.* 2006;43:73–8.
- Purse B, Carpenter S, Venter G, Bellis G, Mullens B. Bionomics of temperate and tropical *Culicoides* midges: knowledge gaps and consequences for transmission of *Culicoides*-borne viruses. *Annu Rev Entomol.* 2015;60:373–92.
- Mellor PS, Boorman J, Baylis M. *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annu Rev Entomol.* 2000;45:307–40.
- Meiswinkel R, van Rijn P, Leijts P, Goffredo M. Potential new *Culicoides* vector of Bluetongue virus in northern Europe. *Vet Rec.* 2007;161:564–5.
- Dijkstra E, van der Ven IJ, Meiswinkel R, Hölzel DR, Van Rijn PA, Meiswinkel R. *Culicoides chiopterus* as a potential vector of Bluetongue virus in Europe. *Vet Rec.* 2008;162:422.
- Tabachnick WJ. *Culicoides variipennis* and Bluetongue virus epidemiology in the United States. *Annu Rev Entomol.* 1996;41:23–43.
- Voigt A, Kampen H, Heuser E, Zeiske S, Hoffmann B, Höper D, et al. Bluetongue virus serotype 3 and Schmallenberg virus in *Culicoides* biting midges, Western Germany, 2023. *Emerg Infect Dis.* 2024;30:1438–41.
- Kopanke J, Lee J, Stenglein M, Carpenter M, Cohnstaedt LW, Wilson WC, et al. Exposure of *Culicoides sonorensis* to enzootic strains of Bluetongue virus demonstrates temperature- and virus-specific effects on virogenesis. *Viruses.* 2021. <https://doi.org/10.3390/v13061016>.
- Veronesi E, Darpel K, Gubbins S, Batten C, Nomikou K, Mertens P, et al. Diversity of transmission outcomes following co-infection of sheep with

- strains of Bluetongue virus serotype 1 and 8. *Microorganisms*. 2020. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060851>.
22. Carpenter S, Veronesi E, Mullens B, Venter G. Vector competence of *Culicoides* for arboviruses: three major periods of research, their influence on current studies and future directions. *Rev Sci Tech*. 2015;34:97–112.
 23. Carpenter M, Kopanke J, Lee J, Rodgers C, Reed K, Sherman TJ, et al. Evaluating temperature effects on Bluetongue virus serotype 10 and 17 coinfection in *Culicoides sonorensis*. *Int J Mol Sci*. 2024. <https://doi.org/10.3390/ijms25053063>.
 24. Flannery J, Sanz-Bernardo B, Ashby M, Brown H, Carpenter S, Cooke L, et al. Evidence of reduced viremia, pathogenicity and vector competence in a re-emerging European strain of Bluetongue virus serotype 8 in sheep. *Transbound Emerg Dis*. 2019;66:1177–85.
 25. Newbrook K, Obishakin E, Jones LA, Waters R, Ashby M, Batten C, et al. Clinical disease in British sheep infected with an emerging strain of Bluetongue virus serotype 3. *Vet Rec*. 2025;196:e4910.
 26. Boorman J. The maintenance of laboratory colonies of *Culicoides variipennis* (Coq.), *C. nubeculosus* (Mg.) and *C. riethi* Kieff (Diptera, Ceratopogonidae). *Bull Entomoll Res*. 1974;64:371–7.
 27. Wernike K, Vasic A, Amler S, Sick F, Răileanu C, Dähn O, et al. Schmallenberg virus non-structural proteins NSs and NSm are not essential for experimental infection of *Culicoides sonorensis* biting midges. *J Virol*. 2025. <https://doi.org/10.1128/jvi.00343-25>.
 28. Wernike K, Hoffmann B, Beer M. Simultaneous detection of five notifiable viral diseases of cattle by single-tube multiplex real-time RT-PCR. *J Virol Methods*. 2015;217:28–35.
 29. Ropiak HM, King S, Busquets MG, Newbrook K, Pullinger GD, Brown H, et al. Identification of a BTV-strain-specific single gene that increases *Culicoides* vector infection rate. *Viruses*. 2021. <https://doi.org/10.3390/v13091781>.
 30. Stokes JE, Darpel KE, Gubbins S, Carpenter S, FernándezdeMarco MdM, Hernández-Triana LM, et al. Investigation of bovine ephemeral fever virus transmission by putative dipteran vectors under experimental conditions. *Parasit Vectors*. 2020;13:597.
 31. Mellor PS. Replication of arboviruses in insect vectors. *J Comp Pathol*. 2000;123:231–47.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

5 Diskussion

5.1 Gnitzenmonitoring in Deutschland 2019 bis 2023

Innerhalb der Insekten existiert eine Vielzahl von Arten, die in der Lage sind Pathogene auf Tiere und Menschen zu übertragen (152). Bei der Übertragung von Arboviren stehen meist die verschiedenen Vektorarten von Moskitos und Zecken im Vordergrund. Zu den bedeutendsten durch Moskitos übertragenen viralen Krankheiten gehören Gelbfieber, Dengue Fieber, Zika-Fieber, West-Nil-Fieber und Japanische Enzephalitis (153). Wichtige zeckenübertragene Krankheiten sind zum Beispiel das Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus oder das Krim-Kongo-Virus (154). Gnitzen dagegen wurden als Vektoren für Arboviren in der Vergangenheit häufig vernachlässigt (29). Gnitzen und die durch Gnitzen übertragenen Viren gewinnen jedoch für Menschen und Tiere zunehmend an Bedeutung. Gründe hierfür sind die Einschleppung und das Auftreten von durch Gnitzen übertragenen Viren wie dem Schmallenberg-Virus (3), die Ausbreitung bekannter Viren in neue geographische Gebiete, wie BTV und EHDV in Zentraleuropa (26, 31), sowie Ausbrüche humanpathogener Viren wie dem Oropouche-Virus in Südamerika (155).

SBV, BTV und EHDV sind in Europa vorkommende, durch Gnitzen übertragene tierpathogene Viren, die Krankheiten bei domestizierten Wiederkäuern verursachen und zu erheblichem Tierleid und Verlusten in landwirtschaftlichen Nutztierhaltungen führen können. Die Schmallenberg-Virus-Infektion führt bei adulten Wiederkäuern meist zu asymptomatischen Infektion oder milden unspezifischen Symptomen (3, 4). Die Infektion von naiven Tieren während der frühen Trächtigkeit kann Aborte, Totgeburten, Mumifikation und kongenitale Missbildungen des Fetus verursachen (8, 9). Das Auftreten einer SBV-Erkrankung bei Rindern, Schafen oder Ziegen unterliegt in Deutschland der Meldepflicht. Wirtschaftliche Schäden von SBV-Infektionen entstehen direkt durch die Reduktion der Milchleistung von Milchkühen und durch die ausgelösten Fertilitätsstörungen wie eine erhöhte Abortrate, eine reduzierte Absetzrate und Komplikationen bei der Geburt (156-160). Indirekte wirtschaftliche Schäden resultieren aus erhöhten tierärztlichen Behandlungskosten und internationalen Handelsrestriktionen (161-163).

BTV und EHDV können bei infizierten Schafen und Rindern Symptome einer hämorrhagischen Krankheit mit Fieber, Stomatitis und Coronitis auslösen sowie zu Läsionen an inneren Organen und damit zum Tod der Tiere führen (17, 66, 164, 165). Zudem können durch BTV und EHDV ebenfalls Fertilitätsstörungen mit Trächtigkeitsabbrüchen oder Missbildungen der Feten nach

der Infektion von trächtigen Kühen, Schafen oder Ziegen ausgelöst werden (18-20). Die direkten, krankheitsbedingten, ökonomische Folgen entstehen durch reduzierte Milchleistung, erhöhte Morbidität und Mortalität, sowie Gewichtsverlust, reduzierte Fertilität, Aborte und fetale Missbildungen (166). BTV und EHDV sind bei der Weltorganisation für Tiergesundheit (WOAH) als zu meldende Tierseuchen gelistet (167). Indirekte wirtschaftliche Verluste resultieren aus den Kosten für Behandlung und Impfung der erkrankten Tiere, sowie aus Ausgaben um Maßnahmen für die Krankheitskontrolle, Diagnostik, Vektorkontrolle und das Monitoring der Vektoren umzusetzen (166, 168). Außerdem ist bei Ausbrüchen von BTV und EHDV mit Mindereinnahmen durch Handelsbeschränkungen zu rechnen (166).

Seit dem ersten Auftreten von BTV in Deutschland im Jahr 2006 wurden gemäß der Regulation (EC) Nummer 1266/2007 Gnitzen in Deutschland gefangen, um das Vorkommen der Vektoren zu überwachen. Viele der vorangegangenen Studien in Deutschland wurden durchgeführt, um die Zusammensetzung der verschiedenen *Culicoides* Spezies in Deutschland zu bestimmen (80, 113, 116, 117, 169). In einigen Studien wurden Gnitzen zusätzlich auch auf Viren wie BTV oder SBV untersucht (34, 81, 116). Um das Gnitzenmonitoring in Deutschland fortzuführen und um das Virusvorkommen in den Gnitzen über mehrere Jahre zu überwachen, wurden seit 2019 deutschlandweit Gnitzen auf landwirtschaftlichen Betrieben mit Nutztierhaltungen gefangen, morphologisch vorbestimmt und mit molekularbiologischen Methoden auf das Vorkommen viraler RNA von SBV, BTV und EHDV untersucht. Von 2019 bis 2022 konnte SBV jedes Jahr in den untersuchten Gnitzen nachgewiesen werden, wenn auch mit unterschiedlichen Prävalenzen je nach Jahr, Standort und Jahreszeit.

Das Übertragungsrisiko von SBV durch die Gnitzen ist insbesondere in den Sommer- und frühen Herbstmonaten in Deutschland erhöht. Die meisten SBV-RNA positiven Gnitzen konnten in den Monaten August und September gefunden werden. Ein Grund dafür ist, dass die in Deutschland heimischen Gnitzenarten im Spätsommer und Frühherbst in besonders hoher Zahl auftreten (28). In dieser Zeit entwickelt sich die zweite Welle an adulten Gnitzen, die die Nachkommen der kleineren Gnitzenwelle aus dem Frühjahr sind (170). Ein weiterer Grund für die höhere Virusprävalenz in den Gnitzen im Sommer ist, dass bei Temperaturen über 25°C die Wahrscheinlichkeit für die Virusreplikation in den Gnitzen deutlich höher ist als bei niedrigeren Temperaturen (139, 140, 171, 172). Dadurch steigt in dieser Zeit auch die Übertragungswahrscheinlichkeit von SBV auf die Wiederkäuer. SBV-Infektionen stellen vor allem bei der Infektion trächtiger Nutztiere in der frühen Phase der Trächtigkeit ein Problem dar. Um das Risiko einer durch SBV induzierten erhöhten Abort- oder Missbildungsrate in

einem Rinder-, Schaf- oder Ziegenbestand zu verringern, ist es im Rahmen des Zuchtmanagements empfehlenswert, zu verhindern, dass sich viele Muttertiere im Spätsommer bzw. Herbst in der vulnerablen Trächtigkeitsphase befinden. Eine weitere Präventionsmöglichkeit sind Impfungen gegen SBV. In der Europäischen Union ist ein inaktivierter SBV-Impfstoff für Rinder und Schafe zugelassen (173, 174). Damit die Muttertiere in der vulnerablen frühen Phase der Trächtigkeit geschützt sind, sollten Auffrischungsimpfungen mindestens zwei Wochen vor einer geplanten Belegung erfolgen (174). Trotz der ausgesprochenen Impfempfehlung der Ständigen Impfkommision Veterinärmedizin (StIKo Vet), ist die Nachfrage nach dem Impfstoff gering, sodass die Verfügbarkeit aufgrund geringer Produktionsmengen eingeschränkt ist (175). Aktuell ist der zugelassene SBV-Impfstoff nicht erhältlich (176). Das Risiko einer Virusübertragung durch Gnitzen in den Wintermonaten in Deutschland kann als gering eingestuft werden, wenngleich eine Übertragung nicht ausgeschlossen werden kann. Um zu untersuchen, ob auch im Winter viruspositive Gnitzen gefangen werden können, wurden die UV-Lichtfallen an einigen Fangstandorten über die Wintermonate aktiviert. Insgesamt konnten im Winter deutlich weniger Gnitzen gefangen werden. In keinem der Gnitzenpools aus der Zeit von Dezember bis März konnte SBV-RNA nachgewiesen werden. Der Grund für die geringere Zahl von adulten Gnitzen ist, dass in gemäßigten Klimazonen, wie Deutschland, die Gnitzen in den immaturren Lavenstadien überwintern (28). Trotzdem konnten auch in früheren Monitoringstudien in Deutschland Gnitzen in den Wintermonaten, vor allem innerhalb, aber auch außerhalb von Ställen, gefangen werden (28, 78). Infolge von milderem Wintern könnte das Risiko der Übertragung von Viren durch Gnitzen in Deutschland in den Wintermonaten ansteigen. Dennoch sieht man auch in südeuropäischen Ländern mit wärmeren Wintern eine ausgeprägte Saisonalität. Insgesamt sprechen die Ergebnisse aber sehr klar für ein drastisch reduziertes Infektionsrisiko in den Monaten Dezember bis März, was für die Einführung einer vektorarmen Zeit, analog zu anderen europäischen Ländern (177), auch in Deutschland spricht.

