



Universitat Autònoma de Barcelona  
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular  
Programa Doctorat en Biotecnologia

Mosquits del gènere *Culicoides*: caracterització  
genotípica de potencials vectors de la Llengua  
Blava a Catalunya i desenvolupament de noves  
eines diagnòstiques

Memòria de Tesi Doctoral

Nonito Pagès Martínez





Treball realitzat al Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA) sota la co-direcció dels Drs. Fernando Rodríguez González i José Ignacio Núñez Garrote

Dr. Fernando Rodríguez González

Investigador del Centre de Recerca en Sanitat Animal

Dr. José Ignacio Núñez Garrote

Investigador del Centre de Recerca en Sanitat Animal

Tutor acadèmic

Joaquín Ariño Carmona

Professor titular d'Universitat del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)

Doctorand

Nonito Pagès Martínez

Investigador del Centre de Recerca en Sanitat Animal

Bellaterra, gener 2010



## ÍNDIX

Agraïments .....	1
Resum .....	3
Llistat de taules .....	5
Llistat de figures .....	7
Glossari .....	9
Sigles .....	11
Capítol 1. Introducció .....	13
1.1 Mosquits del gènere <i>Culicoides</i> .....	16
1.2 La Llengua Blava .....	22
1.3 Els <i>Culicoides</i> com vectors de la LB .....	23
1.4 L'epidemiologia de la LB a Europa i el canvi climàtic .....	27
1.5 Programa de vigilància entomològica de LB a Catalunya .....	30
Capítol 2. Objectius .....	35
Capítol 3. Estudi 1 .....	37
Capítol 4. Estudi 2 .....	59
Capítol 5. Discussió .....	87
Capítol 6. Conclusions .....	95
Capítol 7. Bibliografia .....	97



## AGRAÏMENTS

Vull agrair als directors d'aquesta tesi, Fernando Rodríguez González i José Ignacio Núñez Garrote, investigadors dels CReSA, la seva valuosa implicació tant en l'àmbit científic com personal així com per la seva altruista disponibilitat, l'ajuda prestada i tots els consells que he rebut per la seva part.

Per altra banda, vull recordar que aquesta tesi no hauria tingut lloc de no haver estat pel recolzament d'unes persones a les que els estaré agraït durant molt temps: en primer lloc i de nou als dos directors, però també a Joan Pujols, David Solanes i Mariano Domingo els quals van aportar el necessari en moments complicats.

També vull agrair la presència de les persones que han acceptat estar reunides per avaluar el treball realitzat en aquesta tesi doctoral: Javier Lucientes (Universidad de Zaragoza), Anna Barceló (Universitat Autònoma de Barcelona) i Núria Busquets (Centre de Recerca en Sanitat Animal) com a membres titulars del tribunal, així com a Mariano Domingo (Universitat Autònoma de Barcelona) i Virginia Aragón (Centre de Recerca en Sanitat Animal) com a membres suplents del tribunal.

Donat que els començaments sempre són especials, desitjo plasmar aquí un especial agraïment pel grup del departament de Fisiologia i Biodiversitat Molecular del CSIC, Xavier Bellés, Maria Dolors Piulachs en especial i la resta de gent del seu departament per haver-me donat l'oportunitat d'introduir-me en el món de la recerca de la seva mà, concretament en els camps de l'Entomologia i la Biologia Molecular.

Moltes persones són les que han col·laborat, amb diferent grau d'implicació, al llarg d'aquesta tesi i voldria agrair ràpidament a tots ells la seva aportació per petita que hagi pogut ser: totes les persones que han participat en el desenvolupament del Pla de Vigilància Entomològica de la Llengua Blava a Catalunya, des del departament del DAR de la Generalitat de Catalunya, sense oblidar a tots els propietaris de les més de 30 granges o finques en les que hem pogut recol·lectar mostres gràcies a la seva generosa disponibilitat per poder treballar allà, així com les desenes de persones que han participat en la recol·lecció i

enviament de les mostres al llarg d'aquests anys. A més, també han contribuït amb major o menor mesura, diferents persones que han estat treballant al departament d'Entomologia del CReSA al llarg d'aquests anys amb els que hem compartit molts bons moments: Laia, Daniel, Esther, José, Cristina, Irene, Yolanda i Marc, així com als meus actuals companys de fatiga de la unitat: Sandra, gràcies a qui alguns mals moments s'han pogut suportar millor y Francesc, aquestes dues últimes persones amb contribucions significatives en el tram final d'aquesta tesi. No he trobat adequat llistar a tota la resta de gent del CReSA a qui també voldria agrair alguna cosa, ja que són moltes, així que aquí llenço un agraïment general a tots ells, especialment als meus companys de despatx Núria i José Ignacio.

A part de les persones citades anteriorment, al llarg del transcurs de la tesi també he tingut el plaer de compartir infinitat de bons moments amb molts amics com la gent del departament de Zoologia de la UAB, Anna, Emili, Núria i Laia entre altres, amb qui a més hem compartit infinitat de dinars, cafès i animades sobretauls... També hem passat moments inoblidables amb el gran grup d'immersió (entre altres activitats!) format per Sandra, Pedro, Anna, Emili, Cristina, Francesc, Núria i un servidor. L'antiga colla de biòlegs i "egiptòlegs" de la UB formada per Esther, Maria, Laura, Nuri i Vanesa entre altres per qui sembla ser que el temps no passa... y com no, en l'apartat d'amistats i posats a recordar molts bons moments no pot faltar la menció dels meus amics de Figueres amb qui he tingut el plaer de compartir infinitat de vivències i situacions variopintes: Enric i Marjorie, a qui la Nora ha fet nous pares mentre escrivia aquestes línies, Edgar, Elena, Andreu, Neus, Carles, Gemma, Edu, Cris, Jordi, Pau i Francesc.

Per últim, tot i que no menys important, també estic i estaré enormement agraït a tota la meva família, especialment pares i germà, així com a altres familiars absents i presents que d'una o altre manera han contribuït a fer realitat tota una sèrie d'expectatives que, pel moment, han culminat amb la realització d'aquesta tesi doctoral. I pel final he deixat una persona amb qui he passat alguns dels millors moments de la meva vida, Núria, la meva dona, per qui crec que no tindrè ni les paraules ni el temps necessari per agrair-li la seva extraordinària paciència i comprensió com l'enorme recolzament que m'ha donat al llarg d'aquests últims anys, per mi ha significat molt i ha estat de gran ajut.



## RESUM

Els mosquits del gènere *Culicoides* actuen com a vectors de malalties importants que afecten tant a humans com a animals domèstics i salvatges. Al llarg de la última dècada aquests mosquits han tingut un paper molt important en l'epidemiologia de la major epizootia de Llengua Blava mai detectada a Europa, havent obligat a vacunar a milions de caps de bestiar per evitar les devastadores conseqüències que aquesta malaltia (de declaració obligatòria per la OIE) és capaç de provocar. Recentment, algunes espècies de *Culicoides* que pertanyen als subgèneres *Avaritia* i *Culicoides* han estat descrites com a potencials vectors de la malaltia de la Llengua Blava. En ambdós subgèneres es troben grups o complexes d'espècies que són difícils de diferenciar a nivell morfològic. Òbviament, una identificació correcta i precisa dels vectors resulta fonamental en la vigilància i control de malalties transmeses per artròpodes ja que es poden trobar diferències importants en la capacitat vectorial de les mateixes, inclús entre espècies properes.

Per aquesta raó, al llarg del transcurs d'aquesta tesi doctoral s'ha procedit a identificar la presència de grups d'espècies críptiques en els subgèneres *Avaritia* i *Culicoides*, tant aquells descrits amb anterioritat com aquells no descrits, i detectar el nombre d'espècies que conformen cada un dels grups a Catalunya. S'ha identificat un total de quatre grups d'espècies críptiques, un en el subgènere *Avaritia*, l'anomenat grup *Obsoletus*, i tres en el subgènere *Culicoides*, els grups *Pulicaris*, *Fagineus* i *Newsteadi*. A continuació s'ha avaluat la validesa dels diferents caràcters morfològics diagnòstics descrits per identificar a les diferents espècies que formen part dels grups d'espècies críptiques en ambdós subgèneres i s'ha contrastat amb els resultats moleculars obtinguts a partir de la seqüenciació d'una regió d'ADN mitocondrial, concretament la subunitat I del gen Citocrom Oxidasa. En ambdós subgèneres ha estat possible detectar que alguns dels caràcters àmpliament utilitzats en la identificació de *Culicoides* resultaven ser erronis o bé no tenien el nivell de resolució per detectar espècies individuals en certs grups d'espècies. Per aquest motiu s'ha dissenyat i validat una bateria d'oligonucleòtids amb finalitats diagnòstiques que han permès identificar fins a 13 espècies de *Culicoides* que formaven part de grups d'espècies críptiques. Finalment per facilitar el diagnòstic laboratorial, s'ha dissenyat i validat diferents tipus de PCRs, *one tube heminested*

*PCR* i *multiplex PCR* que han permès identificar, en una reacció individual, totes les espècies dins d'un mateix grup prèviament classificades com espècies críptiques.

## LLISTAT DE TAULES

**Taula 1.1.** Malalties transmeses per artròpodes incloses en el llistat de la OIE (p15).

**Taula 3.1.** Punts de mostreig de *C. obsoletus* i *C. scoticus* utilitzats per seqüenciar el gen COI o per realitzar l'assaig de PCR específic d'espècie (p48).

**Taula 3.2.** Femelles de *C. obsoletus* i *C. scoticus* agrupades en funció dels seus valors de BSL comparat amb el diagnòstic molecular basat en el gen COI (p49).

**Taula 4.1.** Espècimens analitzats del subgènere *Culicoides* recol·lectats en l'àrea de vigilància (p77).

**Taula 4.2.** Llistat d'encebadors específics d'espècie dissenyats per detectar espècies del subgènere *Culicoides* (p78).

**Taula 4.3.** Valors mitjos dels caràcters mètrics útils per diferenciar espècies dins dels grups Pulicaris, Fagineus i Newsteadi (p79).

**Taula 4.4.** Matriu de distàncies genètiques entre parells de bases per espècies dels subgènere *Culicoides* (p80).



## LLISTAT DE FIGURES

**Figura 1.1.** Cicle de vida dels vectors *Culicoides* (p19).

**Figura 1.2.** Distribució global de serotips de VLB i espècies de *Culicoides* vectors implicades en la seva transmissió (p24).

**Figura 1.3.** Cicle de la transmissió del virus de LB (p25).

**Figura 1.4.** Disseminació vírica de VLB a l'interior de vectors competents (p26).

**Figura 1.5.** Mapa de les rutes d'introducció dels diferents serotips de la LB aïllats a Europa des de 1998 (p29).

**Figura 1.6.** Distribució coneguda de *C. imicola* des de 1999 fins a 2005, combinada amb la distribució observada de brots de LB en els països europeus del mediterrani (p31).

**Figura 3.1.** Esquema de la part terminal de l'abdomen (vista ventral) d'una femella de *Culicoides* (p50).

**Figura 3.2.** Preparació microscòpica amb dues matrius de niló, una amb cap, tòrax (amb ales i potes) i l'altre amb abdòmens (p51).

**Figura 3.3.** Gràfic mostrant la distribució bimodal de les dades de la variable BSL per 799 femelles del grup *Obsoletus* (p52).

**Figura 3.4.** Haplotips del gen Citocrom Oxidasa I detectats en *C. obsoletus* i *C. scoticus* (p53).

**Figura 3.5.** Gel d'agarosa amb fragments de DNA amplificats amb la tècnica *One Tube Heminested PCR* (p54).

**Figura 3.6.** Gràfic *scatter plot* mostrant els valors de dispersió de BSL (p55).

**Figura 3.7.** Plaques quitinoses envoltant l'obertura genital de femelles de *C. scoticus* i *C. obsoletus* (p56).

**Figura 3.8.** Plaques quitinoses envoltant l'obertura genital de femelles de *C. scoticus* i *C. obsoletus* (p57).

**Figura 4.1.** Mapa de Catalunya mostrant els llocs de recollecció on van ser capturats els mosquits del gènere *Culicoides* (p81).

**Figura 4.2.** Detall del patró alar d'espècies de *Culicoides* que pertanyen als complexos Pulicaris (a-c), Fagineus (d-f) i Newsteadi (g-i) (p82).

**Figura 4.3.** Arbre filogenètic de *Culicoides* inferit a partir de les seqüències del gen mitocondrial COI (p83).

**Figura 4.4.** Assajos diagnòstics basats en PCR pels espècimens del subgènere *Culicoides* (p84).

## GLOSSARI

**Artròpode:** animal invertebrat, de cos amb simetria bilateral, cobert per cutícula, format per una sèrie lineal de segments més o menys ostensibles i previst d'apèndixs constituïts per peces articulades o artells.

**Arbovirus:** virus transmesos per artròpodes, derivat de l'anglès **arthropod-borne viruses** (virus portats per artròpodes)

**Braguer:** mamelles d'una vaca, d'una cabra i d'altres quadrúpedes.

**Cicle vital:** estats morfològics i funcionals pels que un individu ha de passar.

**Competència vectorial:** referit a la capacitat que un vector té per allotjar un patogen, que aquest es repliqui/desenvolupi i es pugui transmetre a un animal susceptible. La competència depèn de la genètica del vector i d'influències externes ambientals.

**Dípter:** insecte caracteritzat per presentar metamorfosi completa i disposar d'un parell de balancins i d'un sol parell d'ales membranoses, amb venes i cèl·lules, la distribució de les quals és important per a la identificació de les famílies i les espècies.

**Epizootia:** malaltia contagiosa que afecta un gran nombre d'animals d'una o més espècies en un extens territori i es transmet amb gran rapidesa. És com l'epidèmia en l'home.

**Ectotèrmic (animal):** animal que no pot regular significativament la seva temperatura corporal generant calor, la temperatura del seu cos varia amb la de l'ambient. Característic dels animals invertebrats, peixos, amfibis i rèptils.

**Espècies críptiques:** espècies que són extremadament similars en aparença (morfologia, fisiologia i comportament) però es troben aïllades entre elles a nivell reproductiu. Es considera que són el resultat d'un procés recent de diferenciació.

**Hematòfag:** organisme o animal que s'alimenta de sang.

**Hemocel:** cavitat general secundària dels artròpodes, que constitueix el sistema de llacuna ple de líquid hemàtic i que forma part del sistema circulatori obert.

**Hemoparàsit:** paràsit que s'allotja a la sang de l'hoste.

**Insecte holometàbol:** insecte que posseeix un desenvolupament característic dels insectes més evolucionats, en el que es succeeixen les fases d'embrió, larva, pupa i imago (adult) a través d'una metamorfosi completa.

**Metamorfosi:** conjunt de modificacions estructurals i fisiològiques que transformen una larva en un individu adult.

**Oligonucleòtid (o encebador):** seqüència lineal de nucleòtids units per enllaços fosfo-diester, habitualment no major de 50 nucleòtids.

**Període d'incubació extrínsec:** període o interval mínim entre la ingestió/adquisició d'un agent infecciós per part d'un vector i el moment quan aquest ja està preparat per ser alliberat a la saliva del vector.

**Omnívor:** organisme o animal que té una dieta àmplia.

**Variació intraespecífica:** variació fenotípica o genotípica existent entre exemplars d'una mateixa espècie relacionada amb el sexe, l'edat, les estacions, els gradients ambientals, la ubicació geogràfica o altres factors.

**Variació interespecífica:** variació fenotípica o genotípica existent entre exemplars de diferents espècies.

**Vector:** insecte o altre animal que pot transmetre o propagar una malaltia.

**Zoonosi:** malaltia que està biològicament adaptada a animals, però que en determinades condicions es transmet dels animals a l'home i viceversa.



## SIGLES

BSL, *Bigger Spermatheca Length*.

COI, *Cytochrome Oxidase subunit I*.

DAR, Departament d'Agricultura Alimentació i Acció Rural de la Generalitat de Catalunya.

ITS, *Intergenic Transcribed Spacer*.

LB, Llengua Blava.

OIE, Organització Mundial de Sanitat Animal.

PCR, *Polymerase Chain Reaction*.

UNEP, *United Nations Environment Programme*.

VAKA, Virus Akabane.

VLB, Virus Llengua Blava.

VEE, Virus Encefalitis Equina.

VMEH, Virus Malaltia Epizoòtica Hemorràgica.

VFEB, Virus Febre Efímera Bovina.

VPEA, Virus Pesta Equina Africana.

WHO, Organització Mundial Salut.



## Capítol 1

### INTRODUCCIÓ

A finals del segle XX la comunitat científica ja anunciava la seva creixent preocupació pel probable increment de les malalties transmeses per artròpodes com a resultat de l'escalfament global. El canvi climàtic denunciat per climatòlegs i científics ambientals representa un dels majors reptes pel present segle XXI. La prevalença i distribució geogràfica d'aquestes malalties està influenciada per factors demogràfics i socials així com per factors climàtics, principalment alteracions en la temperatura, humitat, pluviometria, humitat del sòl i inclús l'augment del nivell del mar (Haines *et al.*, 2006). Tot i que els artròpodes poden modular la seva temperatura corporal adequant el seu comportament als canvis ambientals externs, no són capaços de controlar-la a nivell fisiològic ja que són animals ectotèrmics, i per aquest motiu són especialment sensibles a canvis en factors climàtics. Aquests factors climàtics o ambientals modulen la supervivència i la taxa de reproducció del vector, regulant la seva distribució i el patró temporal d'activitat al llarg de l'any. A mode d'exemple, ja per l'any 1995, un estudi indicava que com a conseqüència de l'augment global de les temperatures s'havia observat una expansió en la distribució de la malària i el dengue, dues de les malalties transmeses per artròpodes que més es coneixen, cap a les latituds més septentrionals d'Àfrica, Àsia i Amèrica Llatina que havien estat observades fins el moment (WHO/UNEP, 1995). No menys important és el fet que les taxes de replicació, desenvolupament i supervivència de la majoria de patògens transmesos per vectors generalment es veuen afavorides a l'augmentar la temperatura ambiental, reduint l'anomenat període d'incubació extrínsec del patògen a l'interior de l'artròpode (Rogers i Randolph, 2006). Aquest fenomen ja havia estat descrit a Europa com la clau per explicar l'augment en el número de casos d'encefalitis transmeses per paparres a Suècia, associat a la presència d'hiverns més suaus (Lindgren i Gustafson, 2001). De la mateixa manera, s'ha pogut demostrar l'associació entre el cicle de *El Niño*, fenomen que determina els patrons climàtics a nivell global, amb l'inici d'epidèmies de malària a Amèrica del sud i el sud d'Àsia (Kovats *et al.*, 2003).

En els últims anys han emergit diverses malalties transmeses per artròpodes en diferents zones del planeta, ja sigui per primer cop o després d'haver considerat eradicada la malaltia. Entre elles es troben malalties amb una gran repercussió en salut pública com les malalties de Lyme, Oropouche i Dengue, febre hemorràgica Crimea-Congo, les febres: groga, de l'oest del Nil i de la vall del Rift i diverses encefalitis (Watson *et al.*, 2005; Gould *et al.*, 2009; Pagès *et al.*, 2009). Per altra banda també han emergit altres malalties transmeses per artròpodes amb una major repercussió en sanitat animal com és el cas de la Llengua Blava, Pesta Equina Africana, Malaltia Epizoòtica Hemorràgica i Babesiosis entre moltes altres (Genchi *et al.*, 2007; Saegerman *et al.*, 2008; Temizel *et al.*, 2009; Gale *et al.*, 2010).

L'Organització Mundial de Sanitat Animal, creada el 1924 amb el nom d'*Office Internationale des Epizooties* (OIE), té com a principal objectiu dur a terme la lluita i el control de les malalties animals en un context global. Aquesta organització assessora tècnicament als seus 177 països membres recopilant, analitzant i difonent tota la informació científica, veterinària i epidemiològica que pugui resultar útil per combatre les malalties animals. Aquestes malalties animals també engloben aquelles malalties transmissibles als éssers humans, anomenades malalties zoonòtiques o zoonosis. Per tal de garantir la transparència de la situació zoosanitària arreu del món, la OIE ha elaborat un llistat amb totes les malalties considerades de declaració obligatòria, algunes de les quals són transmeses per artròpodes (taula 1).

La situació epidemiològica de cada malaltia es revisa i actualitza periòdicament, indicant els països membres que detecten animals malalts en el seu territori. En aquest llistat s'agrupen les malalties contagioses amb un ampli potencial de disseminació a nivell nacional i especialment a nivell internacional que comportin series repercussions econòmiques, amb risc per la sanitat animal o salut pública, així com pel comerç internacional d'animals o productes animals. Els criteris bàsics per la inclusió d'una malaltia en el llistat de la OIE respon a quatre observacions: i) que la malaltia no es trobi present en tots els països del món, estant declarats almenys tres països lliures de la malaltia, ii) antecedents previs de l'existència de tres casos de disseminació de la malaltia entre països, iii) risc de propagació en poblacions immunològicament desprotegides i que la malaltia pugui produir morbiditat i/o mortalitat significativa, i iv) el potencial zoonòtic de la malaltia i que es consideri una malaltia emergent.

Sota aquests exigents criteris, una de les malalties virals transmeses per artròpodes (arbovirosis) incloses en el llistat de malalties de declaració obligatòria per la OIE, és la malaltia de la Llengua Blava (LB), els vectors de la qual són els mosquits del gènere *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). La creixent rellevància que la LB ha adquirit a Europa, inclosa Espanya i Catalunya, ha suscitat i impulsat els estudis que es presentaran a continuació i han donat lloc a la present tesi doctoral.

**Taula 1.1.** Malalties transmeses per artròpodes incloses en el llistat de la OIE.

Malaltia	Hoste	Vector	Distribució
Llengua Blava	Remugant	<i>Culicoides</i> spp.	Mundial
Malaltia hemorràgica epizoòtica	Remugant	<i>Culicoides</i> spp.	Àfrica, Amèrica, Àsia i Austràlia
<i>Cowdriosis (heartwater)</i>	Remugant	<i>Amblyomma</i> spp.	Àfrica, Àsia
* Encefalitis japonesa	Porcí i aviar	<i>Culex</i> spp.	Àsia, Austràlia
* Encefalitis equina de l'est	Equí i aviar	Mosquits fam. Culicidae	Amèrica del nord i central
* Encefalitis equina de l'oest	Equí i aviar	Mosquits fam. Culicidae	Amèrica del nord i central
* Encefalitis equina veneçolana	Equí	Mosquits fam. Culicidae	Tot continent Americà
* Tularèmia	Rosegadors i lagomorfs	Varis artròpodes	Europa, Amèrica nord, Àsia
Pesta porcina africana	Porcí	<i>Ornithodoros</i> spp.	Àfrica subsahariana i Europa
* Estomatitis vesicular	Mamífers	Varis artròpodes	Europa, EEUU i sud Àfrica
Surra ( <i>Trypanosoma evansi</i> )	Remugant	Dipters fam. Tabanidae	Àsia, Àfrica i Amèrica del sud
* Febre de l'oest del Nil	Múltiples espècies	Mosquits fam. Culicidae	Mundial
* Febre de la vall del Rift	Múltiples espècies	Mosquits fam. Culicidae	Àfrica i Pròxim Orient
* Febre de Crimea-Congo	Múltiples espècies	Paparres	Europa, Àsia i Àfrica
Malaltia de Nairobi	Oví i cabrum	<i>Rhipicephalus</i> spp.	Est d'Àfrica
* Anaplasmosi bovina	Boví	Paparres	Mundial
* Babesiosi bovina	Boví	Paparres	Mundial
Teileriosi	Remugant	Paparres fam. Ixodidae	Mundial
* Tripanosomiasis	Boví	<i>Glossina</i> spp.	Àfrica, Amèrica central i del sud
Pesta equina	Equí	<i>Culicoides</i> spp.	Àfrica, Europa i Est Mitjà
Anèmia infecciosa equina	Equí	† Dipters hematòfags	Mundial
Piroplasmosis equina	Equí	Paparres fam. Ixodidae	Mundial

\* Malalties zoonòtiques

† Mediat per transmissió mecànica

### 1.1. Mosquits del gènere *Culicoides*

Els mosquits del gènere *Culicoides* són uns petits dípters que pertanyen a la família Ceratopogonidae que consta aproximadament de 125 gèneres i al voltant de 5500 espècies descrites. Tot i que els Ceratopogònids estan considerats com un grup d'artròpodes de gran importància veterinària i mèdica, només quatre dels gèneres que pertanyen a aquesta família tenen espècies que són hematòfagues de vertebrats: *Austroconops*, *Culicoides*, *Forcipomya* i *Leptoconops*.

Els *Culicoides* es troben entre els dípters hematòfags més abundants i petits del món, mesurant entre 1 i 3 mm de longitud. Aproximadament unes 1340 espècies de *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) han estat descrites arreu del món (Borkent i Wirth, 1997, actualitzat 2008) incloent 39 registres fòssils procedents d'ambre Bàltic. Els *Culicoides* tenen una distribució Holàrtica, havent colonitzat totes les regions del món, des del nivell del mar fins els 4000 m d'altitud, amb l'excepció de les regions polars extremes, Nova Zelanda i les Illes de Hawaii (Mellor *et al.*, 2000).

Aproximadament un 96% d'aquestes espècies són hematòfags obligats, principalment de mamífers (humans inclosos) i aus. Arreu del planeta els *Culicoides* han estat reconeguts per produir grans molèsties a humans i bestiar, causant inclús dermatitis al·lèrgica en cavalls (Hellberg *et al.*, 2006) o provocant un impacte negatiu en el creixement d'economies locals de zones costaneres com és el cas de la costa de Florida (Cilek *et al.*, 2003) o Escòcia durant la temporada d'estiu (Mands *et al.*, 2004; Carpenter *et al.*, 2006) quan el desmesurat increment estacional de la població de *Culicoides* adquireix les proporcions de plaga, reduint considerablement tant el turisme com la qualitat de vida dels seus habitants. Fins i tot en certes ocasions, la disciplina taxonòmica ha reflectit les constants i irritants molèsties infligides a animals i humans per part dels *Culicoides*, atorgant a algunes de les espècies els noms de *Culicoides damnosus*, *C. irritans* o inclús *C. diabolicus*.

El cicle biològic dels *Culicoides* és el típic dels insectes més evolucionats, els insectes holometàbols i inclou quatre estadis successius de desenvolupament que estan ben diferenciats (figura 1.1):

i) Ou: després d'alimentar-se de la sang d'un hoste, requisit generalment imprescindible per tal que una femella pugui madurar els ovaris i desenvolupar els ous, els *Culicoides* poden realitzar la posta dels ous a partir de les 48 o 72 hores posteriors a la ingesta de sang

(observació personal), tot i que poden tardar fins a dues setmanes depenent de la temperatura ambiental (Gerry i Mullens, 2000). Habitualment, amb una temperatura d'uns 25 °C, l'eclosió dels ous té lloc als 3-5 dies, tot i que en funció de l'espècie, el període de temps pot variar significativament amb valors màxims registrats de 7-8 mesos per l'espècie *C. griseus* (Parker, 1949) i valors mínims de 2-3 dies en el cas de *C. imicola*.

