



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultad de Ciencias

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Determinación del complejo *Culicoides obsoletus*, vectores de la enfermedad de la lengua azul, mediante técnicas morfológicas y moleculares

Jaume Bonet Estrany

Grado Biología

Año académico 2013 - 14

DNI del alumno: 41539197R

Trabajo tutelado por Claudia Paredes Esquivel
Departamento de Zoología



Se autoriza a la Universidad a incluir mi Trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con finalidades exclusivamente académicas y de investigación

Palabras clave del trabajo: *Culicoides obsoletus*, *Culicoides scoticus*, identificación molecular, PCR, taxonomía.

Índice

Resumen.....	4
Género <i>Culicoides</i>	5
<i>Distribución</i>	5
<i>Cambio climático y distribución de los Culicoides</i>	6
<i>Ciclo vital de los Culicoides</i>	7
<i>Papel como vectores, virus de la lengua azul (VLA)</i>	8
<i>Ciclo de transmisión de la enfermedad</i>	9
Complejo <i>Culicoides obsoletus</i>	10
Objetivo principal del trabajo	11
Materiales y métodos	11
<i>Técnicas de captura</i>	12
<i>Técnicas de identificación morfológica</i>	12
<i>Técnicas de identificación molecular</i>	13
<i>Extracción de ADN</i>	13
<i>Amplificación por PCR múltiple</i>	14
Resultados	16
<i>Identificación morfológica</i>	16
<i>Identificación específica según el patrón alar</i>	17
<i>Identificación molecular</i>	19
Discusión.....	20
Agradecimientos	23
Bibliografía	24
Anexo.....	28

Resumen

Los ejemplares del complejo *Obsoletus* presentan una gran dificultad de diferenciación e identificación, requiriendo la combinación de técnicas morfológicas y moleculares para ello. En el presente estudio se han definido las características taxonómicas más relevantes para la identificación de los *Culioides*. Por otro lado, mediante PCR se ha amplificado la región ITS-1 del ARNr, zona muy conservada del ADN, con la finalidad de determinar con exactitud las especies que forman el complejo *Obsoletus*.

Los resultados revelan que en las Islas Baleares se presenta una densidad muy elevada de *C. obsoletus*, con respecto a las demás especies del complejo *Obsoletus*. Considerando que *C. obsoletus* actúa como vector de la lengua azul, en el caso de que se registre un brote de dicha enfermedad en las Islas Baleares, el riesgo de transmisión sería elevado.

Género *Culicoides*

El género *Culicoides* forma parte de un grupo de dípteros hematófagos de la familia Ceratopogonidae implicados en la transmisión de hasta 50 enfermedades de importancia veterinaria como son la lengua azul, peste equina, enfermedad hemorrágica hepática, algunas enfermedades provocadas por protozoos de los cuales actúan como vectores, filariosis (Mellor *et al.*, 2000) y determinados virus de incidencia en humanos y animales domésticos (Pages *et al.*, 2009; J. M. Schwenkenbecher *et al.*, 2009; Venter *et al.*, 2009).

Actualmente se han descrito alrededor de 1300 especies de *Culicoides* (C Garros *et al.*, 2010; Talavera *et al.*, 2011), de las cuales unas 30 se encuentran implicadas en la transmisión de las enfermedades anteriormente comentadas.

A causa de la gravedad de las enfermedades que transmiten, la identificación de los *Culicoides* es un asunto de vital importancia, para ello se combinan técnicas morfológicas y moleculares.

Distribución

Se ha reportado la presencia de *Culicoides* en la mayor parte del planeta (Figura 1), exceptuando zonas polares o algunas regiones donde se alcanzan temperaturas extremas como es el caso de Patagonia (Mellor *et al.*, 2000; Mellor & Leake, 2000). En las zonas geográficas donde están presentes, suelen habitar zonas cálidas y húmedas y con una elevada cantidad de materia orgánica, la cual es importante para el desarrollo de los estadios juveniles (Wittmann & Baylis, 2000)

La distribución de las poblaciones de *Culicoides* se encuentra fuertemente modulada por factores ambientales (Mellor *et al.*, 2000; Wittmann & Baylis, 2000; Purse *et al.*, 2006), entre los que destacan:

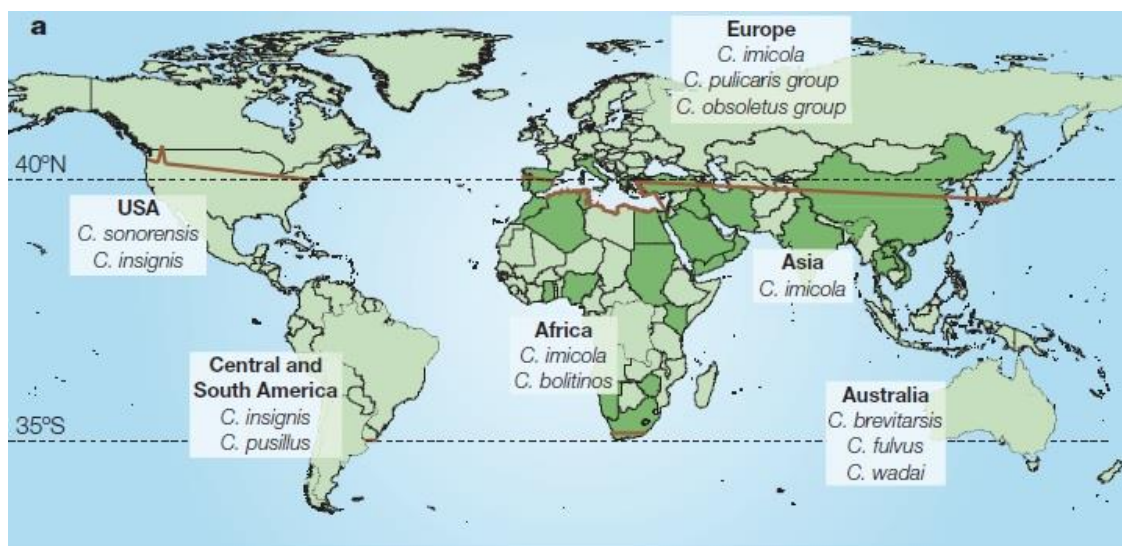


Figura 1. Distribución de las diferentes especies del género *Culicoides* implicadas en la transmisión de la lengua azul. Se resalta con un color verde más oscuro los países en los que se ha detectado la presencia de *C. imicola* – considerado como el vector más antiguo de la enfermedad de la lengua azul –. También se resalta con una línea marrón los límites de la distribución de la lengua azul en 2006: (Purse *et al.*, 2006).

- Temperatura: Principal factor que modula de forma directa la actividad y velocidad del ciclo biológico. La actividad de dichos organismos se establece entre los 12.6 °C y los 32 °C, aunque los mayores índices de actividad registrados se encuentran entre los 18 °C y 29 °C (Sellers & Mellor, 1993)
- Humedad: Los *Culicoides* precisan de un ambiente húmedo y suelos fangosos para el desarrollo de los estadios juveniles.
- Precipitaciones: Factor que puede actuar de forma indirecta, provisionando a los *Culicoides* de nuevas zonas de cría al aumentar la proporción de suelos fangosos (Wittmann & Baylis, 2000).
- Viento: Factor que facilita la dispersión de los *Culicoides* por lo que se conoce como difusión pasiva (Calvete *et al.*, 2008). Según (Mellor *et al.*, 2000) los *Culicoides* adultos pueden recorrer hasta 700 kilómetros en una sola noche mediante ráfagas de viento suaves (10 – 40 km/h). Por otra parte, el mismo estudio muestra como vientos fríos son perjudiciales para las formas adultas que no soportan largas exposiciones a temperaturas bajas.

Cambio climático y distribución de los Culicoides

Según Purse *et al.* (2006), en las zonas donde se presentan veranos muy calurosos o inviernos muy fríos, la densidad de los *Culicoides* se ve reducida drásticamente. Por otro lado, cuanto las temperaturas son cálidas, pero no muy elevadas (alrededor de los 28°C), la actividad de dichos individuos se ve incrementada.

El calentamiento global experimentado el último siglo ha beneficiado la expansión de los *Culicoides* incrementado su ritmo del ciclo vital, Por otro lado, al mismo tiempo que el incremento de la temperatura ha permitido la colonización de nuevos sitios que antes eran muy fríos para *Culicoides*, ha limitado su expansión en zonas que antes presentaban una temperatura más moderada y que ahora superan el intervalo térmico que pueden soportar.

Ciclo vital de los Culicoides

Los *Culicoides* presentan un ciclo de vida holometábolo de duración variable (2 – 6 semanas), en función de la temperatura ambiental (Figura 2).

- Huevo: La puesta se realiza sobre un sustrato húmedo. Los huevos presentan unas dimensiones de 400 µm de largo por 50 µm de ancho, con un tono blanco al inicio de la deposición que rápidamente vira a un tono más oscuro. Estos eclosionan en un período de 2 a 4 días, en función de la temperatura.
- Larva: Las larvas pasan cuatro estadios (Carpenter *et al.*, 2013). En conjunto, la etapa larval puede durar entre 12 y 16 días dependiendo de la temperatura.
- Pupa: La duración de este estadio suele oscilar entre los 2 – 3 días, aunque al igual que los anteriores, depende de la temperatura ambiental. Las pupas de la mayoría de *Culicoides* flotan, pudiendo sobrevivir a las inundaciones del suelo, aunque especies concretas como *C. imicola* no poseen dicha capacidad (Calvete *et al.*, 2008).
- Imago: Fase final del ciclo donde se puede apreciar el *Culicoides* adulto. Las hembras necesitan alimentarse de sangre para conseguir las proteínas necesarias para la maduración de los huevos (Wittmann & Baylis, 2000), actuando así como vectores de las diferentes enfermedades asociadas a ellos (Mehlhorn *et al.*, 2007; Coetzee *et al.*, 2012).