Die Resultate des Gnitzenmonitorings weisen darauf hin, dass SBV in den Wintermonaten nicht oder lediglich in einem sehr geringen Ausmaß zirkuliert. Trotzdem muss SBV in der Lage sein, in Deutschland zu überwintern, denn es konnte jedes Jahr mit dem Frühjahrsbeginn wieder in den Gnitzen nachgewiesen werden und es wurden Fälle in Wiederkäuern gemeldet (Quelle: TSN). Der Überwinterungsmechanismus von SBV konnte bislang nicht aufgeklärt werden. Durch die sehr kurze Virämie von SBV ist es unwahrscheinlich, dass SBV in Wiederkäuern auf dieser Basis überwintert. Auch wenn SBV bisher nicht in den im Winter gefangenen Gnitzen nachgewiesen werden konnte, ist es dennoch möglich, dass die Viren in den adulten Gnitzen

überwintern. Die Lebenszeit adulter Gnitzen beträgt üblicherweise 10-20 Tage (28), kann sich aber unter kalten Umgebungstemperaturen deutlich erhöhen. In einem Experiment mit *C. sonorensis* überlebten die adulten Gnitzen über 80 Tage (178). Gnitzen aus dem *Obsoletus* Komplex konnten in einem Versuch bei einer Umgebungstemperatur von 17°C bis zu 90 Tage überleben (179). Für andere Arboviren, die von Stechmücken übertragen werden, ist bekannt, dass die Viren im Insekt vertikal übertragen werden können und so in den immaturren Stadien überwintern (180). Für die Gnitzen der Gattung *Culiocides* ging man dagegen lange davon aus, dass eine vertikale Virusübertragung nicht möglich ist (28). Erst kürzlich wurde die vertikale Übertragung von EHDV-2 in einer laborgezüchteten Kolonie der nordamerikanischen Spezies *C. sonorensis* nachgewiesen (134). In einem experimentellen Infektionsversuch mit BTV konnte bisher Virus in den Eiern infizierter Gnitzen nachgewiesen werden (181). Auch für SBV gibt es durch den Fund von SBV-RNA in nulliparen Gnitzen Hinweise darauf, dass transovarische Übertragungen möglich sein könnten und das Virus im Larvenstadium überwintert (76).

Neben den jahreszeitlichen Schwankungen der SBV-Zirkulation in Deutschland konnten im Verlauf des Gnitzenmonitorings auch örtliche Unterschiede des SBV-Vorkommens detektiert werden. Die Ergebnisse der Gnitzenuntersuchung von den Jahren 2019 bis 2022 deuten auf ein erhöhtes SBV-Vorkommen im Westen und Süden Deutschlands hin, demgegenüber konnte weniger SBV-RNA in den Gnitzen aus dem Nordosten Deutschlands detektiert werden. Insgesamt wurden auch mehr SBV-Infektionen im Wiederkäuerwirt im Süden und Westen Deutschlands in dieser Zeit gemeldet (Quelle: TSN). Außerdem gab es in den untersuchten Bundesländern fast immer ein Jahr mit einem deutlich erhöhten SBV-Vorkommen als in den anderen Jahren. Diese Schwankungen lassen sich durch die teilweise hohen Seroprävalenzen erklären, die nach einer SBV-Infektion in den Wiederkäuern nachgewiesen werden können (42). Durch die Immunität der Wirte wird auch die Viruszirkulation im Gnitzenvektor in den Folgejahren reduziert. Die nach einer SBV-Infektion gebildeten Antikörper sind in den Wiederkäuern für mehrere Jahre nachweisbar (182), trotzdem wurden häufig nach etwa zwei bis vier Jahren erhöhte SBV-Ausbruchszahlen beobachtet (183). Die verstärkte Zirkulation von SBV wird durch den immer kleiner werdenden Anteil an immungeschützten Tieren ermöglicht. Dieser Anteil verringert sich durch Schlachtungen sowie den schnellen Abbau der maternalen Antikörper in neugeborenen Tieren und durch den Zukauf von naiven Tieren (182).

Aus den Ergebnissen des Gnitzenmonitorings kann geschlossen werden, dass SBV-Infektionen in den gehaltenen Wiederkäuern (Schafe, Rinder, Ziegen) in Deutschland nur unzureichend

erkannt oder gemeldet werden. Somit kann anhand der gemeldeten SBV-Fälle das wahre Ausmaß des Infektionsgeschehens nicht erkannt und bewertet werden. Das Gnitzenmonitoring hingegen erwies sich als geeignet, um das Ausbruchsgeschehen mit seinen zeitlichen und regionalen Schwankungen zu erfassen. In einigen der untersuchten Bundesländer konnten statistisch signifikante Schwankungen der SBV-Zirkulation in den Gnitzen über die Jahre aufgezeigt werden. Im Jahr 2019 wurde SBV vor allem im Westen Deutschlands und im Jahr 2021 im Süden Deutschlands detektiert. In dem 2023 durchgeführten Gnitzenmonitoring in den westlichen Bundesländern Nordrhein-Westfalen und Niedersachsen konnte ebenfalls eine deutlich erhöhte SBV-Zirkulation im Vergleich zu den Vorjahren festgestellt werden. Obwohl eine erhöhte SBV-Prävalenz in den Gnitzen mit einem vermehrten Vorkommen von SBV-Fällen in Wiederkäuern korrelieren sollte, gab es keinen Anstieg der gemeldeten SBV-Fälle bei domestizierten Wiederkäuern in den Regionen. Im Verlauf des Vektorjahres 2019 (01.01.2019-31.03.2020) wurden insgesamt 27 SBV-Fälle bei Wiederkäuern in Deutschland gemeldet und sechs Fälle davon traten in Nordrhein-Westfalen auf. Im Vektorjahr 2021 (01.04.2021-31.03.2022) wurden deutschlandweit 47 SBV-Fälle gemeldet, 14 davon im Süden Deutschlands (Bayern und Baden-Württemberg). Vom Beginn der Gnitzenfänge im September 2023 bis zum Beginn des nächsten Vektorjahres am 01.04.2024 wurden insgesamt sieben SBV-Fälle in Schafen und Rindern in Nordrhein-Westfalen gemeldet (Quelle: TSN). Daraus kann geschlossen werden, dass die Effekte von SBV-Infektionen von Rindern, Schafen oder Ziegen entweder nicht bemerkt wurden oder beim Auftreten von erhöhten Abort- und Missbildungsraten nicht gezielt auf SBV getestet wurde. Da es zudem keine Kompensation von Schäden für SBV gibt, hat die Meldung für den Landwirt auch keinen erkennbaren Vorteil. Eine unzureichende Erkennung und Meldung von SBV-Infektionen werden auch in anderen europäischen Ländern vermutet (183, 184).

Das Gnitzenmonitoring hat sich in dieser Studie als eine geeignete Methode erwiesen, um das Auftreten von SBV, BTV und EHDV in Deutschland retrospektiv zu überwachen. Insbesondere SBV-Infektionen bei adulten Tieren werden häufig übersehen oder durch das erhöhte Auftreten von Aborten oder Missbildungen verzögert erkannt. Aber auch im Zusammenhang mit BTV- und EHDV-Infektionen können je nach Virusstamm und je nach Empfänglichkeit des Wirbeltierwirtes, asymptomatische Infektionen oder milde unspezifische Symptome auftreten, die entweder unbemerkt bleiben oder nicht als BTV- bzw. EHDV-Fall erkannt werden. Auch hier kann der retrospektive Nachweis von Virusgenom in den Gnitzen dazu beitragen, das tatsächliche Ausbruchsgeschehen zu erfassen.

Die Untersuchung der Gnitzenvektoren auf Viren kann darüber hinaus auch als Frühwarnsystem fungieren, mit dem entweder ein Wiedereintrag oder ein Neueintrag von durch Gnitzen übertragenen Viren erkannt werden kann, bevor die Krankheit im Wirbeltierwirt auftritt. In Europa wurden seit dem ersten Auftauchen von BTV im Mittelmeerraum Ausbrüche mit verschiedenen BTV-Serotypen, wie BTV-1, BTV-3, BTV-4, BTV-8 und BTV-12, sowie mit anderen durch Gnitzen übertragene Erreger, wie SBV oder EHDV-8, registriert (3, 27, 185-187). Dabei wird vermutet, dass die Eintragung entweder über den Transport von infizierten Nutztieren erfolgt oder durch die Wanderung/Verschleppung von mit Virus infizierten Insektenvektoren. Gnitzen entfernen sich zwar in der Regel nur wenige hundert Meter von ihrem Schlupfort (28), in einigen Fällen können sie aber größere Distanzen zurücklegen und dabei passiv viele Kilometer durch den Wind weitergetragen werden (188). Ebenfalls werden dem Tourismus und internationalen Handel eine Rolle bei der Verbreitung von Insektenübertragenen Krankheiten zugeschrieben (189). Der Eintrag neuer Krankheiten kann über die infizierten Wirte erfolgen oder infizierte Insekten können als blinde Passagiere, zum Beispiel in Containern oder Flugzeugen, mittransportiert werden (190). Um das Gnitzenmonitoring als Frühwarnsystem zu nutzen, sollten dementsprechend auch Gnitzen in der Nähe von großen internationalen Häfen und Flughäfen gezielt auf Viren untersucht werden.

Das Gnitzenmonitoring ist nur bedingt in der Lage, kleine Ausbruchsgeschehen mit nur wenigen betroffenen Wiederkäuern, die durch Gnitzen übertragenen Viren verursacht werden, darzustellen. Im Gegensatz zu SBV konnte BTV von 2019 bis 2022 nicht in den gefangenen Gnitzen nachgewiesen werden. Seit dem ersten Auftreten von BTV-8 in Zentraleuropa im Jahr 2006 gab es immer wieder Ausbrüche mit verschiedenen BTV-Serotypen in Europa (22, 31, 191, 192). Vereinzelt traten dabei auch Fälle in Deutschland auf. Insgesamt gab es in den Jahren 2019 bis 2021 62 Fälle von BTV-8 vor allem Südwesten Deutschlands (Quelle: TSN). Trotzdem war es nicht möglich BTV-RNA in den Gnitzen nachzuweisen. Die BTV-Zirkulation war in dieser Zeit in Deutschland vermutlich zu niedrig, um sie in den Gnitzen zu sehen. Nur ein kleiner Teil der Gnitzen repliziert und überträgt die Viren, wie es in experimentellen Infektionsstudien mit BTV-8 nachgewiesen wurde (95). Folglich ist entweder ein größeres Ausbruchsgeschehen oder eine größere Menge gefangener und untersuchter Gnitzen erforderlich, um BTV sicher in den Gnitzen nachzuweisen. In September 2023 kam es zum ersten Nachweis von BTV-3 in den Niederlanden (41), daraufhin traten im Jahr 2023 auch einige BTV-3 Fälle in domestizierten Wiederkäuern in Deutschland auf (193). Um das Vorkommen von BTV-3 in den Gnitzen zu untersuchen wurden an der deutsch-niederländischen Grenze insgesamt 14 UV-Licht Fallen in und um Tierhaltungen platziert und

die Gnitzen von Ende September bis Anfang November 2023 gefangen. Dabei konnte insgesamt ein einziger BTV-RNA positiver Pool gefunden werden. Der Gnitzenpool stammte dabei von einem landwirtschaftlichen Betrieb, in welchem einige BTV-3 Fälle bei Schafen aufgetreten waren (Quelle: TSN). Der Nachweis von BTV in den Gnitzen im Jahr 2023 in nur einem Pool passt zum frühen Eintragszeitpunkt nach Deutschland, so dass selbst das gezielte Monitoring im Westen Deutschlands nicht mehr positive Pools ergeben konnte. Auch im Jahr 2019 wurden an einigen beprobten Standorten BTV-8-Fälle gemeldet (Quelle: TSN), allerdings wurden zu diesen Zeitpunkten keine Gnitzen gesammelt. Im Fall von kleinen Ausbruchsgeschehen müssen aus diesem Grund die Gnitzen gezielt an den betroffenen Standorten in möglichst großen Mengen gefangen werden.