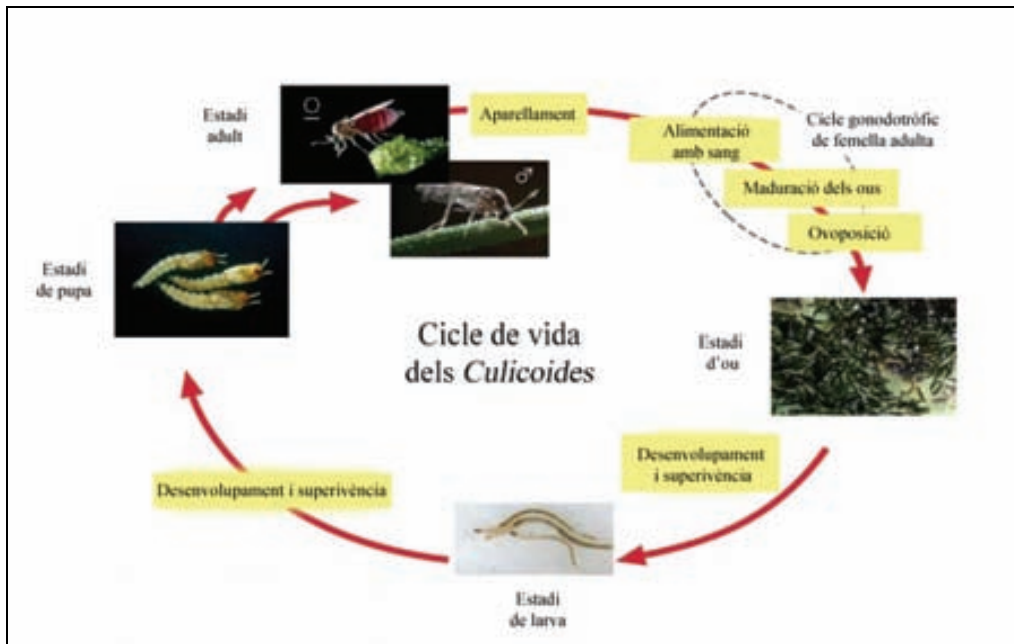
ii) Larva: quan l'ou desclou, emergeixen les larves que es desenvolupen a través de quatre estadis larvaris (L1, L2, L3 i L4). Les larves dels mosquits *Culicoides* es caracteritzen per tenir una silueta prima i desproveïda de pèls la qual cosa n'afavoreix el característic moviment serpentejant que utilitzen per desplaçar-se a través del medi. Les larves madures o L4 mesuren de 2 a 5 mm i posseeixen una pigmentació subcutània característica en el segment toràcic. Els segments toràcics i abdominals tenen forma i mida similar, un fet que contribueix a la seva característica forma cilíndrica. Les peces bucals es caracteritzen per la presència d'un parell de mandíbules a nivell exterior, mentre que a l'interior de la cavitat oral tenen unes estructures esclerotitzades anomenades epifaringe i hipofaringe. Les larves de *Culicoides* són omnívores i es poden alimentar de detritus, bacteris, algues, fongs, protozous i inclús nematodes entre altres organismes. El tipus d'alimentació tan variable, tot i que característic de cada espècie, determina diferències en la morfologia de les estructures encarregades de triturar l'aliment, bàsicament epifaringe i hipofaringe (Kettle i Lawson, 1952). El temps necessari per completar l'etapa de desenvolupament larvari és variable i està regulat per la temperatura, hores diàries d'il·luminació i la disponibilitat de nutrients. D'aquesta manera, trobem espècies que tan sols tarden una setmana en completar aquesta etapa, com és el cas de l'espècie tropical *C. loxodontis* (Meiswinkel, 1992), mentre que en altres casos, com el de les espècies àrtiques, poden tardar fins a dos anys (Downes, 1962).

iii) Pupa: quan l'últim estadi larvari (L4) madura, la larva evoluciona a l'estadi de pupa, generalment el més breu dels quatre estadis. La pupa no s'alimenta ja que no té boca i durant aquest període, el mosquit es transforma a la forma d'*imago* o adult a través de l'última fase de la metamorfosi completa que l'insecte experimenta. La pupa sol ser d'un color marró i té un parell de protuberàncies respiratòries protoràciques amb múltiples obertures espiraculars a la punta. Els tubs respiratoris repel·leixen l'aigua, facilitant l'obtenció d'aire durant la metamorfosi, que té lloc mentre està flotant a la superfície de l'aigua.

Els estadis immadurs (ou, larva i pupa) requereixen d'una certa quantitat d'aigua i matèria orgànica, podent ser trobats en una gran diversitat de microhàbitats.

iv) Imago o adult: els *Culicoides* adults són petits i mesuren de 1 a 3 mm de longitud. El disseny de les seves estructures bucals està evolutivament adaptat per foradar i lacerar els teixits de l'hoste amb la finalitat de poder alimentar-se de la seva sang. A les femelles, les peces bucals estan envoltades per la probòscide que és una extensió del *labium* on es troba el *labrum* o epifaringe, un parell de mandíbules serrades amb dents en la seva part distal interna, un parell de maxil·les i la hipofaringe amb el canal per on la saliva és alliberada quan la femella s'alimenta. També posseeixen diversos òrgans sensorials característics, trobant-se els més importants en els palps maxil·lars i les antenes. Els palps maxil·lars són dues estructures de les peces bucals formades per cinc segments que posseeixen unes agrupacions de sensiles en el tercer segment que actuen com a òrgans sensorials al tenir un gran nombre de receptors. Les antenes estan formades per quinze segments al llarg dels quals trobem diferent nombre de sensiles coelocòniques que són petites fossetes sensorials. El nombre i distribució d'aquestes sensiles és característic de cada espècie, resultant un caràcter taxonòmic molt important. Un altre caràcter taxonòmic molt important i útil per diferenciar les distintes espècies de *Culicoides* són les ales. Els Ceratopogònids posseeixen una venació alar característica que els diferencia de la resta de dípters. Alhora, els *Culicoides* posseeixen un patró alar diferenciat de la resta de Ceratopogònids que és extremadament variable entre les diferents espècies de *Culicoides*. Les femelles en estat adult són les úniques que piquen a vertebrats i s'alimenten de sang per tenir un aportament extra de proteïna i així poder realitzar la síntesi dels ous, mentre que els mascles es solen alimentar de fluids vegetals rics en sucres i aigua. La majoria dels *Culicoides* tenen activitat crepuscular, centrant la seva activitat entre la posta del sol i l'albada (Mellor *et al.*, 2000), tot i que algunes espècies estan actives i poden picar durant el dia (Balenghien *et al.*, 2008). Tot i que la longevitat dels *Culicoides* en estat adult no ha estat molt ben estudiada, certs assajos de laboratori confirmen que poden arribar a viure fins a 90 dies (Nevill, 1971; Boorman, 1991).





**Figura 1.1.** Cicle de vida dels vectors *Culicoides* (adaptat de Purse *et al.*, 2005).

Fins fa poc temps, la família Ceratopogonidae era un dels grups d'artròpodes menys estudiats i coneguts. El coneixement adquirit de les diferents espècies que existeixen en determinades àrees i la seva importància o relació en la transmissió de malalties era superficial. Moltes de les espècies estan encara per nombrar i la identificació d'espècies plaga o que actuen com a vectors resulta difícil o impossible encara avui en dia en moltes regions del planeta (Borkent 2005).

A nivell taxonòmic, el gènere *Culicoides* resulta un grup d'estudi complicat i ja en l'any 1960, Campbell i Pelham-Clinton remarcaven les dificultats taxonòmiques que trobaven després de realitzar una exhaustiva revisió de les espècies del gènere a les illes britàniques *...la majoria de les espècies són molt variables i habitualment, donat que existeixen espècies molt properes, es troben exemplars molt difícils d'identificar...* El gènere *Culicoides* està dividit en múltiples subgèneres i en ells trobem espècies filogenèticament molt properes que s'agrupen en els anomenats grups d'espècies. Algunes d'elles són fins i tot tant properes, que resulta molt difícil la seva diferenciació morfològica, aquestes últimes agrupades en els anomenats complexes d'espècies. Diferents autors han intentat analitzar les relacions filogenètiques reals d'aquestes espècies per poder identificar-les amb fiabilitat. Tot i això encara avui en dia existeixen casos en els que no ha estat possible discernir entre les variacions intraespecífiques i interespecífiques a nivell morfològic (Meiswinkel, 2004).

Alguns dels subgèneres amb grups d'espècies de *Culicoides* millors caracteritzats són aquells que han resultat ser de màxima importància veterinària o mèdica en diferents regions del món. A Àfrica per exemple, dins del subgènere *Avaritia* es troba el complex Imicola, dins el qual trobem espècies que han estat relacionades amb la transmissió de diferents patògens importants (Meiswinkel, 2003; Mellor *et al.*, 2000). A Àfrica aquest complex està format per almenys 12 espècies diferents, mentre que a Europa només s'hi troba una sola espècie, *C. imicola* s.s. (Meiswinkel, 2004). A Europa, altres espècies que pertanyen al subgènere *Avaritia* s'agrupen de manera similar al cas del complex Imicola a Àfrica, com és el cas del complex *Obsoletus*. Aquest complex d'espècies està format per l'espècie nominal *C. obsoletus* s.s. així com per: *C. scoticus*, *C. chiopterus*, *C. dewulfi* i *C. montanus*. Les femelles de les dues primeres espècies són tant extremadament semblants a nivell morfològic que encara no existeix consens per confirmar la validesa dels caràcters diagnòstics utilitzats. La quarta espècie, *C. montanus*, resulta ser una espècie d'identitat un tant confusa, descrita del Pamir (Shakirzjanova, 1962) i amb molt pocs registres fins l'actualitat a Europa. Aquest complex també engloba altres espècies no europees com *C. sinanoensis* Tokunaga, 1937, *C. gornostaevae* Mirzaeva, 1984, i *C. sanguisuga* Coquillett, 1901.

Per altra banda, en base a les principals obres de referència (Campbell i Pelham-Clinton, 1960; Kremer, 1966; Delécolle, 1985; Glukhova, V.M. 1989), encara no està clar el nombre real d'espècies del subgènere *Culicoides* present a Europa ni les espècies que conformen un dels grups amb especial interès epidemiològic, el grup *Pulicaris*. Dins de l'anomenat grup *Pulicaris*, habitualment utilitzat de manera incorrecta per designar diverses espècies del subgènere *Culicoides*, es troba un conglomerat superior a onze espècies que poden ser classificades en tres grups: *Pulicaris*, *Impunctatus* i *Grisescens*, cada un d'ells amb espècies difícils de diferenciar entre elles i amb espècies considerades sinònimes només per certs autors (Meiswinkel, 2004). A Amèrica, al llarg de molts anys es va considerar que el complex *Variipennis*, que pertany al subgènere *Monoculicoides*, estava format per cinc espècies diferents: *C. v. albertensis*, *C. v. australis*, *C. v. occidentalis*, *C. v. sonorensis*, i *C. v. variipennis*. A l'any 2000 es va confirmar que aquest complex, que transmet diferents malalties, estava format únicament per tres espècies: *C. occidentalis*, *C. sonorensis*, i *C. variipennis*, considerant a *C. v. albertensis* i *C. v. australis* espècies sinònimes de *C. sonorensis* (Holbrock *et al.*, 2000).

Els *Culicoides* han adquirit la seva major importància com a transmissors de virus, tot i que també poden transmetre altres patògens tals com hemoparàsits (*Haemoproteus* spp. en

ocells; *Hepaticystis kochi* en mones) i filàries (*Mansonella* spp. en humans; *Onchocerca* spp. en cavalls i bestiar boví). Tan sols unes poques de totes les espècies de *Culicoides* estan involucrades en la transmissió d'agents patògens que poden afectar tant a la salut humana com animal, tot i que aquestes produeixen importants repercussions negatives a nivell econòmic i sanitari. Al voltant del món s'ha aïllat més de 50 espècies de virus diferents en *Culicoides*, la majoria d'ells pertanyen a les famílies Bunyaviridae (n=20), Reoviridae (n=19) i Rhabdoviridae (n=11) (Meiswinkel, 1994; Mellor, 2000). Curiosament, aproximadament el 45% dels virus aïllats en *Culicoides* semblen ser exclusius d'aquests mosquits, ja que mai han estat trobats en cap altre grup d'artròpodes (Meiswinkel, 1994). Per altra banda, existeix tota una sèrie de patògens amb elevat potencial zoonòtic com el virus *Rift Valley fever*, *Vesicular Stomatitis*, *Mitchell River* i *Eastern Equine Encephalomyelitis*, que tot i haver estat aïllats en *Culicoides*, molt probablement es deu a una associació accidental, havent identificat altres grups d'artròpodes com els principals vectors d'aquestes malalties.

El patògen viral humà més important transmès per *Culicoides* és el virus d'Oropouche, que pertany al grup Simbu dels Bunyaviridae (*Orthobunyavirus*). L'espècie de *Culicoides* que actua com a vector del virus d'Oropouche és *C. paraensis* (Pinheiro *et al.*, 1981a; Pinheiro *et al.*, 1982b; Roberts *et al.*, 1981). Aquest virus és el responsable d'una de les arbovirosi més importants d'Amèrica del Sud i Amèrica central, causant de múltiples epidèmies i milers de casos clínics a Brasil, Panamà i Perú (Pinheiro, 1981; Watts, 1997). Actualment aquest virus està reemergint a Brasil amb més de 650 casos confirmats per les autoritats brasileres el darrer any 2009 (Vasconcelos *et al.*, 2009; ProMED-mail, 2009). El virus d'Oropouche produeix una simptomatologia clínica que avarca des dels típics símptomes gripals (febre, calfreds i miàlgia) fins altres més greus que cursen amb mareig, fotofòbia, vòmits, anorèxia i meningitis (Pinheiro *et al.*, 1981b; Pinheiro *et al.*, 1982b).

A nivell mundial, és en el camp de la sanitat animal (no humana) on rau la major repercussió dels *Culicoides* en relació a la transmissió viral. Els virus més importants que els *Culicoides* transmeten als animals són: el virus de la LB (VLB), el virus de la pesta equina africana (VPEA), el virus de la malaltia epizoòtica hemorràgica (VMEH), el virus d'encefalitis equina (VEE), el virus d'*Akabane* (VAKA), el virus de la febre efimera bovina (VFEB) i els virus Palyam. El VLB és capaç d'infectar a tot tipus de remugant, tot i que només afecta greument a certes races d'ovella, cérvols i muflons. La pesta equina africana (PEA) només afecta a èquids i pot ser una malaltia realment devastadora, amb mortalitat superior al 90% en poblacions susceptibles, essent aquesta una de les malalties més letals del

bestiar equí. La malaltia epizoòtica hemorràgica (MEH) afecta greument certes races de cérvol, mentre que les infeccions en altres remugants solen cursar sense simptomatologia clínica. L'encefalitis equina afecta a bestiar equí i aproximadament un 90 % dels casos solen cursar amb una infecció subclínica, desenvolupant el 10% dels casos restants una simptomatologia similar a la produïda pel VPEA. La infecció produïda pel VAKA és inaparent en animals no gestants, mentre que en animals gestants produeix malformacions congènites als fetus. El VFEB afecta al bestiar boví produint pèrdua de pes, una important reducció en la producció de llet i en certs casos, avortament i inclús la mort. Finalment, els virus Palyam s'han associat amb malformacions congènites i avortaments en bestiar boví.

## 1.2 La Llengua Blava

La malaltia de la LB va ser descrita per primer cop a Àfrica del sud com “febre” o “febre catarral malàrica” (Spreull, 1905). El nom de Llengua Blava és el resultat de l'anglicanització de la paraula *bloutong* provinent de l'afrikaans, una llengua derivada del neerlandès i parlada a l'Àfrica austral. Els grangers bòers de la zona van utilitzar la paraula *bloutong* per descriure la característica i distintiva llengua cianòtica d'ovelles greument afectades per la malaltia.

El VLB és l'agent etiològic de la LB, una malaltia infecciosa no contagiosa que pot afectar tant a remugants domèstics com salvatges (MacLachlan, 2004; Stallnecht i Howerth, 2004). Al voltant del món s'han identificat un total de 24 serotips fins al moment, encara que recentment s'ha identificat a Suïssa un nou virus en bestiar cabrú que podria representar un nou serotip de VLB per la seva variabilitat antigènica (Hoffmann *et al.*, 2008). Tot i que existeixen vacunes eficaces per fer front a la LB, aquestes solen ser específiques de serotip, sense que existeixi una protecció creuada, fet que complica enormement les campanyes de vacunació.

El grau de severitat de la LB pot variar entre espècies o inclús entre races dins una mateixa espècie, essent també un factor determinant el/s serotip/s viral/s circulant/s (MacLachlan *et al.*, 2009). Generalment, la malaltia i simptomatologia clínica es donen principalment en bestiar oví i certs remugants salvatges (Taylor, 1986). La infecció pel VLB en bestiar cabrú, boví i la majoria de remugants salvatges sol ser asimptomàtica o subclínica, afavorint la presència no detectable d'animals que actuen com a reservori de la malaltia. En

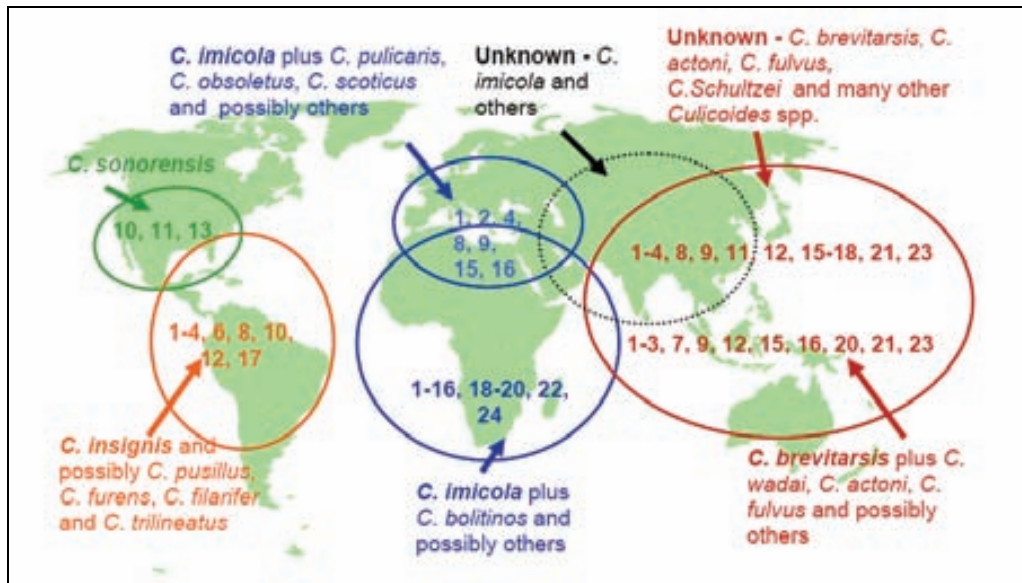
qualsevol cas, certs serotips de la LB, com el VLB-8 actualment present a Europa, produeix malaltia i lesions a altres espècies incloent bestiar boví i camèlids (Darpel *et al.*, 2007; Backx *et al.*, 2008; Henrich *et al.*, 2007; Toussaint *et al.*, 2007; Meyer *et al.*, 2008; Conraths *et al.*, 2009).

La simptomatologia clínica de la LB és molt variada, en bestiar oví pot incloure febre, hipersalivació i hiperlacrimació, descàrrega nasal i excessius moviments de la llengua entre altres. La malaltia produeix diverses lesions característiques com és la ulceració de les mucoses del tracte gastrointestinal superior (cavitat oral, esòfag i part superior de l'estómac), hiperanèmia de la banda coronària, edema de cap, coll i pulmó, necrosi del múscul cardíac i esquelètic, coagulopatia amb hemorràgies disseminades i elevada mortalitat en animals afectats. Si existeixen lesions en bestiar boví produïdes per LB, aquestes solen ser subtils. No obstant, en l'epizoòtia provocada pel serotip VLB-8, es van detectar ulceracions a la mucosa oronasal, lesions als mugrons del braguer, conjuntivitis i necrosi muscular, acompanyades de símptomes clínics típics de LB com salivació i febre entre altres (Elbers *et al.*, 2008).

La LB és una malaltia que causa importants pèrdues econòmiques en bestiar domèstic. Les estimacions de les pèrdues econòmiques a nivell mundial produïdes pel VLB a finals del segle XX, han estat estimades en tres bilions de dòlars anuals (Tabachnick *et al.*, 1996). Tan sols a l'any 2006, les pèrdues associades als brots europeus de LB, van ser estimades en 1,1 milions d'euros (Eurostat, 2007), tot i que posteriorment es va estimar que els costos directes associats als brots de l'any 2007 van arribar a superar els 150 milions d'euros (Hoogendam, 2007).

### 1.3 *Culicoides* com vector del virus de la LB

La descripció dels *Culicoides* com vectors de la LB en condicions naturals es va realitzar fa més de mig segle (Du Toit, 1944). Tot i que a nivell mundial la distribució de la malaltia es restringeix a zones tropicals i temperades, existeixen marcades diferències regionals quant a la presència de serotips de LB, tipus de bestiar afectat i presència d'espècies de *Culicoides* que actuen com a vectors (figura 1.2).



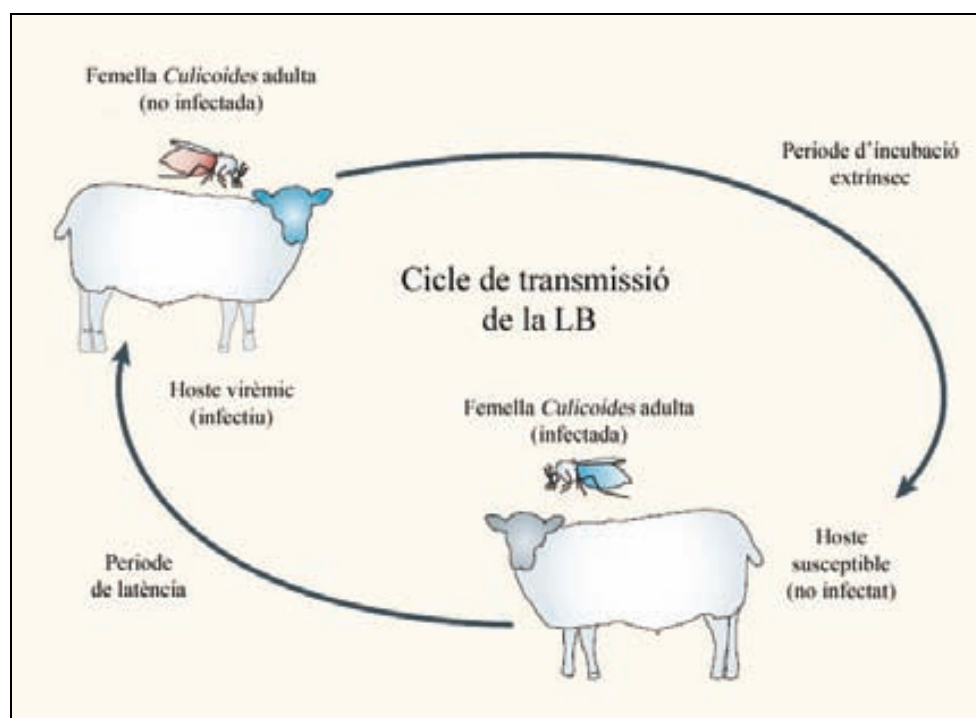
**Figura 1.2.** Distribució global de serotips de VLB i espècies de *Culicoides* vectors implicats en la seva transmissió (EFSA, 2007).

Fins el moment actual, s'ha involucrat aproximadament a unes 30 espècies de *Culicoides* en la transmissió de la LB arreu del món (Mesiwinkel *et al.*, 2004; EFSA, 2007). A l'Àfrica subsahariana s'ha demostrat que tant l'espècie *C. imicola* com *C. bolitinos*, entre altres, són capaces de transmetre VLB, havent identificat múltiples serotips de VLB en *C. imicola* a l'Àfrica del Sud. Aquesta mateixa espècie, *C. imicola*, també resulta ser el principal vector de VLB en la conca Mediterrània, així com molt probablement en el Pròxim Orient. A Europa, fa escassament una dècada que els esforços es van centrar en la detecció i monitoratge de *C. imicola*, el principal vector afro-asiàtic de la malaltia, restant així importància a la resta d'espècies autòctones europees tals com els *Culicoides* del grup *Obsoletus*, prèviament descrites com potencials vectors del virus (Mellor i Pitzolis, 1979). Finalment, al llarg dels últims anys s'ha incriminat altres espècies autòctones europees en la transmissió de la LB en base a tres aproximacions diferents: i) aïllaments virals realitzats en mosquits capturats durant brots de LB (Caracappa *et al.*, 2003; De Liberato *et al.*, 2005; Savini *et al.*, 2005), ii) detecció vírica mitjançant RT-PCR (Caracappa *et al.*, 2003; Meiswinkel *et al.*, 2007; Dijkstra *et al.*, 2008), o iii) mitjançant assajos d'infecció experimental (Carpenter *et al.*, 2006 i 2008). En la recent epizootia que ha afectat al nord d'Europa, on l'absència permanent de *C. imicola* ha estat confirmada (Rodeia *et al.*, 2008), les espècies que han estat relacionades amb la transmissió de la malaltia han estat principalment *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. chiopterus* i *C. dewulfi* (Meiswinkel *et al.*, 2007; Melhorn *et al.*, 2007; Dijkstra *et al.*, 2008). El principal vector de VLB a tot Nord Amèrica és



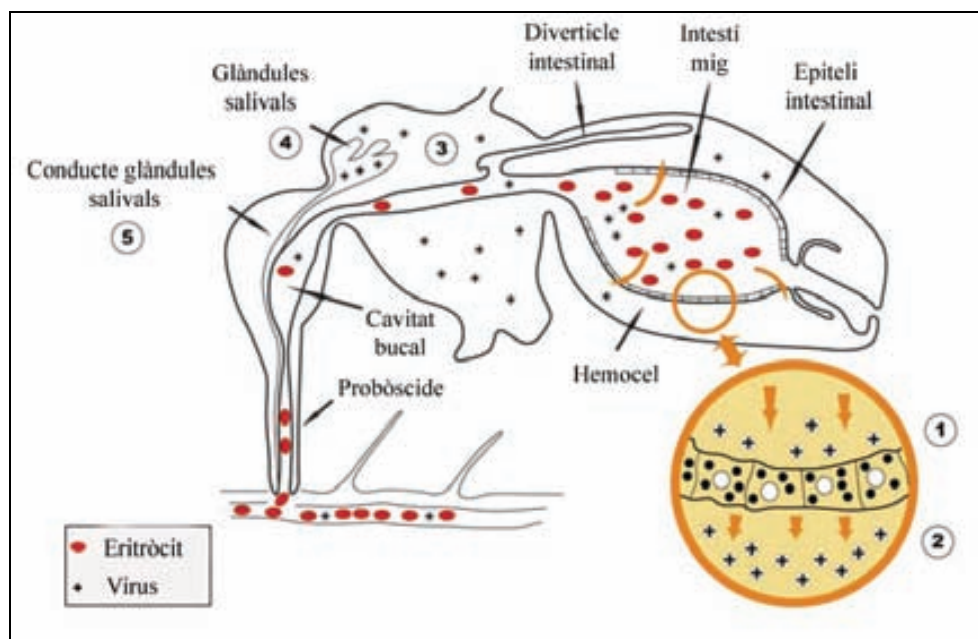
l'espècie *C. sonorensis*, excepte a la zona sud-est dels EEUU (Tabachnick, 1996 i 2004), on l'espècie *C. insignis* mostra el seu rang de distribució més septentrional. Aquesta última espècie, *C. insignis*, es distribueix pel sud a tot Amèrica Central i Sud Amèrica, on comparteix protagonisme amb *C. pusillus* (Mo *et al.*, 1994; Lager, 2004). Per últim, tant en el sud-est asiàtic com a Austràlia, *C. brevitarsis* n'és el principal vector, sospitant que també hi puguin estar involucrades les espècies *C. actoni*, *C. fulvus* i *C. wadai* (Melville, 2004).

El cicle de transmissió de la malaltia de la LB és similar al de la majoria de les arbovirosis (figura 1.3). El cicle s'inicia quan un artròpode no infectat, en aquest cas una femella adulta de mosquit *Culicoides*, s'alimenta d'un hoste virèmic (remugant) i ingereix sang amb suficients partícules víriques com per infectar al vector. Després d'un període d'incubació extrínsec, que és variable en funció de les condicions ambientals i l'espècie de mosquit, el virus replica a l'interior del vector en quantitat suficient com perquè aquest pugui ser infectiu. A partir d'aquest moment, quan la femella de mosquit adulta s'alimenta d'un nou hoste no infectat, aquesta infectarà a l'hoste sempre que aquest sigui susceptible a la malaltia. Després d'un període de latència, que serà variable en funció de les condicions ambientals i l'espècie de remugant, el nou hoste recent infectat desenvoluparà una virèmia que serà suficientment alta com per poder infectar als nous mosquits no infectats que s'alimentin d'ell, tancant així el cicle de transmissió.



**Figura 1.3.** Cicle de la transmissió del virus de LB (adaptat de Purse *et al.*, 2005).

Per tal que un mosquit pugui ser considerat com a vector competent cal que, quan el mosquit s'alimenta d'un hoste virèmic i ingereix la sang, el virus sigui capaç de ser disseminat a l'interior del vector, superant una sèrie de barreres físiques fins arribar a les glàndules salivals, on es produiria la seva replicació, acumulació *de novo* i posterior alliberament a la saliva (figura 1.4). Així doncs, el virus ha de poder: i) infectar les cèl·lules de l'epiteli intestinal (figura 1.4.1) i ser alliberat a l'hemocel (figura 1.4.2.), ii) disseminar a través de l'hemocel fins a les glàndules salivals (figura 1.4.3), iii) infectar les glàndules salivals (figura 1.4.4) i, per últim iv) ser alliberat de les glàndules salivals als conductes salivals conjuntament amb la saliva (figura 1.4.5) (Fu *et al.*, 1999; Mellor, 2000; Mellor, 2004).