El ciclo vital de los *Culicoides* se encuentra modulado principalmente por la temperatura y humedad ambiental (Guis *et al.*, 2012; Gonzalez *et al.*, 2013). Se ha determinado que en zonas templadas su ciclo vital no dura más de 7 días. Por otra parte, en lugares donde las temperaturas no son tan favorables, el ciclo puede tardar hasta 7 meses en completarse sin que se conozcan con claridad los motivos de este cambio temporal (Conte *et al.*, 2007). Algunos estudios sugieren que este retardo se debe a un alargamiento de la fase larvaria durante el periodo de condiciones desfavorables (Mellor *et al.*, 2000; Wittmann & Baylis, 2000), mientras que otros autores sugieren cuando las condiciones adversas no son tan extremas como para erradicar las poblaciones de adultos, se reduce su actividad incrementando su esperanza de vida (Goffredo & Meiswinkel, 2004).

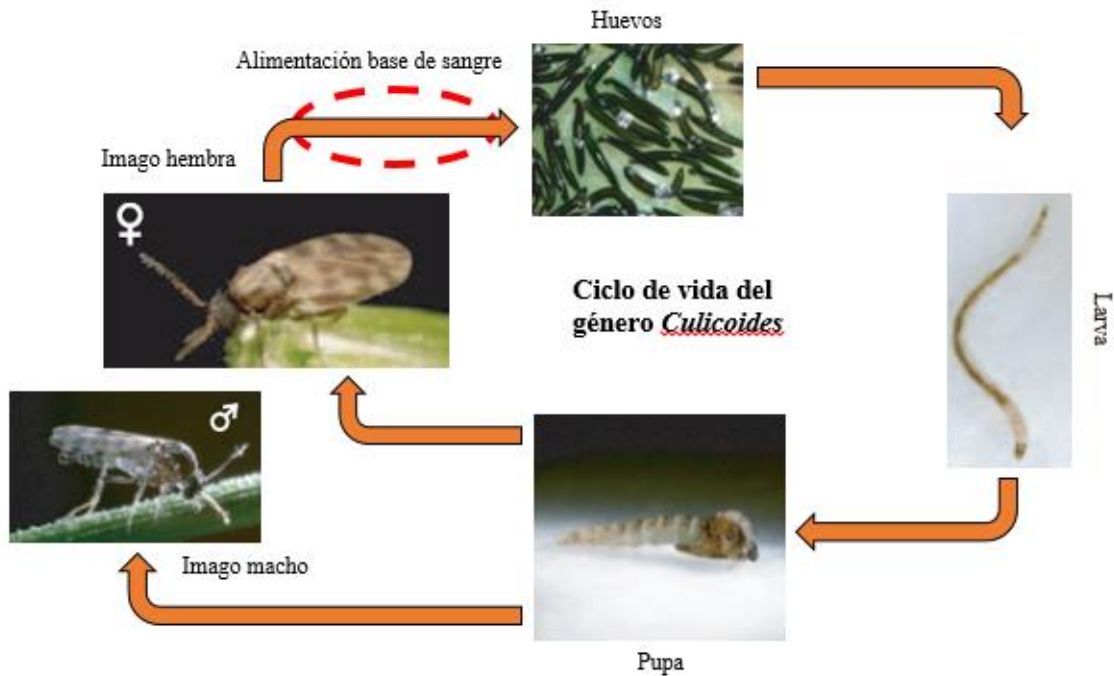


Figura 2. Esquema del ciclo de vida de *Culicoides*. Las hembras son las que se alimentaran de sangre durante la maduración de los huevos

La actividad de la mayoría de *Culicoides* se registra durante la noche (Purse *et al.*, 2006), localizando el pico de actividad durante la puesta de Sol. Aun así, hay algunas especies como *Culicoides heliophilus* (Edwards, 1921) y *Culicoides paraensis* (Goeldi, 1905), que presentan una elevada actividad diurna (Carpenter *et al.*, 2013).

Papel como vectores, virus de la lengua azul (VLA)

Como se ha comentado anteriormente, algunos de los ejemplares del género actúan como vectores de múltiples virus, dentro de los cuales se encuentra el de la lengua azul.

La lengua azul es una enfermedad vírica, no contagiosa, transmitida por vectores. Los huéspedes principales de esta son los rumiantes domésticos, como ganado bovino, ovino o caprino, aunque también se ha detectado en rumiantes salvajes como el ciervo (Balczun *et al.*, 2009; Coetzee *et al.*, 2012).

El virus ha ido mutando hasta presentar un total de 24 serotipos (Figura 3) con distintas características y patogeneicidad (N. James Maclachlan, 2011) que se distribuyen en diferentes zonas del planeta (Walton, 2004).

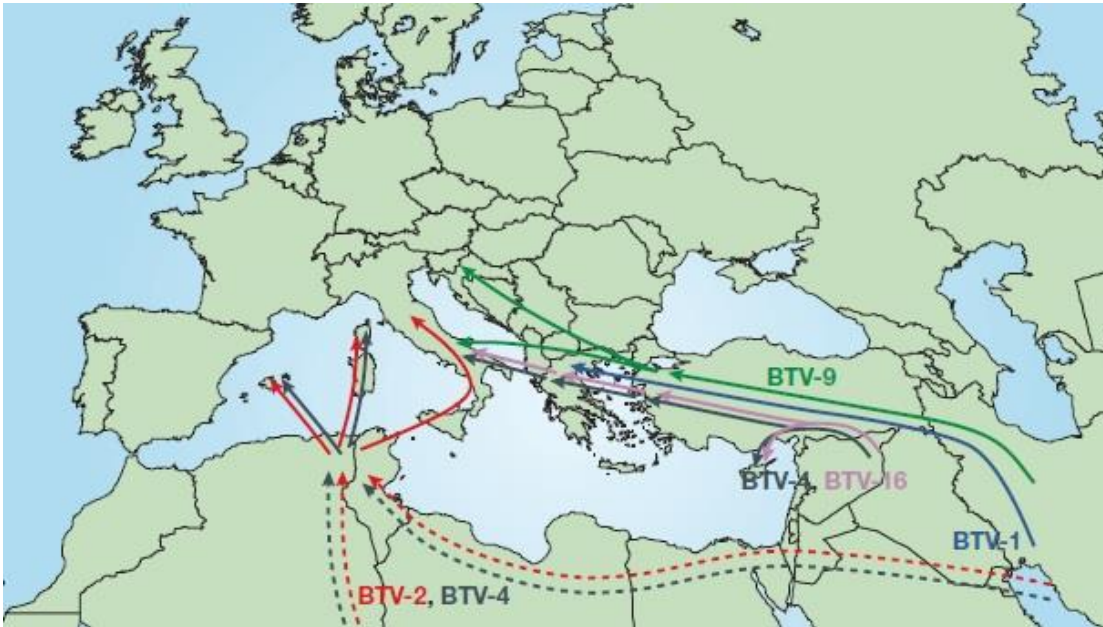


Figura 3. Evolución y distribución de los diferentes serotipos del virus de la lengua azul en Europa. (Purse *et al.*, 2006)

El primer reporte del virus de la lengua azul (VLA) se localiza en Sur África (Walton, 2004). Actualmente, la lengua azul se considera una enfermedad endémica de las latitudes tropicales y subtropicales (N. J. MacLachlan, 2004), aunque durante las últimas décadas se han registrado diferentes brotes en latitudes superiores probablemente debido al calentamiento global del planeta, lo que sugiere una propagación del virus hacia estas zonas (Nolan *et al.*, 2007).

Ciclo de transmisión de la enfermedad

El VLA presenta ciclos alternos de replicación entre hospedadores vertebrados e invertebrados. El virus es transmitido entre ambos organismos mediante la picadura de distintas especies de *Culicoides*.

El ciclo de transmisión (Figura 4) se inicia con la picadura de un *Culicoides* infectado a un animal susceptible, transmitiendo el virus a través de la saliva que inocula en la picada. El virus pasa al torrente sanguíneo del animal vertebrado donde se multiplica (Viremia).

Si un *Culicoides* (vector) se alimenta de un animal virémico, además de ingerir células sanguíneas también ingiere el virus, que pasa al tubo digestivo del insecto. En la mayoría de casos, el virus será eliminado por las heces, aunque en determinados ejemplares, este es capaz de atravesar las paredes del tubo digestivo y multiplicarse en la hemolinfa, colonizando los demás tejidos del insecto hasta infectar las glándulas salivares. Una vez el virus se multiplica en las glándulas salivares, el *Culicoides* es capaz de transmitirlo nuevamente a un huésped vertebrado a través de su picada.