EHDV konnte in keinem der untersuchten Gnitzenpools von 2019 bis 2023 nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis stimmt mit der epidemiologischen Situation für EHDV in Wiederkäuern in Deutschland überein. EHDV-8 wurde 2022 zum ersten Mal in Südeuropa, in Italien, Portugal und Spanien, nachgewiesen (26, 194). Seitdem hat es sich nördlich nach Frankreich ausgebreitet (27). Das weitere Voranschreiten von EHDV-8 in Frankreich wurde seit 2024 durch die ergriffenen Maßnahmen zur Ausbreitungskontrolle verhindert (Quelle: Plateforme d'Epidémiosurveillance en Santé Animale (ESA)), so dass Deutschland noch immer als EHDV-frei gilt.

Neben dem Virusnachweis in Gnitzen wurde im Rahmen der Gnitzenmonitoring-Studien auch untersucht, welche der einheimischen Gnitzenarten in Deutschland für die Übertragung von Viren verantwortlich sind. Dafür wurden die virus-positiven Gnitzenpools mit molekularbiologischen Methoden auf die in den Pools enthaltenen Spezies untersucht. Der Großteil der getesteten Gnitzenpools, sowie die meisten SBV-RNA positiven Pools und der BTV-RNA positive Pool enthielten Spezies des Subgenus *Avaritia*. Die am häufigsten nachgewiesenen Arten des Subgenus *Avaritia*, die in den SBV- und BTV-positiven Pools enthalten waren, sind *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. dewulfi* und *C. chiopterus*. Ein deutlich kleinerer Teil der untersuchten Pools, sowie auch der SBV-RNA positiven Pools gehörte zum Subgenus *Culicoides*. Die am häufigsten nachgewiesene Spezies aus den SBV-positiven Gnitzenpools des Subgenus *Culicoides* waren *C. punctatus*, gefolgt von *C. pulicaris*. Weiterhin wurden die Gnitzenarten *C. lupicaris* und *C. selandicus* in SBV-positiven Pools gefunden, die ebenfalls zum Subgenus *Culicoides* zählen. Nur wenige Spezies aus anderen Subgenera wurden auf Viren untersucht und nur ein Pool mit der Spezies *C. griseidorsum* war SBV-RNA positiv. Diese Ergebnisse stimmen mit anderen Studien zum Vorkommen der *Culicoides*-Spezies in

Deutschland und Zentraleuropa überein, in denen SBV-RNA ebenfalls vorwiegend in Gnitzenarten des Subgenus *Avaritia* gefunden wurden (33, 34, 36, 76, 78, 97).

In den Pools des Subgenus *Avaritia* wurden höhere SBV-RNA Lasten gefunden als in Pools des Subgenus *Culicoides*, was dafürsprechen könnte, dass Gnitzen im Pool enthalten waren, die in der Lage waren das Virus zu replizieren und damit auch zu übertragen. Die Vektorkompetenz von Gnitzen des Obsoletus Komplex für SBV wurde schon in vorherigen Studien bewiesen (96). Dies konnte durch die hohen SBV-RNA-Lasten in Pools, die Gnitzen des Obsoletus Komplex enthalten, bekräftigt werden. Für die Gnitzenarten aus dem Subgenus *Culicoides* konnte ein solcher Beweis bisher nicht erbracht werden. Die niedrigeren Genomlasten deuten darauf hin, dass hier eine virushaltige, noch nicht vollständig verdaute Blutmahlzeit nachgewiesen wurde, ohne dass eine Replikation in der Gnitze stattgefunden hat.

Neben der Einschleppung von Krankheitserregern nach Europa kann durch das Gnitzenmonitoring auch der Eintrag von neuen Insektenvektoren überwacht werden. In Europa spielt in diesem Zusammenhang vor allem die ursprünglich aus Afrika und dem Mittleren Osten stammende Art *Culicoides imicola* eine zentrale Rolle (187). Seit dem ersten Fund von *C. imicola* in Europa im Jahr 1982 (187), hat sich die Spezies immer weiter Richtung Norden ausgebreitet und ist heute in Italien (195), Portugal (39) und Spanien (196) zu finden. Der Eintrag von *C. imicola* in Zentral- und Nordeuropa wird als kritisches Ereignis betrachtet, da die Art ein kompetenter Vektor für die Übertragung von SBV, BTV und EHDV ist (96, 100, 106). Im Großteil der BTV-Fälle im Mittelmeerraum wird das Virus durch *C. imicola* auf die Wirbeltiere übertragen (197, 198). Es ist möglich, dass *C. imicola* eine bessere Empfänglichkeit für die Viren zeigt als die Gnitzen aus dem Obsoletus Komplex (100). Außerdem ist *C. imicola* einer der wichtigsten Vektoren für das Virus der Afrikanischen Pferdepest (engl. African horse sickness virus, AHSV) in Afrika und mit der Ausbreitung nach Südeuropa kam es bereits zu einigen Ausbrüchen von AHSV Spanien und Portugal (199). Mit der weiteren Ausbreitung von *C. imicola* besteht auch die Gefahr weiterer Einträge von AHSV nach Europa.

Bisher gab es keinen Nachweis von *C. imicola* in Deutschland. Der nördlichste Fund dieser Art war in der südlichen Schweiz (200). Verschiedene Klimastudien sagen allerdings voraus, dass sich *C. imicola* in Zukunft in Europa weiter nördlich ausbreiten könnte (201-204). Daher sollte das Gnitzenmonitoring in Deutschland unbedingt weitergeführt werden, um auch die mögliche Eintragung neuer Vektoren wie *C. imicola*, sowie die Eintragung neuer durch Gnitzen übertragener Viren wie EHDV frühzeitig zu erkennen.

5.2 Gnitzen-Infektionsversuche mit BTV-3 und BTV-8

Im Oktober 2023 wurde der erste Ausbruch von BTV-3 in den Niederlanden und damit auch in Zentraleuropa gemeldet (41). Im Verlauf des Jahres 2024 schritt die Ausbreitung von BTV-3 in Deutschland rasch fort und übertraf damit sogar den Ausbruch von BTV-8 in den Jahren 2006 und 2007 (192). Aus diesem Grund wurde ein Infektionsversuch mit einem direkten Vergleich von BTV-3 und BTV-8 in den laborgezüchteten *Culicoides sonorensis* durchgeführt. Mit dem Versuch sollte untersucht werden, ob Unterschiede in den Replikationseigenschaften der Viren in den Gnitzen der Grund für die starke Ausbreitung von BTV-3 in Deutschland sind.

Die höheren Genomkopienzahlen BTV-3 replizierender Gnitzen im Vergleich zu den BTV-8 replizierenden Gnitzen könnten eine mögliche Erklärung für die schnellere Ausbreitung von BTV-3 2023/2024 im Vergleich zu BTV-8 2006/2007 sein. Der Versuch resultierte in einem deutlichen Unterschied in der Genomkopienzahl der replizierenden Gnitzen, mit einer statistisch signifikanten höheren Genomkopienzahl in den replizierenden BTV-3 infizierten Gnitzen. Die höhere Viruslast in den BTV-3 replizierenden Gnitzen könnte bedeuten, dass das Virus effektiver die Darmbarriere in den Gnitzen überschreiten konnte und zudem optimaler repliziert. Die Mitteldarm-Barriere ist eine der wichtigsten Barrieren für die Virusausbreitung innerhalb der Gnitzen. Wenn die Virusreplikation auf die Mitteldarmzellen begrenzt wird, sind die gemessenen Viruslasten in den Gnitzen deutlich geringer als bei einer Überschreitung des Mitteldarms und einer vollen Ausbreitung im gesamten Körper der Gnitze, bis hin zu den Speicheldrüsen. (88). Dazu passend war auch die Infektionsrate der mit BTV-3 infizierten Gnitzen etwas höher als die der mit BTV-8-infizierten Gnitzen, auch wenn dieser Unterschied nicht statistisch signifikant war.

Für vergleichende Untersuchung der Replikation von zwei verschiedenen BTV-Serotypen im Gnitzenvektor ist die Verwendung der *C. sonorensis* Laborkolonie dem Einsatz im Feld gefangener einheimischer Gnitzen vorzuziehen. Der Vorteil an der Versuchsdurchführung mit Gnitzen, die im Feld gefangen wurden ist, dass die Replikation der Viren in den in Europa einheimischen Arten untersucht werden kann. Allerdings unterscheiden sich die gefangenen Gnitzen häufig anhand ihres Alters und anhand der Bedingungen, die während der Entwicklung der immaturren Stadien vorherrschen. Zudem variieren die Spezies der gefangenen Gnitzen und können teilweise nicht sicher morphologisch differenziert werden. Um Einflüsse auf die Replikation durch das Alter, die Aufzuchtbedingungen oder durch speziesspezifische Unterschiede auf die Replikation auszuschließen, wurden für den Vergleich von BTV-3 und BTV-8 Gnitzen aus der laborgezüchteten Kolonie von *C. sonorensis* verwendet. Dadurch

konnte sichergestellt werden, dass die Versuche unter standardisierten Bedingungen stattfinden können.

Obwohl die Versuchsdurchführungen standardisiert waren, wurden in den durchgeführten Infektionsversuchen Unterschiede bei der Replikationsrate festgestellt. Die Replikationsrate bezeichnet den Anteil infizierter Gnitzen, bei denen es nach der Inkubationszeit zu einem Anstieg der Genomkopienzahl kam. Diese Unterschiede wurden sowohl innerhalb der mit dem gleichen BTV-Serotyp infizierten Gnitzen als auch zwischen den verschiedenen Gnitzarten festgestellt. Diese Unterschiede in der Replikationsrate lassen sich vermutlich auf individuelle Unterschiede in der Vektorkompetenz zwischen den einzelnen Gnitzen zurückführen. Neben den extrinsischen Einflüssen, wie beispielsweise Aufzuchtbedingungen und Temperatur, existieren verschiedene intrinsische Faktoren, welche die Barrieren der Virusausbreitung und damit die Vektorkompetenz jeder einzelnen Gnitze individuell beeinflussen können. Zu diesen intrinsischen Einflüssen gehören vor allem genetische Unterschiede zwischen den Gnitzen (88, 92). Ein weiterer wichtiger intrinsischer Faktor scheint das Mikrobiom im Mitteldarm der Insekten zu sein (205). Es wird davon ausgegangen, dass die Darmbakterien dabei entweder das Immunsystem der Insekten aktivieren oder eine mechanische Barriere für die Viren darstellen (206, 207). Die individuellen Unterschiede zwischen den Gnitzen lassen sich bisher nicht beeinflussen und führen so zu den beobachteten Schwankungen in den Replikationsraten.

Mit den Infektionsversuchen konnte die Vermutung aus dem Gnitzenmonitoring, dass nur ein kleiner Teil der Gnitzen mit dem Virus infiziert werden kann und in der Lage ist, das Virus zu replizieren und zu übertragen, bestätigt werden. Insgesamt haben in dem Versuch von den initial mit BTV-3 oder BTV-8 infizierten Gnitzen nur eine geringe Zahl das Virus repliziert. Niedrige Infektionsraten wurden auch in anderen publizierten Infektionsversuchen mit *C. sonorensis* oder mit in Europa einheimischen Gnitzen aus den Subgenera *Avaritia* und *Culicoides* nachgewiesen (95, 100, 141, 149). Die in experimentellen Infektionsstudien beobachteten niedrigen Infektionsraten der Gnitzen nach BTV-Infektion stimmen mit den Feld-Beobachtungen aus den Gnitzenmonitoring-Studien überein. In den Jahren von 2019 bis 2021 wurden insgesamt 62 Fälle von BTV-8 bei domestizierten Wiederkäuern im Südwesten Deutschlands gemeldet, ohne dass BTV-RNA in den gefangenen Gnitzen aus dieser Region nachgewiesen werden konnte. Nach dem Eintrag von BTV-3 im Oktober 2023 wurden bis zum Beginn des nächsten Vektorjahres am 01.04.2024 insgesamt 53 BTV-3 Fälle in Rindern und Schafen im Westen Deutschlands gemeldet (Quelle: TSN). BTV-RNA konnte 2023 nur in einem Gnitzenpool aus dieser Region gefunden werden. Bei der natürlichen Übertragung von

Diskussion

BTV-3 und BTV-8 scheint es so zu sein, dass nur ein kleiner Anteil der in Deutschland einheimischen Gnitzen mit den Viren infiziert wird und an der Übertragung zwischen Insektenvektor und Wirbeltierwirt beteiligt ist. Der niedrige Anteil an vektorkompetenten Gnitzen kann durch das regionale Vorkommen in hoher Zahl und durch die effektive Virusübertragung auf den Wiederkäuerwirt ausgeglichen werden, wodurch der Infektionszyklus aufrechterhalten wird.

6 Schlussfolgerung und Ausblick

SBV, BTV und EHDV sind Viren mit hoher veterinärmedizinischer Bedeutung und werden durch Gnitzen übertragen. Die Ausbrüche von Erkrankungen, die durch diese Viren verursacht werden, führen in Nutztierhaltungen zu erheblichem Tierleid und wirtschaftlichen Verlusten. Aus diesem Grund ist es wichtig, das Auftreten der Viren in Deutschland zu überwachen und die Übertragung von Viren durch Gnitzen zu untersuchen und wenn möglich einzuschränken.