**Figura 1.4.** Disseminació vírica a l'interior de vectors competents.

Seguint aquest cicle, un cop el mosquit ingereix la sang contaminada amb el virus i després d'un període extrínsec d'incubació que pot oscil·lar entre els quatre dies i varies setmanes, depenent de les condicions ambientals i el serotip de VLB del que es tracti (Mullens *et al.*, 1995; Wittmann *et al.*, 2002), el virus és capaç de replicar en quantitat suficient a les glàndules salivals del mosquit com perquè el vector ja resulti ser potencialment infectiu. Per completar el cicle, el vector infectiu ha de picar a un hoste susceptible al que infectaria injectant-li el virus a través de la saliva mentre s'alimenta de la seva sang. Paradoxalment, la susceptibilitat estimada a la infecció pel VLB en poblacions salvatges de



*Culicoides* és baixa, mentre que la probabilitat de transmissió del VLB d'un vector infectat a un hoste susceptible és propera al 100% (O'Connell, 2002).

#### 1.4 L'Epidemiologia de la LB a Europa i el canvi climàtic

La zona Europea ha estat tradicionalment una zona lliure de la malaltia de la LB, havent aparegut tan sols de manera esporàdica. Fins l'any 1998, únicament dues grans epizoòties aïllades de la LB havien estat registrades. La primera va tenir lloc entre els anys 1956 i 1960 quan el serotip VLB-10 va produir un llarg brot de la malaltia a Espanya i Portugal provocant la mort d'aproximadament 179.000 ovelles en els primers quatre mesos de l'epidèmia (Manso-Ribeiro *et al.*, 1957; López i Botija, 1958). Posteriorment, entre els anys 1979 i 1980, es van detectar nous brots a les illes gregues de Rodes i Lesbos provocades pel serotip VLB-4 (Vassalos, 1980; Dragonas, 1981). En ambdues epizoòties es va confirmar la presència de *C. imicola*, espècie que es va relacionar amb la transmissió vírica, ja que tots els brots es van solapar amb la seva presència més septentrional registrada fins el moment, descartant-la més al nord.

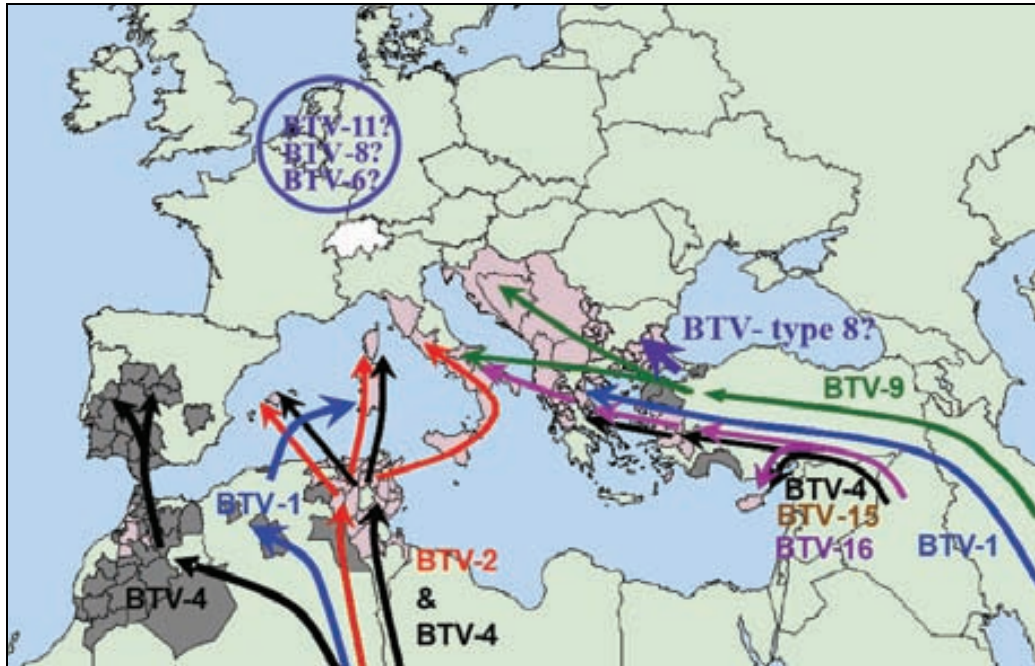
En l'última dècada, la distribució global de la LB ha canviat dràsticament degut al canvi climàtic (Wilson i Mellor, 2008; Purse *et al.*, 2008) i a l'augment del rang de distribució de *C. imicola*, un dels principals vectors de la malaltia que ha estat capaç d'introduir-se i establir-se a varis països europeus del mediterrani (Purse *et al.*, 2005). Múltiples brots de LB han estat registrats a varis països europeus, en els que fins al moment han estat identificats fins a 8 serotips diferents: VLB-1, 2, 4, 6, 8, 9, 11 i 16.

A nivell cronològic, el primer canvi dràstic va tenir lloc a l'any 1998, quan el serotip VLB-9 va ser detectat a varies illes gregues properes a les costes de Turquia (Mellor i Wittmann, 2002). En els tres anys següents, la malaltia es va expandir més cap al nord i l'oest, coincidint a més amb la introducció de tres nous serotips: VLB-1, VLB-4 i VLB-16 (Mellor i Wittmann, 2002; Panagiotatos, 2004). Al mateix temps, el serotip VLB-2 va ser detectat a Tunísia i posteriorment es va expandir a Algèria i el Marroc a l'any 2000 (OIE, 2000a i 2000b), i més endavant varies illes del centre i l'oest mediterrani, així com també a Itàlia. S'ha estimat que entre els anys 1998 i 2002, aproximadament 250.000 ovelles van morir a Europa pel VLB (Baylis, 2002). L'any 2003 es va detectar la circulació d'una segona soca del serotip VLB-4, diferent de la citada anteriorment a l'est mediterrani (Breard *et al.*,

2007), a Sardenya i les Illes Balears, i posteriorment va continuar la seva expansió fins la Península Ibèrica i Còrsega els anys 2004 i 2005. L'any 2006 el serotip VLB-1 va ser detectat al nord d'Àfrica i també va ser introduït a Espanya i Sardenya. La majoria d'aquestes epizooties van ser associades a una expansió cap al nord de *C. imicola*, ampliant així el seu rang de distribució.

El segon canvi dràstic va tenir lloc a l'agost del 2006, quan va ser detectat el primer cas de LB al nord d'Europa, produït pel serotip VLB-8 a Holanda. Actualment, tant l'origen com la ruta d'introducció d'aquest nou serotip exòtic de LB resulten incerts, però des de la seva introducció, successius brots de la malaltia van ser detectats a Holanda, Bèlgica, Alemanya, Luxemburg i França durant els anys 2006 i 2007 (OIE, 2006a, 2006b, 2006c, 2006d i 2006e). Durant l'any 2007 la malaltia es va expandir afectant a Dinamarca, Regne Unit, Suïssa i la República Txeca, i al 2008 es va observar que la malaltia, després de resistir l'hivern, va poder ampliar encara més el seu rang de distribució, afectant Suècia, Hongria, Austràlia i Itàlia. Per acabar, a finals de l'any 2008 Alemanya i Holanda van anunciar la detecció de circulació del serotip VLB-6 a la cabanya de boví sense observar simptomatologia clínica associada. L'anàlisi genètic dels aïllats vírics va mostrar una gran similitud amb la soca vacunal sud-africana modificada per ser utilitzada com vacuna viva (ProMED-mail, 2009b). Una situació similar va tenir lloc a Bèlgica, quan es va detectar la circulació de VLB-11 no virulent amb una gran similitud amb la soca vacunal Sud-africana de referència, utilitzada per produir la vacuna viva específica per aquest serotip (ProMED-mail, 2009b).

A la figura 1.5, es pot observar en detall les rutes d'introducció dels 8 serotips de LB detectats a Europa a l'última dècada: i) serotips VLB-1,4,9 i 16 que van ser introduïts a l'Europa de l'Est a través de Turquia i Xipre, ii) serotips VLB-1, 2 i 4 a través del nord-est d'Àfrica (Algèria i Tunísia) cap a Itàlia i les illes de l'oest mediterrani, iii) el serotip VLB-4 va ser introduït al sud d'Espanya i Portugal procedent del Marroc, i iv) el serotip VLB-8 ha estat registrat al nord d'Europa (Alemanya, Bèlgica, França i Holanda), però la seva ruta d'introducció encara resulta incerta, així com també es desconeix quin és l'origen dels serotips VLB-6 i 11 detectats a Alemanya, Holanda i Bèlgica respectivament.



**Figura 1.5.** Mapa de les diferents rutes d'introducció dels diferents serotips de LB aïllats a Europa des del 1998 (Adaptat de Peter Mertens, Institute of Animal Health).

L'augment global de les temperatures ha tingut un paper molt important en la disseminació de la malaltia per Europa (Purse *et al.*, 2005; Wilson i Mellor, 2008). En estudis previs ja s'anunciava la probable expansió septentrional del principal vector afro-asiàtic de la LB, *C. imicola*, per l'augment de les temperatures, podent introduir la LB o altres arbovirosis en latituds superiors a les habituals (Wittmann i Baylis, 2000). Lamentablement, s'ha pogut comprovar que a nivell global 11 dels 12 anys més calorosos registrats van tenir lloc entre els anys 1998 i 2006, essent cada cop menys freqüents els dies i nits fredes mentre que els dies i les nits càlides i caloroses han passat a ser més freqüents (Trenberth *et al.*, 2007).

En el cas de la LB, un increment de la temperatura pot contribuir a reduir el temps necessari per tal que un *Culicoides* digereixi la sang ingerida, i com a conseqüència, reduir l'interval entre alimentacions successives en hostes (Mullens i Holbrock, 1991), fet que incrementaria el risc de transmissió del virus patògen. L'augment de la temperatura durant el desenvolupament larvari, pot produir a més un increment de la competència vectorial en els mosquits i inclús induir l'anomenada competència en espècies no competents (Mellor, 2000; Mellor *et al.*, 2000). A més, la temperatura ambiental regula l'activitat de la RNA polimerasa viral i per tant la taxa de replicació del virus.

## 1.5 Programa de Vigilància Entomològica de LB a Catalunya

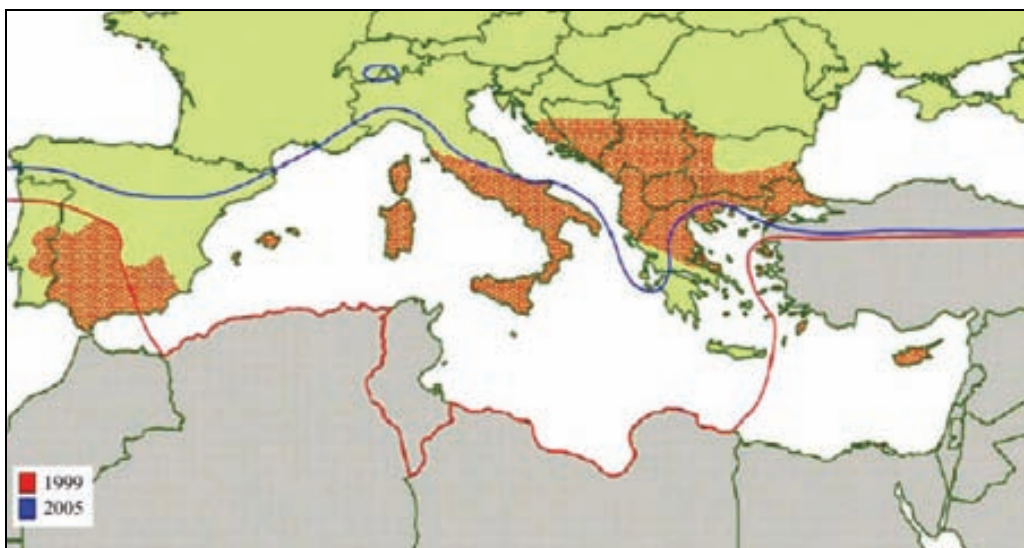
Actualment, els mecanismes d'introducció de la malaltia de la LB més caracteritzats són dos: el primer d'ells a través de moviment o transport de remugants virèmics o productes animals des de zones endèmiques o amb brots de la malaltia (Sellers i Taylor, 1980), mentre que el segon mecanisme està mediat per la dispersió de vectors *Culicoides* al llarg de grans distàncies a través de corrents aèries en condicions excepcionalment favorables pel transport i la supervivència dels vectors (Sellers, 1980; Alba, 2004). Degut a aquestes raons, els moviments d'animals i productes animals de zones endèmiques o epidèmiques cap a zones lliures de la LB estan fortament regulades per la legislació internacional.

L'any 2000, la LB va ser detectada a les Illes Balears i en conseqüència es va realitzar una campanya de vigilància entomològica per determinar la presència de vectors competents de LB a la zona. Els mostrejos efectuats entre 2001 i 2002 van mostrar que *C. imicola* estava present a les illes de Mallorca i Menorca però absent a Eivissa (Miranda *et al.*, 2003). Un cop descartada la importació de remugants infectats, la hipòtesi més plausible que explicava l'aparició de LB a les illes era el transport de *Culicoides* infectats a través de corrents aèries des d'àrees properes afectades pel mateix serotip, probablement Sardenya (Alba *et al.*, 2004).

Estudis previs apunten que els espècimens adults de *Culicoides* poden ser transportats pel vent llargues distàncies en condicions meteorològiques apropiades, com si es tractés de plàncton aeri, gràcies a la seva petita mida (1-3 mm) (Sellers, 1992; Wittmann i Baylis, 2000). Aquest fenomen ha estat àmpliament acceptat per la comunitat científica per explicar la introducció de la LB a Israel (Braverman i Chechik, 1993), Queensland, Austràlia (Ward, 2000) i Xipre (Polydorou, 1980).

La presència de *C. imicola* a les Illes Balears va representar un canvi en la distribució coneguda del mosquit. La seva presència no havia estat detectada amb anterioritat en la meitat est de la Península Ibèrica malgrat la realització de mostrejos a València en la dècada dels 70, i entre 1990-1991 a Almeria, Murcia, València, Tarragona, Barcelona i Girona (Sahuquillo-Herraiz, 1991; *Ministerio Español de Agricultura*, dades no publicades). La seva presència havia estat registrada a Portugal, essent Salses (41°38'N) la localitat més al nord on es va detectar (Capela *et al.*, 1993 i 2003). A Espanya, la cita més septentrional de *C. imicola* era de Talavera de la Reina (40°N), a Toledo, estant present en altres regions del sud-oest peninsular (Ortega *et al.*, 1998; Rawlings *et al.*, 1997; figura 1.6). Per estudiar l'amenaça que representava la hipotètica expansió del *C. imicola* per Europa, Wittmann i col·laboradors

(2001) van desenvolupar un model de regressió lineal per avaluar la distribució de *C. imicola* sota les condicions del moment, comparant-ho amb l'expansió esperada produïda per un hipotètic augment de la temperatura de +2°C. L'estudi conclou que sota les condicions d'escalfament, el mosquit seria capaç d'incrementar el seu rang de distribució cap a noves latituds més al nord, i de fet la situació actual sembla confirmar les previsions del model, havent detectat la seva presència a Alicante, València, Catalunya, Sardenya, Còrsega, França continental i Grècia (figura 1.6)



**Figura 1.6** Distribució coneguda de *C. imicola* l'any 1999 i 2005, comparada amb la distribució observada de brots de LB en els països europeus del mediterrani fins l'any 2006 (adaptat de Wilson i Mellor, 2008).

Com a conseqüència dels brots de LB de les Illes Balears de l'any 2000 i la posterior detecció en la zona de *C. imicola*, el principal vector de LB del vell món, es va decidir iniciar un programa de vigilància entomològica a Catalunya centrat en la detecció d'espècies que poguessin actuar com a vectors de LB. Es va posar especial interès en la detecció d'exemplars de *C. imicola* potencialment infectats amb VLB-2 que poguessin ser transportats pel vent des de les Illes Balears. La vigilància va començar l'any 2001 amb cinc trampes distribuïdes pel litoral català col·locades en granges d'ovelles i/o cabres, realitzant un mostreig setmanal al llarg de tot l'any.

L'any 2002 una femella gràvida va ser capturada a la localitat barcelonesa de Dosrius (Sarto *et al.*, 2003). Aquest va ser l'únic exemplar de *C. imicola* capturat durant l'any 2002,

molt probablement transportat pel vent des de les Illes Balears, separades uns 200 Km de la costa catalana. Durant l'any 2003, es va detectar la presència de *C. imicola* en set de les vuit trampes col·locades, amb un total de 160 exemplars capturats, el 80% dels quals eren del mateix punt on es va capturar una única femella l'any 2002 (Dosrius). Aquest fet era indicatiu de la presència d'una nova població estable en la zona. Des de l'any 2003 fins el 2007, *C. imicola* va experimentar una gran expansió a Catalunya, ampliant la seva distribució geogràfica i incrementant la seva abundància als llocs on ja era present (Pagès, 2007). Un cop detectada i analitzada la distribució de *C. imicola*, es va suggerir que altres espècies autòctones europees que pertanyen als subgèneres *Avaritia* i *Culicoides* podrien tenir un paper important en la transmissió de la LB, fent que l'interès de la vigilància entomològica a nivell europeu s'hagi ampliat i centrat principalment al voltant de les diferents espècies de *Culicoides* dels subgèneres *Avaritia* i *Culicoides*.







## Capítol 2

### OBJECTIUS

La reemergència de la LB a Europa està significat un gran llast pel comerç internacional de bestiar per les greus pèrdues econòmiques que això porta associat. Desgraciadament, la situació epidemiològica actual no sembla augurar un retrocés de la malaltia ni dels seus vectors, almenys a curt termini. Una peça clau pel control de la malaltia és conèixer, a través dels plans de vigilància entomològica, la distribució i abundància de les espècies que poden actuar com a vectors de la LB, identificant així aquelles àrees geogràfiques més susceptibles de servir de porta d'entrada i disseminació d'un nou brot viral.

El desenvolupament de nous mètodes que permetin la identificació precisa de les espècies de *Culicoides* circulants resulta del tot imprescindible per qualsevol pla de vigilància de LB, inclòs el que actualment es realitza a Catalunya. Desafortunadament, a dia d'avui i atenent a criteris morfològics, resulta pràcticament impossible la identificació de certes espècies. Amb aquest punt de partida, van ser dos els objectius principals plantejats en la present tesi doctoral:

- I. **Realitzar la identificació genètica dels potencials vectors de la LB presents a Catalunya**, centrant l'interès en espècies críptiques que pertanyen als subgèneres *Avaritia* i *Culicoides*.
- II. **Desenvolupar eines diagnòstiques basades en mètodes de biologia molecular** per identificar aquelles espècies críptiques que pertanyen als subgèneres *Avaritia* i *Culicoides*.



**Capítol 3**

**ESTUDI 1**

**Differentiation of *Culicoides obsoletus* and *Culicoides scoticus* (Diptera: Ceratopogonidae) based on mitochondrial cytochrome oxidase subunit I**

**N. Pagès i V. Sarto i Monteys**

Article publicat a Journal of Medical Entomology

J. Med. Entomol. 42 (2005): 1026-1034

VECTOR CONTROL, PEST MANAGEMENT, RESISTANCE, REPELLENTS

**Differentiation of *Culicoides obsoletus* and *Culicoides scoticus*  
(Diptera: Ceratopogonidae) Based on Mitochondrial Cytochrome  
Oxidase Subunit I**

N. PAGÈS AND V. SARTO I MONTEYS

Fundació CReSA/Entomologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Campus de Bellaterra, edifici CReSA, 05193  
Bellaterra, Barcelona, Spain

## Introduction

Complexes of sibling species are difficult to distinguish morphologically. Correct identification of these species is essential for understanding disease epidemiology, particularly when only some of the species in the complex are capable of transmitting disease causing pathogens. Some species of biting midges of the genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) are important vectors of several arboviruses of veterinary and medical significance. Bluetongue virus (BTV) and African horse sickness virus (AHSV) (Family Reoviridae, genus *Orbivirus*), are responsible for diseases affecting ruminants and horses, respectively. Bluetongue is an infectious, non-contagious disease affecting wild and domestic ruminants, although severe disease usually occurs only in certain breeds of sheep and some species of deer. The virus that causes it occurs worldwide, approximately between latitudes 35° S and 40° N (Mellor *et al.* 2000), with 24 serotypes identified to date (Mertens 1999). Bluetongue has spread to Europe recently. Since 1998, six BTV serotypes have spread across 12 countries and are now 800 km further north in Europe than has previously been reported (Purse *et al.* 2005). Spain has had three bluetongue epizootics since 2000, two in the Balearic Islands (OIE 2000; 2003) and one in mainland SW Spain (Andalucía and Extremadura) (OIE 2004a, 2004b). Prior to the recent outbreaks, the last bluetongue epizootic in Spain was in 1956-1960.

Different *Culicoides* species serve as BTV vectors in different geographical areas (Mellor *et al.* 2000). In Europe, *C. imicola* Kieffer is considered to be the major BTV vector. However, the occurrence of bluetongue in areas where *C. imicola* is rare or absent indicates that other *Culicoides* species can serve as BTV vectors. There is evidence that species in two widespread and abundant palaeartic species groups, the Obsoletus group and the Pulicaris group, play a role in BTV transmission. Evidence for a role for the Obsoletus group, includes (1) these species are abundant in areas where *C. imicola* was found to be absent when there were bluetongue outbreaks and (2) BTV was isolated during outbreaks from wild-caught individuals in Cyprus (Mellor and Pitzolis, 1979) and, more recently, in Italy (Savini *et al.* 2003, De Liberato *et al.* 2005). The Pulicaris group was identified as a BTV vector in Sicily (Caracappa *et al.* 2003). These species were suspected of being vectors of AHSV since AHSV isolations were made from mixed pools of specimens belonging to the Obsoletus and Pulicaris groups in Spain (Mellor *et al.* 1990). BTV and AHSV use the same *Culicoides* species as vectors (Mellor 1993).

*Culicoides obsoletus* (Meigen) and *Culicoides scoticus* Downes & Kettle are members of the subgenus *Avaritia* Fox. This subgenus comprises about 30 species in the Palaearctic region and are usually referred to collectively as the *Obsoletus* Group or *Obsoletus* Complex. Most of the species in *Avaritia* are widely distributed across the Palaearctic, up to the 70<sup>th</sup> parallel. Six species occur in Spain: *C. montanus* Shakirzjanova, *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. chiopterus* (Meigen), *C. dewulfi* Goetghebuer and *C. imicola* (Rawlings 1997, Delécolle 2002), whereas three (*C. obsoletus*, *C. scoticus* and *C. imicola*) also occur in Catalonia (Sarto i Monteys and Saiz-Ardanaz 2003).

*Culicoides obsoletus* and *C. scoticus* are found in association with various breeds of livestock, in Bulgaria (Glouhova *et al.* 1991), NE Spain (Sarto i Monteys and Saiz-Ardanaz 2003) and Italy (Savini *et al.* 2003). Unfortunately, the females of these two species (and also those of most species in the group) are very difficult to distinguish, and the species are only separable on the basis of certain characteristics of the male genitalia (Kremer and Rebholz 1977, Rawlings 1997), with few exceptions (Gomulski *et al.* 2005). Delécolle (1985) observed that two morphological characteristics distinguish *C. obsoletus* and *C. scoticus* females: a) the length of the two spermathecae (sac-like reservoirs that receive spermatozoa during copulation, located in the lower third of the female abdomen) and b) the way the margins of the two chitinous plates surrounding the genital opening face each other, along with the size/sharpness of the points located at the posterior ends of such margins. Figure 3.1 shows these structures schematically.

It is not known whether all of the species or only some of them in the group are vectors of AHSV and BTV, despite the fact that both viruses have been isolated from *obsoletus sensu lato* specimens.

*Culicoides imicola ss (sensu stricto)*, the main BTV and AHSV vector in Europe, is the only representative in Europe of the *Imicola* group, which in Southern Africa alone comprises at least 10 species (Meiswinkel 1998). At least two of the species, *C. imicola ss* and *C. bolitinos* Meiswinkel, have been recognized as BTV and AHSV vectors (Venter *et al.* 1998). Seven species of the *Imicola* group, were confirmed using molecular markers (Sebastiani *et al.* 2001, Linton *et al.* 2002) and found to possess stable morphological markers that allowed for their reliable identification in the field (Meiswinkel *et al.* 2004). In addition, Cêtre-Sossah *et al.* (2004) designed highly specific and sensitive primers (based on the Internal transcribed

spacer 1 gene) permitting a rapid and reliable PCR-based diagnostic assay for the detection of *C. imicola* in mixed pools of other European *Culicoides* species .

The present work describes a diagnostic assay using the mitochondrial gene cytochrome oxidase subunit I to distinguish *C. obsoletus* and *C. scoticus* females. A species-specific polymerase chain reaction (PCR) distinguished *C. scoticus* and *C. obsoletus* females from Italy based on internal transcribed spacer 2 (ITS2) ribosomal DNA sequences (Gomulski *et al.* 2005). The present work assesses the reliability of the morphological characters to distinguish the females of these two species.

## **Materials and methods**

### **Sample Collection.**

Biting midges of the genus *Culicoides* were collected using light traps (Miniature blacklight trap Model 912. John W. Hock Company, Gainesville, Florida, USA). Collections for a biometric study of female spermathecae were obtained between May 2001 and May 2002 on a farm located in the town of Dosrius (Barcelona-Spain). Additional collections were obtained from May 2003 through January 2004, at Dosrius and other farms located in Catalonia and the Balearics (Table 3.1), for either sequencing the COI gene or for a species-specific diagnostic PCR.

Light traps were placed outside enclosures where livestock were confined. Collections were made once a week. Traps were switched on at dusk and off at dawn the following day. Collection bags were removed in the morning and taken to the laboratory where bags were placed in a freezer for ca. 12 hours to kill the insects. All specimens in the *Obsoletus* group (only *C. obsoletus* and *C. scoticus* were found on the farms) were subsequently separated and preserved for further study in either 70% ethanol at laboratory temperature or 96% ethanol at -20°C.

### **Measurements of Spermathecae and Shape Diversity of Chitinous Plates.**

*Culicoides* were dissected with the aid of an Olympus SZH stereomicroscope, fixed in Tendeiro solution (distilled water: 35 ml; chloral hydrate: 40 g; glacial acetic acid: 18 ml; polyvinyl alcohol: 7 g) and mounted on glass microscope slides.

A total of 995 females of the *Obsoletus* group, all collected at Dosrius farm, were dissected. Females to be dissected were chosen arbitrarily from the collections obtained between May 2001 to May 2002.

Individual abdomens were removed using ultrafine tweezers and placed individually in a 1350  $\mu\text{m}$  x 1250  $\mu\text{m}$  cell, of a nylon matrix of ca. 50 cells set on a microscopic slide in ca. 125  $\mu\text{l}$  Tendeiro solution. The remaining head, thorax, wings and legs of each specimen were placed on a second matrix, ordered the same way as the abdomens on the same slide. When each matrix was filled, they were each covered with a slide cover (Figure 3.2). Abdomens were placed in the cells with the ventral side up to better observe spermathecae and chitinous plates. The slides were air dried at room temperature for 10-15 days.

The length of the larger of the two functional spermathecae (BSL) (Figure 3.1, inset), as well as the length of the abdomen, were measured under an Olympus BX50 light microscope, using a 0.1 mm calibrated ocular micrometer. Malformed spermathecae or those that could not be properly measured, were not included (799 were measured of 995 dissected females). Statistical analysis (frequency distribution) was carried out using Statgraphics Plus software (version 5.0 for Windows), results being expressed in  $\mu\text{m}$  as mean  $\pm$  standard deviation.

The two chitinous plates surrounding the female genital opening, were sketched from images taken using a digital camera (Nikon DXM1200F) coupled to a Nikon Eclipse 90i microscope (Nikon Corporation, Tokyo, Japan).

### **Cytochrome oxidase subunit I (COI) sequencing.**

*Culicoides obsoletus* and *C. scoticus* males are easily distinguished on the basis of their genitalia. Therefore, their genetic variability could be studied and later used to distinguish the females of both species. The PCR analysis was based on a 522 bp (primers included) fragment of the gene COI using primers C1-J-1718 and C1-N-2191 designed by Simon *et al.* (1994). Nucleotide 1 of the *Culicoides* sequence corresponds to COI's nucleotide 250 and the last (nucleotide 472) corresponds to COI's nucleotide 722.