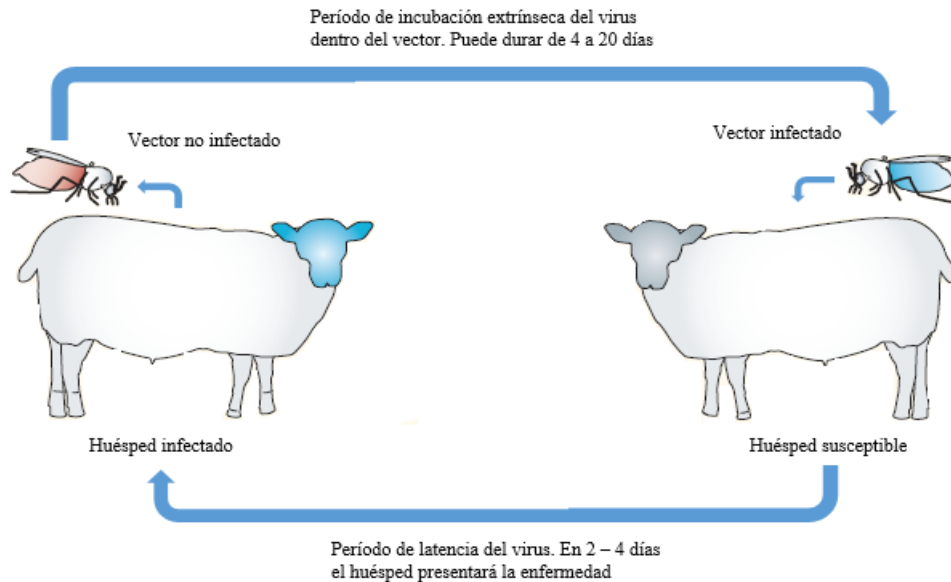


Figura 4. Ciclo de transmisión del virus de la lengua azul en el huésped (período de latencia) y en el vector (período de incubación extrínseca).

Complejo *Culicoides obsoletus*

El término ‘Complejo’ hace referencia a un grupo de especies las cuales presentan una similitud morfológica muy elevada (Nolan *et al.*, 2007). A causa de esta característica, es muy difícil diferenciar las que pertenecen a una especie de otra, requiriendo para dicha identificación técnicas moleculares o unos conocimientos muy avanzados sobre la taxonomía de la especie estudiada.

Referente a los complejos del género *Culicoides*, solo son separables los machos mediante las diferencias aparentes en la genitalia, por otra parte, las hembras presentan una taxonomía idéntica que limita su identificación (Calvete *et al.*, 2008).

El complejo *Culicoides obsoletus* clásico consta de las siguientes especies; *Culicoides obsoletus* (Meigen, 1830), *Culicoides montanus* (Shakirzjanova, 1962), *Culicoides scoticus* (Downes & Kettle, 1952), *Culicoides dewulfi* (Goethebuer, 1936), y *Culicoides chiopterus* (Meigen, 1830), (Balczun *et al.*, 2009; Brugger & Rubel, 2013).

Actualmente hay diferentes posturas frente a las especies que se deberían incluir dentro del complejo. Autores como J. M. Schwenkenbecher *et al.* (2009) defienden que la especie *C. dewulfi* no debe formar parte del complejo ya que a pesar de que presenta una distribución similar a las otras especies que lo conforman, su morfología y comportamiento difiere de estas (J. M. Schwenkenbecher *et al.*, 2009).

Esta postura también es defendida, y ampliada, por Claire Garros *et al.* (2014) indicando que únicamente las especies *C. obsoletus* y *C. scoticus* deberían ser consideradas como integrantes del complejo (Claire Garros *et al.*, 2014).

Las especies que conforman el complejo *Culicoides obsoletus* presentan un mayor grado de adaptación que otras especies del género a zonas frías, ya que, a pesar de tener como temperatura óptima de crecimiento entre 25-29°C, se han encontrado miembros del complejo en altitudes superiores a 2000 metro, con temperaturas muy bajas (Conte *et al.*, 2007).

Las zonas de cría de las especies del complejo *Obsoletus* son muy difíciles de determinar puesto que pueden depositar los huevos en cualquier lugar que presente humedad suficiente. Aun así, diferentes estudios indican la preferencia de zonas húmedas, donde la vegetación sea abundante y el suelo húmedo (Conte *et al.*, 2007; Calvete *et al.*, 2008).

Objetivo principal del trabajo

El objetivo de este trabajo es determinar mediante técnicas moleculares y morfológicas las especies del complejo *Culicoides obsoletus*. La importancia de la determinación radica en la necesidad de determinar con exactitud qué implicación tiene cada una de las especies en la transmisión del virus de la lengua azul (VLA).

Mediante este conocimiento, combinado con censos locales, se puede elaborar un mapa con la distribución geográfica de estos, indicando las zonas de riesgo de las enfermedades transmitidas por los mismos.

Materiales y métodos

Los ejemplares utilizados para la identificación morfológica y molecular se capturaron con trampas de luz ultravioleta Onderstepoort (OVI – ARC, Onderstepoort, Sudáfrica,) (Figura 5) ubicadas en la finca ganadera “Ca’s Boter” (Mallorca, España, 39° 30’ N; 3° 7’ E).

Estas trampas están provistas de un tubo de luz UV azulada que atrae a los. Para la captura dispone de un ventilador que succiona a los insectos hasta un bote localizado en la parte inferior de 500 ml.

Para evitar la recogida de insectos de gran tamaño, una malla de poliéster de 2 mm de paso se colocó alrededor de la fuente de luz.

Técnicas de captura

Las trampas fueron colocadas a una altura de 1,5 – 2 metros de altura, cerca de los animales presentes en la granja con una separación de 20 metros entre trampa y trampa. Los muestreos se realizaron desde el atardecer hasta el amanecer.

Los ejemplares capturados fueron seleccionados e identificados como *Culicoides*, basándose en la nerviación y patrón alar. También se realizó una distinción entre machos y hembras.

Por otro lado, debido a su similitud morfológica, las especies *C. obsoletus*, *C. scoticus* y *C. montanus* se identificaron inicialmente como pertenecientes al complejo *Obsoletus*

Finalmente los ejemplares se conservaron en etanol 70% para su posterior identificación específica

Técnicas de identificación morfológica

Los ejemplares usados para la identificación morfológica fueron capturados durante la primera quincena de junio del 2013.

Las observaciones se realizaron mediante el uso de una lupa binocular adaptada a una cámara digital.

La identificación específica de los *Culicoides* se centró en la observación del patrón alar, puesto que la pigmentación de estas conforman las principales características distintivas entre las especies dentro del género estudiado (Rawlings, 1996; Goffredo & Meiswinkel, 2004). Para asociar los patrones y coloración de las alas a una determinada especie, se utilizó la clave dicotómica elaborada por Rawlings (1996).

Aunque no se realizó en el presente estudio, la identificación morfológica también se basa en la observación de otras estructuras anatómicas que difieren entre especies; patrón en el lado dorsal del tórax, tamaño y forma de los segmentos que componen las antenas, distribución de los pozos sensoriales



Figura 5. Trampa Onderstepoort modelo; OVI – ARC, Onderstepoort, Sudáfrica, situada en la finca “Ca’s Boter”, Mallorca, España (39° 30’ N; 3° 7’ E), utilizada para la captura de los para el estudio.

a lo largo de las antenas, posición relativa de los ojos, número de espermatecas en las hembras y forma de la genitalia de los machos (Rawlings, 1996; C Garros *et al.*, 2010).

Técnicas de identificación molecular

El pequeño tamaño de los *Culicoides*, es necesario realizar disecciones y preparaciones microscópicas de las diferentes regiones taxonómicas. Incluso así, las diferencias morfológicas no son siempre evidentes (C Garros *et al.*, 2010), por lo que se requiere su complementación con técnicas moleculares.

Las técnicas moleculares facilitan la identificación cuando las morfológicas no pueden aportar una clasificación clara (J. Schwenkenbecher *et al.*, 2009). Estas técnicas se basan en regiones de ADN que presentan una elevada homología, como la secuencia de la subunidad I de la citocromo oxidasa mitocondrial (COI) (Nolan *et al.*, 2007).

Por otra parte, el ARNr presenta un gran número de repeticiones localizadas en una cadena larga. Cada repetición consta de los genes ribosómicos 18S, 5.8S y 28S. Estos genes se encuentran separados mediante espaciadores internos transcritos 1 y 2 (ITS1; ITS2), la amplificación de los cuales mediante cebadores específicos puede ser útil para la identificación de las especies que conforman un complejo (Cetre-Sossah *et al.*, 2004; Mathieu *et al.*, 2007)

Aunque inicialmente se consideraba que la región del ARNr ITS2 también podría ser útil para la clasificación de las especies del complejo *Obsoletus*, posteriormente fue descartada debido a homologías detectadas entre la secuencia genética de las especies del complejo (Gomulski *et al.*, 2006; Pages *et al.*, 2009).

En el presente estudio se compararon las regiones ITS1 del ARNr de diferentes especies del complejo *Obsoletus*, seleccionadas mediante cebadores específicos para las especies del complejo (Tabla 1). Previamente a la comparación, se practicó una extracción de ADN de ejemplares del complejo seleccionados en base al patrón alar característico de estos.

Se seleccionaron un total de 17 ejemplares del complejo *Obsoletus*, además de un ejemplar de *Culicoides circumscriptus* Kieffer, 1918 como control negativo.

Extracción de ADN

Se preparó un buffer, con un volumen final de 100 μ L, de cada compuesto comentado a continuación:

- **Tris-HCl 10 mM**: Tampón biológico, cuya función es la de mantener el pH de la solución constante (alrededor de pH 8).
- **EDTA 50 mM**: Agente quelante que protege el DNA de la acción de las nucleasas.

- NaCl 25mM: Incrementan el poder iónico de la solución, ocasionando la precipitación del DNA.
- 500 µL H₂O milliQ
- 20 µL Proteína K: Produce lisis celular y digestión de las proteínas intracelulares.

Se distribuyeron 50 µL del buffer en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, los ejemplares fueron machacados con ayuda de un pestle con la finalidad de facilitar la liberación de DNA del insecto.

El lisado obtenido se mantuvo durante 30' en un baño maría a 37 °C, temperatura a la cual la proteína K presenta un rendimiento óptimo y facilita la liberación del DNA de los tejidos del *Culicoide*. Transcurridos los 30' se inhibió la actividad de dicha proteína exponiendolo a 85 °C durante 10'.