In dieser Arbeit werden die Ergebnisse der Überwachung der Viren in den in Deutschland heimischen Gnitzenarten im Rahmen eines Gnitzenmonitoring von 2019 bis 2023 vorgestellt. SBV-RNA konnte jedes Jahr in den Gnitzen nachgewiesen werden, wodurch die endemische Zirkulation von SBV in Deutschland bestätigt werden konnte. Das ganzjährige Fangen der Gnitzen über mehrere Jahre ermöglicht es, jahreszeitlich bedingte Unterschiede und regionale Schwankungen der SBV-Prävalenz in den Gnitzen zu beobachten. Außerdem konnte BTV-3 nach dem Eintrag nach Deutschland im Jahr 2023 in gefangenen Gnitzen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Speziesidentifizierung der virus-positiven Gnitzenpools deuten darauf hin, dass vor allem die Gnitzen aus dem Subgenus *Avaritia* bei der Virusübertragung in Deutschland eine Rolle spielen. Das gezielte Fangen von Gnitzen auf landwirtschaftlichen Betrieben und die Untersuchung auf die Virusgenome von SBV, BTV und EHDV ist eine geeignete Methode, um das Ausbruchsgeschehen dieser Viren in Deutschland retrospektiv darzustellen. Weiterhin wurden die Ergebnisse von experimentellen Infektionsversuchen mit den BTV Serotypen BTV-3 und BTV-8 in der Laborkolonie *Culicoides sonorensis* zusammengefasst. Die höheren Genomkopienzahlen in den mit BTV-3 replizierenden Gnitzen könnten auf eine effektivere Virusausbreitung und -replikation innerhalb in der Gnitze hindeuten. Dieses Ergebnis könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, dass sich der Ausbruch von BTV-3 in 2023 und 2024 schneller ausgebreitet hat als BTV-8 in den Jahren 2006 und 2007. Allerdings müssen zukünftige Experimente die Verbreitungs- und Übertragungsraten der verschiedenen Serotypen untersuchen, um dieses Ergebnis zu bestätigen.

Der aktuelle Ausbruch von BTV-3 sowie der Eintrag neuer durch Gnitzen übertragener Krankheiten wie EHDV und die mögliche Einschleppung neuer Vektoren wie *C. imicola* stellen eine erhebliche Bedrohung für landwirtschaftliche Betriebe mit Nutztierhaltung in Deutschland und Europa dar. Aus diesem Grund sind die Fortführung der Gnitzenmonitoring-Studien und Gnitzen-Infektionsstudien unerlässlich.

7 Zusammenfassung

Das Schmallenberg-Virus (SBV), das Virus der Blauzungenkrankheit (bluetongue disease; BTV) und das Virus der epizootischen Hämorrhagie der Hirsche (EHDV) werden durch Gnitzen der Gattung *Culicoides* auf Wiederkäuer übertragen. Das Orthobunyavirus SBV gehört zur Simbu-Serogruppe und wurde 2011 zum ersten Mal in Deutschland gefunden. SBV tritt heute in Deutschland und anderen europäischen Ländern endemisch auf. Eine akute Infektion adulter Wiederkäuer mit SBV hat meist keine oder lediglich milde Symptome zur Folge. Die Infektion trächtiger Wiederkäuer in der sensiblen Phase der Trächtigkeit kann zu Aborten, Totgeburten und Missbildungen der Frucht führen. Bei BTV und EHDV handelt es sich um Orbiviren, die bei akut infizierten Wiederkäuern Symptome eines hämorrhagischen Fiebers mit Hyperämie, Ulzerationen und Ödemen vor allem an den Schleimhäuten an Maul und Nase, sowie an den Klauen auslösen können. Hämorrhagische Läsionen an den inneren Organen können zum Tod der Tiere führen und Infektionen trächtiger Wiederkäuer können Aborte und Missbildungen der Kälber und Lämmer zur Folge haben. BTV wurde bereits im 19. Jahrhundert, nach dem Eintrag empfänglicher Schafrassen in Südafrika beschrieben. Seit dem ersten Ausbruch von BTV-8 in Zentraleuropa im Jahr 2006 kam es immer wieder zu Ausbrüchen mit verschiedenen Serotypen, wie zum Beispiel BTV-3 in den Niederlanden im Jahr 2023. EHDV wurde erstmals bei einem Ausbruch des hämorrhagischen Fiebers im Jahr 1955 bei Weißwedelhirschen in Nordamerika detektiert. Im Jahr 2022 wurde EHDV-8 zum ersten Mal in Südeuropa, auf den italienischen Inseln Sardinien und Sizilien, sowie in Spanien und Portugal nachgewiesen. Seitdem hat sich EHDV-8 weiter nördlich ausgebreitet und ist 2023 auch in Frankreich nachgewiesen worden. SBV, BTV und EHDV können durch die ausgelösten Krankheiten zu direkten Verlusten und infolge von Kosten für Behandlungen, Diagnostik und Überwachung, sowie durch Handelsrestriktionen zu indirekten wirtschaftlichen Verlusten führen. Um das Auftreten der Viren in den Gnitzen in Deutschland zu untersuchen, wurden im Rahmen eines Gnitzenmonitorings von 2019 bis 2023 Gnitzen auf landwirtschaftlichen Betrieben mit Nutztierhaltung gefangen, gepoolt und auf die Virusgenome untersucht. Dabei konnte SBV-RNA in jedem untersuchten Jahr in den Gnitzen nachgewiesen werden. Das Übertragungsrisiko ist besonders im Sommer und in den frühen Herbstmonaten hoch, dagegen kann eine Virusübertragung durch Gnitzen in den Wintermonaten in Deutschland als gering eingestuft werden. Die Ergebnisse des Gnitzenmonitorings weisen auf ein erhöhtes Vorkommen von SBV im Westen und Süden Deutschlands im untersuchten Zeitraum hin. Im Verlauf der Gnitzenuntersuchungen konnten außerdem örtliche Schwankungen der SBV-Prävalenz und ein wellenartiges Auftreten festgestellt werden. Dabei

gab es in vielen Bundesländern ein Jahr mit einem erhöhten SBV-Vorkommen in den Gnitzen. Im Gegensatz zu SBV konnte BTV nicht in den gefangenen Gnitzen von 2019 bis 2022 gefunden werden.

Als Reaktion auf den BTV-3 Ausbruch in den Niederlanden 2023 und der Weiterverbreitung nach Deutschland wurden in den betroffenen westlichen Bundesländern Gnitzen gefangen und dabei konnte BTV-RNA in einem Gnitzenpool nachgewiesen werden. EHDV konnte hingegen in keinem der untersuchten Pools gefunden werden. Neben der Virusdiagnostik wurde auch untersucht, welche der in Deutschland vorkommenden Gnitzen für die Virusübertragung verantwortlich sind. Bei der Artbestimmung der gefangenen Gnitzen wurde der Großteil der Gnitzen dem Subgenus *Avaritia* Fox zugeordnet, deutlich weniger Gnitzen gehörten zum Subgenus *Culicoides* Latreille und nur wenige zu anderen Subgenera. Die am häufigsten nachgewiesenen Arten des Subgenus *Avaritia*, die in den SBV- und BTV-positiven Pools enthalten waren, sind *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. dewulfi* und *C. chiopterus*. In den SBV-positiven Gnitzenpools des Subgenus *Culicoides* wurden vor allem *C. punctatus* und *C. pulicaris*, sowie die Arten *C. lupicaris* und *C. selandicus* identifiziert. Nur ein Pool eines anderen Subgenus mit der Spezies *C. griseidorsum* war SBV-RNA positiv. Insgesamt ist das Gnitzenmonitoring eine geeignete Methode, um das Ausbruchsgeschehen der durch Gnitzen übertragenen Viren in Deutschland retrospektiv darzustellen.

Im September 2023 wurde zum ersten Mal BTV-3 in den Niederlanden und damit in Zentraleuropa nachgewiesen. Im Oktober 2023 wurde BTV-3 erstmalig auch in Deutschland detektiert. Im Verlauf des Jahres 2024 schritt die Ausbreitung von BTV-3 in Deutschland rasch fort und übertraf damit sogar den Ausbruch von BTV-8 in den Jahren 2006 und 2007. Um die Replikationseigenschaften der Viren zu vergleichen, wurde ein Infektionsversuch mit einem direkten Vergleich von BTV-3 und BTV-8 in den laborgezüchteten *Culicoides sonorensis* durchgeführt. Der Versuch resultierte außerdem in einer statistisch signifikanten höheren Genomkopienzahl in den replizierenden BTV-3 infizierten Gnitzen im Vergleich zur Genomkopienzahl der BTV-8 replizierenden Gnitzen. Der Unterschied im Replikationsverhalten könnte das unterschiedliche Ausbruchsgeschehen erklären.

8 Summary

Schmallenberg virus (SBV), bluetongue virus (BTV) and epizootic hemorrhagic disease virus (EHDV) are transmitted by biting midges of the genus *Culicoides* between the ruminant hosts. The orthobunyavirus SBV belongs to the Simbu serogroup and was detected for the first time in Germany in 2011. Today SBV has reached an enzootic status in Germany and other European countries. The acute SBV infection of adult ruminants often causes no clinical disease or only mild symptoms. However, the infection of pregnant ruminants during a critical phase in early gestation can lead to abortions or malformations of the fetus. Both BTV and EHDV are orbiviruses and can cause a hemorrhagic disease with clinical signs like mucosal hyperemia, ulcerations and edema, especially at the mouth and nose area, as well as at the coronary band. In severe cases internal hemorrhagic lesions can be fatal, and the infection of pregnant dam can also cause abortions and malformations of the calves or lambs. The first reports of the bluetongue disease date back to the 19th century and was the result of the transfer of susceptible sheep to South Africa. Since the first outbreak of BTV-8 in central Europe several serotypes emerged and caused outbreaks in Europe, such as the recent outbreak of BTV-3 in the Netherlands in 2023. EHDV was first detected in diseased white-tailed deer in North America in 1955. EHDV-8 was reported for the first time in southern Europe in 2022, specifically on the Italian islands of Sardinia and Sicily, in Spain and Portugal. Since then, EHDV-8 has continued to spread further north and was found in France in 2023. Infections of domestic animals with SBV, BTV and EHDV cause massive economic damages to the livestock owners and the agricultural industry. The resulting diseases go along with direct costs for production loss and animal loss, as well as indirect costs for veterinary treatment, diagnostics, surveillance and trade restrictions. To gain an overview of the prevalence of the viruses in the *Culicoides spp.* in Germany, a monitoring programme had been established. The biting midges were caught from 2019 to 2023 on livestock farms in Germany, sorted into pools and were tested for the viral genomes of SBV, BTV and EHDV. SBV-RNA was detected in the biting midges in every monitored year. The risk of SBV transmission seems to be especially high in summer and early autumn, whereas transmission through biting midges seems unlikely in winter. The results of the monitoring indicate that the prevalence of SBV is higher in western and southern Germany than in the rest of the country. Over the monitored years regional fluctuations of the SBV prevalence could be observed. In nearly every German federal state there was a year where the SBV prevalence in the biting midges was more elevated than in the other years. In contrast to the findings of SBV, BTV could not be found in any of the biting midges caught from 2019 to 2022. As a reaction to the BTV-3 outbreak in the Netherlands and in Germany 2023, biting

Summary

midges were caught in the affected federal states in the western part of Germany and BTV-RNA was found in one pool of biting midges. EHDV was never found in any of the tested pools from 2019 to 2023. In addition to the virus diagnostics another aim of the study was to investigate which *Culicoides* species in Germany are responsible for virus transmission. The majority of the biting midges caught were found to belong to the subgenus *Avaritia* Fox. Considerably fewer were identified as species belonging to the subgenus *Culicoides* Latreille, and only a few were species belonging to other subgenera. The majority of the SBV-RNA positive pools, as well as the BTV-RNA positive pool contained species of the subgenus *Avaritia*, such as *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. dewulfi* and *C. chiopterus*. The biting midges in the SBV-RNA positive pools of the subgenus *Culicoides* were mostly identified as *C. punctatus* and *C. pulicaris*, as well as *C. lupicaris* and *C. selandicus*. Only one pool of another subgenus, containing the species *C. griseidorsum*, was found to be positive for SBV-RNA. Overall, monitoring of biting midges is a suitable method to retrospectively monitor the occurrence of viruses transmitted by biting midges in Germany.

In September 2023 BTV-3 was detected for the first time in central Europe in the Netherlands. The first case of BTV-3 in Germany was reported in October 2023. Over the course of 2024, BTV-3 spread rapidly throughout Germany, surpassing the spread of BTV-8 in 2006 and 2007. To compare the replication properties of the BTV serotypes an experimental infection study with BTV-3 and BTV-8 in the laboratory reared colony of *C. sonorensis* was conducted. Oral infection with BTV-3 resulted in a significantly higher viral load in the infected midges with demonstrated replication than BTV-8 infection, offering a possible explanation for the difference in the outbreak progressions.