*Culicoides obsoletus* and *C. scoticus* males from the collection sites, previously identified morphologically and stored in ethanol, were individually homogenized for DNA extraction. With fresh specimens (less than two months in ethanol), DNA extraction was performed using the Single fly DNA preps for PCR (Gloor and Engels 1992). Homogenization was done using a tip of a pipet for 5-10 seconds in a 0.2 mL PCR tube,

containing 50 µL of buffer (10 mM Tris HCl pH 8.2, 1 mM EDTA, 25mM NaCl and 200 µg/µL proteinase K). The tubes were then incubated at 25-37°C for 25-30 minutes, to which immediately followed a 1-2 minutes treatment at 95°C to inactivate proteinase K. Specimens more than two months in ethanol had their DNA extracted using the commercial kit DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Crawley, U.K). Extraction was carried out following the manufacturer's instructions, although, for a better DNA recovery, the sample was eluted in a final volume of 100 µL (instead of 200 µL).

PCR reactions were performed in a final volume of 50 µL in 0.2 mL tubes, using 2mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM dNTP's, 0.3 mM each primer, 1 EcoTaq polimerase unit and 10 µl of genomic DNA. Primers used were C1-J-1718: 5' GGA GGA TTT GGA AAT TGA TTA GTT CC 3' and C1-N-2191: 5' CCC GGT AAA ATT AAA ATA TAA ACT TC 3' (Simon *et al.* 1994). Reactions were carried out in a programmable thermal cycler (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems). The DNA amplification program was: an initial denaturing step at 94°C for 3 minutes, followed by 35 cycles at 94°C for 30 seconds, 54°C for 30 seconds, 72°C for 30 seconds, and a final extension step at 72 °C for 7 minutes. Then tubes were stored at 4°C for further processing. Controls on the amplification reactions were carried out every PCR round by adding all reagents, but the genomic DNA.

Electrophoresis in 2% (w/v) agarose TAE gel (SeaKem LE Agarose) was used to confirm PCR-amplified DNA. It was carried out at 10 V/cm per 1 hour, stained later for 30 minutes with Sybr Gold nucleic acid gel stain 1:10000 dilution. After DNA band confirmation on the gel, and when dimer formation from the primers did not occur, the PCR-purification was performed using QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Crawley, U.K.). If dimers occurred, purification was performed using QIAquick gel Extraction Kit on the appropriate PCR fragments that were excised from the gel.

DNA purified products of 522 bp were tagged using Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) in 10µL reaction volumes which included the original primers C1-J-1718 and C1-N-2191. After the sequencing reaction, products were purified by ethanol precipitation and sequenced (both strands) on an Abi Prism 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Several midges (13 *C. obsoletus* (2 ♂, 11 ♀) and 13 *C. scoticus* (1 ♂, 12 ♀)) from different sampling sites in Catalonia and the Balearics were sequenced for the COI gene.



The sequences obtained were aligned using the BioEdit Sequence Alignment Editor software (version 5.0.9. for Windows) (Hall, 1999). The genetic differences between *C. obsoletus* and *C. scoticus* males, as well as those among males within the same species, were analyzed using the DNA Sequence Polymorphism software (version 4.0 for Windows) (Rozas *et al.* 2003).

### **Molecular diagnosis.**

A sample of 521 *Obsoletus* group females (i.e. *Culicoides obsoletus* + *Culicoides scoticus*), from the collections listed in table 3.1, were chosen at random. Individual female abdomens were separated as described above and placed in the nylon matrices as above. The rest of the body parts (head, thorax, wings and legs) of each female specimen, which might be used for extracting its DNA, were placed in 0.2 mL tubes and stored at -20°C.

The BSL was determined for all 521 females, but only 106 females were selected for molecular diagnosis. Procedures for extracting DNA from females were similar to those described for males.

Diagnostic hemi-nested PCR was performed in a final volume of 50 µL. Each reaction was performed using 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM dNTP's, 0.2 mM per original primer (C1-N-2191 and C1-J-1718), 0.1 mM of the diagnostic primer (*C. scoticus* or *C. obsoletus*), 1 EcoTaq polimerase unit and 10 µl of genomic DNA. Hemi-nested PCR reactions were carried out in a programmable thermal cycler GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems). The DNA amplification program used was as described for males.

## **Results and Discussion**

### **Species-specific Diagnosis Based on Biometry**

We assumed that only *C. obsoletus* and *C. scoticus* were present in the pool based on finding only males of these species in our collections.

As a result we expected to observe a bimodal distribution of BSL due to the presence of the two different species in the pool of 799 females. The range of BSL was 27.17 - 83.98 µm (mean = 54.67 ± 11.51 µm;  $\sigma_M = 0.407751$ ), not surprisingly much wider than that of Delécolle's (n = 15; range: 50-67 µm). The standardized skewness = 2.30498 and

standardized kurtosis = - 4.60083, indicated a significant deviation from normality. The BSL distribution was bimodal, suggesting two species were present in the pool. In addition, the variations in density or density trace over the range of BSL showed a bimodal distribution with a considerable overlapping region (Figure 3.3). Delécolle (1985) did not observe overlap between the BSL of the two species. Although Delécolle (1985) concluded that all females with a BSL  $\leq 59 \mu\text{m}$  were *C. obsoletus* and those with a BSL  $\geq 61 \mu\text{m}$  were *C. scoticus* there were 45 females in our collections with BSL between 59  $\mu\text{m}$  and 61  $\mu\text{m}$ . As a result these could not be assigned to either species. Our observations on a larger sample than that studied by Delécolle (1985) concluded that distinguishing the females of both species on the basis spermathecae lengths was not reliable.

### COI Sequence and Species Specific PCR Diagnostic Assay

A 472 bp fragment was obtained and sequenced. The fragments were assigned to either *C. obsoletus* or *C. scoticus* based on those of the three males sequenced since males of both species are easily identified on the basis of their different genitalic structures. The analysis of the 26 sequences showed that both species had intraspecific polymorphisms, bearing both transitions and transversions, with several haplotypes found (Figure 3.4). Sequences were aligned using a sequence of *Anopheles gambiae* s.s. (GenBank Accession number AF 252878) to locate the translating reading frame. Nucleotide sequences were translated into aminoacid sequences using the invertebrate mitochondrial code in the software MEGA 2.0 (Kumar *et al.* 2001) and showed that the intraspecific substitutions were synonymous substitutions.

The base composition in the COI gene for both *Culicoides* species is similar to that of most insects (Crozier and Crozier 1993), i.e. strongly AT biased, with an observed G+C content of  $0.3615 \pm 0.00568$ . G+C composition at third codon positions was 0.194 whereas that at the second codon positions amounted to 0.448, somewhat less AT biased. This sequence translates different protein domains of the cytochrome oxidase I gene: internal loops, transmembrane helices and external loops (Lunt *et al.* 1996). *Culicoides obsoletus* and *C. scoticus* differ for three aminoacidic substitutions which result from four non-synonymous changes: two in the external loop E2, affecting aminoacids 133 (A $\rightarrow$ S) and 135 (V $\rightarrow$ I), and one in the internal loop I2, affecting aminoacid 173 (T $\rightarrow$ Y).

### PCR Primers and Testing of PCR Diagnostic

We observed that *C. obsoletus* and *C. scoticus* shared a 38 bp region (codifying for a part of COI external loop E2) which showed interspecific but no intraspecific variation. The interspecific variability was used to design two species-specific primers for a PCR-based diagnostic assay. The primers were as follows: for *C. obsoletus*: 5' CAG GAG CTT CTG TAG ATT TGG CT 3' (primer 'CO') and for *C. scoticus*: 5' CAG GAG CCT CAG TTG ACT TAG CA 3' (primer 'CS').

The One Tube Hemi-Nested PCR technique used three primers in the same reaction: two amplify the initial COI sequences (C1-J-1718/C1-N-2191) and the third was one of the two species-specific primers for distinguishing between *C. scoticus* and *C. obsoletus*, i.e. primer CS or primer CO. Therefore, a female *C. obsoletus* would produce two bands for the tube containing the CO primer (one band resulting from the amplification between C1-J-1718 and C1-N-2191, a fragment of 522 bp, and a second band resulting from the amplification between C1-N-2191 and CO, a fragment of 334 bp) and one band for the tube containing the CS primer (resulting from the amplification between C1-J-1718 and C1-N-2191 only). Similarly, *C. scoticus* females would produce two bands in the presence of the CS primer and one band for the tube containing the CO primer. This is shown in (Figure 3.5).

All 106 females tested showed amplifications using either the CS primer or the CO primer, therefore confirming the reliability of the PCR-based diagnostic assay in differentiating *C. obsoletus* and *C. scoticus* females.

The One Tube Hemi-Nested PCR technique has advantages compared to a Nested PCR or a conventional diagnostic PCR. Firstly, it is quicker and cheaper, since it accomplishes diagnosis in a single reaction, instead of the two consecutive reactions needed for a Nested PCR. Secondly, it allows one to discern between a negative result, when there is only a single band present on the gel, the 522 bp fragment resulting from the amplification between C1-J-1718 and C1-N-2191, from a total reaction failure due to a lack of DNA, presence of inhibitors, etc., where no bands (i.e. no amplification) are observed on the gel. This would also be a problem using a conventional diagnostic PCR.

### Morphology Compared to Molecular Diagnosis

We compared the diagnostic value of the BSL in *C. obsoletus* and *C. scoticus* using the 106 females whose species had been established using the COI gene sequence. The 106

females were sorted into three groups according to their BSL values consistent with the criteria for species assignment proposed by Delécolle (1985) (Table 3.2). How the particular BSL value for each one of these females disperses over the whole BSL range is shown in Figure 3.6. There, it can be clearly seen that *C. scoticus* has a wider variability than *C. obsoletus*, this accounting, to a large extent, for the non-reliability of the BSL morphological character to distinguish the two species. Although *C. scoticus* generally has larger BSL than *C. obsoletus*, many exceptions occur, specially within group I with 32.73% of these BSL *C. obsoletus* are *C. scoticus* based on the COI gene.

According to Delécolle (1985), *C. obsoletus* and *C. scoticus* females can also be distinguished by the way the margins of the two chitinous plates surrounding the genital opening face each other, along with the size/sharpness of the points located at the posterior ends of such margins. *Culicoides scoticus* has margins that converge posteriorly, both ending in one conspicuous and sharp point (Figure 3.7a; 3.7c) whereas *C. obsoletus* females have margins that do not converge, being instead parallel each other, both ending in one inconspicuous, small point (Figure 3.7b; 3.7d).

A sample of females (30 *C. scoticus*, 18 *C. obsoletus*) out of the 106 females previously examined using the COI gene were examined for the morphology of their chitinous genital plates. 41 (85.42%) out of the 48 females whose chitinous plates were analyzed, showed concordance between the morphology and COI gene diagnosis. The remaining seven (14.58%) were not in accordance. Four belonged to *C. scoticus* according to the COI gene, but the margins of their chitinous plates did not end in one conspicuous and sharp point (Figs. 3.8a; 3.8b; 3.8c). One specimen (Figure 3.8c) also had margins virtually parallel to each other. Three other females belonging to *C. obsoletus* according to COI had margins parallel to each other, but also had conspicuous points at their ends like *C. scoticus* (Figs. 3.8d; 3.8e). *Culicoides scoticus* had widely variable margins, but *C. obsoletus* always had parallel margins.

### Conclusions.

The COI gene and PCR diagnostic should prove useful in distinguishing *C. obsoletus* and *C. scoticus* females. Further work will be needed to assess the potential for geographic

intraspecific variation in the COI markers to assure that the diagnostic is useful in throughout the range of both species.

### **Acknowledgements**

We thank A. Bensaid and D. Ventura, for advice on molecular techniques and Dipteran taxonomy, respectively. M. Domingo's support for the molecular studies is deeply appreciated. M.A. Miranda provided *Obsoletus* group specimens from Majorca. We thank the Catalanian Department of Agriculture, Livestock and Fisheries for coordination and financial support for the surveillance programme that provided *Culicoides* from Catalonia. The comments of two anonymous reviewers were useful in improving this manuscript.

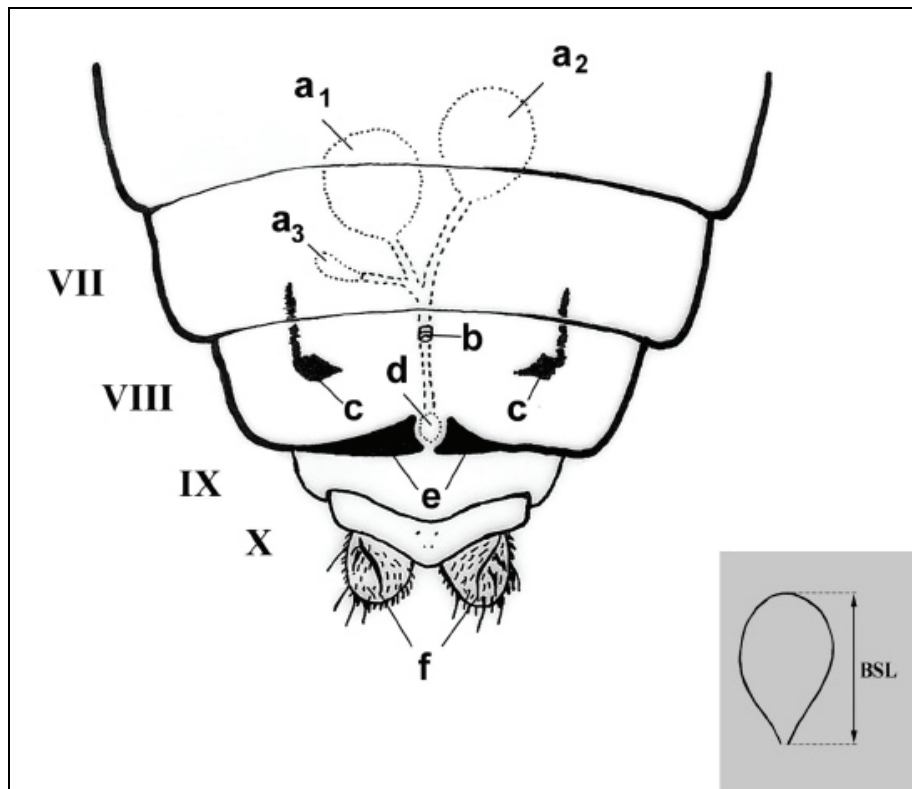
**Table 3 1.** Sampling sites for *C. obsoletus* and *C. scoticus* used for either sequencing the COI gene or running a species-specific diagnostic PCR assay

Sampling sites	Spanish A.C.	Geographic coordinates
Peralada	Catalonia	42° 19' N / 3° 01' E
Vilanova de la Muga	Catalonia	42° 18' N / 3° 02' E
Dosrius	Catalonia	41° 35' N / 2° 25' E
Bellaterra	Catalonia	41° 31' N / 2° 06' E
Cervelló	Catalonia	41° 23' N / 1° 55' E
Vinallop	Catalonia	40° 46' N / 0° 30' E
La Galera	Catalonia	40° 40' N / 0° 27' E
Capdepera	Balearics	39° 39' N / 3° 26' E
Felanitx	Balearics	39° 27' N / 3° 14' E

**Table 3.2.** *C. obsoletus* and *C. scoticus* females grouped according to their BSL values with comparison molecular diagnosis based on the COI gene.

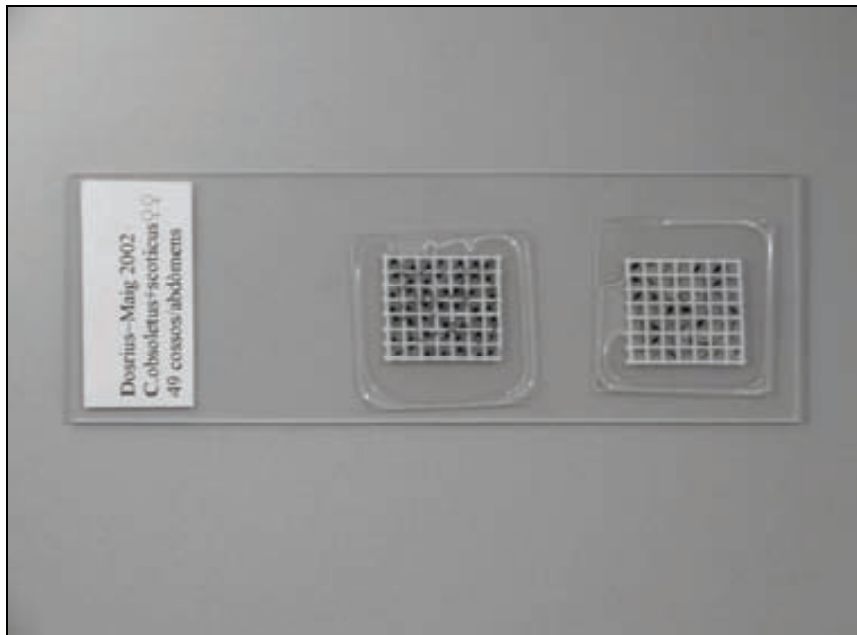
Group of females	BSL	Number of females ( <i>C. obsoletus</i> + <i>C. scoticus</i> )	BSL diagnosis according to Delecolle (1985)	Molecular diagnosis based on COI gene	Percentage of BSL diagnosis error
I	≤ 59µm	55	all <i>C. obsoletus</i>	37 <i>C. obsoletus</i> + 18 <i>C. scoticus</i>	32.73%
II	> 59 µm and < 61µm	1	undefined	<i>C. obsoletus</i>	-
III	≥ 61 µm	50	all <i>C. scoticus</i>	2 <i>C. obsoletus</i> + 48 <i>C. scoticus</i>	4.00%

**Figure 3.1.** Lower third of abdomen (ventral view) of a *Culicoides* female. a<sub>1</sub>, a<sub>2</sub>, functional spermathecae; a<sub>3</sub>, rudimentary spermatheca; b, chitinous ring; c, abdominal sclerites; d, genital opening; e, chitinous plates; f, cerci; VII, VIII, IX and X correspond to 7th, 8th, 9th and 10th abdominal segments respectively (reproduced from Delécolle, 1985). Inset shows schematic drawing of the larger of the two functional spermathecae in *C. obsoletus* and *C. scoticus*. The BSL line marks the length measured, i.e. the bigger spermatheca length (BSL).

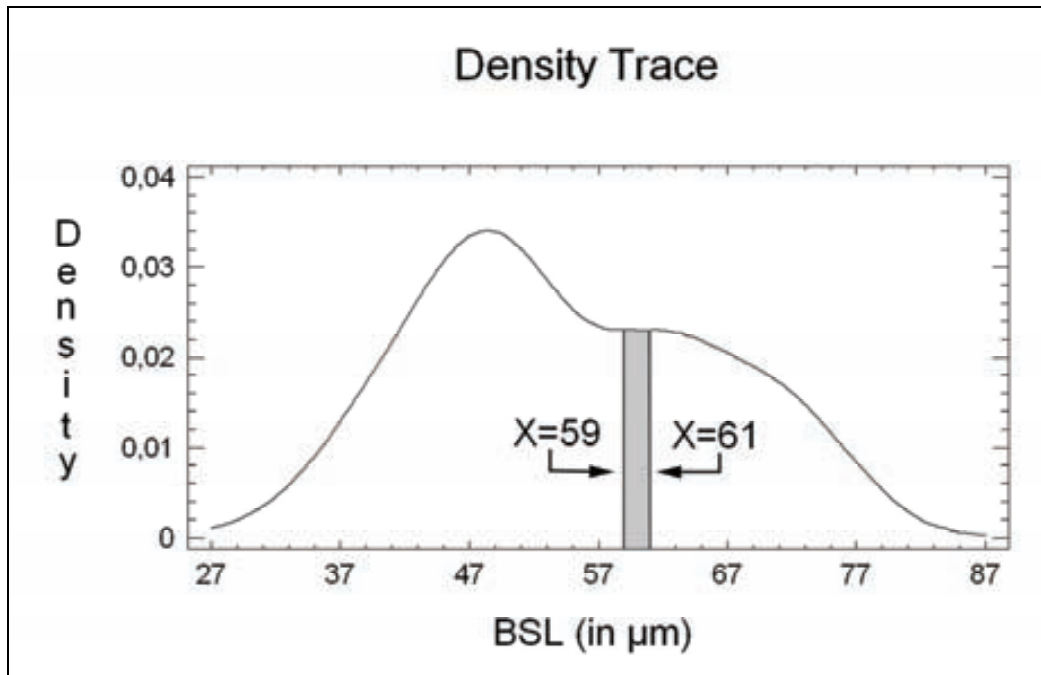




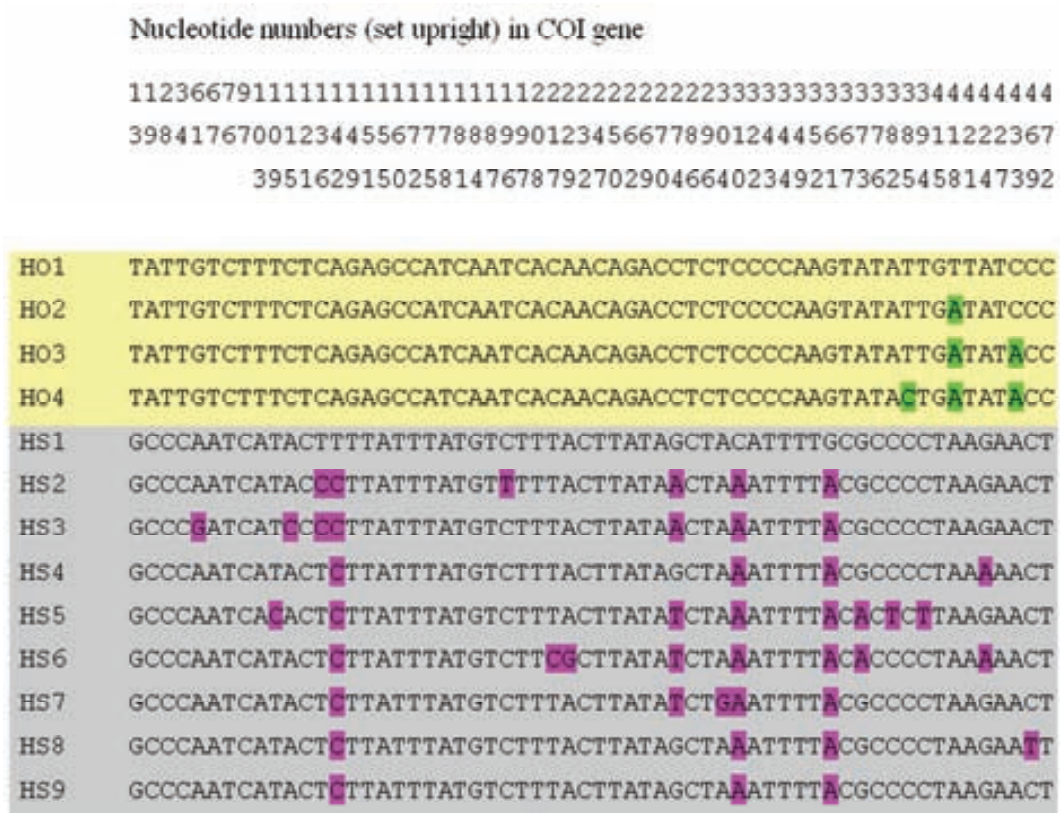
**Figure 3.2.** A microscopic slide containing two nylon matrices each with 49 cells. The left matrix contains 49 heads and thoraces, with wings and legs, belonging to 49 *C. obsoletus* + *C. scoticus* females; the right matrix contains the corresponding 49 abdomens of these specimens.



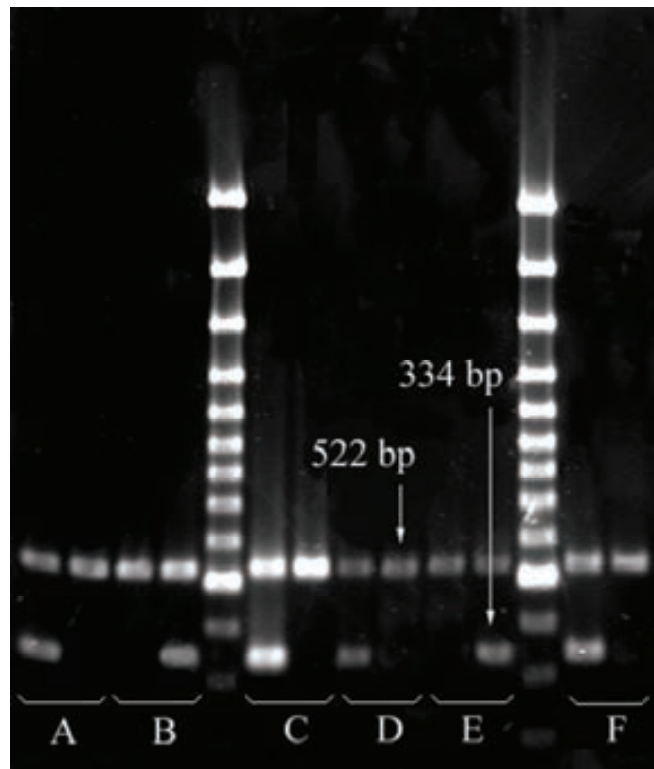
**Figure 3.3.** The graph shows a bimodal distribution of data for the variable BSL from a total of 799 *Obsoletus* group females. A considerable overlapping zone exists.



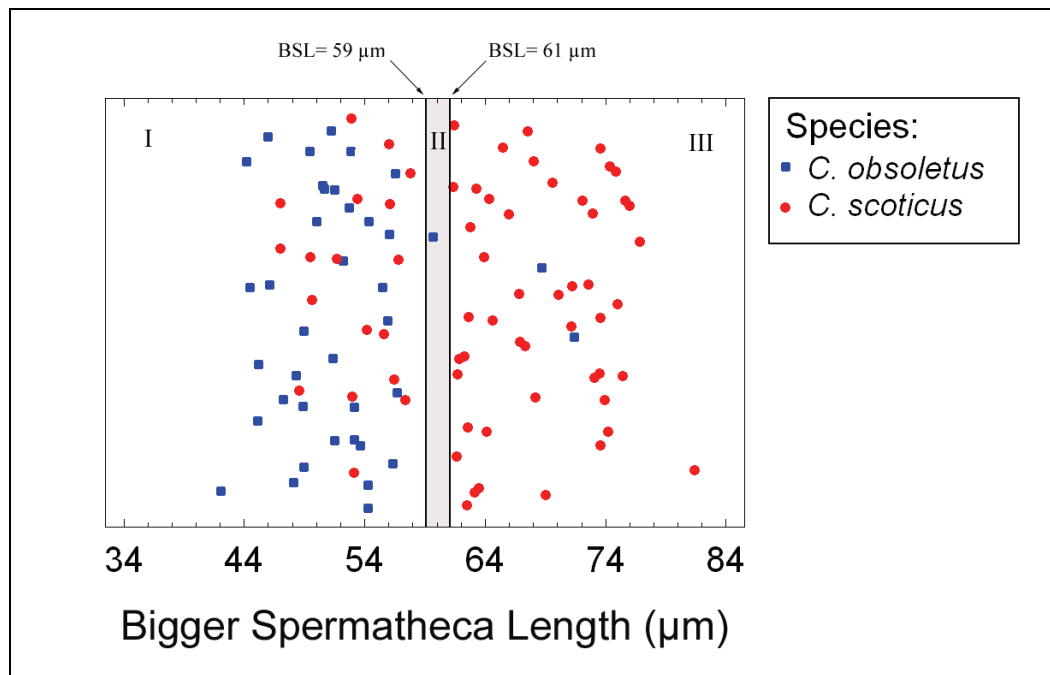
**Figure 3.4.** Haplotypes detected in 13 specimens of *C. obsoletus* and 13 specimens of *C. scoticus* within the fragment of 472 bp (excluding primers) of the gene cytochrome oxidase I (COI). Only polymorphic positions between and within the two species are shown aligned. *Culicoides obsoletus* haplotypes are HO1 - HO4. *Culicoides scoticus* haplotypes are HS1- HS9. Intraspecific nucleotide changes (compared to the first haplotype) for both species are highlighted in green for *C. obsoletus* and in purple for *C. scoticus*.