Finalmente se centrifugó a 8.000 rpm durante 10', velocidad suficiente para que sedimenten los precipitados sólidos pero no el DNA. Se recuperaron 22 µL del sobrenadante, y se introdujeron en otro tubo de microcentrífuga de 1,5 mL.

Mediante técnicas de espectrofotometría (NanoDrop 2000), se verificó que la concentración era la adecuada (> 10 µm/µl) para realizar la PCR.

Amplificación por PCR múltiple

Para cada muestra de DNA se elaboró un "Master Mix", con un volumen final de 25 µl, utilizando los compuestos siguientes:

- 1,5 mM MgCl₂
- 250 µM dATP
- 250 µM dCTP
- 250 µM dGTP
- 250 µM dTTP
- 20 pmol de los siguientes primers:
 - o Obs-sensu stricto-R
 - o Obs-sensu lato-R
 - o Dewulfi-R
 - o Chinopterus-R
- 40 pmol del siguiente primer:
 - o Montanus-R
- 60 pmol del siguiente primer:

- Pan CulF
- 2.5 U TaqDNA
- 1 µl DNA genómico

Los cebadores utilizados identifican cuatro especies del complejo *Obsoletus* (Tabla 1).

Primer	Longitud (bases)	T. Act (°C)	Secuencia
PanCulF	20	53,6	5'-GTAGGTGAACCTGCGGAACC-3'
Obs-sl-R	21	55,6	5'-TGAATCACAGCACCCGCTTAA-3'
Obs-ss-R	30	55,7	5'-ATCTTGATAAAAAATCAATGCATACTCAGT-3'
Dewulfi-R	36	54,7	5'-CACACCATACACTATATAAGAATACATCATTATATT-3'
Montanus-R	20	59,2	5'-CGAGCTGCAATGCCCAATGA-3'
Chinopterus-R	21	56,4	5'-CGAGCTGCTATACCGAAGCAT-3'

Tabla 1. Secuencia de nucleótidos, temperatura de activación y longitud de los cebadores usados para la PCR múltiple.

La PCR fue realizada mediante los siguientes ciclos:

- 1 ciclo a 94°C durante 5'
- 30 ciclos
 - 94°C durante 1'
 - 61°C durante 1'
 - 72°C durante 1'
- 1 ciclo a 72°C durante 10'

Una vez finalizada la PCR los datos fueron analizados mediante una electroforesis con un gel de agarosa del 2,5% al que se le añadió 0,0625% de bromuro de etidio.

Resultados

Identificación morfológica

La identificación morfológica revela dimorfismos entre machos y hembras (Figura 6). Una diferenciación rápida de estos organismos se basa en la presencia de espermatecas (hembras) o genitalia (machos), aun así también se pueden diferenciar por la morfología general del cuerpo, donde los machos presentan un abdomen más alargado respecto al de las hembras, el cual presenta una estructura más redondeada.

Otra de las diferencias entre machos y hembras son las antenas. Estas son plumadas en los machos, característica ausente en las hembras.



Figura 6. a) Imagen de una hembra de la especie *C. obsoletus*. b) Imagen de un macho de la especie *C. obsoletus*. c) Imagen donde se observan las espermatecas de las hembras de *C. obsoletus*. d) Imagen donde se observan los genitales de un macho de *C. obsoletus*. e) Antenas de una hembra *C. obsoletus*. f) Antenas de un macho *C. obsoletus*. En las imágenes se puede apreciar como el macho presenta un abdomen más estrecho y alargado respecto al de las hembras, el cual presenta una simetría más redondeada. También se pueden diferenciar las vellosidades presentes en las antenas de los machos pero no en las de las hembras.

Otro carácter que presenta diferencias entre machos y hembras es la pigmentación alar (Figura 7), siendo las hembras las que presentan una coloración más intensa respecto a la que se observa en los machos.

En general, esta característica dificulta la identificación entre las diferentes especies, sobre todo entre las especies que presentan una pigmentación parecida.

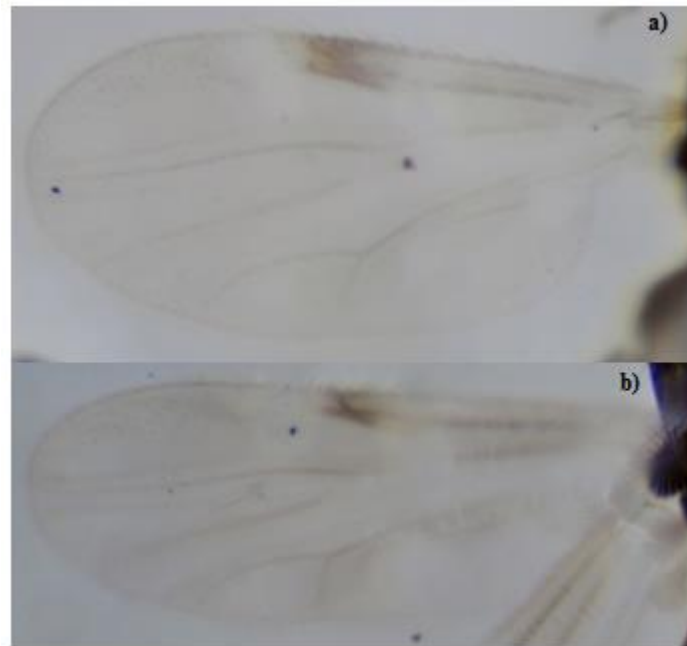


Figura 7. a) Imagen del ala una hembra de la especie *C. obsoletus*, donde se puede apreciar el patrón alar característico de esta especie. b) Ala de un macho de la especie *C. obsoletus*. En comparación con el ala de la hembra (a) se presenta una pigmentación más tenue, menos definida, la que dificulta el proceso de identificación de estos.

A pesar de que los machos presentan una pigmentación alar más tenue, los que conforman el complejo *Obsoletus* son identificables fácilmente a nivel morfológico, principalmente por las diferencias entre la genitalia de estos.

Identificación específica según el patrón alar

El patrón alar (Figura 8) es útil para la diferenciación de los *Culicoides* de otros Ceratopogónidos, utilizando como herramienta identificativa el patrón de nerviación. Por otra parte, en función de la pigmentación expresada en los compartimentos que definen los nervios también se puede realizar una distinción de las especies presentes dentro del género *Culicoides*.

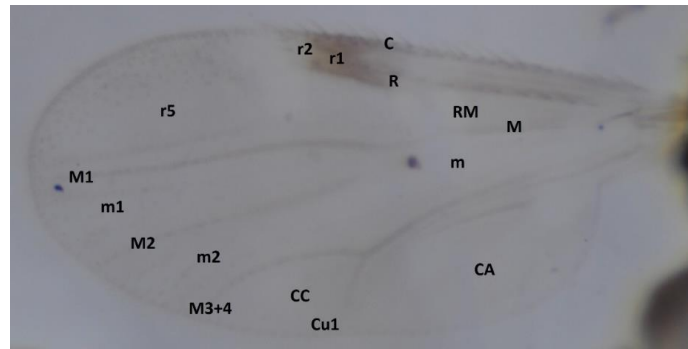


Figura 8. Ala de una hembra de la especie *C. obsoletus*, donde se representan las partes de las alas, usadas para su identificación morfológica. Las partes indicadas son las siguientes; **C:** vena costal; **R:** vena radial; **RM:** vena transversal; **M:** vena medial; **M1:** primera vena medial; **M2:** segunda vena medial; **M3+4:** vena medial 3+4; **Cu1:** primera vena cubital; **r1:** primera celda radial; **r2:** segunda celda radial; **r5:** quinta celda radial; **m:** celda medial; **m1:** primer celda medial; **m2:** segunda celda medial; **CC:** celda cubital; **CA:** celda anal. *Fuente:* (Rawlings, 1996)

Basándonos en la clave dicotómica propuesta por Rawlings (1996), se identificó el patrón alar característico del complejo *Obsoletus* (Figura 9).



Figura 9. a) Ala de hembra de la especie *C. obsoletus*. Se aprecia una coloración parda no muy intensa a lo largo del ala, sobre todo en las partes próximas al ápice. Se distinguen unas manchas de color blanco, sin bordes definidos, dominantes en la zona próxima al tórax del animal. Se puede observar una pigmentación más clara en el centro de la celda **r2**, característica que juntamente con el patrón poco definido de las manchas blancas es una característica distintiva de esta especie. b) Esquema del ala de un *C. obsoletus* donde se pueden diferenciar los patrones de manchas blancas.

Las alas del complejo *Obsoletus* presentan una coloración predominantemente oscura, con algunas zonas blancas, sin bordes definidos repartidas entre las celdas **r5**, **m**, **CA** y **CC**. Las manchas blancas son más frecuentes en las zonas más próximas al tórax del animal, dando lugar a una coloración más clara a las zonas del ala más próximas al insecto, mientras que las zonas próximas al ápice presentan un color pardo más oscuro. Por otro lado, la celda **r2** presenta un color muy oscuro, el cual también envuelve la celda **r1**, aunque no toda, restando la parte del centro con un color más claro.

Se tratan de alas con nervios definidos, característica que permite una fácil diferenciación de las celdas que forman el ala.

Identificación molecular

Una vez realizadas las extracciones de ADN de los ejemplares seleccionados, se calcularon las concentraciones de este, obteniéndose los siguientes resultados (Tabla 2).