9 Literaturverzeichnis

1. de Souza WM, Calisher CH, Carrera JP, Hughes HR, Nunes MRT, Russell B, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Peribunyaviridae* 2024. J Gen Virol. 2024;105(11).
2. Goller KV, Höper D, Schirrmeier H, Mettenleiter TC, Beer M. Schmallerberg virus as possible ancestor of Shamonda virus. Emerg Infect Dis. 2012;18(10):1644-6.
3. Hoffmann B, Scheuch M, Höper D, Jungblut R, Holsteg M, Schirrmeier H, et al. Novel orthobunyavirus in cattle, Europe, 2011. Emerg Infect Dis. 2012;18(3):469-72.
4. Wernike K, Hoffmann B, Bréard E, Bötner A, Ponsart C, Zientara S, et al. Schmallerberg virus experimental infection of sheep. Vet Microbiol. 2013;166(3-4):461-6.
5. Wernike K, Silaghi C, Nieder M, Pfeffer M, Beer M. Dynamics of Schmallerberg virus infection within a cattle herd in Germany, 2011. Epidemiol Infect. 2014;142(7):1501-4.
6. Golender N, Brenner J, Valdman M, Khinich Y, Bumbarov V, Panshin A, et al. Malformations caused by Shuni Virus in ruminants, Israel, 2014-2015. Emerg Infect Dis. 2015;21(12):2267-8.
7. Kirkland PD. Akabane virus infection. Rev Sci Tech. 2015;34(2):403-10.
8. Wernike K, Holsteg M, Schirrmeier H, Hoffmann B, Beer M. Natural infection of pregnant cows with Schmallerberg virus--a follow-up study. PLoS One. 2014;9(5):e98223.
9. Herder V, Wohlsein P, Peters M, Hansmann F, Baumgärtner W. Salient lesions in domestic ruminants infected with the emerging so-called Schmallerberg virus in Germany. Vet Pathol. 2012;49(4):588-91.
10. Beer M, Conraths FJ, van der Poel WH. 'Schmallerberg virus'--a novel orthobunyavirus emerging in Europe. Epidemiol Infect. 2013;141(1):1-8.
11. Wernike K, Beer M. Re-circulation of Schmallerberg virus, Germany, 2019. Transbound Emerg Dis. 2020;67(6):2290-5.
12. Wernike K, Fischer L, Holsteg M, Aebischer A, Petrov A, Marquart K, et al. Serological screening in wild ruminants in Germany, 2021/2022: No evidence of SARS-CoV-2, bluetongue virus or pestivirus spread but high seroprevalences against Schmallerberg virus. Transbound Emerg Dis. 2022;69(5):e3289-e96.
13. Matthijnssens J, Attoui H, Bányai K, Brussaard CPD, Danthi P, Del Vas M, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Sedoreoviridae* 2022. J Gen Virol. 2022;103(10).
14. Mahrt CR, Osburn BI. Experimental bluetongue virus infection of sheep; effect of vaccination: pathologic, immunofluorescent, and ultrastructural studies. Am J Vet Res. 1986;47(6):1198-203.
15. MacLachlan NJ. Bluetongue: pathogenesis and duration of viraemia. Vet Ital. 2004;40(4):462-7.
16. MacLachlan NJ, Zientara S, Savini G, Daniels PW. Epizootic haemorrhagic disease. Rev Sci Tech. 2015;34(2):341-51.

17. Darpel KE, Batten CA, Veronesi E, Shaw AE, Anthony S, Bachanek-Bankowska K, et al. Clinical signs and pathology shown by British sheep and cattle infected with bluetongue virus serotype 8 derived from the 2006 outbreak in northern Europe. *Vet Rec.* 2007;161(8):253-61.
18. Zanella G, Durand B, Sellal E, Breard E, Sailleau C, Zientara S, et al. Bluetongue virus serotype 8: Abortion and transplacental transmission in cattle in the Burgundy region, France, 2008–2009. *Theriogenology.* 2012;77(1):65-72.
19. Worwa G, Hilbe M, Ehrensperger F, Chaignat V, Hofmann MA, Griot C, et al. Experimental transplacental infection of sheep with bluetongue virus serotype 8. *Vet Rec.* 2009;164(16):499-500.
20. Coetzee P, Stokstad M, Myrmel M, Mutowembwa P, Loken T, Venter EH, Van Vuuren M. Transplacental infection in goats experimentally infected with a European strain of bluetongue virus serotype 8. *Vet J.* 2013;197(2):335-41.
21. Erasmus BJ. Bluetongue in sheep and goats. *Aust Vet J.* 1975;51(4):165-70.
22. Subhadra S, Sreenivasulu D, Pattnaik R, Panda BK, Kumar S. Bluetongue virus: Past, present, and future scope. *J Infect Dev Ctries.* 2023;17(2):147-56.
23. Zientara S, Sánchez-Vizcaíno JM. Control of bluetongue in Europe. *Vet Microbiol.* 2013;165(1-2):33-7.
24. Shope R, MacNamara L, Mangold R. Epizootic haemorrhagic disease of deer. *New Jersey Outdoors.* 1955.
25. Savini G, Afonso A, Mellor P, Aradaib I, Yadin H, Sanaa M, et al. Epizootic haemorrhagic disease. *Res Vet Sci.* 2011;91(1):1-17.
26. Lorusso A, Cappai S, Loi F, Pinna L, Ruiu A, Puggioni G, et al. Epizootic hemorrhagic disease virus serotype 8, Italy, 2022. *Emerg Infect Dis.* 2023;29(5):1063-5.
27. Gondard M, Postic L, Garin E, Turpaud M, Vorimore F, Ngwa-Mbot D, et al. Exceptional bluetongue virus (BTV) and epizootic hemorrhagic disease virus (EHDV) circulation in France in 2023. *Virus Res.* 2024;350:199489.
28. Mellor PS, Boorman J, Baylis M. *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annu Rev Entomol.* 2000;45:307-40.
29. Sick F, Beer M, Kampen H, Wernike K. *Culicoides* biting midges-underestimated vectors for arboviruses of public health and veterinary importance. *Viruses.* 2019;11(4).
30. Mellor PS, Wittmann EJ. Bluetongue virus in the Mediterranean Basin 1998-2001. *Vet J.* 2002;164(1):20-37.
31. Toussaint JF, Vandebussche F, Mast J, De Meester L, Goris N, Van Dessel W, et al. Bluetongue in northern Europe. *Vet Rec.* 2006;159(10):327.
32. De Regge N, Deblauwe I, De Deken R, Vantieghem P, Madder M, Geysen D, et al. Detection of Schmallenberg virus in different *Culicoides* spp. by real-time RT-PCR. *Transbound Emerg Dis.* 2012;59(6):471-5.

33. Rasmussen LD, Kristensen B, Kirkeby C, Rasmussen TB, Belsham GJ, Bødker R, Bøtner A. Culicoids as vectors of Schmallenberg virus. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(7):1204-6.
34. Hoffmann B, Bauer B, Bauer C, Bätza HJ, Beer M, Clausen PH, et al. Monitoring of putative vectors of bluetongue virus serotype 8, Germany. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(9):1481-4.
35. Ségard A, Gardès L, Jacquier E, Grillet C, Mathieu B, Rakotoarivony I, et al. Schmallenberg virus in *Culicoides Latreille* (Diptera: *Ceratopogonidae*) populations in France during 2011-2012 outbreak. *Transbound Emerg Dis.* 2018;65(1):e94-e103.
36. Kęsik-Maliszewska J, Larska M, Collins Á B, Rola J. Post-epidemic distribution of Schmallenberg virus in *Culicoides* arbovirus vectors in Poland. *Viruses.* 2019;11(5).
37. Savini G, Goffredo M, Monaco F, Di Gennaro A, de Santis P, Meiswinkel R, Caporale V. The isolation of bluetongue virus from field populations of the *Obsoletus* Complex in central Italy. *Vet Ital.* 2004;40(3):286-91.
38. Dijkstra E, van der Ven IJK, Meiswinkel R, Hölzel DR, van Rijn PA, Meiswinkel R. *Culicoides chiopterus* as a potential vector of bluetongue virus in Europe. *Veterinary Record.* 2008;162(13):422-.
39. Capela R, Purse BV, Pena I, Wittman EJ, Margarita Y, Capela M, et al. Spatial distribution of *Culicoides* species in Portugal in relation to the transmission of African horse sickness and bluetongue viruses. *Med Vet Entomol.* 2003;17(2):165-77.
40. Hristescu D, Bărbuceanu F, Dascălu L, Nițescu C, Goffredo M, Santilli A, et al. Species composition and relative abundance of the genus *Culicoides* (Diptera: *Ceratopogonidae*) in Romania. *Parasit Vectors.* 2020;13(1):393.
41. Santman-Berends I, van den Brink K, Dijkstra E, van Schaik G, Spierenburg MAH, van den Brom R. The impact of the bluetongue serotype 3 outbreak on sheep and goat mortality in the Netherlands in 2023. *Prev Vet Med.* 2024;231:106289.
42. Wernike K, Conraths F, Zanella G, Granzow H, Gache K, Schirrmeyer H, et al. Schmallenberg virus-two years of experiences. *Prev Vet Med.* 2014;116(4):423-34.
43. Elliott RM. Orthobunyaviruses: recent genetic and structural insights. *Nat Rev Microbiol.* 2014;12(10):673-85.
44. Elliott RM, Blakqori G. Molecular biology of orthobunyaviruses. 2011.
45. Raju R, Kolakofsky D. The ends of La Crosse virus genome and antigenome RNAs within nucleocapsids are base paired. *J Virol.* 1989;63(1):122-8.
46. van den Brom R, Luttikholt SJ, Lievaart-Peterson K, Peperkamp NH, Mars MH, van der Poel WH, Vellema P. Epizootic of ovine congenital malformations associated with Schmallenberg virus infection. *Tijdschr Diergeneeskd.* 2012;137(2):106-11.
47. Laloy E, Riou M, Barc C, Belbis G, Bréard E, Breton S, et al. Schmallenberg virus: experimental infection in goats and bucks. *BMC Vet Res.* 2015;11:221.

48. Conraths FJ, Kämer D, Teske K, Hoffmann B, Mettenleiter TC, Beer M. Reemerging Schmallenberg virus infections, Germany, 2012. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(3):513-4.
49. Jiménez-Ruiz S, Vicente J, Risalde MA, Acevedo P, Cano-Terriza D, González-Barrio D, et al. Survey of *Culicoides*-borne bluetongue and Schmallenberg viruses at the wildlife-livestock interface in Doñana National Park (Spain). *Transbound Emerg Dis.* 2022;69(5):e1815-e24.
50. Linden A, Desmecht D, Volpe R, Wirtgen M, Gregoire F, Pirson J, et al. Epizootic spread of Schmallenberg virus among wild cervids, Belgium, Fall 2011. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(12):2006-8.
51. Jack C, Anstaett O, Adams J, Noad R, Brownlie J, Mertens P. Evidence of seroconversion to SBV in camelids. *Vet Rec.* 2012;170(23):603.
52. Schulz C, Beer M, Hoffmann B. Schmallenberg virus infection in South American camelids: Field and experimental investigations. *Vet Microbiol.* 2015;180(3-4):171-9.
53. Kęsik-Maliszewska J, Krzysiak MK, Grochowska M, Lechowski L, Chase C, Larska M. Epidemiology of Schmallenberg virus in European bison (*Bison Bonasus*) in Poland. *J Wildl Dis.* 2018;54(2):272-82.
54. Beer M, Wernike K. Akabane virus and Schmallenberg virus (*Peribunyaviridae*). In: Bamford DH, Zuckerman M, editors. *Encyclopedia of Virology (Fourth Edition)*. Oxford: Academic Press; 2019. p. 34-9.
55. König P, Wernike K, Hechinger S, Tauscher K, Breithaupt A, Beer M. Fetal infection with Schmallenberg virus - An experimental pathogenesis study in pregnant cows. *Transbound Emerg Dis.* 2019;66(1):454-62.
56. Peperkamp NH, Lutikholt SJ, Dijkman R, Vos JH, Junker K, Greijdanus S, et al. Ovine and bovine congenital abnormalities associated with intrauterine infection with Schmallenberg virus. *Vet Pathol.* 2015;52(6):1057-66.
57. Collins ÁB, Doherty ML, Barrett DJ, Mee JF. Schmallenberg virus: a systematic international literature review (2011-2019) from an Irish perspective. *Irish Veterinary Journal.* 2019;72(1):9.
58. Postler TS, Kuhn JH. Rename all established species to comply with the newly ICTV-mandated binomial species format (*Reovirales: Sedoviridae*) 2023 [updated June 23, 2023]. Available from: https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202404879&taxon_name=Orbivirus%20Ocaerulinguae.
59. Verwoerd DW, Els HJ, De Villiers EM, Huismans H. Structure of the bluetongue virus capsid. *J Virol.* 1972;10(4):783-94.
60. Mellor P. The replication of bluetongue virus in *Culicoides* vectors. *Bluetongue viruses.* 1990:143-61.
61. Foster NM, Breckon RD, Luedke AJ, Jones RH. Transmission of two strains of epizootic hemorrhagic disease virus in deer by *Culicoides variipennis*. *J Wildl Dis.* 1977;13(1):9-16.