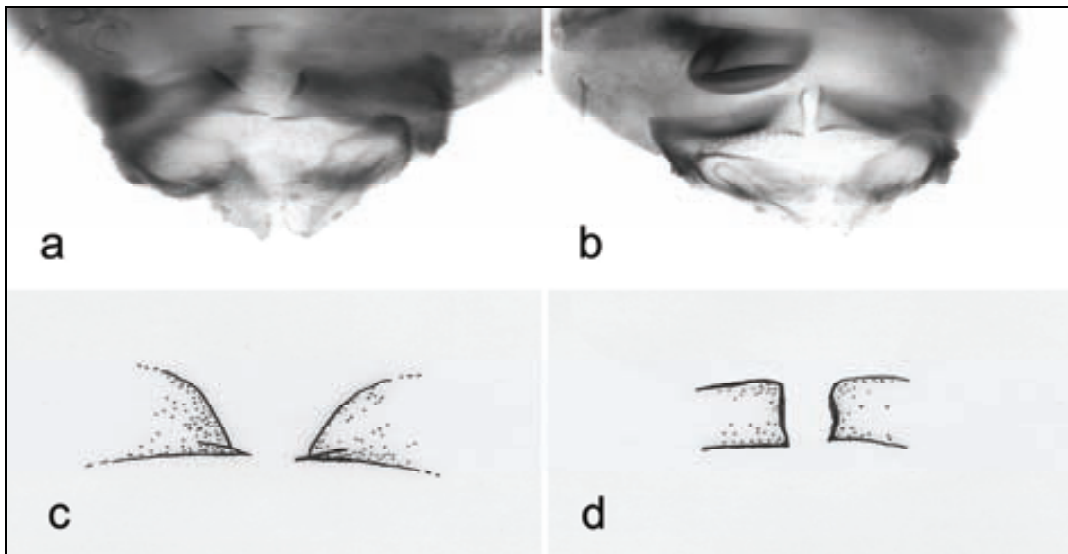
**Figure 3.5.** 522 bp and 334 bp DNA fragments on agarose gel resulting from the amplification carried out using the One Tube Hemi-Nested PCR technique. Six female specimens belonging to either *C. scoticus* (A, C, D and F) or *C. obsoletus* (B and E) are shown. Lanes 5 and 12 show a DNA ladder for estimating sizes of the fragments.



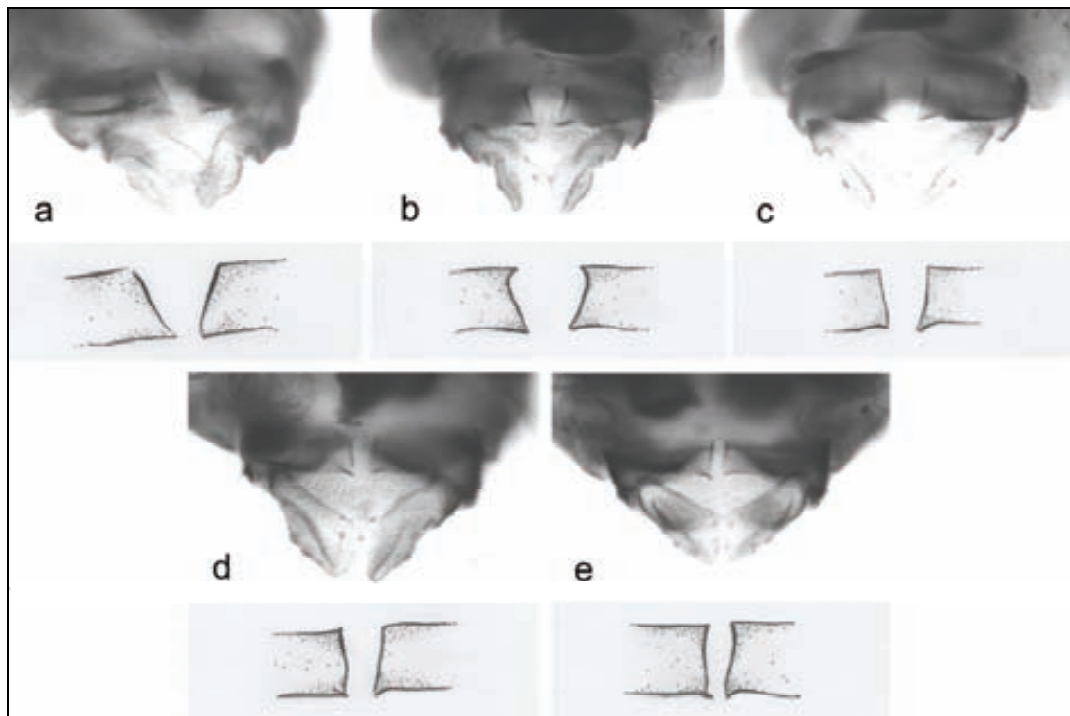
**Figure 3.6.** Scatter plot showing the dispersion of the BSL values for the 106 females whose species had been established using the COI gene sequence. The females are sorted into three groups (I, II and III) according to their BSL values consistent with the criteria for species assignment proposed by Delécolle (1985).



**Figure 3.7.** Chitinous plates surrounding the genital opening of female *C. scoticus* (**7c**) and female *C. obsoletus* (**7d**) according to Delécolle (1985). (**7a**) Lower part of the abdomen, set ventrally, of a female *C. scoticus* and (**7b**) a female *C. obsoletus* clearly showing the two chitinous plates. These two specimens were confirmed using the COI gene and showed concordance with the morphology.



**Figure 3.8.** Chitinous plates surrounding the genital opening of three *C. scoticus* females (3.8a, 3.8b, 3.8c) and two *C. obsoletus* females (3.8d, 3.8e) These five specimens were confirmed using the COI gene and showed no concordance with the morphology.







## Capítol 4

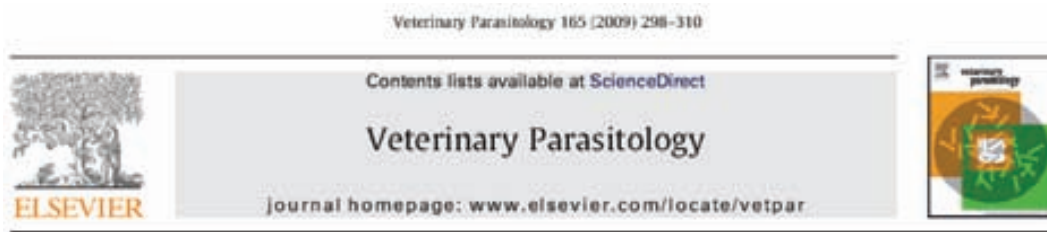
## ESTUDI 2

**Identification of cryptic species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in the subgenus *Culicoides* and development of species-specific PCR assays based on barcode regions**

**N. Pagès, F. Muñoz-Muñoz, S. Talavera, V. Sarto, C. Lorca and J.I. Núñez**

Article publicat a Veterinary Parasitology

Vet. Parasitol. 165 (2009): 298-310



**Identification of cryptic species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in the subgenus *Culicoides* and development of species-specific PCR assays based on barcode regions**

**N. Pagès<sup>a,\*</sup>, F. Muñoz-Muñoz<sup>a</sup>, S. Talavera<sup>a</sup>, V. Sarto<sup>b</sup>, C. Lorca<sup>a</sup>, J.I. Núñez<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), UAB-IRTA, Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain  
<sup>b</sup> Departament d'Agricultura, Alimentació i Acció Rural de la Generalitat de Catalunya, Spain

## Introduction

Biting midges of the genus *Culicoides* Latreille 1809 are among the smallest blood-feeding flies found in the world and are distributed almost worldwide excluding the Antarctica and New Zealand. More than 1340 different species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) have been described worldwide, including 39 fossil records from Baltic amber, and have been classified among 39 subgenera (Borkent and Wirth, 1997; updated 2008). Although *Culicoides* are well known for producing biting nuisance to humans and dermatitis to horses, they became a major cause of concern as disease vectors. Some species of *Culicoides*, through insect bites, act as transmission vectors for protozoa, filarial worms and overall, many different viruses affecting humans and domestic or wild animals (Mellor *et al.*, 2000).

Bluetongue (BT) is an infectious non-contagious disease of domestic and wild ruminants being exclusively transmitted between its vertebrate hosts by certain species of biting midges of the genus *Culicoides* (Du Toit, 1944; Mellor and Pitzolis, 1979). BT is actually one of the most economically important diseases transmitted by *Culicoides* midges. Due to its rapid transboundary spread, the disease causes disruption of international and domestic trade worldwide, resulting in extremely high associated economic losses. Due to its socioeconomic impact on animal health, BT has been included in the official list of reportable diseases by the World Organization for Animal Health. The disease is strictly restricted to areas where competent midges are present, although only a small number of *Culicoides* species (~1%) have been incriminated with bluetongue virus (BTV) transmission around the world. The disease has a world-wide distribution, produced by a dsRNA virus of the genus *Orbivirus* (Family *Reoviridae*) is differentiated in to 25 different serotypes due to antigenic variability (Hofmann *et al.*, 2008). Although all ruminants are susceptible to BT viral replication, severe disease is mainly restricted to certain breeds of sheep and some species of deer (Taylor, 1986).

Since the re-emergence of BT in the European Mediterranean basin in the last decade, several BT serotypes have been circulating across the southern fringe of Europe provoking the largest epidemic ever recorded in, the outbreak is still ongoing throughout several countries (Saegerman *et al.*, 2008). Epizootics were initially associated to the climate change and the northern expansion of the major Afro-Asiatic vector midge *Culicoides imicola* Kieffer, which was believed to be the responsible species spreading the disease in epizootic

regions. Several outbreaks were recorded from the eastern Mediterranean Basin, into the Balkans and beyond, in areas free of *C. imicola*, thus suggesting the involvement of novel Palaearctic species of *Culicoides* in BT transmission (Mellor 2004). In summer 2006, BTV serotype 8 was unexpectedly introduced in central Europe by unknown routes, and to date it has experienced an unprecedented large spread across most European countries that north as the UK, Denmark, and Sweden, as far West as Southern Spain, and as far East as the Czech Republic (<http://eubtnet.izs.it>).

As mentioned, new Palaearctic species of *Culicoides*, besides *C. imicola*, have been described as potential vectors of BT in different parts of Europe, mainly based on viral isolation from midges captured during BT outbreaks (Caracappa *et al.*, 2003; De Liberato *et al.*, 2005; Savini *et al.*, 2005), on virus detection by RT-PCR (Caracappa *et al.*, 2003, Meiswinkel *et al.*, 2007, Dijkstra *et al.*, 2008) and on experimental midge infection assays (Carpenter *et al.*, 2006 and 2008). The newly described candidate vectors belong to the subgenus *Avaritia* (*C. obsoletus* s.l., *C. chiopterus*, *C. dewulfi*) and *Culicoides* (*C. pulicaris* s.l.), where morphologically similar species do occur within species complexes.

Identification of *Culicoides* to species level is difficult even for specialist taxonomists and sibling species within species complexes can be indistinguishable when using available morphological information (Meiswinkel, 2004; Pagès and Sarto, 2005). To solve this problem, new molecular tools have been developed to identify precisely different species of subgenus *Avaritia* and *Culicoides*. Thus, to differentiate Palaearctic members within the subgenus *Avaritia* some authors used a region of the mitochondrial DNA (mtDNA) cytochrome oxidase I (COI) gene which has been useful in differentiating even sibling species within this subgenus (Pagès and Sarto, 2005; Nolan *et al.*, 2007), while others used different ribosomal regions such as the ITS1 rDNA (Mathiew *et al.*, 2007) and ITS2 rDNA (Gomulski *et al.*, 2005). The subgenus *Culicoides* has been by far less analyzed for species-specific diagnostics, and only one assay has been developed to detect some species using mtDNA COI gene without detection of sibling species (Nolan *et al.*, 2007). Contrarily, phylogenies based on ITS2 rDNA have suggested the presence of sibling species within the subgenus *Culicoides* (Gomulski *et al.*, 2006). The taxonomy within the subgenus *Culicoides* has been historically difficult in the absence of molecular approaches. Large intra-specific morphological variation has been recorded in some species usually linked to specific geographic areas, and the subgenus has been continuously reorganized (Edwards, 1939; Downes and Kettle, 1952;

Khalaf, 1954; Wada and Kitaoka, 1977; Delécolle, 1985; Kitaoka, 1985; Boorman, 1986; Glukhova, 1989)

Given the features of the suggested presence of sibling species within the subgenus *Culicoides*, and the detection of species with large intra-specific variation in our region, the aim of the present study was: i) to determine the presence of sibling or cryptic species within the subgenus *Culicoides* and define morphological characters useful to distinguish them, ii) to study and establish the phylogenetic relationships of Palaearctic species within the *Culicoides* subgenus, and iii) to develop new fast and reliable species-specific diagnostic assays to detect and differentiate species present within this subgenus.

Based on previous lab studies and following the Barcode Project of Life guidelines (<http://www.barcodinglife.org>), the mtDNA COI gene was selected as molecular marker and used together with the morphological characterization of every single captured *Culicoides* midge to achieve these objectives.

## **Material and methods**

### **Insects and morphological identification**

Biting midges of the genus *Culicoides* were trapped at 10 sites over a four years period within the framework of the BT Entomological Surveillance Network from the Autonomous Community of Catalonia (NE Spain). Collection sites were numbered as follows: 1) Susqueda 41°59'N, 2°32'E; 2) Vilanova de la Muga 42°18'N, 3°02'E; 3) Canyamars 41°35'N, 2°27'E; 4) Peralada 42°18'N, 3°0'E; 5) Aramunt 42°12'N, 0°59'E; 6) Garcia 41°08'N, 0°38'E; 7) Caldes de Malavella 41°50'N, 2°50'E; 8) Piera 41°30'N, 1°45'E; 9) La Galera 40°40'N, 0°27'E, and 10) Montroig del Camp 41°5' N, 0°57' E (Figure 4.1).

Midges were collected by means of light traps (Miniature blacklight trap model 912, John W. Hock Company, Gainesville, FL) in either sheep or goat farms. Traps were placed outside the enclosures where the livestock were confined. These traps were switched on at dusk and off at dawn the following day. Collection bags were removed in the morning and taken to the laboratory to kill the insects by freezing them at -20°C. Details about the species identified and their collection sites are summarized in Table 4.1.

All specimens were identified to species level using a stereomicroscope according to wing morphology (Campbell and Pelham-Clinton, 1960; Krémer, 1965; Delécolle, 1985) and then stored in 96% ethanol at -20°C until further analysis. After first morphological identification, 118 specimens of the subgenus *Culicoides* were dissected with the aid of a Nikon SMZ 800 stereomicroscope using sterilized ultrafine tweezers for each individual to avoid DNA cross-contamination between samples. Midge body was divided into head, thorax, legs, wings and the abdomen. The anterior part of the abdomen was separated for DNA extraction, and remaining body parts were fixed in Tendeiro solution (35 ml of distilled water, 40 g of chloral hydrate, 18 ml of glacial acetic acid, and 7 g of polyvinyl alcohol) and mounted on glass microscope slides. All specimens were morphologically analyzed with a Nikon Eclipse E200 light microscope using taxonomic keys of Campbell and Pelham-Clinton (1960), Krémer (1965), Delécolle (1985), Glukhova (1989), Delécolle and Ortega (1998) for sound morphological analysis. Fifty-nine morphological traits were recorded and statistically analyzed to identify those that were variable between molecular groups and thus potentially informative to distinguish the species. For this purpose a discriminant function analysis, with molecular group as categorical predictor and linear measurements that differed significantly among the species of the complex as dependent variables (size-corrected if necessary), was applied to each species complex.

### **DNA extraction, PCR amplification and Sequencing**

Total DNA was extracted for each dissected midge from the anterior part of the abdomen using a commercial kit (DNeasy Blood and Tissue Kit, Qiagen, Crawley, U.K) following manufacturer's instructions with a final elution volume of 100µL.

Sequencing and phylogenetic analyses were based on a fragment of the mtDNA COI gene. Sequences were amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) in a final volume of 50 µl. Each reaction used 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dNTPs, 0.2 µM each primer, 1 polymerase unit, and 2 µl of genomic DNA. Forward and reverse primers used were respectively C1-J-1718 and C1-N-2191 (Simon *et al.*, 1994). We also used a new version of the former primers modified by Dallas *et al.* (2003) to avoid primer dimerization: C1-J-1718M and C1-N-2191M. Reactions were carried out in a programmable thermal cycler (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, Foster City, CA) using an amplification program consisting of an initial denaturing step at 94°C for 3 min, followed by 35 cycles at (94°C, 30 s; 50°C, 30 s; 72°C, 30 s) and a final extension step at 72°C for 7 min. Then, reactions were

stored at 4°C until further processing. Controls for the amplification reactions were carried out at every PCR round by adding all reagents without the genomic DNA.

PCR products were confirmed by electrophoresis on 2% (w/v) agarose 1xTAE gel and run at 10 V/cm for 1 h. Bands were stained with SYBR Gold nucleic acid gel stain at 1:10000 final dilution. DNA fragments of interest were excised from the agarose gel and purified using QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Crawley, U.K) following manufacturer's instructions. Gel DNA purified products were sequenced on both strands using Big Dye Terminator version 3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) and analyzed on an ABI PRISM 3730 Automated sequencer (Applied Biosystems).

### **Data analysis**

The mtDNA COI sequences obtained were aligned using the BioEdit sequence alignment editor software (version 5.0.9. for Windows; Hall, 1999) with ClustalW Multiple alignment option without manual optimization. Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using the software MEGA *version 4.1* (Tamura *et al.*, 2007). Phylogenetic analysis was inferred under a Neighbour-Joining (NJ) algorithm and the nucleotidic substitution model of Jukes-Cantor with a resampling nodal support of 1000 bootstrap replicates. To assess phylogenetic relationships, the most appropriate model of nucleotide substitution determined in ModelTest (Posada and Crandall 1998) was used to infer maximum likelihood (ML) analysis using PAUP (version 4.0; Swofford 1998) and TreePuzzle (Schmidt 2002). Ratios for transition/transversion and pairwise genetic distances were obtained also with MEGA software. Haplotype and nucleotide diversity as well as base composition were calculated using DnaSP v 3.99 (Rozas *et al.*, 2003).

### **Species-specific PCR design**

Species-specific primers were designed based on the sequence alignment of the 95 COI sequences obtained with the aid of the software HintPcr v3.0 (Dopazo *et al.*, 1993). Primers were tested in 50 µl PCR reactions using two different approaches:

i) Single primer pairs PCRs were used to test using the appropriate annealing temperature (Table 4.2). Cycling conditions consisted of an initial denaturing step at 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles at (94 °C, 30 s; specific annealing temperature, 30 s; 72 °C, 30 s) and a final extension step at 72 °C for 7 min. All reactions used 0.1 µM of each primer, 1 mM dNTPs, 1 polymerase unit, and 2 mM of MgCl<sub>2</sub>.

ii) Single tube multiplex PCRs were performed to detect simultaneously different members within a species complex. Conditions for all multiplex PCRs were adjusted to the same temperature profile, consisting of an initial denaturing step at 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles at (94 °C, 30 s; 52 °C, 30 s; 72 °C, 30 s) and a final extension step at 72 °C for 7 min. In all three multiplex PCRs we used species-specific primers each at 0.1 µM and non specific primers at 0.06 µM, 1 mM dNTPs, and 1 polymerase unit. The multiplex PCR for members of the Pulicaris complex was performed using the species-specific primers P1F174, P1R337, PDNP1R, P3R262, in combination with the generic primer CIJ1718M, and 1.5 mM of MgCl<sub>2</sub>. Multiplex PCR for members of the Fagineus complex used the species-specific primers F1R198, F2R337, F3Full, in combination with the generic primers CIJ1718M and C1N2191M, and 4 mM of MgCl<sub>2</sub>. The last multiplex PCR, to identify members of the Newsteadi complex, was performed using species-specific primers N1F81, N2F348, N3R194, combined with generic primers CIJ1718M and C1N2191M, and 3.5 mM of MgCl<sub>2</sub>.

## Results

### Morphological diagnoses of *Culicoides* species

Captured individuals were first categorized according to wing morphology identifying five species of the subgenus *Culicoides*, some of them with high morphological variability associated. These species were assigned to *C. fagineus* Edwards, 1939, *C. flavipulicaris* Dzhanfarov, 1964, *C. newsteadi* Austen, 1921, *C. pulicaris* (Linnaeus), 1758 and *C. punctatus* (Meigen), 1804. Nevertheless, we detect up to 11 species by sequencing them: individuals of *C. fagineus* were split into three similar species, as those of *C. newsteadi* and *C. pulicaris*, the last two species were *C. punctatus* and *C. flavipulicaris*. Further detailed microscopic analyses with slide mounted dissected individuals and statistical analysis of traits allowed us to recognize several useful morphological characters to identify and distinguish the species within each of the three species groups or complexes morphologically defined.

The Pulicaris complex was comprised of three species, *C. lupicaris*, *C. pulicaris* P1, and *C. pulicaris* P3. Common characters within this group were the presence of a dark spot in the cubital wing cell, the absence of a pale spot at the end of vein M<sub>3+4</sub> and the presence of an hourglass-shaped third costal spot (Figure 4.2a-4.2c). *Culicoides lupicaris* could be differentiated from *C. pulicaris* P1 and *C. pulicaris* P3 by wing pattern, showing bigger



confluent dark spots and a bigger and well-marked dark spot in the cubital wing cell. This species had a long dark spot in the anal wing cell running along and in contact with the hind margin, while neither in *C. pulicaris* P1 nor *C. pulicaris* P3 the spot contact the margin, sometimes being diffused while others had the spot tips more heavily pigmented (Krémer, 1965; Delécolle, 1985) (Figure 4.2a-4.2c). Wing pattern for *C. pulicaris* P1 and *C. pulicaris* P3 were extremely similar without any useful character to differentiate them (Figure 4.1a-4.1c).

The Fagineus complex was represented by three species, *C. fagineus* Edwards 1939, *C. subfagineus* Delécolle and Ortega 1998 and a third non described species, *C. fagineus* F1. The common distinctive character within this group was the presence of cibarial armature in all three species. Wing pattern of *C. fagineus* F1 had more confluent dark spots, defining a round pale spot in the distal region of anal wing cell, and a dark spot crossing continuously the wing from the basal area until the anal cell. *Culicoides fagineus* F1 was the largest in size, considering wing length as an indicator of size. Regarding *C. fagineus* s.s., its main distinguishable trait was the dark areas covering veins M<sub>1</sub> and M<sub>2</sub>, none of which contacted the wing margin. Wing appearance of *C. subfagineus* resembled that of *C. fagineus* s.s. while the pale spots in distal regions R5, M1 and M2 were more rounded and less elongated than in the other two species (Figure 4.1d-4.1f).

The Newsteadi complex was the last group detected in the surveillance region and was represented also by three species. The best morphological characters to distinguish these species were those of wing pattern, eyes separation and measurements of the palp. In regard to the wing pattern, *C. newsteadi* N2 showed well defined clear pale spots at the tip of veins M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> and M<sub>3+4</sub>, as was in *C. newsteadi* N3, whereas *C. newsteadi* N1 was lacking the pale spot at tip of vein M<sub>3+4</sub> and M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> pale spots were smaller and diffused (Figure 4.1g-4.1i). A wider third costal spot without a narrow waist was present only in *C. newsteadi* N3. The longitudinal dark mark of the anal cell in *C. newsteadi* N1 is small and reduced to a round spot close to Cu<sub>2</sub>, while in *C. newsteadi* N2 and N3 the dark spot is elongate spreading along the lower part of the anal cell until it reaches the dark area in Cu<sub>2</sub>, then a second dark spot descends from the mid cell crossing the anal vein until touching the first dark spot. In *C. newsteadi* N2 the long mark is always distinctly separated from the hind margin while in *C. newsteadi* N3 it contacted the margin. Another non-wing based diagnostic morphological character that was determined for this complex was that *C. newsteadi* N3 had always the inner



margins of upper lobes of eyes separated or joined by a narrow bridge whilst in *C. newsteadi* N1 and N2 the inner margins were in contact.

In order to distinguish by morphology members from these species complexes 59 metric traits were statistically evaluated for whether they could discriminate species. The useful traits were: i) lengths of fronto-vertex, labrum, 1st + 2nd palpal segments, and antennomeres 9<sup>th</sup>, 11<sup>th</sup>, 12<sup>th</sup> and 15<sup>th</sup>, ii) width of the 3<sup>rd</sup> palpal segment, iii) number of maxillary and mandible teeth, and iv) index and rapport for both antenna and palpus, as well as costal ratio (Table 4.3). It is noteworthy to notice that the discriminant function analysis performed for each of the species complexes (Pulicaris, Fagineus, and Newsteadi) using these metric traits classified properly 100% of the cases, indicating a good separation of the species within the complex by means of morphological traits, without any overlapping area (data not shown).

### COI sequence analysis and divergence

In total, ninety five sequences of 472-476 base pairs covering a fragment of the COI gene were successfully sequenced from specimens belonging to the *Culicoides* subgenus. One hundred and forty five polymorphic sites were distributed amongst the COI sequences leading to the detection of 42 different haplotypes (GenBank accession n° GQ338893 through GQ338934). Haplotype diversity for each species ranged from 0.000 for *C. newsteadi* N1, showing a unique haplotype for all sequenced individuals, to  $0.933 \pm 0.122$  for *C. newsteadi* N2 (Table 4.1). Base composition for all species was strongly AT biased, with an observed mean G+C content of 0.362, which is in accordance with mitochondrial genes in insects (Crozier and Crozier, 1993). Sequences also showed the typical pattern of variability of mitochondrial coding genes, being the third codon position the most variable. Of the 476 nucleotide sites analyzed, 312 were constant sites (65.5 %), 162 were parsimony informative sites (34.0%) and 3 were singletons (0.6%). The first singleton detected was in *C. fagineus* s.s. having a Guanidine at nucleotide position 54, while the second and third were both detected in *C. punctatus* at nucleotide position 161 and 407 with an Adenine and a Cytosine respectively. The ratio between transitions and transversions ( $R=ti/tv$ ) was  $R=3.314$ , indicating low saturation level associated to the absence of multiple hits at a given site. *Culicoides* COI sequences were aligned against the *Anopheles gambiae* Giles s.s. (DQ792577) to locate the translation reading frame and no insertions or deletions were identified within the aligned sequences. Then, using the invertebrate mitochondrial code,

nucleotide sequences were translated into amino acid sequences, which contained no stop codons, and their structure was checked to be in accordance with that suggested by Lunt *et al.* (1996).

Nucleotide diversity ( $\pi$ ) was calculated for all species sequenced, whereas values of pairwise Tamura-Nei genetic distance (d) were also calculated for sequenced species and for other *Culicoides* COI sequences currently available in GenBank under accession numbers AM236708 to AM236716 for *C. pulicaris*, AM236717 to AM236725 for *C. impunctatus*, AM236726 to AM236732 for *C. griseus*, AM236733 to AM236737 for *C. punctatus* and AM236738 to AM236746 for *C. newsteadi*, all of them from the subgenus *Culicoides*.

Intraspecific nucleotide diversity was low for all species, with highest values reported for *C. punctatus* ( $\pi = 0.00617 \pm 0.00073$ ), *C. newsteadi* N2 ( $\pi = 0.00621 \pm 0.00224$ ) and *C. fagineus* s.s. ( $\pi = 0.00584 \pm 0.00228$ ) (Table 4.1). *C. newsteadi* N1 was the only species without intraspecific polymorphisms (Table 4.3). Intraspecific polymorphisms recorded were usually synonymous changes. Two non-synonymous intraspecific polymorphisms were detected, the first was recorded in *C. punctatus* at amino acidic position 54 V→E (nucleotides 160-162), and the second in *C. fagineus* s.s. at amino acidic position 73 I→V (nucleotides 217-219). Only nine amino acidic substitutions were recorded from all species sequenced.

Interspecific pairwise genetic distances between species ranged from 0.120 (*C. fagineus* F1 – *C. fagineus* s.s.) to 0.272 (*C. griseus* GB - *C. pulicaris* GB). To validate the presence of new sibling species within the three species complexes, distances between candidate members were checked to assess their status at species level. Recorded distances were analyzed by species complex: i) in Pulicaris complex distances ranged from 0.128 (*C. pulicaris* P3 - *C. pulicaris* P1) to 0.207 (*C. lupicaris* - *C. pulicaris* P3), ii) for Newsteadi complex from 0.179 (*C. newsteadi* N3 - *C. newsteadi* GB) to 0.228 (*C. newsteadi* N1 - *C. newsteadi* N2), and iii) for Fagineus complex, from 0.120 (*C. fagineus* F1 - *C. fagineus* s.s.) to 0.131 (*C. fagineus* s.s. - *C. subfagineus*) (Table 4.4).