Muestra	Concentración (µg/µl)
1	13,5
2	32,8
3	39,6
4	45,8
5	23,8
6	13,4
7	18,2
8	26,3
9	15,7
10	20,4
11	14
12	45,1
13	27
14	15,2
15	17,8
16	23,3
17	12,2

Tabla 2. Concentraciones de la extracción de ADN. Se pueden observar tres concentraciones, marcadas en gris, con valores elevados (>39 µg/µl) en las muestras 3, 4 y 12.

Las concentraciones de ADN han sido las esperadas, aunque en dos de las muestras, 3, 4 y 12, presenta un valor $> 39 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, lo que supone un valor muy elevado con respecto a los demás.

Por otra parte, la amplificación de la región ITS-1 del ARNr de los ejemplares, presentó los siguientes resultados (Figura 10).

La técnica mostró resultados en 12 de las 17 muestras ensayadas. En la mayoría de los resultados obtenidos se puede apreciar el mismo patrón de bandas, este se conforma por tres bandas claras; 460 pares de bases; 300 pares de bases y 160 pares de bases. Por otro lado, la muestra 3 difiere del patrón de bandas característico de las demás muestras, observando solo una banda, aunque muy difusa, en las 160 pares de bases.

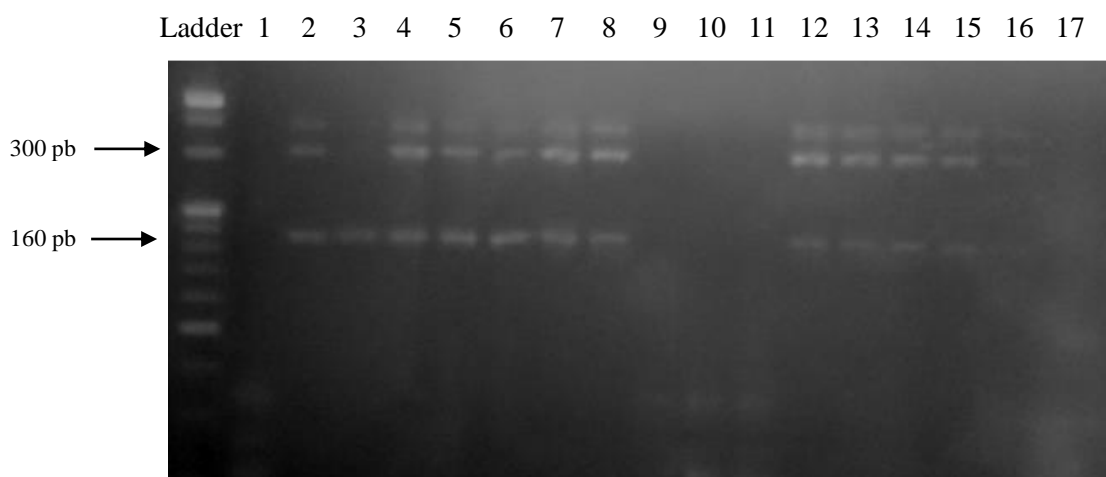


Figura 10. Resultado del análisis de PCR múltiple de ejemplares adultos del complejo *Culicoides obsoletus*. Se amplificó el segmento ITS-1 ARNr. El ladder es de 20 pb. Las muestras 1, 9 – 11 no determinan ningún patrón de bandas, por otro lado las muestras 2, 4 – 7, 12 – 16 sí lo definen.

Discusión

La identificación morfológica de un complejo de *Culicoides* precisa una gran experiencia de la taxonomía de las especies que lo conforman, lo que requiere muchos años de dedicación. Entre machos y hembras *Culicoides*, se han determinado algunos dimorfismos sexuales en las antenas, aparato reproductor y morfología general del cuerpo, lo que facilita la distinción entre sexos.

Aun así, los machos del complejo *Obsoletus* son los que presentan mayor facilidad de identificación, sobre todo por las diferencias que presentan en la genitalia.

Una forma clásica de distinguir las especies *Culicoides*, entre ellas y entre los demás Ceratopogónidos, se basa en la nerviación alar (característica usada para la diferenciación de los demás Ceratopogónidos) y en la pigmentación presente en cada celda (característica usada para la diferenciación entre especies de *Culicoides*). Aun así como se ha comentado anteriormente, al tratarse

de complejos de especies donde la taxonomía es muy similar entre las especies, se requiere un experto en dicha taxonomía, lo cual requiere años de formación (Rawlings, 1996).

Puesto que el virus de la lengua azul se expande a gran velocidad, se precisan identificaciones rápidas de las especies que se sospecha que pueden actuar como vectores. Esta necesidad derivó en el uso de técnicas moleculares, las cuales son rápidas, fiables y no requirieron un elevado grado de conocimiento de la taxonomía de los *Culicoides*.

Las extracciones de ADN para la identificación molecular presentan una concentración final de material genético aceptable. Tres muestras presentan una concentración elevada de ADN respecto a las demás (>39 µg/µl). Puesto que se utilizó la misma solución de digestión para todas las muestras, el incremento de concentración no se relaciona con una mayor concentración de ningún reactivo utilizado para este fin.

Las concentraciones elevadas se podrían atribuir a una mayor eficiencia en el machacado del insecto con el pestle, favoreciendo la liberación de ADN. Aun así, el tamaño y el estado de conservación del insecto también pueden desarrollar un papel importante.

La amplificación de la región ITS-1 del ARNr presentó resultados en 12 muestras, ocasionando errores en 5 de ellas. Se contemplan diferentes motivos por los cuales 5 de las muestras no han amplificado; en primer lugar las especies seleccionadas inicialmente por el patrón alar, podrían no corresponder a las especies presentes dentro del complejo *Obsoletus*, en cuyo caso los cebadores no presentarían ningún lugar de unión al ADN y no amplificarían ningún segmento. Por otro lado, también se considera que la máquina de PCR no funcione correctamente.

Por otra parte, las muestras que amplificaron correctamente la región ITS-1 del ARNr, revelaron dos patrones de bandas. Contrastando los resultados con los de Mathieu *et al.* (2007) la muestra que solo presenta una banda en los 160 pb hace referencia a la especie *Culicoides scoticus*. Por otra parte, el patrón de la mayoría de las demás muestras no coincide con ninguno de los detectados por el mismo.

Llama la atención que dos de las tres bandas del patrón (160 pb; 300 pb), coinciden con las del autor anterior, lo que intuye que la banda observada a los ~ 460 pb se puede atribuir a un posible error.

La ausencia de un control positivo, que defina el patrón de *C. obsoletus*, evita que se pueda afirmar con absoluta seguridad, que las muestras que presentan este patrón de tres bandas correspondan a esta especie.

Una posible causa de la banda ~ 450 pb podría deberse a una elevada concentración de ADN en el momento de realizar la amplificación, aunque también se puede deber a una poca especificidad de los cebadores para la cadena de ADN.

Para corregir el error, se tendrían que realizar nuevas amplificaciones, incrementando la temperatura de hibridación del ADN, hasta un máximo de 65 °C durante 1 minuto o por el contrario, reducir el ciclo de hibridación a 30 segundos a la misma temperatura que se ha utilizado en el presente trabajo (61 °C). Mediante el incremento de la temperatura o la reducción temporal del ciclo, se espera que los cebadores se unan de una manera más específica al ADN, amplificando únicamente los segmentos con una mayor tasa de homología.

Al presentar una selección más específica, no se debería observar la banda ~ 460 pb, en cuyo caso se podría afirmar que las especies analizadas corresponden con *C. obsoletus*.

Suponiendo que las muestras que presentaban el patrón de tres bandas corresponden a la especie *C. obsoletus*, se identificaron 11 *C. obsoletus* y 1 *C. scoticus*, sugiriendo una densidad elevada de *Culicoides obsoletus* respecto de las demás especies del complejo.

Contrastando los resultados observados con los de Miranda *et al.* (2004) y del Rio *et al.* (2013) – los cuales afirman que la densidad máxima registrada del complejo Obsoletus en las Islas Baleares data durante el final de la primavera e inicio del verano – podemos afirmar que la mayor parte de los insectos del complejo Obsoletus capturados en las Islas Baleares, corresponderán a la especie *C. obsoletus*.

Diferentes estudios definen a la especie *Culicoides imicola* Kieffer, 1913 como el primer vector del virus de la lengua azul (Purse *et al.*, 2006). Aun así, en zonas donde *C. imicola* está ausente pero no lo está el complejo Obsoletus se ha registrado el virus de la lengua azul (Calvete *et al.*, 2008; Guis *et al.*, 2012). Indicando que los ejemplares del complejo Obsoletus también actúan como vectores del virus (Mehlhorn *et al.*, 2007).

Considerando los porcentajes de densidad poblacional interpretados en el presente trabajo y que los insectos del complejo Obsoletus actúan como vectores de la lengua azul, podemos determinar que el riesgo de transmisión del virus en las Islas Baleares, en el caso de que se declarase un brote, sería elevado.

Es necesario comentar que aunque se han cumplido los resultados esperados, para poder ofrecer resultados fiables, se tendrían que analizar molecularmente un mayor número de ejemplares, para así determinar con exactitud que especies concretas del complejo *Obsoletus* se encuentran en Mallorca, al igual que la proporción de estas. Con este conocimiento, se puede elaborar un mapa más específico de las zonas que presentarían un riesgo más elevado de transmisión de la lengua azul en el caso de que se declarara un brote en las Islas Baleares.

En el presente trabajo se han identificado las características más relevantes de la taxonomía del complejo *Obsoletus*. En un futuro, se sugiere realizar disecciones y preparaciones microscópicas con la finalidad de realizar unas identificaciones morfológicas más precisas. Además, también sería interesante realizar censos poblacionales e identificar las zonas de cría de estos.