62. Bréard E, Schulz C, Sailleau C, Bernelin-Cottet C, Viarouge C, Vitour D, et al. Bluetongue virus serotype 27: Experimental infection of goats, sheep and cattle with three BTV-27 variants reveal atypical characteristics and likely direct contact transmission BTV-27 between goats. *Transbound Emerg Dis*. 2018;65(2):e251-e63.
63. Batten C, Darpel K, Henstock M, Fay P, Veronesi E, Gubbins S, et al. Evidence for transmission of bluetongue virus serotype 26 through direct contact. *PLoS One*. 2014;9(5):e96049.
64. Radar Bulletin Oktober 2024. Radar Bulletin Deutschland. 2024.
65. European Commission. Bluetongue - map with the member states and zones with their disease status 2025 [updated 18.07.2025. Available from: https://food.ec.europa.eu/document/download/0c2e7ca6-96eb-42e9-830e-27f43a3a01ba_en?filename=ad_control-measures_bt_restrictedzones-map.pdf.
66. Saminathan M, Singh KP, Khorajiya JH, Dinesh M, Vineetha S, Maity M, et al. An updated review on bluetongue virus: epidemiology, pathobiology, and advances in diagnosis and control with special reference to India. *Vet Q*. 2020;40(1):258-321.
67. Eschbaumer M, Wernike K, Batten CA, Savini G, Edwards L, Di Gennaro A, et al. Epizootic hemorrhagic disease virus serotype 7 in European cattle and sheep: diagnostic considerations and effect of previous BTV exposure. *Vet Microbiol*. 2012;159(3):298-306.
68. Gibbs EP, Lawman MJ. Infection of British deer and farm animals with epizootic haemorrhagic disease of deer virus. *J Comp Pathol*. 1977;87(3):335-43.
69. Becker ME, Roberts J, Schroeder ME, Gentry G, Foil LD. Prospective study of epizootic hemorrhagic disease virus and bluetongue virus transmission in captive ruminants. *J Med Entomol*. 2020;57(4):1277-85.
70. Spedicato M, Profeta F, Thabet S, Teodori L, Leone A, Portanti O, et al. Experimental infection of cattle, sheep, and goats with the newly emerged epizootic hemorrhagic disease virus serotype 8. *Vet Ital*. 2023.
71. Katz JB, Gustafson GA, Alstad AD, Adler KA, Moser KM. Colorimetric diagnosis of prolonged bluetongue viremia in sheep, using an enzyme-linked oligonucleotide sorbent assay of amplified viral nucleic acids. *American journal of veterinary research*. 1993;54(12):2021-6.
72. Katz J, Alstad D, Gustafson G, Evermann J. Diagnostic analysis of the prolonged bluetongue virus RNA presence found in the blood of naturally infected cattle and experimentally infected sheep. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 1994;6(2):139-42.
73. Bonneau KR, DeMaula CD, Mullens BA, MacLachlan NJ. Duration of viraemia infectious to *Culicoides sonorensis* in bluetongue virus-infected cattle and sheep. *Vet Microbiol*. 2002;88(2):115-25.
74. van den Brink KMJA, Santman-Berends IMG, Harkema L, Scherpenzeel CGM, Dijkstra E, Bisschop PIH, et al. Bluetongue virus serotype 3 in ruminants in the Netherlands: Clinical signs, seroprevalence and pathological findings. *Veterinary Record*. 2024;195(4):e4533.

75. De Regge N, De Deken R, Fassotte C, Losson B, Deblauwe I, Madder M, et al. *Culicoides* monitoring in Belgium in 2011: analysis of spatiotemporal abundance, species diversity and Schmallenberg virus detection. *Med Vet Entomol.* 2015;29(3):263-75.
76. Larska M, Lechowski L, Grochowska M, Żmudziński JF. Detection of the Schmallenberg virus in nulliparous *Culicoides obsoletus/scoticus* complex and *C. punctatus*--the possibility of transovarial virus transmission in the midge population and of a new vector. *Vet Microbiol.* 2013;166(3-4):467-73.
77. Werner D, Groschupp S, Bauer C, Kampen H. Breeding habitat preferences of major *Culicoides* species (Diptera: *Ceratopogonidae*) in Germany. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(14).
78. Groschupp S, Kampen H, Werner D. Occurrence of putative *Culicoides* biting midge vectors (Diptera: *Ceratopogonidae*) inside and outside barns in Germany and factors influencing their activity. *Parasit Vectors.* 2023;16(1):307.
79. Groschupp S, Kampen H, Werner D. Winter activity of *Culicoides* (Diptera: *Ceratopogonidae*) inside and outside stables in Germany. *Med Vet Entomol.* 2024.
80. Kiel E, Liebisch G, Focke R, Liebisch A, Werner D. Monitoring of *Culicoides* at 20 locations in northwest Germany. *Parasitol Res.* 2009;105(2):351-7.
81. Kameke D, Werner D, Hoffmann B, Lutz W, Kampen H. Schmallenberg virus in Germany 2011-2014: searching for the vectors. *Parasitol Res.* 2016;115(2):527-34.
82. Meiswinkel R, De Bree F, Bossers-De Vries R, Elbers AR. An unrecognized species of the *Culicoides obsoletus* complex feeding on livestock in the Netherlands. *Vet Parasitol.* 2015;207(3-4):324-8.
83. Linley JR, Davies JB. Sandflies and tourism in Florida and the Bahamas and Caribbean Area. *Journal of Economic Entomology.* 1971;64(1):264-78.
84. Hendry G, Godwin G. Biting midges in Scottish forestry: a costly irritant or a trivial nuisance? *Scottish Forestry.* 1988;42(2):113-9.
85. Cohn BA. Biting midges--those marauding "no-see-ums". *Int J Dermatol.* 2003;42(6):459-60.
86. Prudhomme J, Bardet C, Rakotoarivony I, Garros C, Bouhsira É, Lienard E. Local investigation into the role of *Culicoides* species diversity (Diptera: *Ceratopogonidae*) in recurrent horse dermatitis cases in southwest France. *Parasit Vectors.* 2025;18(1):86.
87. Blanton FS, Wirth WW. The Sand Flies (*Culicoides*) of Florida (Diptera: *Ceratopogonidae*): Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry; 1979.
88. Mellor PS. Replication of arboviruses in insect vectors. *J Comp Pathol.* 2000;123(4):231-47.
89. Aguilar PV, Barrett AD, Saeed MF, Watts DM, Russell K, Guevara C, et al. Iquitos virus: a novel reassortant Orthobunyavirus associated with human illness in Peru. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(9):e1315.

90. Wesselmann KM, Postigo-Hidalgo I, Pezzi L, de Oliveira-Filho EF, Fischer C, de Lamballerie X, Drexler JF. Emergence of Oropouche fever in Latin America: a narrative review. *The Lancet Infectious Diseases*. 2024;24(7):e439-e52.
91. Motlou TP, Venter M. Shuni virus in cases of neurologic disease in humans, South Africa. *Emerg Infect Dis*. 2021;27(2):565-9.
92. Fu H, Leake CJ, Mertens PP, Mellor PS. The barriers to bluetongue virus infection, dissemination and transmission in the vector, *Culicoides variipennis* (Diptera: *Ceratopogonidae*). *Arch Virol*. 1999;144(4):747-61.
93. Mills MK, Michel K, Pfannenstiel RS, Ruder MG, Veronesi E, Nayduch D. *Culicoides*-virus interactions: infection barriers and possible factors underlying vector competence. *Curr Opin Insect Sci*. 2017;22:7-15.
94. Purse BV, Carpenter S, Venter GJ, Bellis G, Mullens BA. Bionomics of temperate and tropical *Culicoides* midges: Knowledge gaps and consequences for transmission of *Culicoides*-borne viruses. *Annual Review of Entomology*. 2015;60(Volume 60, 2015):373-92.
95. Veronesi E, Darpel K, Gubbins S, Batten C, Nomikou K, Mertens P, Carpenter S. Diversity of transmission outcomes following co-infection of sheep with strains of bluetongue virus serotype 1 and 8. *Microorganisms*. 2020;8(6).
96. Pagès N, Talavera S, Verdún M, Pujol N, Valle M, Bensaid A, Pujols J. Schmallenberg virus detection in *Culicoides* biting midges in Spain: First laboratory evidence for highly efficient infection of *Culicoides* of the *Obsoletus* complex and *Culicoides imicola*. *Transbound Emerg Dis*. 2018;65(1):e1-e6.
97. Balenghien T, Pagès N, Goffredo M, Carpenter S, Augot D, Jacquier E, et al. The emergence of Schmallenberg virus across *Culicoides* communities and ecosystems in Europe. *Prev Vet Med*. 2014;116(4):360-9.
98. Carpenter S, McArthur C, Selby R, Ward R, Nolan DV, Mordue Luntz AJ, et al. Experimental infection studies of UK *Culicoides* species midges with bluetongue virus serotypes 8 and 9. *Vet Rec*. 2008;163(20):589-92.
99. Paslaru AI, Mathis A, Torgerson P, Veronesi E. Vector competence of pre-alpine *Culicoides* (Diptera: *Ceratopogonidae*) for bluetongue virus serotypes 1, 4 and 8. *Parasit Vectors*. 2018;11(1):466.
100. Federici V, Goffredo M, Mancini G, Quaglia M, Santilli A, Di Nicola F, et al. Vector competence of Italian populations of *Culicoides* for some bluetongue virus strains responsible for recent northern African and European outbreaks. *Viruses*. 2019;11(10).
101. Jennings DM, Mellor PS. The vector potential of British *Culicoides* species for bluetongue virus. *Vet Microbiol*. 1988;17(1):1-10.
102. Carpenter S, Lunt HL, Arav D, Venter GJ, Mellor PS. Oral susceptibility to bluetongue virus of *Culicoides* (Diptera: *Ceratopogonidae*) from the United Kingdom. *J Med Entomol*. 2006;43(1):73-8.

103. Purse B, Carpenter S, Venter G, Bellis G, Mullens B. Bionomics of temperate and tropical *Culicoides* midges: knowledge gaps and consequences for transmission of *Culicoides*-borne viruses. *Annual review of entomology*. 2015;60(1):373-92.
104. Purse BV, Carpenter S, Venter GJ, Bellis G, Mullens BA. Bionomics of temperate and tropical *Culicoides* midges: knowledge gaps and consequences for transmission of *Culicoides*-borne viruses. *Annu Rev Entomol*. 2015;60:373-92.
105. Maurer LM, Paslaru A, Torgerson PR, Veronesi E, Mathis A. Vector competence of *Culicoides* biting midges from Switzerland for African horse sickness virus and epizootic haemorrhagic disease virus. *Schweiz Arch Tierheilkd*. 2022;164(1):66-70.
106. Paweska JT, Venter GJ, Hamblin C. A comparison of the susceptibility of *Culicoides imicola* and *C. bolitinos* to oral infection with eight serotypes of epizootic haemorrhagic disease virus. *Med Vet Entomol*. 2005;19(2):200-7.
107. Braks M, van der Giessen J, Kretzschmar M, van Pelt W, Scholte EJ, Reusken C, et al. Towards an integrated approach in surveillance of vector-borne diseases in Europe. *Parasit Vectors*. 2011;4:192.
108. Balenghien T, Delécolle J-C, Setier-Rio M-L, Rakotaoarivony I, Allène X, Venail R, et al. Bluetongue-report on entomological surveillance in France in 2010. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation*. 2010;46:26-31.
109. Savini G, Goffredo M, Monaco F, Di Gennaro A, Cafiero MA, Baldi L, et al. Bluetongue virus isolations from midges belonging to the *Obsoletus* complex (*Culicoides*, Diptera: *Ceratopogonidae*) in Italy. *Vet Rec*. 2005;157(5):133-9.
110. De Deken G, Maddler M, Deblauwe I, De Clercq K, Fassotte C, Losson B, et al. Vector monitoring at Belgian outbreak sites during the bluetongue epidemic of 2006. *Prev Vet Med*. 2008;87(1-2):64-73.
111. Meiswinkel R, Goffredo M, Leijts P, Conte A. The *Culicoides* 'snapshot': a novel approach used to assess vector densities widely and rapidly during the 2006 outbreak of bluetongue (BT) in The Netherlands. *Prev Vet Med*. 2008;87(1-2):98-118.
112. Casati S, Racloz V, Delécolle JC, Kuhn M, Mathis A, Griot C, et al. An investigation on the *Culicoides* species composition at seven sites in southern Switzerland. *Med Vet Entomol*. 2009;23(2):93-8.
113. Hörbrand T, Geier M. Monitoring of *Culicoides* at nine locations in Southern Germany (2007-2008). *Parasitol Res*. 2009;105(2):387-92.
114. Ioniță M, Mitrea I, Buzatu M, Dascălu L, Ionescu A. Seasonal dynamics of haematophag arthropod populations (ticks and *Culicoides spp.*)-vectors of pathogens in animals and humans, in different areas of Romania. 2009.
115. Kaufmann C, Schaffner F, Mathis A. [Monitoring of biting midges (*Culicoides spp.*), the potential vectors of the bluetongue virus, in the 12 climatic regions of Switzerland]. *Schweiz Arch Tierheilkd*. 2009;151(5):205-13.