### Phylogenetic analysis

To perform the phylogenetic analysis sequences obtained in this study were combined with those previously obtained from GenBank. Figure 4.3 depicts the common tree inferred when using both neighbour-joining (NJ) and maximum likelihood (ML) analyses under the nucleotide substitution model TrN+I+G, based on the 476 aligned nucleotide sites for mtDNA

COI sequences. *Anopheles gambiae* Giles s.s. (DQ792577), *Stempellinella flavidula* (EF585424) and *C. imicola* sequences were used as outgroups and the resulting dendrogram showed 14 different separate otus, each one with individuals representing a single species within the *Culicoides* subgenus. Species attributed to the Pulicaris complex (*C. pulicaris* P1, *C. lupicaris* and *C. pulicaris* P3) were grouped together in a major cluster with *C. impunctatus*, *C. punctatus* and species of the Newsteadi complex. A sister association between *C. pulicaris* P1 and *C. pulicaris* P3 is strongly supported although the inclusion of the third representative of the Pulicaris complex (*C. lupicaris*) was not supported. Members of the Fagineus complex (*C. fagineus* F1, *C. fagineus* s.s. s and *C. subfagineus*) were consistently grouped in the same phyletic cluster, closely related to *C. flavipulicaris*, relationships between all these species were supported by high bootstrap values. At the base of the tree, the bootstrap value (80%) supported the separation of *C. flavipulicaris* with the Fagineus complex species from the rest of the species in the subgenus *Culicoides*. The Newsteadi complex displayed scattered clustering among the various species.

### Species-specific PCR assays

Inter-specific nucleotide sequence differences were used to design 15 species-specific primers to allow the identification of the 11 species detected within the surveillance area. Size of diagnostic bands when using different combinations of diagnostic primers in single PCRs are summarized in Table 4.2. To test the designed primers, 18 single PCRs were assessed for individual species identification using adult specimens identified both morphologically and by sequencing. Various PCR conditions were tested to improve the final assay and all species diagnosed yielded PCR products of the expected length (Figure 4.4a-b). To validate specificity of each specific single PCR assay, two different approaches were performed: i) assessment of possible non-specific diagnosis between captured members of the subgenus *Culicoides* (n=22): *C. pulicaris* s.l., *C. fagineus* s.l., *C. newsteadi* s.l., *C. punctatus*, *C. flavipulicaris*, and ii) assessment of possible non specific diagnosis for common trapped *Culicoides* spp. belonging to other subgenera: subgenus *Avaritia* (n=5): *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. imicola*, *C. chiopterus* and *C. dewulfi*; subgenus *Monoculicoides* (n=2): *C. parroti* and *C. puncticollis*; subgenus *Oecacta* (n=2): *C. brunnicans* and *C. vexans*; subgenus *Beltranmyia* (n=1): *C. circumscriptus*; subgenus *Sylvaticulicoides* (n=1): *C. achrayii*; and *C. festivipennis*. The primer F1R198 amplified the target species *C. fagineus* F1 and can amplify *C. flavipulicaris*, whereas those primers specific for *C. flavipulicaris* (FlavNP1F and FlavNP1R) only amplified the target species *C. flavipulicaris* being useful to distinguish both

species. All other results tested negative either for the first and second specificity assays indicating that no cross-amplification between different species exists in the rest of the species-specific diagnostic PCRs developed in the study.

For more efficient analysis of specimens, a specific multiplex-PCR assay was developed for those groups having sibling or cryptic species: *C. pulicaris* s.l., *C. fagineus* s.l. and *C. newsteadi* s.l. (each group with three species detected). Each multiplex PCR allows the rapid identification between individuals assigned to each of the groups according to wing morphology.

The PCR-Multiplex to detect members of the Pulicaris complex was performed using four species-specific primers: P1F174, P1R337, PDNP1R and P3R262 in combination with the primer CIJ1718M (used as common reverse primer) allowing the following diagnostic bands: i) two bands of 183bp and 379bp for *C. pulicaris* P1, ii) one band of 385bp for *C. lupicaris*, and iii) one band of 306bp for *C. pulicaris* P3 (Figure 4.4c).

The PCR-Multiplex for members of the Fagineus complex was performed with three species-specific primers: F1R198, F2R337, F3Full combined with primers CIJ1718M and C1N2191M (common forward and reverse primers). Diagnostic bands were i) one band of 238bp for *C. fagineus* F1, ii) one band of 377bp for *C. fagineus* s.s., and iii) one band of 325bp for *C. subfagineus* (Figure 4.4d). When using the common forward and reverse primers, a control band of 522bp was present for all three diagnoses to differentiate between a negative diagnostic (presence of the 522bp band) and a PCR failure (no band present).

The last PCR-Multiplex was designed to detect members of the Newsteadi complex, it was performed using three species-specific primers: N1F81, N2F348 and N3R194, combined with CIJ1718M and C1N2191M as in the Fagineus group. Diagnostic bands were i) one band of 422bp for *C. newsteadi* N1, ii) one band of 157bp for *C. newsteadi* N2, and iii) one band of 234bp for *C. newsteadi* N3 (Figure 4.4e). As in the former PCR-multiplex a control band of 522bp was present for all three diagnoses to discern between a negative diagnostic and a PCR failure.

*Culicoides* specimens sequenced and other trapped adults were used to test either single or multiplex PCR assays designed (*C. pulicaris* s.l., n=37; *C. fagineus* s.l., n=34; *C. newsteadi* s.l., n=76; *C. flavipulicaris*, n= 19; *C. punctatus*, n= 25; Table 4.1). Each individual midge showed the amplification pattern corresponding to the individual species-specific target being

diagnosed, and shared bands from cross-species diagnosis were not detected while analyzing results from individual *Culicoides*. Additionally, both no-template negative control and positive control of species (from sequenced individuals) were added at each diagnostic PCR round, with no amplification observed for negative control and the typical band pattern expected for the positive control.

## Discussion

The results presented here for *Culicoides* reveal that COI sequence data can be used as a tool to identify unambiguously different species of the subgenus *Culicoides*, showing a pattern of low intraspecific variation and high interespecific variation, even when cryptic species are present. Taking together the morphology data and the molecular biology results, we have been able to detect eleven different species formerly attributed to the subgenus *Culicoides*.

Despite some disparity in previous literature, all species included in the analysis have been attributed to the subgenus *Culicoides* (Campbell and Pelham-Clinton, 1960; Krémer, 1965; Delécolle, 1985). Although the real number of species within this subgenus in the Palaearctic region is unknown it is suggested that some of the species included belong to related subgenera (Meiswinkel *et al.*, 2004; Gomulski *et al.*, 2006). Species of the subgenus *Culicoides* are characterized mainly by the presence of a dark spot within the cubital wing cell, otherwise this has been suggested to be an homoplastic character being unreliable to define the subgenus. This statement is supported by phylogenetic relationships based on ITS2 rDNA sequences (Gomulski *et al.*, 2006) as well as by our results of mtDNA COI sequences, where the topology for both rDNA and mtDNA trees suggest the exclusion of the Fagineus complex species altogether with *C. flavipulicaris* in a separate subgenus, even though *C. flavipulicaris* has the distinctive spot in the cubital wing cell. Contrarily, *C. deltus* that lacks this spot is placed within the subgenus *Culicoides* (Meiswinkel *et al.*, 2004; Gomulski *et al.*, 2006).

Identified species within the Pulicaris complex were *C. lupicaris* and the cryptic species *C. pulicaris* P1 and *C. pulicaris* P3. Two different molecular patterns have been identified under the same wing pattern attributed to *C. pulicaris* s.s. and their genetic distance ( $d=0.128$ ) confirm the presence of two different species in the region with the same wing pattern. We

were unable to identify confidently *C. pulicaris* s.s. from the two species detected (*C. pulicaris* P1 and *C. pulicaris* P3), probably due to large misidentification of these two species (at least) within a single species in previous literature, as first record from Linnaeus (1758) as well as following descriptions (Kieffer, 1919; Goetghebuer, 1920) did not report the necessary metric data to distinguish them, therefore widening the real intraspecific morphological variability of *C. pulicaris* s.s. This statement is enhanced by the fact that these species are sympatric and observations of our male specimens did not show differences in their respective terminalia, as in Downes and Kettle (1952). We accorded to treat *C. pulicaris* P1 as *C. pulicaris* s.s. based on published *C. pulicaris* COI sequences (AM236708 to AM236716; Nolan *et al.*, 2007) while waiting for confirmation of which of the two cryptic forms is conspecific with *C. pulicaris* s.s., a taxon needing a sound redescription. Individuals of *C. lupicaris* were identified using published keys and measurements were in accordance with those described (Downes and Kettle, 1952; Campbell and Pelham-Clinton, 1960), contrarily to what happened for individuals identified as *C. lupicaris* collected from Italy (Meiswinkel *et al.*, 2004).

Three cryptic species were recorded within the Fagineus complex, *C. fagineus* s.s., *C. subfagineus* and a third non described species which can be identified either by morphology or molecularly, *C. fagineus* F1. Similar wing patterns have been described for *C. fagineus*, *C. subfagineus*, *C. grisescens* and *C. impunctatus* whilst the last two species lack cibarial armature (Delécolle, 1985). Individuals of *C. fagineus* F1 were larger, similar than those described in Campbell and Pelham-Clinton (1960), while measurements of *C. fagineus* s.s. were in accordance with those of Delécolle (1985), and wing pattern matched exactly those in Edwards (1939) of first description. Our *C. subfagineus* specimens were smaller in size as type specimens from South Spain (Delécolle and Ortega, 1998), and measurements matched with collected *C. fagineus* from Algeria (Clastrier 1957), when *C. subfagineus* still remained undescribed, thus indicating its probable presence there. Although *C. flavipulicaris* was closely related to species of this complex, they were easily distinguishable from *C. flavipulicaris* by the presence of cibarial armature, robust teeth and differences in wing pattern. Genetic pairwise distances between all four species were the lowest detected, ranging from  $d = 0.120$  to  $d = 0.131$  when comparing species within the Fagineus complex, and  $0.141 - 0.163$  when comparing this species with *C. flavipulicaris*. Their close phylogenetic relationships were supported in the dendogram in the most well defined clade found with a



common branch separated from the rest of species analyzed, which is in agreement with previous ITS2 rDNA phylogenies (Gomulski *et al.*, 2006).

In the *Newsteadi* group, three different species have been molecularly and morphologically characterized for the first time, enabling to being distinguished from each other. At a European level at least four species are included within this group, the fourth molecular COI pattern was detected by Nolan *et al.* (2007) in individuals from Italy attributed to *C. newsteadi*. Unexpectedly, these species were not phylogenetically closely related based on COI sequences, they showed high genetic distances and were closer to other species despite their morphological similarity.

Identified *C. punctatus* specimens were molecularly the same specie as the one detected in UK (Nolan *et al.*, 2007), COI sequences differed only by one or few nucleotidic changes. Mean genetic distance between Spanish and UK specimens was 0.004. Phylogenetic relationships with other species analyzed could not be inferred from the dendogram as the resulting bootstrap support was too low.

Although some species were part of a complex with other cryptic species, the dendogram depicted well defined terminal clades for each species as well as the appropriate amount of genetic distance between them. Thus, the lowest interspecific genetic distance between two cryptic species was recorded for *C. fagineus* s.s. and *C. fagineus* F1 ( $d=0.120$ ). This value was consistent with others inferred from published sequences of sibling or cryptic species (Linton *et al.*, 2002; Pagès and Sarto, 2005): i) it is similar or slightly lower than recorded distance between the cryptic species *C. obsoletus* and *C. scoticus* with  $d=0.141$ , whose females are currently morphologically indistinguishable, ii) is somewhat similar than those between some species of the *Imicola* complex ( $d=0.122$  for *C. imicola* – *C. tuttifruti*;  $d=0.117$  for *C. bolitinos* - *C. kwagga*;  $d=0.118$  for *C. imicola* - *C. kwagga*;  $d=0.112$  for *C. tuttifruti* – *C. loxodontis*;  $d=0.109$  for *C. kwagga* - *C. tuttifruti*), and iii) is even higher than the inferred distance for *C. bolitinos* - *C. tuttifruti* with  $d=0.080$  (data not shown). On the other hand, we also detected higher distances than expected between species placed within the *Newsteadi* complex according to morphology, with a range of genetic distance  $0.228 \leq d \leq 0.203$ , being sometimes higher between species of the *Newsteadi* complex than when we compared them with members of the *Pulicaris* complex.

The separation of *Culicoides* species in two major groups was supported by the phylogenetic analysis. This analysis supports a well defined group of related species involving

*C. flavipulicaris* and species of the Fagineus complex with significant bootstrap values. It was difficult to accurately define the phylogenetic relationship of higher level clades with more than one species, since there was little resolution and poor bootstrap values. Clustering between all individuals of the same species was found in single terminal clades with high bootstrap support values and they were distant from individuals of other clades, thus demonstrating the integrity of the cryptic species detected within species complexes.

Sympatry has been demonstrated by some sibling species analyzed in the surveillance area, except for the Fagineus complex. The absence of hybrid individuals detected in paired comparisons of molecular and morphological results reinforces the evidence for the species-level status of all sibling species determined within the species complexes.

Previous work has been performed to develop fast PCR based diagnostics to identify species within the *Culicoides* subgenus (Nolan *et al.*, 2007). Unfortunately no cryptic species were reported in the subgenus, with only one species detected within the Pulicaris and Newsteadi groups identified as *C. pulicaris* and *C. newsteadi* respectively. The present work complements those results by reporting new cryptic species and several new fast and reliable species-specific PCR based diagnostics which allows the identification of the species detected within each of the species complex. To date no diagnostic tool is available to distinguish neither *C. flavipulicaris* nor the nine cryptic species detected, leading to both morphological and molecular misidentification errors. As an example of this we failed to detect a single species when using the only available primer to identify *C. newsteadi* (UOAnews; Nolan *et al.*, 2007), detecting simultaneously three different species: identified *C. newsteadi* from Italy, as well as our *C. newsteadi* N1 and *C. newsteadi* N2 from Spain.

Wrong or misidentification of disease vectors has important epidemiological implications. The dynamics and occurrence of arthropod borne diseases can be modelled or predicted according to multiple factors, and of major importance are the presence and distribution of arthropod vectors. Thus, the knowledge of which single species could act as disease vector as well as their correct identification remains essential to assess the real risk for disease transmission into new areas. Significant differences in susceptibility to infection with BTV were recorded between *C. variipennis* populations of different geographic areas in the United States, where this species belong to the Nearctic Variipennis complex (Jones and Foster 1978, Tabachnick 1996). In the same way, similar observations were reported while screening oral susceptibility to BTV for *Culicoides* in the UK, where two populations with



higher than expected BTV infection rates were detected, one of *C. pulicaris* s.l. and the second of *C. obsoletus* s.l. Variability and disparity of results obtained when comparing all analyzed populations was interpreted by the presence of non detected cryptic species within these populations (Carpenter *et al.*, 2006). Our newly developed assays can be useful to detect misidentified cryptic species and contribute to our knowledge of the real BT vector status for different *Culicoides* species, as in the case of the former *C. pulicaris* s.l. population. In the same way, the first record identifying *C. pulicaris* as a BTV vector (Caracappa *et al.*, 2003) can be re-assessed if remaining material from *C. pulicaris* BTV positive pools from Sicily is available. It will be valuable to determine whether a single species was present or mixed cryptic species were in those pools.

Nevertheless, the newly developed PCR assays can be used in a routinely way to perform a concise identification of species within entomological monitoring and surveillance campaigns allowing an improved knowledge of the regional, national and transboundary distribution of all these cryptic species. The same assays, without any modification, can be used for the identification of larvae from soil samples to species level in areas where no adult activity is detected trough midge overwintering periods, both for population midge monitoring and for larval habitat identification purposes.

## Conclusions

Present results showed the identification of up to eleven different species of *Culicoides* in the BT risk area of Catalonia, initially assigned to the subgenus *Culicoides*, most of them of difficult or even impossible correct identification using available morphological diagnostic keys for Palaearctic fauna (Campbell and Pellham-Clinton, 1960; Gutsevich, 1960; Krémer, 1965; Shevchenko, 1977; Delécolle, 1985; Glukhova, 1989).

The aim of this study was to detect cryptic and non-cryptic species belonging to the *Culicoides* subgenus from the BT surveillance area in Catalonia and perform their molecular and morphological characterization. This was achieved at our regional level and several fast reliable PCR diagnostic assays become now available to detect these species as well as some valuable morphological differential characters that allow us to confidently link all specific molecular patterns to specific morphological patterns. High conservation within the selected

COI region in individuals from other European countries supports the wide use of such diagnostic techniques.

Now the challenge is to further improve and complement the basis of the present work performed in Spain at an European or at a Palaearctic level where probably more cryptic species are awaiting for their future morphological and molecular identification.

**Acknowledgements**

The authors would like to thank Departament d'Agricultura, Alimentació i Acció Rural (DAR) for financing the BT Entomological Surveillance Network and for logistic support. This study was partly financed by the project AGL2005-04426 from the Spanish Ministry of Science and Innovation. We also thank the owners of farms for permission to place the traps there and people involved in sample collection. We are indebted to Fernando Rodríguez for critical review and support, as well as Joan Pujols and Mariano Domingo from CReSA.

**Conflict of interest statement**

None of the authors (Nonito Pagès, Francesc Muñoz, Sandra Talavera, Víctor Sarto, Cristina Lorca and José Ignacio Núñez) has a financial or personal relationship with other people or organizations that could inappropriately influence or bias the paper entitled "Identification of cryptic species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in the subgenus *Culicoides* and design of species-specific primers based on barcode regions".

Table 4.1. Analyzed specimens of the subgenus *Culicoides* collected in the surveillance area.

Specie	C.S.	N <sub>m</sub>	N <sub>PCR</sub>	N <sub>seq</sub>	N <sub>Hap</sub>	H ± SD	π ± SD
<i>C. pulicaris</i> P1	1, 2, 3	5	7	4	3	0.833 ± 0.222	0.00404 ± 0.00116
<i>C. lupicaris</i>	1, 4	10	13	11	5	0.618 ± 0.164	0.00170 ± 0.00057
<i>C. pulicaris</i> P3	1, 2, 5	14	17	6	2	0.333 ± 0.215	0.00072 ± 0.00046
<i>C. fagineus</i> F1	6	5	8	5	3	0.800 ± 0.164	0.00356 ± 0.00073
<i>C. fagineus</i> s.s.	1, 2, 3, 7	11	17	9	4	0.583 ± 0.183	0.00584 ± 0.00228
<i>C. subfagineus</i>	2	8	9	7	3	0.762 ± 0.115	0.00209 ± 0.00046
<i>C. newsteadi</i> N1	2, 8	11	29	4	1	0.000 ± 0.000	0.00000 ± 0.00000
<i>C. newsteadi</i> N2	2, 4, 9	6	25	6	5	0.933 ± 0.122	0.00621 ± 0.00224
<i>C. newsteadi</i> N3	8, 6, 9	9	22	9	2	0.222 ± 0.166	0.00047 ± 0.00035
<i>C. flavipulicaris</i>	1 to 8	16	19	15	2	0.514 ± 0.069	0.00111 ± 0.00015
<i>C. punctatus</i>	1 to 5, 7, 9, 10	23	25	19	12	0.918 ± 0.047	0.00617 ± 0.00073

C.S., collection site; N<sub>m</sub>, number of specimens morphologically identified to species; N<sub>PCR</sub>, number of specimens identified by species-specific PCR; N<sub>seq</sub>, number of specimens sequenced; N<sub>Hap</sub>, number of haplotypes detected among COI sequences; H, haplotype diversity values; π, nucleotide diversity values.

Table 4.2. List of designed species-specific primers to detect species of the *Culicoides* subgenus.

Species	Primer	Sense	Sequence	Annealing temperature (°C)	Diagnostic band (bp)
<i>C. flavipulicaris</i>	FlavNP1F	Forward	5'-AACTAATAATTTCCCATGCAGGC-3'	b 58, e 59	b 352, e 141
<i>C. flavipulicaris</i>	FlavNP1R	Reverse	5'-ACGATCAAAAAGTAATACCATTG-3'	a 59	a 316
<i>C. punctatus</i>	PunNP1F	Forward	5'-CTCTTTTCGGCCAATGWATCC-3'	b 53	b 360
<i>C. punctatus</i>	PunNP1R	Reverse	5'-AAATGAAATCCCCTTTGATCGC-3'	a 54, d 54	a 309, d 142
<i>C. punctatus</i>	PunNP2R	Reverse	5'-GAACTGGTAAAGATAAAAGTAG-3'	a 53, d 54	a 379, d 212
<i>C. pulicaris</i> P1	PIF174	Forward	5'-GCATCCGTAGACTTGGCC-3'	c 63	c 183
<i>C. pulicaris</i> P1	P1R337	Reverse	5'-ATACGGGAAGAGAGTAACAG-3'	a 61	a 379
<i>C. pulicaris</i> P3	P3R262	Reverse	5'-TGAAATCCGTTAGAACGCATG-3'	a 56	a 306
<i>C. lupicaris</i>	PDNP1R	Reverse	5'-CTGCCAAAACCTGGTAAAGAAAG-3'	a 58	a 385
<i>C. fagineus</i> F1	F1R198	Reverse	5'-GAAATCCAGCTAAATGAAGT-3'	a 52	a 238
<i>C. fagineus</i> s.s.	F2R337	Reverse	5'-TAATACAGGAGGAAAGAAAGC-3'	a 52	a 377
<i>C. subfagineus</i>	F3Full	Forward	5'-ACGCTGGAGCTTCTGTAGATC-3'	b 59	b 325
<i>C. newsteadi</i> N1	N1F81	Forward	5'-CCTTACTTATTAAAGCAGC-3'	b 59	b 422
<i>C. newsteadi</i> N2	N2F348	Forward	5'-CCTCCCAGTTCCTTGCTGGT-3'	b 63	b 157
<i>C. newsteadi</i> N3	N3R194	Reverse	5'-TGCCAGGTGTAGGGAGAAAG-3'	b 61	a 234

<sup>a</sup>In combination with C1J1718M

<sup>d</sup>In combination with PunNP1F

**Table 4.3.** Mean values for metric characters useful to differentiate species within *Pulicaris*, *Fagineus* and *Newsteadi* complexes.

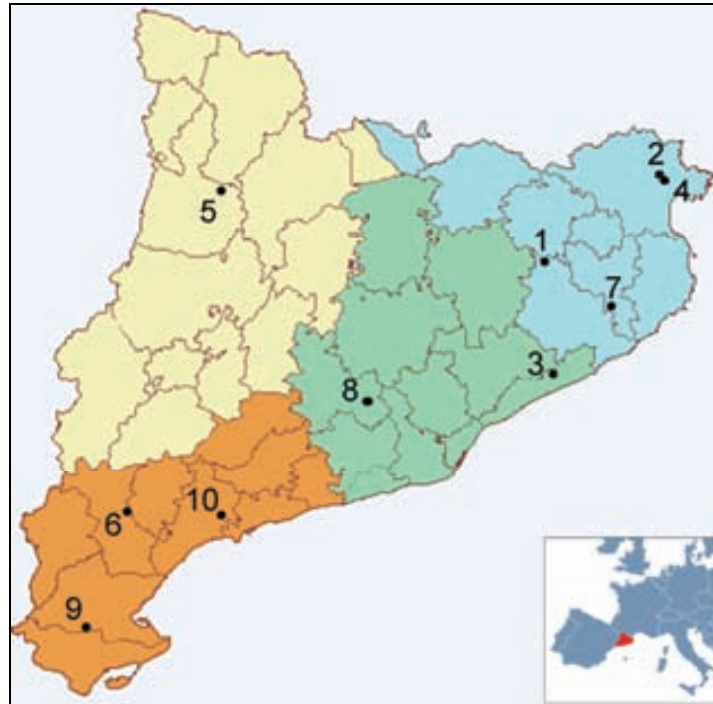
	ES	FV-L	L-L	MxT	MdT	1,2p-L	5p-L	3p-W	PI	3p-W/L	AI	AR	CR	9a-L	11a-L	12a-L	15a-L
<i>C. pulicaris</i> P1	No	37.5	246.0	19.5	12	116.5	46.5	30.5	0.73	0.36	0.97	1.39	0.61	51.3	68.8	69.4	109.4
<i>C. lupicaris</i>	No	25.5	234.0	18.7	12	108.9	37.5	27.8	0.71	0.36	1.06	1.47	0.61	47.2	66.6	69.1	115.9
<i>C. pulicaris</i> P3	No	24.5	220.0	18.7	12	103.1	41.9	32.1	0.81	0.39	1.00	1.39	0.58	46.3	62.7	64.8	105.0
<i>C. fagineus</i> F1	No	32.5	263.5	19.0	18.8	111.9	48.7	29.4	0.96	0.27	0.85	1.15	0.64	54.4	63.7	64.4	105.0
<i>C. fagineus</i> s.s.	No	34.8	230.0	20.9	16.0	93.6	41.5	25.5	0.96	0.28	1.04	1.40	0.63	51.4	75.3	72.5	113.1
<i>C. subfagineus</i>	No	17.1	207.5	17.9	16.3	82.1	35.7	31.8	1.10	0.35	0.90	1.27	0.62	45.8	58.3	55.0	95.4
<i>C. newsteadi</i> N1	No	23.1	245.0	19.1	16.1	108.9	36.7	31.2	0.82	0.35	0.98	1.36	0.57	47.5	63.2	67.0	111.7
<i>C. newsteadi</i> N2	No	22.0	199.0	18.1	15.0	88.0	42.5	28.5	0.93	0.35	1.00	1.36	0.56	43.5	58.5	61.0	100.0
<i>C. newsteadi</i> N3	Yes	24.2	203.0	16.6	15.6	83.9	37.8	31.7	0.99	0.39	1.00	1.31	0.58	43.4	57.5	58.4	101.9

ES, eyes separated; FV-L, fronto-vertex length (µm); L-L, labrum length (µm); MxT, number of maxillary teeth; MdT, number of mandible teeth; 1,2P-L, 1<sup>st</sup> + 2<sup>nd</sup> palpal segment length (µm); 5P-L, 5<sup>th</sup> palpal segment length (µm); 3P-W, 3<sup>rd</sup> palpal segment width (µm); PI, palpal index; 3p-W/L, ratio width/length 3<sup>rd</sup> palpal segment; AI, antennal index; AR, antennal rapport; CR, costal ratio; 9A-L, 9<sup>th</sup> antennomere length (µm); 11A-L, 11<sup>th</sup> antennomere length (µm); 12A-L, 12<sup>th</sup> antennomere length (µm); 15A-L, 15<sup>th</sup> antennomere length (µm).

**Table 4.4.** Distance matrix of pairwise genetic distances for species of the subgenus *Culicoides*. Results of genetic distance between species are displayed in the bottom half-matrix and their standard deviation in the upper half-matrix. Intraspecific genetic distances are shown in bold (diagonal).