Los ejemplares del complejo *Obsoletus*, presentan una gran dificultad de diferenciación e identificación, requiriendo técnicas morfológicas y moleculares para ello. Estas técnicas se complementan dando lugar a identificaciones rápidas y eficaces de las especies que lo conforman. En este estudio se han repasado estas técnicas y mediante la aplicación de las mismas, se ha identificado el riesgo de transmisión que presentan las Islas Baleares frente a un nuevo brote del virus de la lengua azul.

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han contribuido, de una manera u otra, en la realización de este trabajo de fin de grado.

En especial, quiero expresar mi gratitud a Ricardo del Río, por su ayuda y apoyo tanto dentro del laboratorio como fuera de este, sin su ayuda este trabajo no hubiera sido posible. También quiero agradecer a David Borràs y a Carlos Barceló su interés y colaboración.

Bibliografía

Alarcón-Elbal, P. M. & Lucientes, J. (2012) *Actualización del catálogo de Culicoides Latreille, 1809 (Diptera, Ceratopogonidae) de España* 2012.

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

Brugger, K. & Rubel, F. (2013) Bluetongue Disease Risk Assessment Based on Observed and Projected *Culicoides obsoletus* spp. Vector Densities. *Plos One*, **8**.

Calvete, C., Estrada, R., Miranda, M. A., Borrás, D., Calvo, J. H. & Lucientes, J. (2008) Modelling the distributions and spatial coincidence of bluetongue vectors *Culicoides imicola* and the *Culicoides obsoletus* group throughout the Iberian peninsula. *Medical and Veterinary Entomology*, **22**, 124-134.

Carpenter, S., Groschup, M. H., Garros, C., Felipe-Bauer, M. L. & Purse, B. V. (2013) *Culicoides* biting midges, arboviruses and public health in Europe. *Antiviral Research*, **100**, 102-113.

Cetre-Sossah, C., Baldet, T., Delecolle, J. C., Mathieu, B., Perrin, A., Grillet, C., *et al.* (2004) Molecular detection of *Culicoides* spp. and *Culicoides imicola*, the principal vector of bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) in Africa and Europe. *Veterinary Research*, **35**, 325-337.

Coetzee, P., Stokstad, M., Venter, E. H., Myrmel, M. & Van Vuuren, M. (2012) Bluetongue: a historical and epidemiological perspective with the emphasis on South Africa. *Virology Journal*, **9**.

Conte, A., Goffredo, M., Ippoliti, C. & Meiswinkel, R. (2007) Influence of biotic and abiotic factors on the distribution and abundance of *Culicoides imicola* and the *Obsoletus* Complex in Italy. *Veterinary Parasitology*, **150**, 333-344.

del Rio, R., Monerris, M., Miquel, M., Borrás, D., Calvete, C., Estrada, R., *et al.* (2013) Collection of *Culicoides* spp. with four light trap models during different seasons in the Balearic Islands. *Veterinary Parasitology*, **195**, 150-156.

Garros, C., Balenghien, T., Carpenter, S., Delecolle, J.-C., Meiswinkel, R., Pedarrieu, A., *et al.* (2014) Towards the PCR-based identification of Palearctic *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae): results from an international ring trial targeting four species of the subgenus *Avaritia*. *Parasites & Vectors*, **7**, 223.

- Garros, C., Mathieu, B., Balenghien, T., Cetre-Sossah, C. & Delecolle, J. (2010) Suggesting synonymies? Comments on Kiehl et al. (2009) "the European vectors of Bluetongue virus: are there species complexes, single species or races in *Culicoides obsoletus* and *C. pulicaris* detectable by sequencing ITS-1, ITS-2 and 18S-rDNA?". *Parasitol Res*, **107**, 731 - 734.
- Goffredo, M. & Meiswinkel, R. (2004) Entomological surveillance of bluetongue in Italy: methods of capture, catch analysis and identification of *Culicoides* biting midges. In *Bluetongue, Pt 1, Proceedings* (ed. by N. J. MacLachlan & J. E. Pearson), pp. 260-265.
- Gomulski, L. M., Meiswinkel, R., Delecolle, J. C., Goffredo, M. & Gasperi, G. (2006) Phylogeny of the subgenus *Culicoides* and related species in Italy, inferred from internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences. *Medical and Veterinary Entomology*, **20**, 229-238.
- Gonzalez, M., Lopez, S., Mullens, B. A., Baldet, T. & Goldarazena, A. (2013) A survey of *Culicoides* developmental sites on a farm in northern Spain, with a brief review of immature habitats of European species. *Vet Parasitol*, **191**, 81-93.
- Guis, H., Caminade, C., Calvete, C., Morse, A. P., Tran, A. & Baylis, M. (2012) Modelling the effects of past and future climate on the risk of bluetongue emergence in Europe. *Journal of the Royal Society Interface*, **9**, 339-350.
- MacLachlan, N. J. (2004) Bluetongue: pathogenesis and duration of viraemia. *Veterinaria italiana*, **40**, 462-467.
- MacLachlan, N. J. (2011) Bluetongue: History, global epidemiology, and pathogenesis. *Preventive Veterinary Medicine*, **102**, 107-111.
- Mathieu, B., Perrin, A., Baldet, T., Delecolle, J., Albina, E. & Cetre-Sossah, C. (2007) Molecular identification of Western European species of *obsoletus* complex (Diptera: Ceratopogonidae) by an internal transcribed spacer-1 rDNA multiplex polymerase chain reaction assay. *J Med Entomol*, **44**, 1019 - 1025.
- Mehlhorn, H., Walldorf, V., Klimpel, S., Jahn, B., Jaeger, F., Eschweiler, J., et al. (2007) First occurrence of *Culicoides obsoletus*-transmitted Bluetongue virus epidemic in Central Europe. *Parasitology Research*, **101**, 219-228.

- Mellor, P. S., Boorman, J. & Baylis, M. (2000) Culicoides biting midges: Their role as arbovirus vectors. *Annual Review of Entomology*, **45**, 307-340.
- Mellor, P. S. & Leake, C. J. (2000) Climatic and geographic influences on arboviral infections and vectors. *Revue Scientifique Et Technique De L Office International Des Epizooties*, **19**, 41-54.
- Miranda, M. A., Rincon, C. & Borrás, D. (2004) Seasonal abundance of *Culicoides imicola* and *C. obsoletus* in the Balearic islands. In *Bluetongue, Pt 1, Proceedings* (ed. by N. J. MacLachlan & J. E. Pearson), pp. 292-295.
- Nolan, D. V., Carpenter, S., Barber, J., Mellor, P. S., Dallas, J. F., Mordue, A. J., *et al.* (2007) Rapid diagnostic PCR assays for members of the *Culicoides obsoletus* and *Culicoides pulicaris* species complexes, implicated vectors of bluetongue virus in Europe. *Veterinary Microbiology*, **124**, 82-94.
- Pages, N., Muñoz-Munoz, F., Talavera, S., Sarto, V., Lorca, C. & Nunez, J. I. (2009) Identification of cryptic species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in the subgenus *Culicoides* and development of species-specific PCR assays based on barcode regions. *Veterinary Parasitology*, **165**, 298-310.
- Purse, B. V., Mellor, P. S., Rogers, D. J., Samuel, A. R., Mertens, P. P. C. & Baylis, M. (2006) Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe (vol 3, pg 171, 2005). *Nature Reviews Microbiology*, **4**.
- Rawlings, P. (1996) A key, based on wing patterns of biting midges (genus *Culicoides* Latreille-Diptera: Ceratopogonidae) in the Iberian Peninsula, for use in epidemiological studies. *Graellsia*, **52**, 57-71.
- Schwenkenbecher, J., Mordue, A. & Piertney, S. (2009) Phylogenetic analysis indicates that *Culicoides dewulfi* should not be considered part of the *Culicoides obsoletus* complex. *Bull Entomol Res*, **99**, 371 - 375.
- Schwenkenbecher, J. M., Mordue, A. J. & Piertney, S. B. (2009) Phylogenetic analysis indicates that *Culicoides dewulfi* should not be considered part of the *Culicoides obsoletus* complex. *Bulletin of Entomological Research*, **99**, 371-375.
- Sellers, R. F. & Mellor, P. S. (1993) Temperature and the persistence of viruses in *Culicoides* spp. during adverse conditions. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, **12**, 733-755.

Talavera, S., Munoz-Munoz, F. & Pages, N. (2011) New insights on diversity, morphology and distribution of *Culicoides* Latreille 1809 (Diptera: Ceratopogonidae) from Northeast Spain. *Annales De La Societe Entomologique De France*, **47**, 214-228.