116. Mehlhorn H, Walldorf V, Klimpel S, Schaub G, Kiel E, Focke R, et al. Bluetongue disease in Germany (2007-2008): monitoring of entomological aspects. *Parasitol Res.* 2009;105(2):313-9.
117. Vorsprach B, Meiser CK, Werner D, Balczun C, Schaub GA. Monitoring of *Ceratopogonidae* in southwest Germany. *Parasitol Res.* 2009;105(2):337-44.
118. Ander M, Meiswinkel R, Chirico J. Seasonal dynamics of biting midges (Diptera: *Ceratopogonidae*: *Culicoides*), the potential vectors of bluetongue virus, in Sweden. *Vet Parasitol.* 2012;184(1):59-67.
119. Pérez JM, García-Ballester JA, López-Olvera JR, Serrano E. Monitoring bluetongue virus vectors in Andalusia (SW Europe): *Culicoides* species composition and factors affecting capture rates of the biting midge *Culicoides imicola*. *Parasitol Res.* 2012;111(3):1267-75.
120. Brugger K, Rubel F. Characterizing the species composition of European *Culicoides* vectors by means of the Köppen-Geiger climate classification. *Parasit Vectors.* 2013;6(1):333.
121. Goffredo M, Conte A, Meiswinkel R. Distribution and abundance of *Culicoides imicola*, *Obsoletus* Complex and *Pulicaris* Complex (Diptera: *Ceratopogonidae*) in Italy. *Vet Ital.* 2004;40(3):270-3.
122. Venail R, Balenghien T, Guis H, Tran A, Setier-Rio ML, Delécolle JC, et al. Assessing diversity and abundance of vector populations at a national scale: Example of *Culicoides* surveillance in France after bluetongue virus emergence. In: Mehlhorn H, editor. *Arthropods as Vectors of Emerging Diseases*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2012. p. 77-102.
123. Europäischen Zentrums für die Prävention und die Kontrolle von Krankheiten (ECDC). Biting midge maps 2024 [Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/surveillance-and-disease-data/biting-midge-maps#biting-midge-surveillance>].
124. Goffredo M, Catalani M, Federici V, Portanti O, Marini V, Mancini G, et al. Vector species of *Culicoides* midges implicated in the 2012-2014 Bluetongue epidemics in Italy. *Vet Ital.* 2015;51(2):131-8.
125. Baldet T, Delécolle JC, Cêtre-Sossah C, Mathieu B, Meiswinkel R, Gerbier G. Indoor activity of *Culicoides* associated with livestock in the bluetongue virus (BTV) affected region of northern France during autumn 2006. *Prev Vet Med.* 2008;87(1-2):84-97.
126. Rasmussen LD, Kirkeby C, Bødker R, Kristensen B, Rasmussen TB, Belsham GJ, Bøtner A. Rapid spread of Schmallenberg virus-infected biting midges (*Culicoides* spp.) across Denmark in 2012. *Transbound Emerg Dis.* 2014;61(1):12-6.
127. Elbers AR, Meiswinkel R, van Weezep E, Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM, Kooi EA. Schmallenberg virus in *Culicoides* spp. biting midges, the Netherlands, 2011. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(1):106-9.
128. Elbers AR, Meiswinkel R, van Weezep E, Kooi EA, van der Poel WH. Schmallenberg virus in *Culicoides* biting midges in the Netherlands in 2012. *Transbound Emerg Dis.* 2015;62(3):339-42.

129. Goffredo M, Monaco F, Capelli G, Quaglia M, Federici V, Catalani M, et al. Schmallenberg virus in Italy: a retrospective survey in *Culicoides* stored during the bluetongue Italian surveillance program. *Prev Vet Med.* 2013;111(3-4):230-6.
130. Pagès N, Muñoz-Muñoz F, Talavera S, Sarto V, Lorca C, Núñez JI. 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.* 2009;165(3-4):298-310.
131. Quaglia M, Foxi C, Satta G, Puggioni G, Bechere R, De Ascentis M, et al. *Culicoides* species responsible for the transmission of epizootic haemorrhagic disease virus (EHDV) serotype 8 in Italy. *Vet Ital.* 2023;59(1):83-9.
132. Becvar T, Vojtkova B, Siriyasatien P, Votypka J, Modry D, Jahn P, et al. Experimental transmission of *Leishmania* (*Mundinia*) parasites by biting midges (Diptera: *Ceratopogonidae*). *PLoS Pathog.* 2021;17(6):e1009654.
133. Bernotienė R, Iezhova TA, Bukauskaitė D, Chagas CRF, Kazak M, Valkiūnas G. Development of *Trypanosoma everetti* in *Culicoides* biting midges. *Acta Trop.* 2020;210:105555.
134. Erram D, McGregor B, Acevedo C, Alto BW, Burkett-Cadena N. Epizootic hemorrhagic disease virus oral infection affects midge reproduction and is vertically transmitted to offspring in *Culicoides sonorensis*. *Sci Rep.* 2025;15(1):16078.
135. Wernike K, Vasic A, Amler S, Sick F, Răileanu C, Dähn O, et al. Schmallenberg virus non-structural proteins NSs and NSm are not essential for experimental infection of *Culicoides sonorensis* biting midges. *Journal of Virology.* 0(0):e00343-25.
136. Wittmann EJ, Mello PS, Baylis M. Effect of temperature on the transmission of orbiviruses by the biting midge, *Culicoides sonorensis*. *Med Vet Entomol.* 2002;16(2):147-56.
137. Fahrner J, Barthelmess C. Rearing of *Culicoides nubeculosus* (Diptera: *Ceratopogonidae*) by natural or artificial feeding in the laboratory. *Vet Parasitol.* 1988;28(4):307-13.
138. Tabachnick WJ. *Culicoides variipennis* and bluetongue-virus epidemiology in the United States. *Annu Rev Entomol.* 1996;41:23-43.
139. Carpenter M, Kopanke J, Lee J, Rodgers C, Reed K, Sherman TJ, et al. Evaluating temperature effects on bluetongue virus serotype 10 and 17 coinfection in *Culicoides sonorensis*. *Int J Mol Sci.* 2024;25(5).
140. Kopanke J, Lee J, Stenglein M, Carpenter M, Cohnstaedt LW, Wilson WC, Mayo C. Exposure of *Culicoides sonorensis* to enzootic strains of bluetongue virus demonstrates temperature- and virus-specific effects on virogenesis. *Viruses.* 2021;13(6).
141. Newbrook K, Obishakin E, Jones LA, Waters R, Ashby M, Batten C, Sanders C. Clinical disease in British sheep infected with an emerging strain of bluetongue virus serotype 3. *Vet Rec.* 2025;196(4):e4910.

142. Morales-Hojas R, Hinsley M, Armean IM, Silk R, Harrup LE, Gonzalez-Uriarte A, et al. The genome of the biting midge *Culicoides sonorensis* and gene expression analyses of vector competence for bluetongue virus. *BMC Genomics*. 2018;19(1):624.
143. Ropiak HM, King S, Busquets MG, Newbrook K, Pullinger GD, Brown H, et al. Identification of a BTV-strain-specific single gene that increases *Culicoides* vector infection rate. *Viruses*. 2021;13(9).
144. Carpenter M, Benavides Obon A, Kopanke J, Lee J, Reed K, Sherman T, et al. In situ hybridization (RNAscope) detection of bluetongue virus serotypes 10 and 17 in experimentally co-infected *Culicoides sonorensis*. *Pathogens*. 2023;12(10).
145. Carpenter M, Kopanke J, Lee J, Rodgers C, Reed K, Sherman TJ, et al. Assessing reassortment between bluetongue virus serotypes 10 and 17 at different coinfection ratios in *Culicoides sonorensis*. *Viruses*. 2024;16(2).
146. Nayduch D, Lee MB, Sasaki CA. The reference transcriptome of the adult female biting midge (*Culicoides sonorensis*) and differential gene expression profiling during teneral, blood, and sucrose feeding conditions. *PLoS One*. 2014;9(5):e98123.
147. Venter GJ, Paweska JT, Lunt H, Mellor PS, Carpenter S. An alternative method of blood-feeding *Culicoides imicola* and other haematophagous *Culicoides* species for vector competence studies. *Vet Parasitol*. 2005;131(3-4):331-5.
148. Carpenter S, Lunt HL, Arav D, Venter GJ, Mellor PS. Oral susceptibility to bluetongue virus of *Culicoides* (Diptera: *Ceratopogonidae*) from the United Kingdom. *J Med Entomol*. 2006;43(1):73-8.
149. Carpenter S, McArthur C, Selby R, Ward R, Nolan DV, Luntz AJ, et al. Experimental infection studies of UK *Culicoides* species midges with bluetongue virus serotypes 8 and 9. *Vet Rec*. 2008;163(20):589-92.
150. McDonald SM, Nelson MI, Turner PE, Patton JT. Reassortment in segmented RNA viruses: mechanisms and outcomes. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14(7):448-60.
151. Samal SK, el-Hussein A, Holbrook FR, Beaty BJ, Ramig RF. Mixed infection of *Culicoides variipennis* with bluetongue virus serotypes 10 and 17: evidence for high frequency reassortment in the vector. *J Gen Virol*. 1987;68 (Pt 9):2319-29.
152. Young PR. Arboviruses: A family on the move. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1062:1-10.
153. Huang Y-JS, Higgs S, Vanlandingham DL. Emergence and re-emergence of mosquito-borne arboviruses. *Current Opinion in Virology*. 2019;34:104-9.
154. Madison-Antenucci S, Kramer LD, Gebhardt LL, Kauffman E. Emerging tick-borne diseases. *Clin Microbiol Rev*. 2020;33(2).
155. Rodriguez-Morales AJ, Drexler JF. Re-emergence of Oropouche virus in Brazil and Latin America. *The Lancet Infectious Diseases*. 2025;25(2):137-9.
156. Poskin A, Méroc E, Behaeghel I, Riocreux F, Couche M, Van Loo H, et al. Schmallenberg virus in Belgium: Estimation of impact in cattle and sheep herds. *Transbound Emerg Dis*. 2017;64(1):264-74.

157. Veldhuis AM, Carp-van Dijken S, van Wuijckhuise L, Witteveen G, van Schaik G. Schmallenberg virus in Dutch dairy herds: potential risk factors for high within-herd seroprevalence and malformations in calves, and its impact on productivity. *Vet Microbiol.* 2014;168(2-4):281-93.
158. Veldhuis AM, Santman-Berends IM, Gethmann JM, Mars MH, van Wuyckhuise L, Vellema P, et al. Schmallenberg virus epidemic: impact on milk production, reproductive performance and mortality in dairy cattle in the Netherlands and Kleve district, Germany. *Prev Vet Med.* 2014;116(4):412-22.
159. Waret-Szkuta A, Alarcon P, Hasler B, Rushton J, Corbière F, Raboisson D. Economic assessment of an emerging disease: the case of Schmallenberg virus in France. *Rev Sci Tech.* 2017;36(1):265-77.
160. Saegerman C, Martinelle L, Dal Pozzo F, Kirschvink N. Preliminary survey on the impact of Schmallenberg virus on sheep flocks in South of Belgium. *Transbound Emerg Dis.* 2014;61(5):469-72.
161. Wüthrich M, Lechner I, Aebi M, Vöglin A, Posthaus H, Schüpbach-Regula G, Meylan M. A case-control study to estimate the effects of acute clinical infection with the Schmallenberg virus on milk yield, fertility and veterinary costs in Swiss dairy herds. *Prev Vet Med.* 2016;126:54-65.
162. Häslér B, Alarcon P, Raboisson D, Waret-Szkuta A, Rushton J. Integration of production and financial models to analyse the financial impact of livestock diseases: a case study of Schmallenberg virus disease on British and French dairy farms. *Vet Rec Open.* 2015;2(1):e000035.
163. EFSA. Schmallenberg virus: State of art. *EFSA Journal.* 2014;12(5):3681.
164. Elbers AR, Backx A, Meroc E, Gerbier G, Staubach C, Hendrickx G, et al. Field observations during the bluetongue serotype 8 epidemic in 2006. I. Detection of first outbreaks and clinical signs in sheep and cattle in Belgium, France and the Netherlands. *Prev Vet Med.* 2008;87(1-2):21-30.
165. Dal Pozzo F, Saegerman C, Thiry E. Bovine infection with bluetongue virus with special emphasis on European serotype 8. *Vet J.* 2009;182(2):142-51.
166. Barua S, Rana EA, Prodhan MA, Akter SH, Gogoi-Tiwari J, Sarker S, et al. The global burden of emerging and re-emerging Orbiviruses in Livestock: An emphasis on bluetongue virus and epizootic hemorrhagic disease virus. *Viruses.* 2024;17(1).
167. World Organisation for Animal Health (WOAH). Animal Diseases [Available from: <https://www.woah.org/en/what-we-do/animal-health-and-welfare/animal-diseases/>].
168. Gethmann J, Probst C, Conraths FJ. Economic impact of a bluetongue serotype 8 epidemic in Germany. *Front Vet Sci.* 2020;7:65.
169. Clausen PH, Stephan A, Bartsch S, Jandowsky A, Hoffmann-Köhler P, Schein E, et al. Seasonal dynamics of biting midges (Diptera: *Ceratopogonidae*, *Culicoides spp.*) on dairy farms of Central Germany during the 2007/2008 epidemic of bluetongue. *Parasitol Res.* 2009;105(2):381-6.