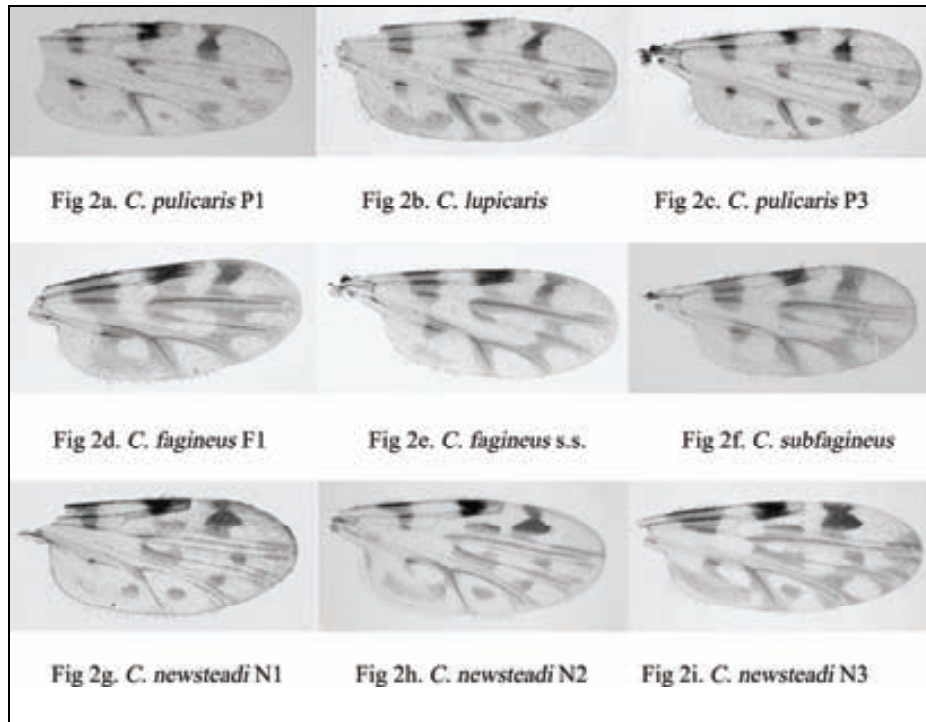
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
<i>C. pubicaris</i> P1	<b>1</b>	0.004	0.025	0.020	0.030	0.030	0.026	0.027	0.032	0.033	0.029	0.028	0.029	0.002	0.032	0.035	0.028
<i>C. lupicaris</i>	2	0.186	<b>0.002</b>	0.028	0.030	0.026	0.029	0.030	0.027	0.031	0.030	0.030	0.025	0.026	0.031	0.025	
<i>C. pubicaris</i> P3	3	0.128	0.207	<b>0.001</b>	0.030	0.027	0.030	0.028	0.029	0.033	0.030	0.026	0.026	0.020	0.034	0.033	0.029
<i>C. newsteadi</i> N1	4	0.226	0.234	0.226	<b>0.004</b>	0.029	0.028	0.030	0.029	0.029	0.027	0.027	0.027	0.031	0.027	0.028	0.030
<i>C. newsteadi</i> N2	5	0.227	0.200	0.216	0.228	<b>0.000</b>	0.027	0.030	0.026	0.031	0.025	0.025	0.031	0.028	0.033	0.028	0.028
<i>C. newsteadi</i> N3	6	0.196	0.209	0.229	0.217	0.203	<b>0.006</b>	0.027	0.028	0.029	0.031	0.031	0.026	0.024	0.031	0.023	0.023
<i>C. fagineus</i> F1	7	0.218	0.236	0.224	0.239	0.247	0.209	<b>0.000</b>	0.018	0.020	0.021	0.031	0.032	0.028	0.029	0.027	0.032
<i>C. fagineus</i> s. s.	8	0.249	0.237	0.225	0.231	0.205	0.202	0.120	<b>0.000</b>	0.020	0.021	0.031	0.032	0.033	0.027	0.026	0.029
<i>C. subfagineus</i>	9	0.263	0.205	0.248	0.228	0.247	0.205	0.128	0.131	<b>0.003</b>	0.025	0.028	0.029	0.034	0.028	0.029	0.029
<i>C. flavipubicaris</i>	10	0.225	0.232	0.246	0.200	0.242	0.214	0.141	0.152	0.163	<b>0.006</b>	0.027	0.027	0.030	0.026	0.024	0.031
<i>C. punctatus</i>	11	0.218	0.220	0.188	0.198	0.202	0.235	0.252	0.251	0.223	0.205	<b>0.002</b>	0.002	0.029	0.028	0.027	0.031
<i>C. punctatus</i> (GB)	12	0.220	0.220	0.191	0.198	0.201	0.237	0.251	0.251	0.224	0.203	0.004	<b>0.001</b>	0.030	0.027	0.027	0.030
<i>C. pubicaris</i> (GB)	13	0.004	0.188	0.134	0.233	0.236	0.199	0.225	0.256	0.270	0.232	0.225	0.226	<b>0.006</b>	0.033	0.035	0.028
<i>C. newsteadi</i> (GB)	14	0.254	0.203	0.262	0.191	0.219	0.179	0.235	0.211	0.220	0.196	0.206	0.204	0.261	<b>0.001</b>	0.031	0.027
<i>C. griseicens</i> (GB)	15	0.268	0.248	0.260	0.212	0.255	0.234	0.200	0.192	0.205	0.179	0.208	0.211	0.272	0.240	<b>0.005</b>	0.029
<i>C. impunctatus</i> (GB)	16	0.210	0.183	0.224	0.230	0.209	0.163	0.249	0.228	0.213	0.239	0.231	0.230	0.212	0.204	0.222	<b>0.003</b>

**Figure 4.1.** Map of Catalonia with collection sites where midges of the subgenus *Culicoides* were trapped. Sites were: 1- Susqueda, 2- Vilanova de la Muga, 3- Canyamars, 4- Peralada, 5- Aramunt, 6- Garcia, 7- Caldes de Malavella, 8- Piera, 9- La Galera and 10- Montroig del Camp.

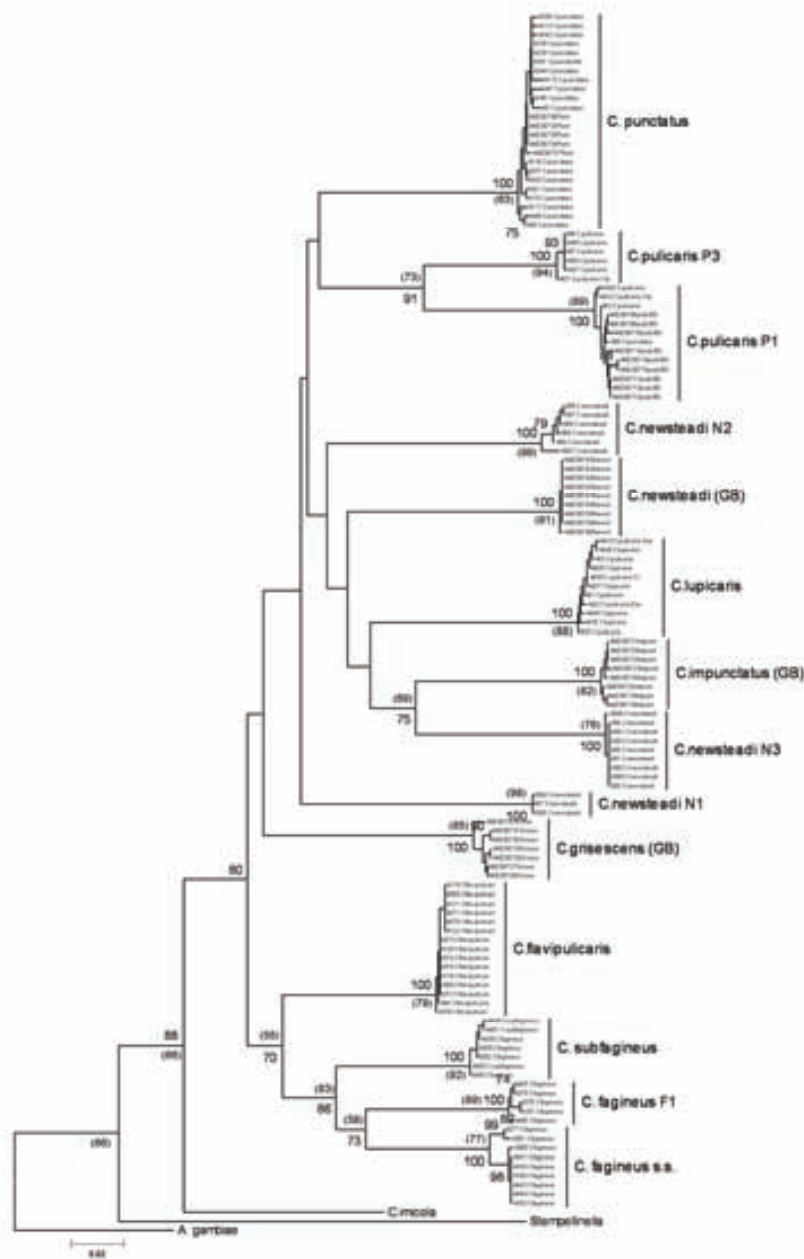




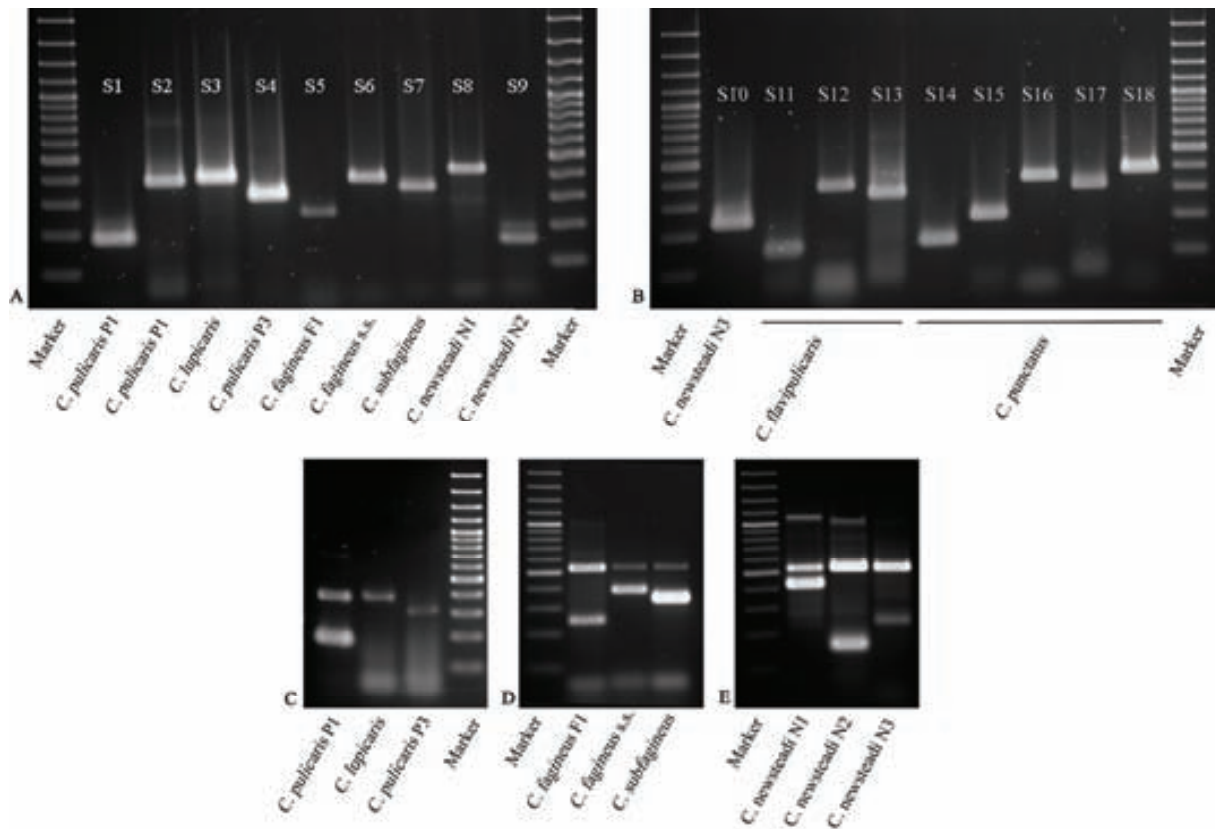
**Figure 4.2.** *Culicoides* wing pattern details of species belonging to Pulicaris (a-c), Fagineus (d-f) and Newsteadi (g-i) complexes.



**Figure 4.3.** Phylogenetic tree for *Culicoides* inferred from mtDNA COI sequences. The tree was rooted on *Anopheles gambiae*, branch lengths indicate computed evolutionary distances using the Jukes-Cantor method and are displayed as number of base substitutions per site. Bootstrap support values from neighbor-joining (NJ) and maximum likelihood (ML) values (shown in brackets) are displayed on the nodes. Significant values lower than 70% are not shown.



**Figure 4.4.** PCR based diagnostic assays for specimens of the *Culicoides* subgenus. DNA size marker used was GeneRuler 100bp PlusDNA Ladder, with individual DNA fragments of 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 and 100 base pairs.



A-B. Amplification products of single PCR diagnosis. DNA samples of different *Culicoides* species indicated at the bottom was amplified using primer pairs S1 (P1F174+ P1R337), S2 (P1R337 + C1J1718M), S3 (PDNP1R + C1J1718M), S4 (P3R262 + C1J1718M), S5 (F1R198 + C1J1718M), S6 (F2R337 + C1J1718M), S7 (F3Full + 9C1N2191M), S8 (N1F81 + C1N2191M), S9 (N2F348 + C1N2191M), S10 (N3R194 + C1J1718M), S11 (FlavNP1F + FlavNP1R), S12 (FlavNP1F + C1N2191M), S13 (FlavNP1R + C1J1718M), S14 (PunNP1F + PunNP1R), S15 (PunNP1F + PunNP2R), S16 (PunNP1F + C1N2191M), S17 (PunNP1R + C1J1718M) and S18 (PunNP2R + C1J1718M).

C-E. Amplification products of multiplex PCR assays for different *Culicoides* species within the Pulicaris (C), Fagineus (D) and Newsteadii (E), species are indicated at the bottom. Primers combination used are mentioned in material and methods section.



## Capítol 5

### DISCUSSIÓ

Tot i la complexitat de les relacions filogenètiques de les espècies que pertanyen als subgèneres *Avaritia* i *Culicoides*, la utilització de la regió del gen COI va permetre agrupar a tots els exemplars d'una mateixa espècie en un mateix clade terminal ben diferenciat en l'arbre filogenètic (figura 4.3), a diferència de l'observat en treballs similars realitzats utilitzant la regió ITS2 de l'ADN ribosomal (Meiswinkel *et al.*, 2004; Gomulski *et al.*, 2005). Això, junt amb el fet que les distàncies genètiques resultessin ser molt baixes a nivell intraespècífic mentre que les distàncies genètiques a nivell interespecífic fossin elevades i amb unes desviacions estàndard baixes (taula 4.4), va permetre confirmar la validesa de la utilització del gen COI per aquest tipus d'estudi. Així mateix, la validesa de les espècies identificades està avalada per l'anàlisi comparatiu de les distàncies genètiques a nivell interespecífic per totes les espècies trobades. D'aquesta manera, i basant-nos en la mateixa regió del gen COI, les distàncies genètiques interespecífiques detectades més petites ( $d=0.120-0.131$ , grup Fagineus) van ser similars a les identificades a partir de les seqüències d'exemplars del grup Imicola ( $d=0.109$ , *C. kwagga-C. tutti frutti*; Linton *et al.*, 2002) i inclús superiors en algunes de les espècies críptiques africanes del grup Imicola ( $d=0.080$ , *C. bolitinos-C. tutti frutti*; Linton *et al.*, 2002) l'estatus de les quals com a espècie ja està actualment confirmat (Linton *et al.*, 2002; Meiswinkel, 1989; Meiswinkel, 1992).

En referència a la nostra àrea geogràfica d'estudi, s'ha detectat que el subgènere *Avaritia* posseeix un únic grup amb espècies críptiques: el grup *Obsoletus*. L'anàlisi d'aquest grup a nivell molecular ha permès confirmar la presència de dues espècies críptiques: *C. obsoletus* i *C. scoticus*, mostrant resultats similars als obtinguts en un estudi posterior realitzat a partir del mateix gen mitocondrial COI (Nolan *et al.*, 2007). En aquest treball, els diferents exemplars d'una mateixa espècie, com en el nostre cas, van mostrar uns baixos valors de variabilitat intraespècífica i van formar clades terminals ben definits en l'arbre filogenètic,

fins i tot tractant-se d'exemplars de diferents països. Altres autors han realitzat treballs similars utilitzant les regions ribosomals ITS1 i ITS2 pels seus estudis filogenètics amb resultats no massa concloents. En el cas de la regió ITS2 es va obtenir resultats un tan confusos en els que s'agrupava, *a priori*, les espècies *C. obsoletus* i *C. montanus* en un mateix clade terminal, mentre que *C. scoticus* formava dos clades terminals diferents tot i que propers (Gomulski *et al.*, 2005). La utilitat de la regió ITS1 com a marcador filogenètic per diferenciar espècies dins el grup *Obsoletus* no ha pogut ser validada, principalment degut a l'escassa mostra poblacional utilitzada per l'únic estudi realitzat (*C. obsoletus*, n=3; *C. scoticus*, n=3), exemplars a més que pertanyen a localitats molt properes (Mathiew *et al.*, 2007).

Centrant-nos en el subgènere *Culicoides* a Catalunya, s'ha determinat que aquest està format per almenys onze espècies diferents. Nou d'aquestes onze espècies formen part de tres grups d'espècies morfològicament molt similars, els grups *Pulicaris*, *Fagineus* y *Newsteadi*. Al grup *Pulicaris* es va detectar per primera vegada la presència de dues espècies críptiques i filogenèticament molt properes, *C. pulicaris* i *C. pulicaris* P3, mentre que *C. lupicaris*, la tercera espècie del grup ja havia estat descrita morfològicament (Downes y Kettle, 1952) i detectada a nivell molecular (Meiswinkel *et al.*, 2004; Gomulski *et al.*, 2006; Perrin *et al.*, 2006). De manera similar, al grup *Fagineus* es va identificar una nova espècie críptica no descrita, *C. fagineus* F1, filogenèticament molt propera a *C. fagineus* s.s., formant aquestes dues un clade molt robust amb la tercera espècie del grup, *C. subfagineus*; tot això encaixava amb resultats obtinguts amb anterioritat per altres grups (Meiswinkel *et al.*, 2004; Gomulski *et al.*, 2006). En el cas del grup *Newsteadi*, la variació morfològica observada entre les espècies que pertanyen al grup, que era relativament baixa, no va resultar proporcional a la variació molecular inferida a partir de l'arbre filogenètic, ni a partir de les distàncies genètiques (essent aquestes últimes inclús majors entre les espècies del mateix grup que quan es comparaven amb espècies d'altres grups diferents). Tot i l'aparent contrast que va suposar la descripció d'aquesta àmplia dispersió genètica dins d'un grup morfològicament uniforme, aquests resultats ratificaven el que ja havia estat descrit amb anterioritat utilitzant la regió ITS2, on es va observar dues variants de *C. newsteadi* molt distants entre si a nivell genètic, tot i que identificades morfològicament com un únic taxó (Gomulski *et al.*, 2006).

La metodologia utilitzada en els dos estudis, combinant l'anàlisi de les dades morfològiques i moleculars en un mateix individu, ha permès assignar tots els patrons d'ADN mitocondrial detectats a espècies concretes. A nivell morfològic, trobem dos grups d'espècies amb presència d'espècies críptiques: el grup *Obsoletus* i el grup *Pulicaris*, en els que les femelles continuen essent no diferenciables morfològicament. Tot i això, en el cas del grup *Obsoletus*, cada un dels dos patrons genètics identificats s'ha pogut associar de manera inequívoca a una espècie concreta, gràcies a la caracterització morfològica dels mascles, que poden ser diferenciats per la morfologia de les seves estructures genitals. Aquest fet ha permès identificar de forma inequívoca a totes les femelles analitzades i a més ha permès confirmar que, *a priori*, les femelles d'ambdues espècies no són morfològicament diferenciables, contràriament al que s'havia indicat en una de les principals obres de referència de diagnòstic i identificació morfològica de *Culicoides* a nivell europeu, que afirma que ambdues espècies podien ser diferenciades en base a dos caràcters morfològics: la longitud màxima de les espermateques (BSL) i la forma de les plaques antevaginals (Delécolle, 1985). Per altra banda, el grup *Pulicaris* mostra certes semblances amb el grup *Obsoletus*, ja que dues de les tres espècies del grup resulten ser morfològicament no diferenciables, *C. pulicaris* s.s. i *C. pulicaris* P3. Curiosament, la presència de les espècies críptiques havia passat desapercebuda en aquest cas, des de la descripció de *C. pulicaris* (Linnaeus, 1758), molt probablement a causa de dos fets principals: i) aparentment, els mascles d'ambdues espècies no es podien diferenciar morfològicament, i ii) les dues espècies són simpàtriques, és a dir, coexisteixen en una mateixa localització geogràfica.

En els dos grups d'espècies restants, grup *Fagineus* i grup *Newsteadi*, va ser possible detectar certs caràcters diagnòstics que permetien diferenciar les femelles de les tres espècies que conformen cada un dels respectius grups. No obstant, al grup *Fagineus* es va identificar una nova espècie no descrita amb anterioritat que és molt similar a *C. fagineus* s.s. a la que vam denominar *C. fagineus* F1 provisionalment, a l'espera de la seva descripció definitiva. La tercera espècie d'aquest grup, *C. subfagineus*, també resulta ser de recent descripció (Delécolle i Ortega, 1998). L'anàlisi del grup *Newsteadi* va resultar ser més complexa ja que no es va poder identificar *C. newsteadi* s.s. entre les tres espècies del complex identificades, tot i que en totes elles va ser possible determinar caràcters morfològics útils per identificar i diferenciar les femelles de les tres espècies detectades.

A dia d'avui encara no s'ha dissenyat una tècnica diagnòstica basada en la caracterització genètica d'un número mínim d'exemplars per grup poblacional, que permeti detectar amb fiabilitat la majoria de variants o polimorfismes intraespecífics per població que pugui haver-hi al llarg de diferents poblacions de *Culicoides* a nivell europeu, i així elaborar una tècnica de detecció molt fiable a nivell europeu (Pagès *et al.*, 2009b).

Després de caracteritzar les espècies de *Culicoides* que pertanyen als subgèneres *Avaritia* i *Culicoides* a Catalunya, es van desenvolupar diferents tècniques diagnòstiques, totes elles variants de la PCR, per poder respondre a les diferents problemàtiques trobades associades a la identificació morfològica. Com que el gènere *Culicoides* està tant diversificat en quant a espècies es referix, el nostre interès es va centrar en aquells subgèneres en els que hi hagués espècies que poguessin actuar com a vectors de LB o que fossin sospitoses de poder ser-ho, els subgèneres *Avaritia* i *Culicoides*. L'estratègia que es va seguir va ser la de dissenyar una sèrie de tècniques moleculars de diagnòstic, com un complement als mètodes tradicionals basats en la identificació morfològica, facilitant la identificació fidedigne d'aquelles espècies incloses en un grup d'espècies morfològicament molt similars, que actualment, o bé no s'identifiquen, o bé es fa de manera errònia. Després de la caracterització genètica de les espècies que pertanyen als dos subgèneres, es va detectar quatre grups que contenien espècies críptiques o bessones. Dins del subgènere *Avaritia* es va trobar dues espècies críptiques, *C. obsoletus* i *C. scoticus*, formant part de l'anomenat grup *Obsoletus*. Dins del subgènere *Culicoides* van ser detectades un total de nou espècies críptiques distribuïdes en tres grups d'espècies morfològicament molt semblants, cada un d'ells constituït per tres espècies. *Culicoides pulicaris* s.s., *C. lupicaris* i *C. pulicaris* P3 van formar part del grup *Pulicaris*, *C. fagineus* s.s., *C. subfagineus*, *C. fagineus* F1 van formar part del grup *Fagineus*, i *C. newsteadi* N1, *C. newsteadi* N2 i *C. newsteadi* N3 van formar part del grup *Newsteadi*. Basat en els diferents grups amb espècies críptiques trobats, es van desenvolupar diferents tècniques diagnòstiques, totes elles variants de la PCR. Es van dissenyar inicialment 35 oligonucleòtids, 17 dels quals van ser finalment seleccionats i validats en els dos estudis realitzats.

El desenvolupament de la PCR diagnòstica de l'estudi 1 per identificar i diferenciar les dues espècies críptiques que pertanyen al grup *Obsoletus*, va representar, conjuntament amb



el treball realitzat en paral·lel per Gomulski i col·laboradors (2005) en el mateix any, la primera cita en la que es va aplicar tècniques diagnòstiques basades en mètodes de biologia molecular en la identificació de mosquits del gènere *Culicoides*. La tècnica *One tube heminested-PCR* dissenyada en l'estudi 1 representa un avantatge respecte a una PCR convencional ja que la mateixa reacció incorpora un control intern d'amplificació que resulta útil per discernir entre un fals diagnòstic negatiu i un diagnòstic negatiu real. Un fals diagnòstic negatiu pot estar associat a un error en la reacció de PCR o a un error en l'extracció d'ADN, i en aquest cas no s'observaria cap fragment d'ADN amplificat. En el cas d'un diagnòstic negatiu real, sempre s'haurà d'observar un únic fragment d'ADN amplificat, corresponent a la regió control amplificada pels oligonucleòtids universals. Aquesta tècnica va ser testada i validada amb èxit en més de 100 exemplars adults del grup *Obsoletus* de diferents procedències geogràfiques.

Per altra banda, per identificar les espècies críptiques del subgènere *Culicoides*, que pertanyen als grups *Pulicaris*, *Fagineus* i *Newsteadi*, es va desenvolupar tres *multiplex-PCR* diferents. En les *multiplex-PCR* dissenyades pels grups *Fagineus* i *Newsteadi* es va incorporar un control intern d'amplificació per les mateixes raons exposades anteriorment, mentre que en el cas del grup *Pulicaris* no va ser possible la seva incorporació a causa dels problemes que va representar per la validació. Com a mostra d'utilitat de les PCRs assajades, cal destacar el fet que treballs similars realitzats amb espècies del subgènere *Culicoides* no van detectar la presència d'espècies críptiques dins dels grups *Pulicaris* i *Newsteadi* (Nolan *et al.*, 2007). A més, alguns dels encebadors específics dissenyats per Nolan i col·laboradors (2007) van resultar ser poc fiables ja que posteriorment varem poder confirmar que podien amplificar varies espècies d'un mateix grup alhora, obtenint falsos positius.

La identificació inequívoca d'espècies individuals que puguin actuar com a vectors de la malaltia resulta imprescindible en qualsevol programa de vigilància epidemiològica, ja que facilitaria l'avaluació del risc real de transmissió vírica cap a noves àrees i ajudaria a predir com evolucionarà allà la malaltia. Com a mostra de l'utilitat d'aquest tipus d'estudis cal destacar el fet que s'ha identificat diferències en la susceptibilitat a la infecció per VLB entre diferents poblacions de *C. variipennis* als Estats Units, on aquesta és l'espècie nominal d'un grup d'espècies del complex *Variipennis* (Jones y Foster, 1978; Tabachnick, 1996). A Europa,

s'ha realitzat observacions similars, detectant taxes d'infecció heterogènies entre poblacions de *C. pulicaris* s.l. i *C. obsoletus* s.l., associades actualment a la més que probable presència d'espècies críptiques no identificades en les poblacions analitzades en l'estudi (Carpenter *et al.*, 2006). En aquest sentit, les noves eines diagnòstiques desenvolupades durant aquesta tesi, podrien resultar de gran utilitat per identificar espècies no detectades prèviament, que podrien haver passat desapercebudes amb anterioritat, al analitzar als *Culicoides* agrupats en *pools*. Agrupar els exemplars d'una mateixa espècie mitjançant la seva identificació a través del patró de taques alars en *pools* resulta ser una pràctica habitual quan té lloc un brot i es vol identificar l'espècie que pot estar contribuint a disseminar la malaltia en camp. Com exemple, cal destacar que aquesta va ser la metodologia utilitzada en la primera cita on es va identificar a *C. pulicaris* com a potencial vector de la LB (Caracappa *et al.*, 2003), sense que en l'actualitat es sàpiga quina de les tres espècies identificades en el present treball dins el grup *Pulicaris* estava present en els *pools* positius a LB.

Els treballs desenvolupats al llarg d'aquesta tesi doctoral realitzen contribucions importants a l'estudi dels mosquits del gènere *Culicoides*, resultant de gran utilitat per la vigilància entomològica i anàlisi de risc de malalties transmeses per aquests vectors. A nivell epidemiològic, tal i com hem comentat anteriorment, resulta imprescindible realitzar una correcta identificació de les espècies analitzades, ja que es poden trobar diferències importants en la capacitat vectorial inclús entre espècies properes filogenèticament (Venter *et al.*, 2006; Carpenter *et al.*, 2008). El fet que en moltes regions europees afectades o amenaçades per la LB, no es disposi d'una experiència taxonòmica suficient per realitzar la correcta identificació rutinària de certes espècies de *Culicoides*, fa encara més rellevant el desenvolupament d'aquest nou tipus de tècniques diagnòstiques moleculars.

Els resultats obtinguts posen de manifest l'existència d'un problema present arreu del món i molt habitual: existeix una total confiança dipositada en les grans obres de referència d'identificació morfològica de *Culicoides*. És per això que resulta molt important conèixer que en moltes d'aquestes obres, i per certes espècies, tant les claus d'identificació, com els caràcters diagnòstics, s'han inferit a partir d'un número d'exemplars relativament baix i en ocasions amb un rang de distribució geogràfica massa limitat com per poder reflectir les variacions a nivell intraespecífic que determinades espècies poden mostrar al llarg de grans

regions geogràfiques. Aquesta afirmació es veu corroborada pels resultats obtinguts en aquesta tesi en els que, inclús en certes espècies analitzades, ha estat possible identificar errors en caràcters diagnòstics utilitzats en els estudis morfològics. Continuant en la mateixa línia, també ha estat possible identificar espècies no descrites amb anterioritat i que representen noves espècies per la ciència que hauran de ser descrites en breu. Resulta necessari remarcar que cap d'aquestes obres (Campbell y Pelham-Clinton, 1960; Kremer, 1966; Delécolle, 1985; Glukhova, V.M. 1989), incorpora informació obtinguda a través de les modernes tècniques basades en l'anàlisi d'ADN, ja que es tracta d'estudis realitzats quan encara no s'havia iniciat aquest tipus d'estudis en mosquits del gènere *Culicoides*.