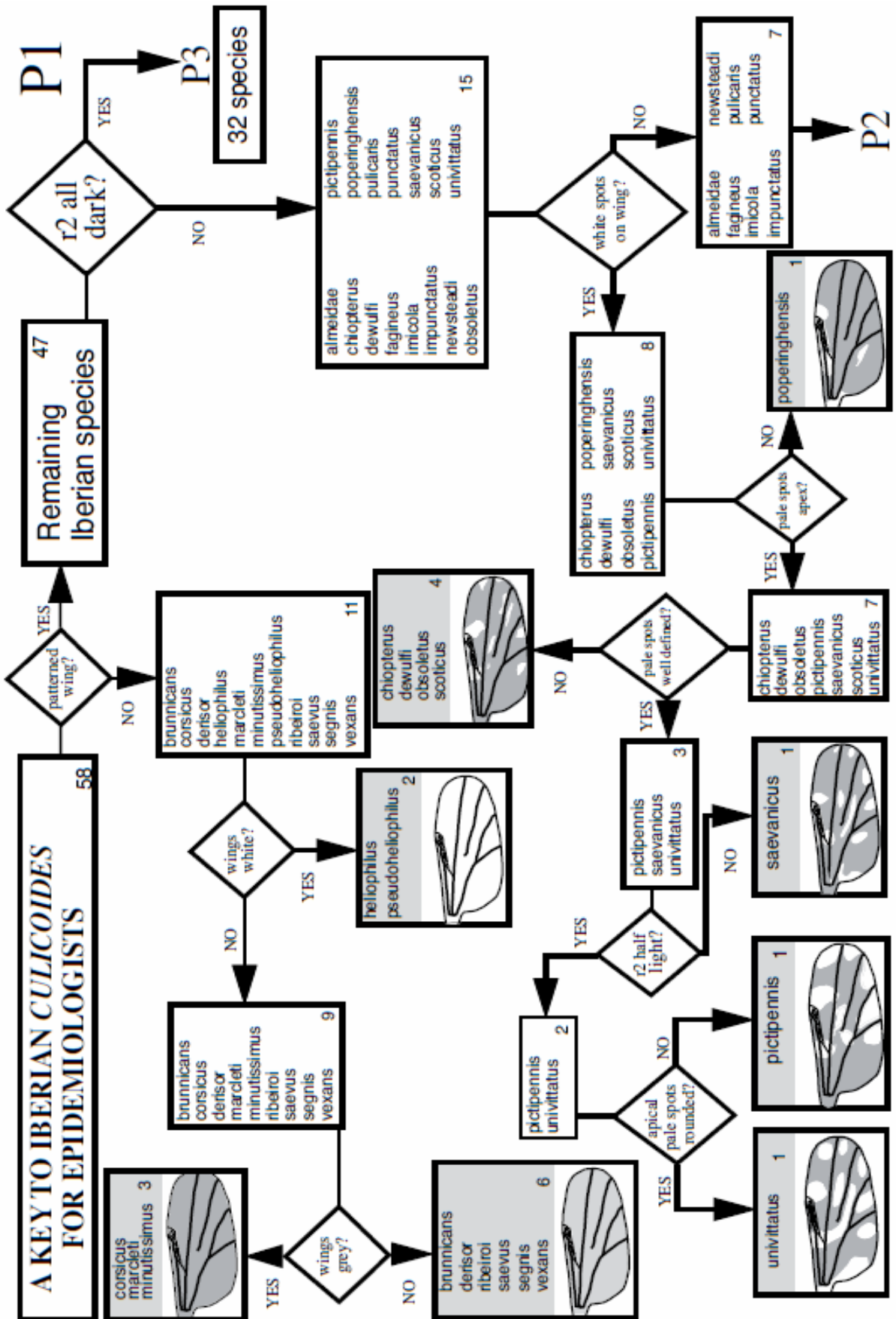
Venter, G. J., Labuschagne, K., Hermanides, K. G., Boikanyo, S. N. B., Majatladi, D. M. & Morey, L. (2009) Comparison of the efficiency of five suction light traps under field conditions in South Africa for the collection of *Culicoides* species. *Veterinary Parasitology*, **166**, 299-307.

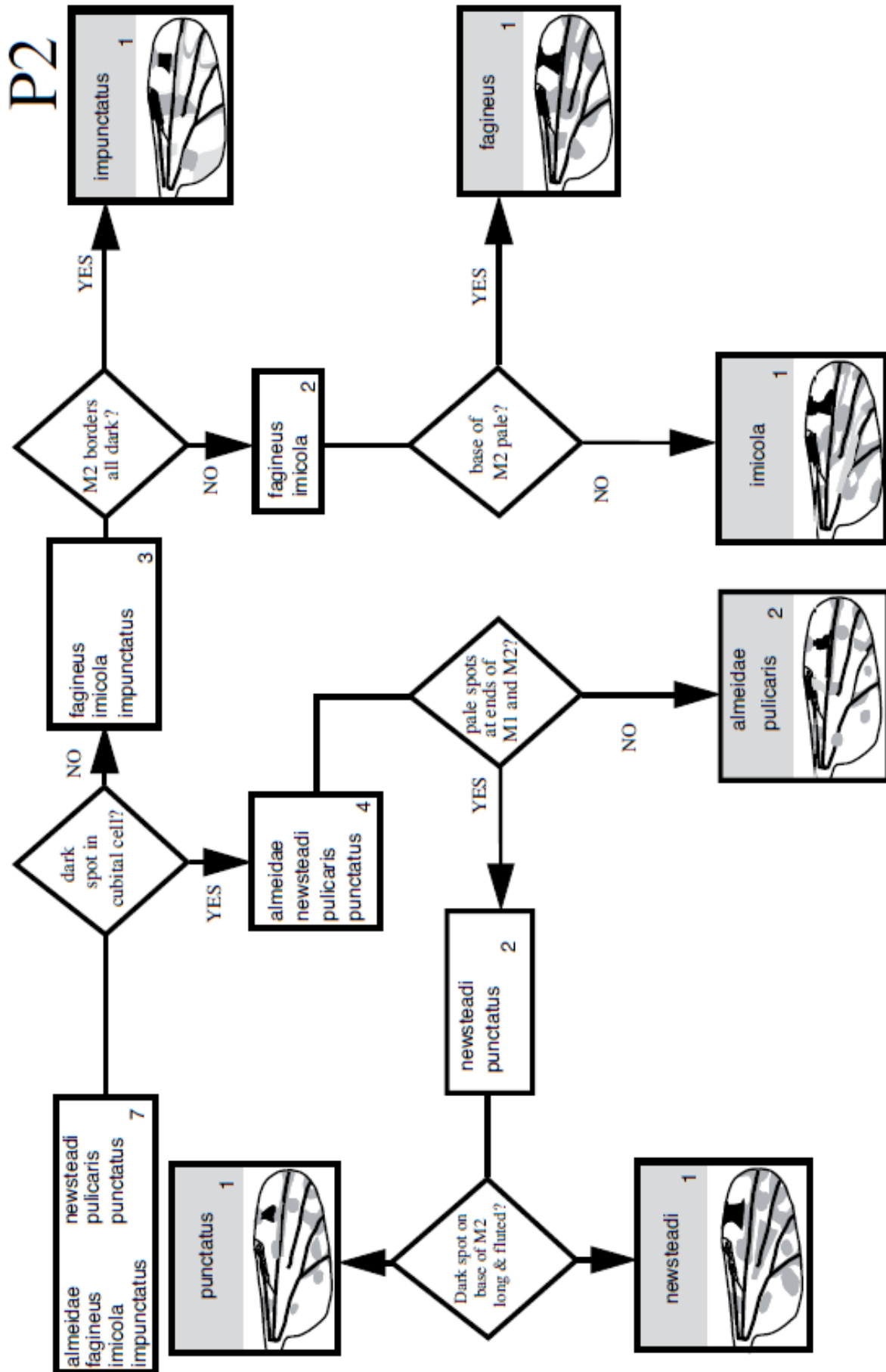
Walton, T. E. (2004) The history of bluetongue and a current global overview. In *Bluetongue, Pt 1, Proceedings* (ed. by N. J. MacLachlan & J. E. Pearson), pp. 31-38.

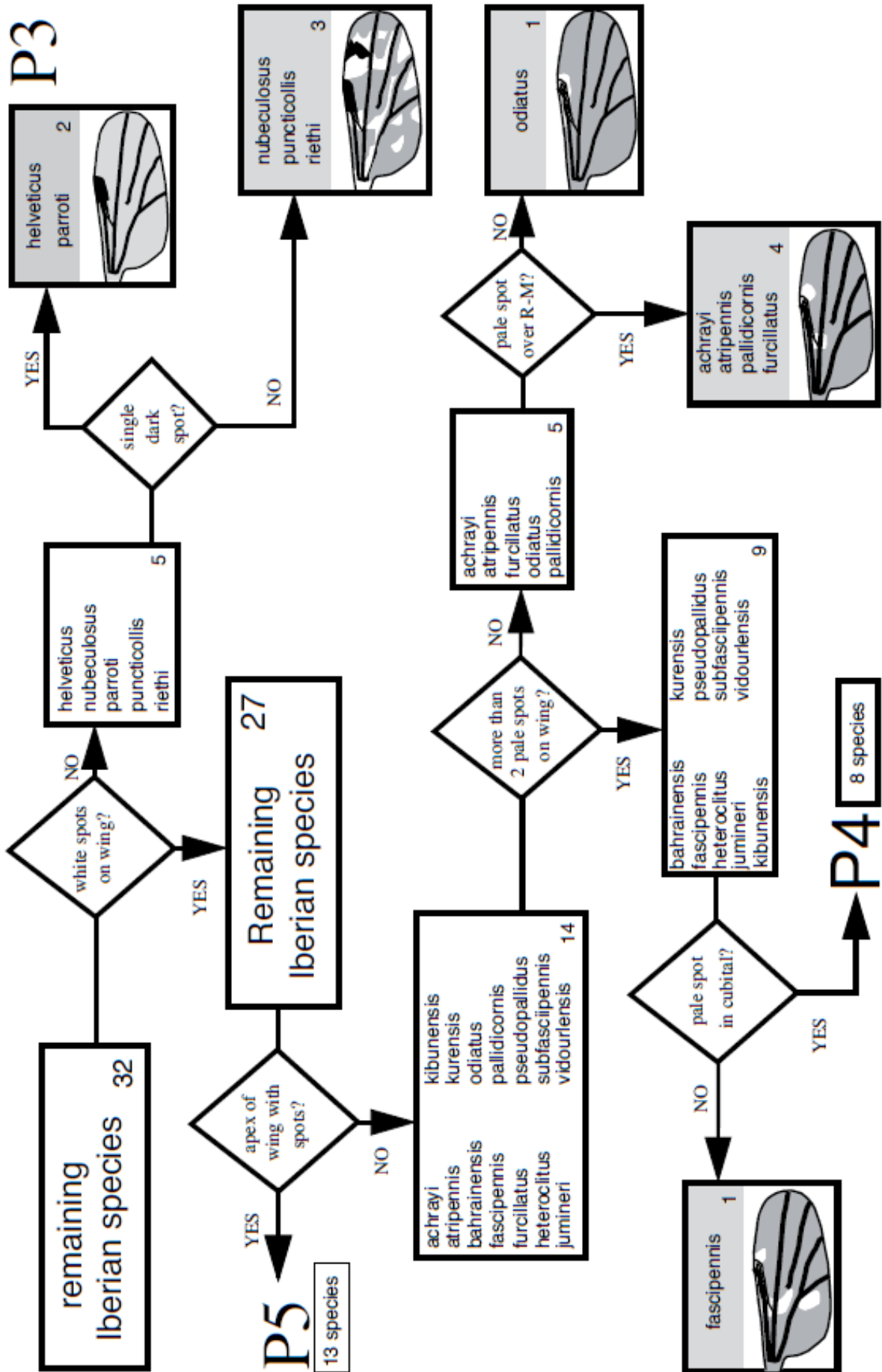
Wittman, E. J., Mellor, P. S. & Baylis, M. (2001) Using climate data to map the potential distribution of *Culicoides imicola* (Diptera : Ceratopogonidae) in Europe. *Revue Scientifique Et Technique De L Office International Des Epizooties*, **20**, 731-740.