170. Mayo CE, Mullens BA, Reisen WK, Osborne CJ, Gibbs EP, Gardner IA, MacLachlan NJ. Seasonal and interseasonal dynamics of bluetongue virus infection of dairy cattle and *Culicoides sonorensis* midges in northern California--implications for virus overwintering in temperate zones. PLoS One. 2014;9(9):e106975.
171. Carpenter S, Wilson A, Barber J, Veronesi E, Mellor P, Venter G, Gubbins S. Temperature dependence of the extrinsic incubation period of orbiviruses in *Culicoides* biting midges. PLoS One. 2011;6(11):e27987.
172. Gubbins S, Carpenter S, Baylis M, Wood JL, Mellor PS. Assessing the risk of bluetongue to UK livestock: uncertainty and sensitivity analyses of a temperature-dependent model for the basic reproduction number. J R Soc Interface. 2008;5(20):363-71.
173. Wernike K, Aebischer A, Audonnet JC, Beer M. Vaccine development against Schmallenberg virus: from classical inactivated to modified-live to scaffold particle vaccines. One Health Outlook. 2022;4(1):13.
174. StIKo-Vet. Schmallenbergvirus-Infektionen 2025 [updated 29.08.2025. Available from: https://stiko-vet.fli.de/de/impftabelle/c-rinder/c-1-milchkuehe/schmallenbergvirus-infektionen/?utm_source=chatgpt.com.
175. Stavrou A, Daly JM, Maddison B, Gough K, Tarlinton R. How is Europe positioned for a re-emergence of Schmallenberg virus? Vet J. 2017;230:45-51.
176. Ganter M, Müller K, Böttcher J, Donat K, Gethmann J, Holsteg M, et al. Leitlinie zur Impfung von Rindern und kleinen Wiederkäuern. Leitlinien der Ständigen Impfkommision Veterinärmedizin (StIKo Vet). 3. Auflage ed. Greifswald - Insel Riems: Friedrich-Loeffler-Inst.; 2025.
177. Das Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen (BLV), Verordnung des BLV über Massnahmen zur Verhinderung der Weiterverbreitung der Blauzungenkrankheit 2024 [Available from: https://www.fedlex.admin.ch/eli/cc/2024/473/de#art_2_a.
178. Lysyk TJ, Danyk T. Effect of temperature on life history parameters of adult *Culicoides sonorensis* (Diptera: *Ceratopogonidae*) in relation to geographic origin and vectorial capacity for bluetongue virus. J Med Entomol. 2007;44(5):741-51.
179. Goffredo M, Romeo G, Monaco F, Di Gennaro A, Savini G. Laboratory survival and blood feeding response of wild-caught *Culicoides obsoletus* complex (Diptera: *Ceratopogonidae*) through natural and artificial membranes. Vet Ital. 2004;40(3):282-5.
180. Janjot S, Kataria D, Yadav M, Dahiya N, Sehrawat N. Transovarial transmission of mosquito-borne viruses: a systematic review. Front Cell Infect Microbiol. 2023;13:1304938.
181. Osborne CJ, Mayo CE, Mullens BA, McDermott EG, Gerry AC, Reisen WK, MacLachlan NJ. Lack of evidence for laboratory and natural vertical transmission of bluetongue virus in *Culicoides sonorensis* (Diptera: *Ceratopogonidae*). Journal of Medical Entomology. 2015;52(2):274-7.
182. Wernike K, Holsteg M, Szillat KP, Beer M. Development of within-herd immunity and long-term persistence of antibodies against Schmallenberg virus in naturally infected cattle. BMC Vet Res. 2018;14(1):368.

183. Larska M. Schmallenberg virus: a cyclical problem. *Vet Rec.* 2018;183(22):688-9.
184. Tarlinton R, Daly J, Dunham S, Kydd J. The challenge of Schmallenberg virus emergence in Europe. *The Veterinary Journal.* 2012;194(1):10-8.
185. van den Brom R, Santman-Berends I, van der Heijden MG, Harders F, Engelsma M, van Gennip RGP, et al. Bluetongue virus serotype 12 in sheep and cattle in the Netherlands in 2024 – A BTV serotype reported in Europe for the first time. *Veterinary Microbiology.* 2025;301:110365.
186. Celina SS, King S, Ashby M, Harris K, Polo N, Alishani M, et al. Re-emergence of BTV-4 in sheep farms in Kosovo, 2020: A retrospective study. *Transbound Emerg Dis.* 2023;2023:3112126.
187. Mellor P, Boorman J, Wilkinson P, Martinez-Gomez F. Potential vectors of bluetongue and African horse sickness viruses in Spain. *Veterinary Record.* 1983;112(10):229–30.
188. Aguilar-Vega C, Fernández-Carrión E, Sánchez-Vizcaíno JM. The possible route of introduction of bluetongue virus serotype 3 into Sicily by windborne transportation of infected *Culicoides spp.* *Transbound Emerg Dis.* 2019;66(4):1665-73.
189. Pfeiffer M, Dobler G. Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration. *Parasites & Vectors.* 2010;3(1):35.
190. Liang G, Gao X, Gould EA. Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. *Emerg Microbes Infect.* 2015;4(3):e18.
191. Zhang S, Zhang Q, Zhang H, Liang R, Chen Q, Niu B. Assessing the export trade risk of bluetongue virus serotypes 4 and 8 in France. *Risk Anal.* 2023;43(6):1124-36.
192. Boender GJ, Hagenaars TJ, Holwerda M, Spierenburg MAH, van Rijn PA, van der Spek AN, Elbers ARW. Spatial transmission characteristics of the bluetongue virus serotype 3 epidemic in the Netherlands, 2023. *Viruses.* 2024;16(4).
193. Voigt A, Kampen H, Heuser E, Zeiske S, Hoffmann B, Höper D, et al. Bluetongue virus serotype 3 and Schmallenberg virus in *Culicoides* biting midges, Western Germany, 2023. *Emerg Infect Dis.* 2024;30(7):1438-41.
194. Díaz-Cao JM, López-Lorenzo G, López-Novo C, Díaz P, Remesar S, López C, et al. Description of the clinical findings associated with the epizootic hemorrhagic disease in cattle from northwestern Spain during the emergence. *Transbound Emerg Dis.* 2025;2025:7808243.
195. Calistri P, Goffredo M, Caporale V, Meiswinkel R. The distribution of *Culicoides imicola* in Italy: Application and evaluation of current Mediterranean models based on climate. *Journal of Veterinary Medicine, Series B.* 2003;50(3):132-8.
196. Miranda MA, Borràs D, Rincón C, Alemany A. Presence in the Balearic Islands (Spain) of the midges *Culicoides imicola* and *Culicoides obsoletus* group. *Medical and Veterinary Entomology.* 2003;17(1):52-4.

197. Conte A, Goffredo M, Ippoliti C, Meiswinkel R. Influence of biotic and abiotic factors on the distribution and abundance of *Culicoides imicola* and the Obsoletus Complex in Italy. *Veterinary Parasitology*. 2007;150(4):333-44.
198. Mellor PS, Carpenter S, Harrup L, Baylis M, Mertens PPC. Bluetongue in Europe and the Mediterranean Basin: History of occurrence prior to 2006. *Preventive Veterinary Medicine*. 2008;87(1):4-20.
199. Mellor PS. African horse sickness: transmission and epidemiology. *Vet Res*. 1993;24(2):199-212.
200. Cagienard A, Griot C, Mellor PS, Denison E, Stärk KD. Bluetongue vector species of *Culicoides* in Switzerland. *Med Vet Entomol*. 2006;20(2):239-47.
201. Gao H, Wang L, Ma J, Gao X, Xiao J, Wang H. Modeling the current distribution suitability and future dynamics of *Culicoides imicola* under climate change scenarios. *PeerJ*. 2021;9:e12308.
202. Del Lesto I, Magliano A, Casini R, Ermenegildi A, Rombolà P, De Liberato C, Romiti F. Ecological niche modelling of *Culicoides imicola* and future range shifts under climate change scenarios in Italy. *Med Vet Entomol*. 2024;38(4):416-28.
203. Altamiranda-Saavedra M, Ávila-Jiménez J, Rojas M, Navarro-Mamani DA. Global potential distribution and realized niche conservatism during biological invasion of *Culicoides imicola* from Africa to the Mediterranean basin of Europe. *Acta Trop*. 2025;265:107627.
204. Purse BV, Mellor PS, Rogers DJ, Samuel AR, Mertens PPC, Baylis M. Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nature Reviews Microbiology*. 2005;3(2):171-81.
205. Möhlmann TWR, Vogels CBF, Göertz GP, Pijlman GP, ter Braak CJF, te Beest DE, et al. Impact of gut bacteria on the infection and transmission of pathogenic arboviruses by biting midges and mosquitoes. *Microbial Ecology*. 2020;80(3):703-17.
206. Rodgers FH, Gendrin M, Wyer CAS, Christophides GK. Microbiota-induced peritrophic matrix regulates midgut homeostasis and prevents systemic infection of malaria vector mosquitoes. *PLoS Pathog*. 2017;13(5):e1006391.
207. Joyce JD, Nogueira JR, Bales AA, Pittman KE, Anderson JR. Interactions between La Crosse virus and bacteria isolated from the digestive tract of *Aedes albopictus* (Diptera: *Culicidae*). *J Med Entomol*. 2011;48(2):389-94.

10 Abkürzungsverzeichnis

BTV	bluetongue virus, Blauzungenvirus
<i>C.</i>	<i>Culicoides</i>
EC	Europäische Kommission
EHDV	epizootic hemorrhagic disease virus, Virus der epizootischen Hämorrhagie der Hirsche
ICTV	international committee on taxonomy of viruses
NTR	nicht-translatierende Region
RNA	Ribonukleinsäure
SBV	Schmallenberg-Virus
StIKo Vet	Ständige Impfkommission Veterinärmedizin
TSN	Tierseuchen-Nachrichtensystem

11 Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle die Gelegenheit ergreifen mich für die Beurteilung dieser Arbeit bei Prof. Dr. Markus Meissner sowie den weiteren Gutachtern zu bedanken.

Ich danke meinem Mentor Prof. Dr. Martin Beer für die Möglichkeit der Durchführung der Promotion am Institut für Virusdiagnostik, sowie für die Bereitstellung des Themas und die Unterstützung durch hilfreiche und anregende Gespräche.

Ein besonderer Dank geht an PD Dr. habil. Kerstin Wernike für die umfassende Betreuung und Unterstützung während meiner Zeit als Doktorandin. Ohne ihre Hilfe im Labor, beim Verfassen der Manuskripte, sowie den täglichen Herausforderungen der Promotion, wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Nicht zuletzt möchte ich allen Beteiligten aus dem CeratoVir Plus Projekt, insbesondere den Kooperationspartnern am ZALF und den Mitarbeitern des Labor PD Dr. Helge Kampen für die hervorragende Zusammenarbeit und Unterstützung danken.

Des Weiteren gilt mein aufrichtiger Dank Dr. Franziska Sick für die hervorragende Zusammenarbeit im Labor, für ihre stets hilfreichen Ratschläge in jeglicher Situation und für ihre unschätzbare Freundschaft.

Ich möchte mich außerdem aufrichtig bei den Technischen Mitarbeitern, insbesondere Bianka Hillmann, Uday Gottam und Julien Schäfer für ihre wertvolle Hilfe bei der täglich anfallenden Laborarbeit bedanken.

Abschließend geht ein großer Dank an meine Familie und meinen Freund, ohne deren Unterstützung ich den bisherigen Weg bis zur Promotion nicht hätte meistern können.