A nivell pràctic, ambdós treballs ens han permès confirmar que els patrons de les seqüències d'ADN generades a partir de la subunitat I del gen Citocrom Oxidasa (COI) resulten ser vàlids com a eina per identificar i diferenciar de manera inequívoca les espècies críptiques analitzades. No obstant, s'ha confirmat que el potencial d'aquestes eines moleculars necessita estar íntimament vinculat a un profund coneixement i estudi morfològic dels *Culicoides*, per poder interpretar correctament tota la informació obtinguda.



## Capítol 6

### CONCLUSIONS

L'anàlisi dels resultats obtinguts a partir de l'estudi dels grups d'espècies críptiques de *Culicoides* presents a Catalunya i que pertanyen als subgèneres *Avaritia* i *Culicoides* ens permet concloure que:

1. La regió d'ADN mitocondrial corresponent a la subunitat I del gen Citocrom Oxidasa (COI) resulta adequada per identificar amb fiabilitat les espècies de mosquit del gènere *Culicoides*, mostrant un patró de baixa variabilitat a nivell intraespecífic i elevada variabilitat a nivell interespecífic.
2. A Catalunya, es confirma la presència de dues espècies críptiques dins el subgènere *Avaritia*: *C. obsoletus* i *C. scoticus*, les dues formant part del grup *Obsoletus*.
3. A Catalunya es confirma la presència de tres grups d'espècies críptiques dins el subgènere *Culicoides*, contant cada un d'ells amb tres espècies. El grup *Pulicaris* format per *Culicoides pulicaris* s.s., *C. lupicaris* i *C. pulicaris* P3; el grup *Fagineus* format per *C. fagineus* s.s., *C. subfagineus* i *C. fagineus* F1; i el grup *Newsteadi* format per *C. newsteadi* N1, *C. newsteadi* N2 i *C. newsteadi* N3.
4. Les noves eines moleculars de diagnòstic desenvolupades, 18 PCR individuals, 2 PCR *one tube heminested* i 3 PCR *multiplex*, han permès identificar amb fiabilitat totes les espècies del subgènere *Culicoides* així com totes les espècies críptiques dels quatre grups presents en els subgèneres *Avaritia* i *Culicoides*, moltes de les quals no eren diferenciables mitjançant la utilització de caràcters morfològics.
5. S'ha identificat al menys dues noves espècies de mosquit per la ciència: *C. pulicaris* P3 i *C. fagineus* F1. Així mateix, dues de les tres varietats de *C. newsteadi* s.l. identificades, representen unes altres dues potencials noves espècies.



**Capítol 7****BIBLIOGRAFIA**

- (OIE). Office International des Epizooties. 2000. Bluetongue in Spain: in the Balearic Islands (follow-up report. number 1). Disease Information. 13: 224.
- (OIE). Office International des Epizooties. 2003. Bluetongue in Spain: in the Balearic Islands. Disease Information. 16: 240.
- (OIE), Office International des Epizooties. 2004 a. Bluetongue in Spain: serological findings in the peninsular territory, in sentinel animals. Disease Information. 17: 302.
- (OIE). Office International des Epizooties. 2004 b. Bluetongue in Spain: in the peninsular territory (follow-up report No. 2: cases reported in Extremadura). Disease Information. 17: 324.
- (OIE), World Health Organization. 2006b. Bluetongue in France. Disease Information 19, 636-637.
- (OIE), World Health Organization. 2006e. Bluetongue in Belgium. Disease Information 19, 616-617.
- (OIE), World Health Organization. 2006c. Bluetongue in Germany. Disease Information 19, 618.
- (OIE), World Health Organization. 2006a. Bluetongue in Luxembourg. Disease Information 19, 852.
- (OIE), World Organisation for Animal Health. 2000a. Bluetongue in Tunisia. Disease Information 13, 1.
- (OIE), World Organisation for Animal Health. 2000b. Bluetongue in Algeria. Disease Information 13, 109.
- (OIE), World Organisation for Animal Health. 2006d. Bluetongue in The Netherlands.

- Disease Information 19, 612-613.
- Avise, J.C., 1994, *Molecular Markers, Natural History and Evolution* London, UK.
- Balenghien, T., Cetre-Sossah, C., Grillet, C., Delecolle, J.C., Mathieu, B., Baldet, T., 2008, Diurnal activity of potential bluetongue vectors in northern Europe. *Vet Rec* 162, 323-324.
- Borkent, A., 2005, The Biting Midges, the Ceratopogonidae (Diptera). in *Biology of Diseases Vectors*.
- Borkent, A., Wirth, W.W., 1997, World species of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History* 233, 257.
- Campbell, J.A., Pelham-Clinton, E.C., 1960, A taxonomic review of the British Species of *Culicoides* Latreille (Diptera, Ceratopogonidae). *Proceedings of the Royal Society of Edimburg (B)* 67, 181-302.
- Caracappa, S., Torina, A., Guercio, A., Vitale, F., Calabro, A., Purpari, G., Ferrantelli, V., Vitale, M., Mellor, P.S., 2003, Identification of a novel bluetongue virus vector species of *Culicoides* in Sicily. *Vet Rec* 153, 71-74.
- Carpenter, S., Lunt, H.L., Arav, D., Venter, G.J., Mellor, P.S., 2006, Oral susceptibility to bluetongue virus of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) from the United Kingdom. *J Med Entomol* 43, 73-78.
- Carpenter, S., McArthur, C., Selby, R., Ward, R., Nolan, D.V., Luntz, A.J., Dallas, J.F., Tripet, F., Mellor, P.S., 2008, Experimental infection studies of UK *Culicoides* species midges with bluetongue virus serotypes 8 and 9. *Vet Rec* 163, 589-592.
- Carpenter, S., Mordue Luntz, A.J., Mordue, W., 2006, Oogenesis and laboratory survival in the Scottish biting midge *Culicoides impunctatus*. *Physiological Entomology* 31, 89-93.
- Cetre-Sossah, C., Baldet, T., Delecolle, J.C., Mathieu, B., Perrin, A., Grillet, C., Albina, E., 2004, Molecular detection of *Culicoides* spp. and *Culicoides imicola*, the principal vector of bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) in Africa and Europe. *Vet Res* 35, 325-337.
- Cilek, J.E., Kline, D.L., Hallmon, C.F., 2003, Evaluation of a novel removal trap system to



- reduce biting midge (Diptera: Ceratopogonidae) populations in Florida backyards. *J Vector Ecol* 28, 23-30.
- Clastrier, J., 1957, Notes sur les Ceratopogonides. II. Quelques *Culicoides* d'Algerie a ailes tachetees. *Arch. Inst. Pasteur Alger.* 35, 404-444.
- Crozier, R.H., Crozier, Y.C., 1993, The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics* 133.
- Dallas, J.F., Cruickshank, R.H., Linton, Y.M., Nolan, D.V., Patakakis, M., Braverman, Y., Capela, R., Capela, M., Pena, I., Meiswinkel, R., Ortega, M.D., Baylis, M., Mellor, P.S., Mordue Luntz, A.J., 2003, Phylogenetic status and matrilineal structure of the biting midge, *Culicoides imicola*, in Portugal, Rhodes and Israel. *Med Vet Entomol* 17, 379-387.
- De Liberato, C., Scavia, G., Lorenzetti, R., Scaramozzino, P., Amaddeo, D., Cardeti, G., Scicluna, M., Ferrari, G., Autorino, G.L., 2005, Identification of *Culicoides obsoletus* (Diptera: Ceratopogonidae) as a vector of bluetongue virus in central Italy. *Vet Rec* 156, 301-304.
- Delecolle, J.C., 1998, Description d'une espèce nouvelle du genre *Culicoides* originaire d'Espagne, apparentée à *C. fagineus* Edwards, 1939 (Diptera, Ceratopogonidae). *Nouv. Rev. Entomol.* 15, 283-290.
- Delécolle, J.C., 1985, Nouvelle contribution à l'étude systématique et iconographique des espèces du genre *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) du Nord-Est de la France. Ph.D. Thesis. Université Louis Pasteur de Strasbourg. U.E.R. Sciences "Vie et terre". 238 pp.
- Delécolle, J.C., 2002, Ceratopogonidae, pp. 26-33. In M. Carles-Tolrá Hjorth-Andersen (ed.), *Catálogo de los Diptera de España, Portugal y Andorra (Insecta) vol 8. Monografias de la Sociedad Entomológica Aragonesa, Zaragoza, España.*
- Dijkstra, E., van der Ven, I.J., Meiswinkel, R., Holzel, D.R., Van Rijn, P.A., Meiswinkel, R., 2008, *Culicoides chiopterus* as a potential vector of bluetongue virus in Europe. *Vet Rec* 162, 422.
- Dopazo, J., Rodríguez, A., Sáiz, J.C., Sobrino, F., 1993, Design of primers for PCR

- amplification of highly variable genomes. *Comput. Appl. Biosci.* 9, 123-125.
- Downes, J.A., Kettle, D.S., 1952, Descriptions of three species of *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) new to science, together with notes on, and a revised key to the British species of the pulicaris and obsoletus groups. *Proc. R. Ent. Soc. Lond. (B)* 21, 61-78.
- Du Toit, R.M., 1944, The transmission of bluetongue and horsesickness by *Culicoides*. *Onderstepoort J. Vet. Sci. Anim. Ind.* 19, 7-16.
- Edwards, F.W., 1939, British blood-sucking flies. British Museum London, 156 p.
- Elbers, A.R., Backx, A., Meroc, E., Gerbier, G., Staubach, C., Hendrickx, G., van der Spek, A., Mintiens, K., 2008, 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* 87, 21-30.
- Eurostat 2007. Number of sheep. Key indicators on EU policy (<http://epp.eurostat.ec.europa.eu/>. Accessed October 10, 2007).
- Gale, P., Brouwer, A., Ramnial, V., Kelly, L., Kosmider, R., Fooks, A.R., Snary, E.L., 2010, Assessing the impact of climate change on vector-borne viruses in the EU through the elicitation of expert opinion. *Epidemiology and Infection* 138, 214-225.
- Genchi, C., 2007, Human babesiosis, an emerging zoonosis. *Parassitologia* 49, 29-31.
- Gloor, G.B., Engels, W.R., 1992, Single fly DNA preps for PCR. *Drosophila Information Service* 71, 148-149.
- Glouhova, V.M., Nedelchev, N.K., Rousev, I., Tanchev, T., 1991, On the fauna of blood-sucking midges of the genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in Bulgaria. *Vet. Science* 25, 63-66.
- Glukhova, V.M., 1989, Bloodsucking midges of the genera *Culicoides* and *Forcipomyia* (Ceratopogonidae). Leningrad: Nauka, 189p p.
- Goetghebuer, M., 1920, Ceratopogoninae de Belgique. *Memoires du Musee Royale d'Histoire Naturelle de Belgique.* 8, 1-116.
- Gomulski, L.M., Meiswinkel, R., Delecolle, J.C., Goffredo, M., Gasperi, G., 2005,

- Phylogenetic relationships of the genus *Avaritia* Fox, 1955 including *Culicoides obsoletus* (Diptera, Ceratopogonidae) in Italy based on internal spacer 2 ribosomal DNA sequences. *Systematic Entomology* 30, 619-631.
- 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.
- Gould, E.A., Higgs, S., 2009, Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103, 109-121.
- Gutsevich, A.V., 1960, Bloodsucking Diptera (Heleidae) of the USSR fauna, 131 pp.
- Haines, A., Kovats, R.S., Campbell-Lendrum, D., Corvalan, C., 2006, Climate change and human health: impacts, vulnerability and public health. *Public Health* 120, 585-596.
- Hall, T.A., 1999, BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium. Ser. 41*, 95-98.
- Hellberg, W., Wilson, A.D., Mellor, P., Doherr, M.G., Torsteinsdottir, S., Zurbriggen, A., Jungi, T., Marti, E., 2006, Equine insect bite hypersensitivity: immunoblot analysis of IgE and IgG subclass responses to *Culicoides nubeculosus* salivary gland extract. *Vet Immunol Immunopathol* 113, 99-112.
- Hofmann, M.A., Renzullo, S., Mader, M., Chaignat, V., Worwa, G., Thuer, B., 2008, Genetic characterization of toggenburg orbivirus, a new bluetongue virus, from goats, Switzerland. *Emerg Infect Dis* 14, 1855-1861.
- Hoogendam, K. 2007. International study on the economic consequences of outbreaks of bluetongue serotype 8 in north-western Europe (Van Hall Institute, Leeuwarden).
- Jennings, M., Mellor, P.S., 1989, *Culicoides*: biological vectors of Akabane virus. *Vet Microbiol* 21, 125-131.
- Jones, R.H., Foster, N.M., 1978, Heterogeneity of *Culicoides variipennis* field populations to oral infection with bluetongue virus. *Am J Trop Med Hyg* 27, 178-183.
- Karas, K. 2000. Climate change and the Mediterranean region. Greenpeace Report

- (Greenpeace ), p. 34pp.
- Khalaf, K., 1954, The speciation of the subgenus *Culicoides* (Diptera: Heleidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 47, 34-51.
- Kieffer, J.J., 1919, Chironomides d'Europe conserves au Musee National Hongrois de Budapest. Annales Historico-Naturales Musei Nationalis Hungarici 17, 1-160.
- Kitaoka, S., Tanaka, K., 1985, Description of seven new species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) from Taiwan. Jpn. J. Sanit. Zool. 36, 39-48.
- Kovats, R.S., Bouma, M.J., Hajat, S., Worrall, E., Haines, A., 2003, El Nino and health. Lancet 362, 1481-1489.
- Kremer, M., 1966, Contribution à l'étude du genre *Culicoides* Latreille particulièrement en France: 299 pp. Encyclopédie Entomologique, Série A 39. Éditions Paul Lechevalier. Paris. .
- Kremer, M., and C. Rebholz, 1977, Systematics of the obsoletus group of *Culicoides* (subgenus *Avaritia*) in the palaeartic region, with remarks on some types. Mosq. News 37, 378.
- Krémer, M., 1965, Genre *Culicoides* Latreille. Paris, 301 pp.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B., Nei, M., 2001, MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. Bioinformatics 17, 1244-1245.
- Lager, I.A., 2004, Bluetongue virus in South America: overview of viruses, vectors, surveillance and unique features. Veterinaria Italiana 40, 89-93.
- Lindgren, E., Gustafson, R., 2001, Tick-borne encephalitis in Sweden and climate change. Lancet 358, 16-18.
- Linnaeus, C., 1758, Systema Naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis, Vol Vol 1, 824 p.
- Linton, Y.M., Mordue Luntz, A.J., Cruickshank, R.H., Meiswinkel, R., Mellor, P.S., Dallas, J.F., 2002, Phylogenetic analysis of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene of five species of the *Culicoides* imicola species complex. Med Vet Entomol 16, 139-146.

- Lunt, D.H., Zhang, D.X., Szymura, J.M., Hewitt, G.M., 1996, The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Mol Biol* 5, 153-165.
- Maclachlan, N.J., Drew, C.P., Darpel, K.E., Worwa, G., 2009, The pathology and pathogenesis of bluetongue. *J Comp Pathol* 141, 1-16.
- Mands, V., Kline, D.L., Blackwell, A., 2004, *Culicoides* midge trap enhancement with animal odour baits in Scotland. *Med Vet Entomol* 18, 336-342.
- Mathieu, B., Perrin, A., Baldet, T., Delecolle, J.C., 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., Hoffmann, B., Beer, M., 2007, First occurrence of *Culicoides* *obsoletus*-transmitted Bluetongue virus epidemic in Central Europe. *Parasitol Res* 101, 219-228.
- Meiswinkel, R., 1989, Afrotropical *Culicoides*: a redescription of *C. (Avaritia) imicola* Kieffer, 1913 (Diptera: Ceratopogonidae) with description of the closely allied *C. (A.) bolitinos* sp. nov. reared from the dung of the African buffalo, blue wildebeest and cattle in South Africa. *Onderstepoort J Vet Res* 56, 23-39.
- Meiswinkel, R., 1992, Afrotropical *Culicoides*: *C. (Avaritia) loxodontis* sp. nov., a new member of the *Imicola* group (Diptera: Ceratopogonidae) associated with the African elephant in the Kruger National Park, South Africa. *Onderstepoort J Vet Res* 59, 145-159.
- Meiswinkel, R., 1998, The ten species in the *Culicoides imicola* Kieffer complex: an update (Ceratopogonidae), pp. 114-115. In Ismay, J.M. (ed.) *Abstracts Volume Fourth International Congress of Dipterology*. 6-13 September 1998, Oxford, University Museum of Natural History. Oxford, UK.
- Meiswinkel, R., Gomulski, L.M., Delécolle, J.D., Goffredo, M., Gasperi, G., 2004, The taxonomy of *Culicoides* vector complexes – unfinished business. *Veterinaria Italiana* 40, 151-159.

- Meiswinkel, R., Nevil, E.M., Venter, G.J., 1994, Vectors: *Culicoides* spp. pp. 68-89.
- Meiswinkel, R., Nevill, E.M., Venter, G.J., 1994, Vectors: *Culicoides* spp., pp. 68-89. In J.A.W. Coetzer, G.R. Thomson, R.C. Tustin (eds.), Infectious diseases of livestock with special reference to Southern Africa, vol. 1. Oxford University Press, Cape Town, South Africa.
- Meiswinkel, R., Paweska, J.T., 2003, Evidence for a new field *Culicoides* vector of African horse sickness in South Africa. *Prev Vet Med* 60, 243-253.
- Meiswinkel, R., van Rijn, P., Leijts, P., Goffredo, M., 2007, Potential new *Culicoides* vector of bluetongue virus in northern Europe. *Vet Rec* 161, 564-565.
- Mellor, P.S., 2000, Replication of arboviruses in insect vectors. *J Comp Pathol* 123, 231-247.
- Mellor, P.S., 2004, Infection of the vectors and bluetongue epidemiology in Europe. *Veterinaria Italiana* 40, 167-174.
- 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., Pitzolis, G., 1979, Observations on breeding sites and light-trap collections of *Culicoides* during an outbreak of bluetongue in Cyprus. *Bulletin of Entomological Research* 69, 229-234.
- Mellor, P.S., Wittmann, E.J., 2002, Bluetongue virus in the Mediterranean Basin 1998-2001. *Vet J* 164, 20-37.
- Melville, L.F., 2004, Bluetongue surveillance methods in an endemic area: Australia. *Veterinaria Italiana* 40, 184-187.
- Mertens, P.P.C., 1999, Orbiviruses and Coltiviruses, pp. 1043-1061. In A. Granoff and R.G. Webster (eds.), *Encyclopaedia of Virology*, 2nd Edition. London Academic Press, London, UK.
- Mo, C.L., L.H., T., E.J., H., M.T., O., E.C., G., J., G., M.R., S., 1994, Bluetongue virus isolations from vectors and ruminants in Central America and the Caribbean. Interamerican Bluetongue Team. *American Journal of Veterinary Research* 55, 211-215.

- Nolan, D.V., Carpenter, S., Barber, J., Mellor, P.S., Dallas, J.F., Mordue Luntz, A.J., Piertney, S.B., 2007, Rapid diagnostic PCR assays for members of the *Culicoides* *obsoletus* and *Culicoides* *pulicaris* species complexes, implicated vectors of bluetongue virus in Europe. *Vet Microbiol* 124, 82-94.
- Pagès, N., 2007. Estructura genética poblacional del principal vector de la enfermedad de la Lengua Azul *Culicoides imicola* (Diptera: Ceratopogonidae) en Cataluña y la Península Ibérica. Treball de Recerca de Master del Programa de Doctorat en Biotecnologia. Universitat Autònoma de Barcelona (UAB),
- Pagès, N., Huber, K., Cipriani, M., Chevallier, V., Conraths, F.J., Goffredo, M., Balengien, T., 2009, Scientific review on mosquitoes and mosquito-borne diseases. EFSA, 1-96.
- Pagès, N., Muñoz-Muñoz, F., Talavera, S., Sarto, V., Lorca, C., Nuñez, J.I., 2009. *Culicoides* species of the subgenus *Culicoides* in Catalonia (NE Spain). In: MedReoNet taxonomy meeting, Strasbourg, 16-20 March 2009.
- Pagès, N., Sarto, I.M.V., 2005, Differentiation of *Culicoides* *obsoletus* and *Culicoides* *scoticus* (Diptera: Ceratopogonidae) based on mitochondrial cytochrome oxidase subunit I. *J Med Entomol* 42, 1026-1034.
- Panagiotatos, D.E., 2004, Regional overview of bluetongue viruses, vectors, surveillance and unique features in Eastern Europe between 1998 and 2003. *Veterinaria Italiana* 40, 61-72.
- Parker, A.H., 1949, Observations on the seasonal and daily incidence of certain biting midges (*Culicoides* Latreille: Diptera, Ceratopogonidae) in Scotland. *Transactions of the Royal Entomological Society London (A)* 100, 170-190.
- Pinheiro, F.P., Hoch, A.L., Gomes, M.L., Roberts, D.R., 1981, Oropouche virus. IV. Laboratory transmission by *Culicoides* *paraensis*. *Am J Trop Med Hyg* 30, 172-176.
- Pinheiro, F.P., Rocha, A.G., Freitas, R.B., Ohana, B.A., Travassos da Rosa, A.P., Rogerio, J.S., Linhares, A.C., 1982, [Meningitis associated with Oropouche virus infections]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 24, 246-251.
- Pinheiro, F.P., Travassos Da Rosa, A.P.A., Gomes, M.L., 1982, Transmission of Oropouche Virus from man to Hamster by the midge *Culicoides paraensis*. *Science* 215, 1251-

1253.

- Pinheiro, F.P., Travassos Da Rosa, A.P.A., Travassos Da Rosa, J.F., Isaac, R., R.B., F., al., e., 1981, Oropouche virus. In A review of clinical, epidemiological and ecological findings. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30, 149-160.
- Posada, D., Crandall, K.A., 1998, MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14, 817-818.
- ProMED-mail., Bluetongue - Europe (07): BTV-6, BTV-11 update. ProMED-mail 2009; 04 March:20090304.0888 <<http://www.promedmail.org>> Accessed 23 November 2009.
- ProMED-mail., Oropouche fever - Brazil (Amapa). ProMED-mail 2009; 08 Aug: 20090808.2816 <<http://www.promedmail.org>> Accessed 29 August 2009.
- Purse, B.V., Mellor, P.S., Rogers, D.J., Samuel, A.R., Mertens, P.P., Baylis, M., 2005, Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nat Rev Microbiol* 3, 171-181.
- Rawlings, P., 1997, 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.
- Roberts, D.R., Hoch, A.L., Dixon, K.E., Llewellyn, C.H., 1981, Oropouche virus. III. Entomological observations from three epidemics in Para, Brazil, 1975. *Am J Trop Med Hyg* 30, 165-171.
- Rodeia, S.P., Deluyker, H., Pfeiffer, D.U., Salman, M.D., 2008, The bluetongue outbreak in North-West Europe: the outcome from the epidemiological investigation coordinated by the European Food Safety Authorities (EFSA). *Prev Vet Med* 87, 1-3.
- Rogers, D.J., Randolph, S.E., 2006, Climate change and vector-borne diseases. *Adv Parasitol* 62, 345-381.
- Rozas, J., Sanchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X., Rozas, R., 2003, DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19, 2496-2497.
- Saegerman, C., Berkvens, D., Mellor, P.S., 2008, Bluetongue epidemiology in the European



- union. *Emerg Infect Dis* 14, 539-544.
- Sarto i Monteys, V., Aranda, C., Escosa, R., Pagès, N., Ventura, D., 2003, Results of current surveillance on likely bluetongue virus vectors of the genus *Culicoides* in Catalonia (Spain). OIE Bluetongue International Symposium. Taormina, 26-29 october 2003. Abstract Book A12, 25.
- Savini, G., M., Goffredo, F., Monaco, P.d.S., Meiswinkel, R., 2003, Transmission of bluetongue virus in Italy. *Vet. Rec.* 152, 119.
- Savini, G., Goffredo, M., Monaco, F., Di Gennaro, A., Cafiero, M.A., Baldi, L., de Santis, P., Meiswinkel, R., Caporale, V., 2005, Bluetongue virus isolations from midges belonging to the *Obsoletus* complex (*Culicoides*, Diptera: Ceratopogonidae) in Italy. *Vet Rec* 157, 133-139.
- Schmidt, H.A., Strimmer, K., Vingron, M., von Haeseler, A., 2002, TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. *Bioinformatics* 18, 502-504.
- Sebastiani, F., Meiswinkel, R., Gomulski, L.M., Guglielmino, C.R., Mellor, P.S., Malacrida, A.R., Gasperi, G., 2001, Molecular differentiation of the Old World *Culicoides* imicola species complex (Diptera, Ceratopogonidae), inferred using random amplified polymorphic DNA markers. *Mol Ecol* 10, 1773-1786.
- Shakirzjanova, M.C., 1962, New species of *Culicoides* (Diptera, Heleidae) from Kazakhstan [in Russian]. *Trudy Instituta Zoologia. Akademiya Nauk Kazakhskoi SSR (Alma Ata)* 18, 254-259.
- Shevchenko, A.K., 1977, Fauna of the Ukraine. Blood sucking midges, Vol 13:1, 255 pp.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Lui, H., Flook, P., 1994, Evolution, weighing and phylogenetic unity of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87, 651-701.
- Swofford, D.L., 1998, 1998. PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tabachnick, W.J., 1996, *Culicoides* variipennis and bluetongue-virus epidemiology in the United States. *Annu Rev Entomol* 41, 23-43.

- Tabachnick, W.J., 2004, *Culicoides* and the global epidemiology of bluetongue virus infection. *Veterinaria Italiana* 40, 145-150.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007, MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596-1599.
- Taylor, W.P., 1986, The epidemiology of bluetongue. *Rev. Sci. Tech. OIE* 5, 351-356.
- Temizel, E.M., Yesilbag, K., Batten, C., Senturk, S., Maan, N.S., Clement-Mertens, P.P., Batmaz, H., 2009, Epizootic hemorrhagic disease in cattle, Western Turkey. *Emerg Infect Dis* 15, 317-319.
- Trenberth, K.E., Jones, P., Ambenje, P., Bojariu, R., Easterling, D., Klein Tank, A., Parker, D., Rahimzadeh, F., Renwick, J.A., Rusticucci, M., Soden, B., Zha, P., 2007, Observations: surface and atmospheric climate change. In: Solomon, S, Qin, D, Manning, M *et al* (eds). *Climate change 2007: the physical science basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change.* Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Vasconcelos, H.B., Azevedo, R.S., Casseb, S.M., Nunes-Neto, J.P., Chiang, J.O., Cantuaria, P.C., Segura, M.N., Martins, L.C., Monteiro, H.A., Rodrigues, S.G., Nunes, M.R., Vasconcelos, P.F., 2009, Oropouche fever epidemic in Northern Brazil: epidemiology and molecular characterization of isolates. *J Clin Virol* 44, 129-133.
- Venter, G.J., Paweska, J.T., Van Dijk, A.A., Mellor, P.S., Tabachnick, W.J., 1998, Vector competence of *Culicoides* bolitinos and *C. imicola* for South African bluetongue virus serotypes 1, 3 and 4. *Med Vet Entomol* 12, 378-385.
- Wada, Y., 1986, Revision of the claggi group of the genus *Culicoides* distributed in Japan, with description of a new species (Diptera: Ceratopogonidae). *Japanese Journal of Sanitary Zoology* 37, 141-152.
- Wada, Y., Kitaoka, S., 1977, Preliminary arrangement of Japanese *Culicoides* into groups (Diptera: Ceratopogonidae). *Trop. Med.* 19, 169-176.
- Watson, R.T., Patz, J., Gubler, D.J., Parson, E.A., Vincent, J.H., 2005, Environmental health implications of global climate change. *J Environ Monit* 7, 834-843.
- Watts, D.M., Phillips, I., Callahan, J.D., Griebenow, W., Hyams, K.C., Hayes, C.G., 1997,

Oropouche virus transmission in the Amazone River basin of Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56, 148-152.

WHO/UNEP., 1995, *Climate Change and Human Health*. Personal communication from Athena Ronquillo of Greenpeace Southeast Asia.

Wilson, A., Mellor, P., 2008, Bluetongue in Europe: vectors, epidemiology and climate change. *Parasitology Research* 103, S69-S77.

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