Wittmann, E. J. & Baylis, M. (2000) Climate change: Effects on *Culicoides*-transmitted viruses and implications for the UK. *Veterinary Journal*, **160**, 107-117.

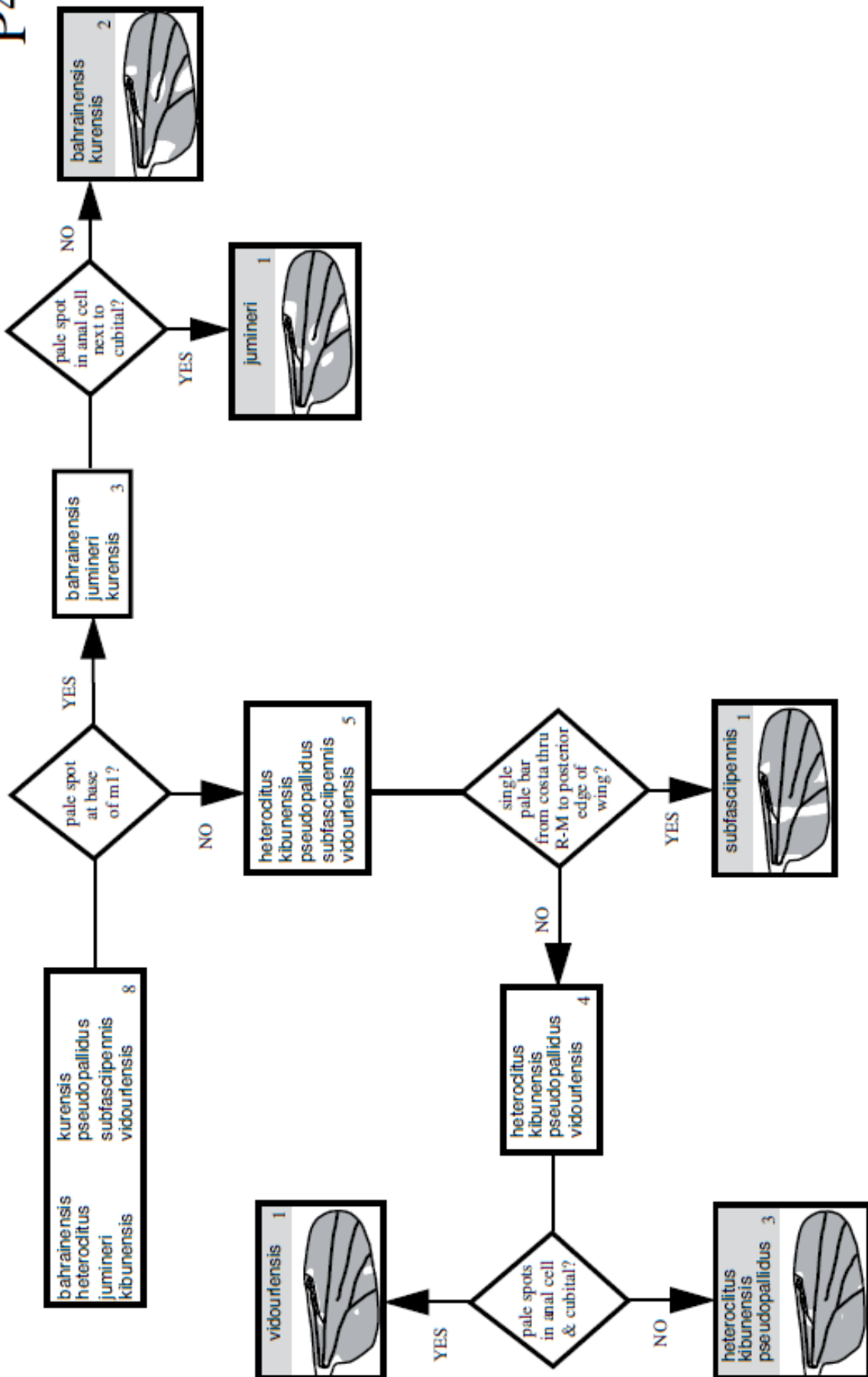
Anexo

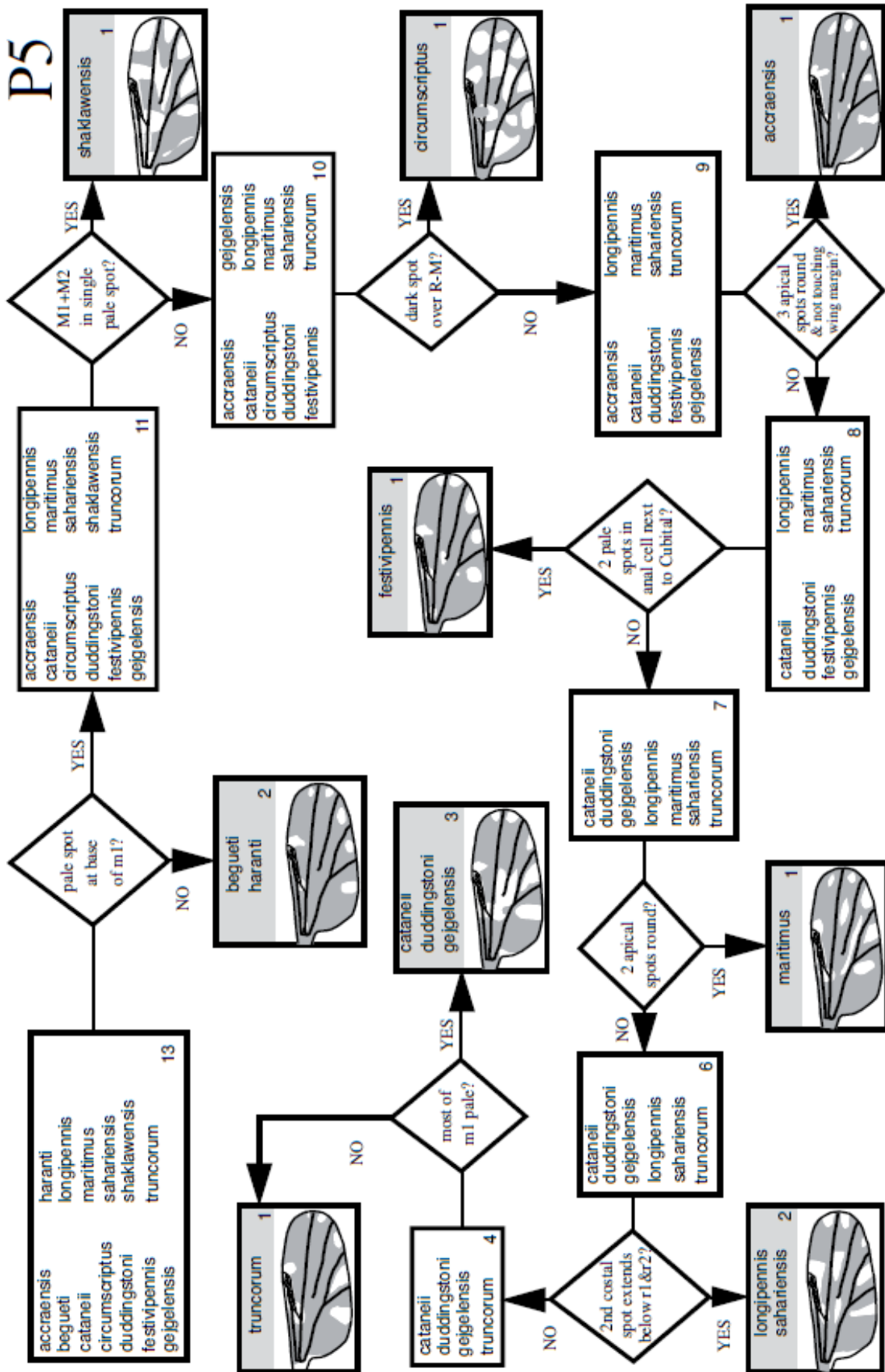






P4





Clave de identificación de las especies del género *Culicoides* Latreille, 1809 de la Península Ibérica usada para identificar las especies en este trabajo. Fuente: (Rawlings, 1996)